ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ,
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

Διδακτορική Διατριβή

«Ενδονουκλεάσες – Απόπτωση και συγκριτική μελέτη της αντοχής του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα σε δύο σχήματα χημειοθεραπείας με Docetaxel/Cisplatin vs Docetaxel/Gemcitabine»

Αιμιλία Τσαρουχά
Πνευμονολόγος-Φυματιολόγος

Αθήνα 2018

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Γεωργούλιας Βασίλειος (Επιβλέπων)**,** *Ομότιμος Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης*

Μαυρουδής Δημήτριος, *Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης*

Σταθόπουλος Ευστάθιος, *Ομότιμος Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης*

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Αγγελάκη Σοφία, *Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης*

Γεωργούλιας Βασίλειος *(Επιβλέπων), Ομότιμος Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης*

Κουτσόπουλος Αναστάσιος, *Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης*

Λαζόπουλος Γεώργιος, *Αναπληρωτής Καθηγητής Θωρακοχειρουργικής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης*

Λιανίδου Ευρύκλεια, *Καθηγήτρια Αναλυτικής Χημείας-Κλινικής Χημείας,Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών*

Μαυρουδής Δημήτριος, *Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης*

Σταθόπουλος Ευστάθιος, *Ομότιμος Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης*

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας του Καρκίνου, του Τομέα Παθολογίας, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Βασίλη Γεωργούλια.

Με αφορμή το πέρας της διδακτορικής διατριβής μου, θα επιθυμούσα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες προς τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Βασίλη Γεωργούλια, χωρίς τη συνδρομή και τη συνεχή παρότρυνση του οποίου δεν θα ήταν δυνατή η εκπόνηση της.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη της συμβουλευτικής και εξεταστικής μου επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Μαυρουδή Δημήτριο, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Αγγελάκη Σοφία, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κουτσόπουλο Αναστάσιο, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Λαζόπουλο Γεώργιο, την Καθηγήτρια κ. Λιανίδου Ευρύκλεια και τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Σταθόπουλο Ευστάθιο, που μου έκαναν την τιμή να συμμετέχουν σε αυτή και να αφιερώσουν πολύτιμο χρόνο σε μένα.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον κ. Κακλαμάνη Λουκά, Διευθυντή του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Ωνασείου Καρδιοχειρουργικού Κέντρου για τη σημαντική βοήθεια που μου πρόσφερε, με τις συμβουλές και τις υποδείξεις του. Με αφορμή την εκπόνηση της διατριβής μου, είμαι σε θέση να πω ότι γνώρισα και συνεργάστηκα με σημαντικούς ανθρώπους, οι οποίοι στην πορεία εκτός από συνεργάτες έγιναν και φίλοι μου, όπως ο κ. Κακλαμάνης και η κ. Λιανίδου.

Δεν θα μπορούσα ποτέ να ξεχάσω τους δύο Επιμελητές της αρχής της σταδιοδρομίας μου, τους Παθολόγους – Ογκολόγους Καραμπέλη Θάνο και

Τσαβαρή Νίκο, στο Νοσοκομείο Μεταξά, στις αρχές της δεκαετίας του ’90. Τους ευχαριστώ για την αρχή η οποία σηματοδότησε τη συνέχεια …

Στην κλινική μου παρουσία, οφείλω επίσης πολλά στις 3 Διευθύντριες μου Πνευμονολόγους, τις κυρίες Αναγνωστοπούλου Νίνα, Παυλάκου Γεωργία και Ράπτη Αγγελική, οι οποίες μου μετέδωσαν εκτός από γνώσεις και σημαντική εμπειρία και οι οποίες πάντοτε στήριζαν τις επιλογές μου.

Ευχαριστώ τον Βασίλη Κουράνο, τον Γιάννη Βαμβακάρη και τον Γιάννη Παναγούλια για τη βοήθεια και την υποστήριξη τους στα διάφορα στάδια της συλλογής δειγμάτων και της επεξεργασίας της διατριβής μου.

Οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στους ανθρώπους που βρίσκονται έξω από τον επιστημονικό χώρο και με ενθάρρυναν σε όλη αυτή την προσπάθεια, προσφέροντας μου υποστήριξη και σθένος να συνεχίσω. Πρόκειται για την μητέρα μου, στην οποία οφείλω όλα όσα έχω γίνει μέχρι τώρα και τον σύζυγο με τους 2 γιούς μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους δασκάλους μου και ιδιαίτερα τον Φιλόλογο μου στα χρόνια του Λυκείου κ. Ποζιό Βασίλη. Σε όλη την πορεία της ζωής μου, υπήρξαν κάποιοι αληθινοί δάσκαλοι για μένα, χωρίς να είναι κατ΄ ανάγκη γιατροί. Σε αυτούς οφείλω το ήθος και τη μαχητικότητα μου και τους οφείλω το ότι μετά από τόσα χρόνια κλινικής παρουσίας και εμπειρίας δεν έχασα την ανθρωπιά και την ευαισθησία μου ως προς τον άρρωστο.

Σας ευχαριστώ όλους πάρα πολύ και εύχομαι σε όλους μας, αυτό που επιθυμούμε περισσότερο από όλα, υγεία.

Αιμιλία

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ **10**

I. SUMMARY **15**

II.ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ **19**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 20

Επιδημιολογία του καρκίνου του πνεύμονα *20*

1.1. Επιδημιολογία του καρκίνου του πνεύμονα παγκοσμίως 20

1.2. Επιδημιολογία του καρκίνου του πνεύμονα στην Ελλάδα 25

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 29

Παράγοντες κινδύνου *29*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 35

Διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα *35*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 40

Ιστολογική ταξινόμηση *40*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 45

Σύστημα σταδιοποίησης του καρκίνου του πνεύμονα *45*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 49

Παθογένεια του καρκίνου πνεύμονα *49*

6.1. Μοριακή παθογένεια αδενοκαρκινώματος (AD) 50

6.2. Μοριακή παθογένεια του καρκίνου εκ πλακωδών κυττάρων του επιθηλίου του πνεύμονα (SCC) 52

6.3. Μοριακή παθογένεια του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (SCLC) .. 54

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 56

Θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα *56*

7.1. Χειρουργική επέμβαση 56

7.2. Ακτινοθεραπεία 57

7.3. Χημειοθεραπεία 58

7.3.1. Επικουρική χημειοθεραπεία 59

7.3.2. Νεοεπικουρική χημειοθεραπεία 59

7.3.3. Χημειοθεραπευτικά σχήματα 60

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 62

Προβλεπτικοί και προγνωστικοί παράγοντες ... *62*
8.1. Μεταλλάξεις στον EGFR ... 63
8.2. Αναδιατάξεις στο γονίδιο ALK ... 70
8.3. Αναδιατάξεις στο γονίδιο ROS1 ... 74
8.4. Μεταλλάξεις στο γονίδιο KRAS ... 75
8.5. Μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF ... 76
8.6. Ανοσολογικοί προβλεπτικοί παράγοντες ... 78
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 ... 82
Μοριακή βιολογία του καρκινικού κυττάρου ... *82*
9.1. Η απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα ... 82
9.2. Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στο καρκινικό κύτταρο ... 85
9.3. Επιδιορθωτικοί μηχανισμοί του DNA στο καρκινικό κύτταρο ... 87
9.4. Χημειοανθεκτικότητα στις ταξάνες ... 92
ΣΚΟΠΟΣ ... 95
ΙΙΙ. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ ... 96
ΑΣΘΕΝΕΙΣ, ΜΕΘΟΔΟΙ & ΥΛΙΚΑ ... 97
1. Ασθενείς και χημειοθεραπευτικά σχήματα ... *98*
1.1. Κριτήρια επιλογής ασθενών ... 98
1.2. Χημειοθεραπευτικά σχήματα ... 100
1.3. Αξιολόγηση της θεραπείας ... 102
1.4. Εκτίμηση Τοξικότητας ... 104
1.5. Ερευνητικά κέντρα ... 105
2. Μέθοδοι & Υλικά ... *105*
2.1. Μονιμοποίηση ιστού σε μπλοκ παραφίνης/χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης ... 105
2.2. Ανοσοϊστοχημεία ... 107
2.2.1. Εκτίμηση ανοσοϊστοχημικής χρώσης ... 110
2.3. Απομόνωση ολικού RNA από ιστό και Reverse transcription –PCR (RT-PCR) ... 110
2.4. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qReal-time PCR) ... 113
3. Στατιστική ανάλυση ... *119*
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ... 122
1. Χαρακτηριστικά ασθενών ... *123*
2. Έκφραση των πρωτεϊνών BCL2, p53, p21WAF1 και APE1 στον NSCLC ... *123*
3. Γονιδιακή έκφραση των BRCA1, TXR1 και TSP1 mRNA στον NSCLC με βάση τον ιστολογικό τύπο ... *128*
4. Γονιδιακή έκφραση των BRCA1, TXR1 και TSP1 mRNA στον NSCLC με βάση την απόκριση στα χημειοθεραπευτικά σχήματα ... *130*

5. Γονιδιακή έκφραση των BRCA1, TXR1 και TSP1 mRNA στον NSCLC και έκβαση της θεραπείας σύμφωνα με τον ιστολογικό υπότυπο και τη χημειοθεραπευτική αγωγή πρώτης γραμμής *134*

6. Μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση *136*

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ 139

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 149

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι (ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ) 168

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ (ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ) 174

I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται ραγδαία εξέλιξη στην ερευνητική δραστηριότητα πάνω στους μηχανισμούς της καρκινογένεσης με στόχο τόσο την πληρέστερη κατανόηση των κλινικών φαινομένων που παρατηρούνται, όσο και στην ανάπτυξη φαρμακευτικών παραγόντων με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα καθώς και μικρότερη τοξικότητα.

Η φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων είναι αποτέλεσμα της αρμονικής συνεργασίας τριών βασικών διαδικασιών : του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της κυτταρικής διαφοροποίησης και του κυτταρικού θανάτου. Ο καρκίνος προκαλείται από διαταραχή των ρυθμιστικών μηχανισμών των παραπάνω διαδικασιών με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων και ταυτόχρονα την αδυναμία ολοκλήρωσης του προγράμματος κυτταρικής διαφοροποίησης. Λόγω των βασικών αυτών διαταραχών τα κύτταρα εμφανίζουν προϊούσα γονιδιακή αστάθεια, αδυναμία φυσιολογικής γήρανσης και αποκτούν ικανότητα διήθησης στους γειτονικούς ιστούς. Η βιολογική συμπεριφορά των τροποποιημένων αυτών κυττάρων και η αντίδραση του ξενιστού είναι υπεύθυνες για το σύνολο των εκδηλώσεων του καρκίνου.

Η κακοήθης εξαλλαγή, σύμφωνα με τα υπάρχοντα δεδομένα, οφείλεται σε σταδιακή συσσώρευση πολλαπλών αλλοιώσεων σε κρίσιμα γονίδια του κυττάρου. Οι αλλοιώσεις αυτές επισυμβαίνουν διαδοχικά για μακρύ χρονικό διάστημα στα κύτταρα αλλά επιλεκτικά ένα συνηθισμένο κύτταρο αποκτά ικανότητα ανεξέλεγκτου πολλαπλασιασμού και δημιουργεί μεγάλο αριθμό θυγατρικών κυττάρων με τα ίδια γενετικά χαρακτηριστικά. Η ανεξέλεγκτη

αύξηση των καρκινικών κυττάρων προέρχεται από τη σταδιακή απόκτηση μεταλλάξεων στα γονίδια που ελέγχουν την κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση ή που ελέγχουν την απόπτωση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ικανότητα των νεοπλασματικών κυττάρων να πολλαπλασιάζονται χωρίς τους φυσιολογικούς περιορισμούς. Έτσι, στην παθογένεια του καρκίνου εμπλέκονται τρεις κατηγορίες γονιδίων. Τα ογκογονίδια (π.χ. ras, EGFR, erb-B, c-kit) είναι τροποποιημένες μορφές των φυσιολογικών γονιδίων που ονομάζονται πρωτογκογονίδια και ρυθμίζουν τη φυσιολογική κυτταρική αύξηση και διαφοροποίηση. Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια (π.χ. p53, p21, retinoblastoma) είναι γονίδια των οποίων τα προϊόντα αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Τέλος, τα μεταλλαγμένα γονίδια εμπλέκονται στην αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA με στόχο να διατηρούν την ακεραιότητα του γονιδιώματος και την πιστότητα της αντιγραφής του DNA.

Ένας πολύ συχνός στόχος των αντινεοπλασματικών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται ευρέως ως χημειοθεραπευτικά στο **μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Non Small Cell Lung Cancer - NSCLC)** είναι ο μηχανισμός της απόπτωσης. Η κυτταρική απόπτωση, ή αλλιώς προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, παίζει ρυθμιστικό και προστατευτικό ρόλο στους ζώντες οργανισμούς ως μια φυσιολογική κυτταρική διαδικασία απαραίτητη για τη διατήρηση της ομοιόστασης. Αναγνωρίζονται δύο βασικά μονοπάτια δια μέσου των οποίων το κύτταρο οδηγείται σε θάνατο στα πλαίσια της απόπτωσης. Το πρώτο (εξωγενές ή κυτταροπλασματικό ή εξαρτώμενο από τους υποδοχείς θανάτου) ενεργοποιείται διαμέσου του υποδοχέα θανάτου Fas (CD95), ο οποίος είναι μέλος της υπερ-οικογένειας υποδοχέων του **TNF (Tumor Necrosis Factor - παράγοντας νέκρωσης όγκων)**. Το

δεύτερο μονοπάτι (ενδογενές ή μιτοχονδριακό) ενεργοποιούμενο, οδηγεί στην αποδέσμευση του κυτοχρώματος-c από τα μιτοχόνδρια. Η οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2, κατέχει πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης. Τόσο το πρώτο όσο και το δεύτερο μονοπάτι καταλήγουν σε ένα τελικό κοινό μονοπάτι που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση ενός καταρράκτη πρωτεασών που ονομάζονται κασπάσες με τελικό αποτέλεσμα τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της απόπτωσης κατέχουν το γονίδιο p53, ο παράγοντας NFκB και η κινάση PI3K. Το γονίδιο p53 βρίσκεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 17 και το πρωτεϊνικό του προϊόν είναι παρόν σε όλους σχεδόν τους φυσιολογικούς ιστούς. Στα φυσιολογικά κύτταρα το p53 ρυθμίζει την κυτταρική διαίρεση. Συγκεκριμένα, σε αντίδραση στη βλάβη του DNA, τα επίπεδά του αυξάνουν και εμποδίζουν το κύτταρο να εισέλθει στη φάση S του κυτταρικού κύκλου, παρέχοντας έτσι αρκετό χρόνο ώστε να πραγματοποιηθεί η διόρθωση του DNA. Με αυτόν τον τρόπο, το p53 δρα περιορίζοντας τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η απώλεια του p53 οδηγεί σε αναστολή της απόπτωσης.

Σκοπός του ερευνητικού έργου είναι η διερεύνηση των μοριακών και ιστοπαθολογικών παραμέτρων που καθορίζουν την αντοχή του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα σε διαφορετικά χημειοθεραπευτικά σχήματα. Η μελέτη αρχικά εστίασε στις ενδονουκλεάσες (ένζυμα που ενέχονται στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA) και στις πρωτεΐνες που ελέγχουν τη διαδικασία της απόπτωσης (p53, p21, Bcl-2).

Καταγράφηκαν 131 ασθενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένο μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα σταδίου IIIB-IV. Οι ασθενείς έλαβαν

χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς 1^{ης} γραμμής με δοσεταξέλη-γεμσιταμπίνη ή δοσεταξέλη-σισπλατίνη στο Γενικό Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών «Σωτηρία» και στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου (ΠΑΓΝΗ). Όλοι οι ασθενείς αποδέχτηκαν το βιοπτικό υλικό του όγκου να χρησιμοποιηθεί για μοριακό και ανοσοϊστοχημικό έλεγχο χωρίς επιβάρυνσή τους ή του νοσοκομείου. Η μελέτη έχει πάρει την έγκριση της επιστημονικής επιτροπής Ηθικής και Δεοντολογίας του νοσοκομείου. Τα στοιχεία των ασθενών δεν έχουν χρησιμοποιηθεί ή παρουσιαστεί σε άλλη μελέτη.

Τα πρώτα αποτελέσματα της μελέτης δεν ήταν ενθαρρυντικά, καθώς οι αναλύσεις στους πρώτους ασθενείς δεν κατάφεραν να αναδείξουν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες των ασθενών με βάση τον εντοπισμό ενδονουκλεασών αλλά και των πρωτεϊνών p53, p21, Bcl-2 που συμμετέχουν στη διαδικασία της απόπτωσης.

Λόγω των παραπάνω δυσκολιών, προχωρήσαμε στην εκτίμηση της συσχέτισης της έκφρασης των mRNA των *BRCA1, TXR1* και *TSP1* με την έκβαση της θεραπείας των ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα σταδίου IIIB-IV με χημειοθεραπεία 1^{ης} γραμμής που περιελάμβανε δοσεταξέλη.

Η πρωτεΐνη BRCA1 συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA και το προϊόν του γονιδίου έχει συσχετιστεί με διάφορους καρκινικούς όγκους, μεταξύ των οποίων και ο NSCLC. Συγκεκριμένα, η έκφραση της BRCA1 συνδέεται με ευαισθησία στη θεραπεία με ταξάνες και αντοχή στην πλατίνα. Το γονίδιο TXR1 σχετίζεται επίσης με την αντίσταση στις ταξάνες, αναστέλλοντας τη διαδικασία της απόπτωσης στα κύτταρα. Η δράση του αυτή διαμεσολαβείται

από την καταστολή, σε μεταγραφικό επίπεδο της έκφρασης της θρομβοσπονδίνης (TSP1).

Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης έδειξαν ότι τα επίπεδα των mRNA των *TXR1-TSP1* συσχετίζονται αντίστροφα με την έκβαση της θεραπείας (Spearman's test: -0.37; p=0.001), δηλαδή χαμηλότερα επίπεδα *TXR1* mRNA παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με υψηλότερα ποσοστά ανταπόκρισης (RR; p=0.018), μεγαλύτερο ελεύθερο νόσου διάστημα (PFS; p=0.029) και υψηλότερη μέση συνολική επιβίωση (mOS p=0.003). Αντίθετα, υψηλά επίπεδα έκφρασης *TSP1* συσχετίστηκαν με υψηλότερα ποσοστά ανταπόκρισης (p=0.035), μεγαλύτερο PFS (p<0.001) και υψηλότερη μέση συνολική επιβίωση (p < 0.001). Επίσης, υψηλότερη έκφραση του *BRCA1* mRNA συσχετίστηκε σημαντικά με υψηλότερα ποσοστά ανταπόκρισης (p=0.028) και αυξημένο PFS (p=0.021), αλλά όχι ανάλογη αύξηση της μέσης συνολικής επιβίωσης (p=0.4). Η πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι ο συνδυασμός χαμηλών επιπέδων mRNA *TXR1* / υψηλών *TSP1* αποτελεί έναν ανεξάρτητο παράγοντα που προβλέπει αυξημένο PFS (HR 0.49; 95% CI: 0.32-0.76; p<0.001) και μέση συνολική επιβίωση (HR 0.37; 95% CI: 0.2-0.58; p<0.001). Από την ίδια ανάλυση προκύπτει ότι η αυξημένη έκφραση *BRCA1* σχετίζεται με αυξημένο PFS (HR 0.53; 95% CI: 0.37-0.78; p=0.001).

Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι η έκφραση των *TXR1-TSP1* και *BRCA1* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προβλεπτικός παράγοντας για την ανταπόκριση των ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα στη χημειοθεραπεία με ταξάνες.

I. SUMMARY

During the last years there has been a rapid development in research on the mechanisms of carcinogenesis, aiming to the better understanding of the clinical phenomena observed and to the development of pharmaceutical products with greater efficacy and less toxicity.

Normal cell growth is the result of the interplay of three fundamental processes: cell proliferation, cell differentiation and cell death. Cancer is caused by disturbances of these regulatory mechanisms resulting in uncontrolled proliferation of neoplastic cells and the inability to complete the cell differentiation program. Due to these disorders the cells exhibit progressive genomic instability, impaired cell development, and invasion ability. The biological behavior of cancer cells and the host immune responses are responsible for all cancer manifestations.

Malignant transformation is caused by the gradual accumulation of multiple mutations in essential genes. These mutations occur for a long time in cells. However, a normal cell selectively acquires the ability to proliferate without control and generates a large number of daughter cells with the same genetic features. The uncontrolled growth and division of cancer cells arises from the gradual acquisition of gene mutations that control cell growth and differentiation or apoptosis. This results in the ability of neoplastic cells to proliferate without physiological limitations. Thus, the pathogenesis of cancer involves three classes of genes. Oncogenes (e.g., ras, EGFR, erb-B, c-kit) are modified forms of normal genes called proto-oncogene that regulate normal cell growth and differentiation. The tumor suppressor genes (e.g., p53, p21,

retinoblastoma) are genes encoding proteins that inhibit cell proliferation. Finally, DNA repair genes code for proteins whose normal function is to correct errors that arise when cells duplicate their DNA prior to cell division, in order to maintain the genome integrity and DNA replication fidelity.

A common target of antitumor drugs widely used as chemotherapeutics in non-small cell lung cancer (NSCLC) is the mechanism of apoptosis. Cell apoptosis or programmed cell death, plays a regulatory and protective role in living organisms as a normal cellular process essential to maintain homeostasis. There are two major pathways of apoptosis in mammalian cells, the extrinsic and intrinsic pathways. The extrinsic pathway is activated via the Fas death receptor (CD95), which is a member of the tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily. When the intrinsic pathway is activated leads to the release of cytochrome-c by the mitochondria. The Bcl-2 family of proteins has an important role in regulating the intrinsic pathway of apoptosis. Both pathways result in a final common pathway involved in the activation of a cascade of proteases called caspases, resulting in the programmed cell death.

The p53 gene, the NFκB factor and the PI3K kinase play an important role in the regulation of apoptosis. p53 gene is located in the short arm of chromosome 17 and its protein product is present in almost all normal tissues. In normal cells, p53 regulates cell division. In particular, in response to DNA damage, its levels increase and prevent the cell from entering S phase of the cell cycle, thus providing enough time for DNA repair to take place. Thus, p53 acts by limiting uncontrolled cell proliferation. Loss of p53 leads to inhibition of apoptosis.

The aim of this study was to investigate the molecular and histopathological parameters that determine the resistance of NSCLC to different chemotherapeutic regimens. The study initially focused on endonucleases (enzymes involved in repairing DNA damage) and on proteins that control apoptosis (p53, p21, bcl-2).

A total of 131 consecutive patients with histologically confirmed stage IIIB-IV NSCLC were enrolled. Patients received first-line chemotherapy combinations with docetaxel-gemcitabine or docetaxel-cisplatin at the «Sotiria» Hospital of Chest Diseases of Athens. The study has been approved by the institutional ethics committee and all patients gave their informed consent for the use of the tissue material for translational research. Patient data have not been used or presented in another study.

The first results of the study were not encouraging, as the analysis in the first 100 patients failed to reveal statistically significant differences between groups of patients based on endonuclease (APE1) detection but also on the p53, p21 and bcl-2 proteins that are involved in the process of apoptosis.

Due to the above difficulties, we evaluated the correlation of *BRCA1*, *TXR1* and *TSP1* mRNA expression with treatment outcome to docetaxel-based first-line chemotherapy in patients with stage IIIB-IV NSCLC.

The BRCA1 protein is involved in DNA repair and the gene product has been associated with various tumors, including NSCLC. The BRCA1 expression is associated with sensitivity to taxane therapy and platinum resistance. TXR1 is also associated with taxane resistance by inhibiting the process of apoptosis in the cells. This activity is mediated by the transcriptional repression of thrombospondin 1 (TSP1) expression.

Our results have shown that *TXR1-TSP1* mRNA levels were inversely correlated with the treatment outcome (Spearman's test: -0.37; p = 0.001), ie lower levels of *TXR1* mRNA showed statistically significant correlation with higher response rates (RR; p = 0.018), higher median progression-free survival (PFS, p = 0.029) and higher mean overall survival (mOS p = 0.003). In contrast, high levels of *TSP1* mRNA expression were associated with higher response rates (p = 0.035), higher PFS (p <0.001), and higher mean overall survival (p <0.001). Additionally, higher *BRCA1* mRNA gene expression was significantly associated with higher response rates (p = 0.028) and elevated PFS (p = 0.021), but not with higher mean overall survival (p = 0.4). Multifactorial analysis showed that the combination of low levels of *TXR1* / high *TSP1* mRNA was an independent factor predicting increased PFS (HR 0.49; 95% CI: 0.32-0.76; p <0.001) and mean overall survival (HR 0.37; 95% CI: 0.2-0.58; p<0.001). The same analysis revealed that increased *BRCA1* mRNA gene expression was associated with elevated PFS (HR 0.53; 95% CI: 0.37-0.78; p = 0.001).

These results indicated that the expression of *TXR1-TSP1* and *BRCA1* can be used as predictive marker of the NSCLC patients' response to taxane chemotherapy.

ΙΙ.ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1

Επιδημιολογία του καρκίνου του πνεύμονα

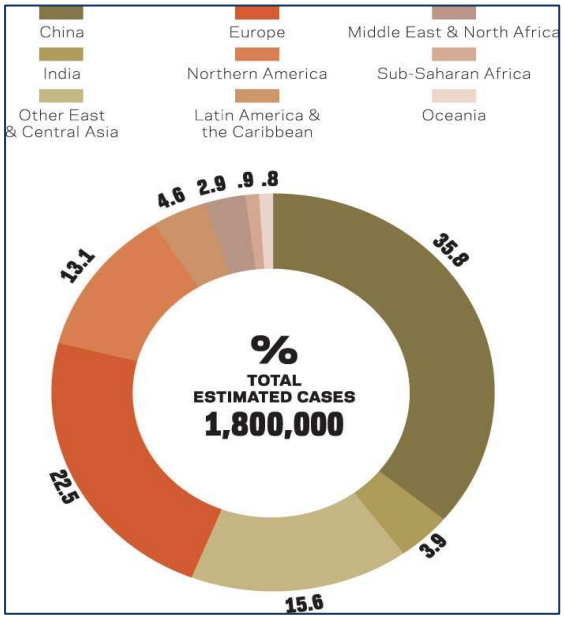
Ο καρκίνος του πνεύμονα (ΚΠ) είναι ένας από τους πιο συχνά εμφανιζόμενους τύπους καρκίνου παγκοσμίως και στα δύο φύλα (1), ενώ σχετίζεται άμεσα με το κάπνισμα (2). Ο ΚΠ αντιπροσώπευε το 14% των περιστατικών καρκίνου που διαγνώστηκαν το 2012, με 1.8 εκατομμύρια νέα περιστατικά (3). Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.), μόνο το 2015 προκλήθηκαν 1.69 εκατομμύρια θάνατοι που οφείλονταν σε ΚΠ (4). Το 27% των θανάτων που προκλήθηκαν από καρκίνο στις ΗΠΑ και το 20% στην Ευρώπη, τα έτη 2015-2016, οφείλονταν σε ΚΠ (5), ενώ υπολογίζεται ότι οι θάνατοι θα φτάσουν το 2035 τα 3 εκατομμύρια (6). Αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο στις Ηνωμένες Πολιτείες (7) ενώ οι νέες περιπτώσεις για το 2018 υπολογίζονται στις 234.030 (121.680 άνδρες και 112.350 γυναίκες). Εκτιμάται ότι θα συμβούν 154.050 θάνατοι από τη νόσο (8) και μόνο το 18% των ασθενών αναμένεται να επιβιώσει σε ορίζοντα 5ετίας ή περισσότερο, μετά από τη διάγνωση ΚΠ.

1.1. Επιδημιολογία του καρκίνου του πνεύμονα παγκοσμίως

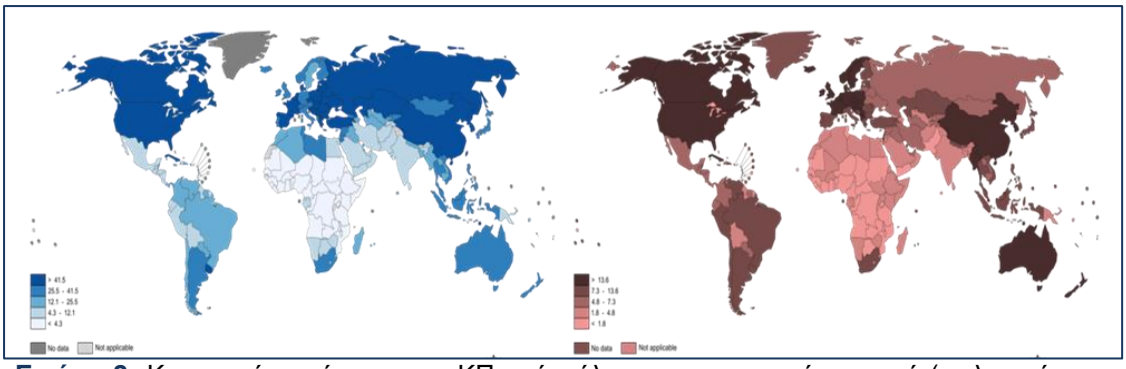
Περίπου το 58% όλων των περιστατικών θανάτου από ΚΠ αναφέρονται στα λιγότερο οικονομικά ανεπτυγμένα κράτη (9). Έτσι, οι περισσότεροι θάνατοι από ΚΠ αναφέρονται στις χώρες του Δυτικού Ειρηνικού ωκεανού ενώ 2^{η} σε συχνότητα θανάτων έρχεται η Ευρώπη (6). Παρ΄όλα αυτά, η μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης του ΚΠ εμφανίζεται στην Ανατολική Ευρώπη (10) και Ανατολική Ασία (11) με 53.5 και 50.4 περιστατικά ανά 100.000, αντίστοιχα

(12). Στην Εικόνα 1 παρουσιάζονται τα προβλεπόμενα περιστατικά ΚΠ με βάση τη γεωγραφική κατανομή.

Τα ποσοστά εμφάνισης του ΚΠ διαφέρουν και μεταξύ των δύο φύλων με τους άντρες να εμφανίζουν πιο συχνά αυτό τον τύπο καρκίνου. Παρ΄όλα αυτά, η διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης ΚΠ μεταξύ των δύο φύλων έχει μειωθεί αισθητά την τελευταία δεκαετία. Ο ΚΠ στις ΗΠΑ αποτελεί τον πιο θανατηφόρο τύπο καρκίνου στις γυναίκες έχοντας ξεπεράσει σε συχνότητα τον καρκίνο του μαστού ήδη από τη δεκαετία του ΄80 (13). Έτσι, η τάση είναι πτωτική στους άνδρες και αυξανόμενη στις γυναίκες (13). Η χρονική διακύμανση στην εμφάνιση του ΚΠ ποικίλλει και εξαρτάται άμεσα και από τον ιστολογικό τύπο. Παγκοσμίως έχει παρατηρηθεί αύξηση στην εμφάνιση αδενοκαρκινώματος (AD) και μείωση του καρκινώματος εκ πλακωδών κυττάρων (SCC) και του μικροκυτταρικού (SCLC). Συγκεκριμένα, μεγαλύτερο ποσοστό γυναικών διαγιγνώσκεται με AD, σε μικρότερη ηλικία και σε πιο πρώιμα στάδια της νόσου σε σχέση με τους άντρες (13). Στην Εικόνα 2 παρουσιάζονται τα ποσοστά εμφάνισης του ΚΠ ανά φύλο και γεωγραφική κατανομή.



Εικόνα 1: Εμφάνιση περιστατικών ΚΠ ανά γεωγραφική περιοχή. Στο σύνολο του 1.800.000 νέων περιστατικών ΚΠ το 53.5% αναφέρθηκαν στην Ασία, με το ποσοστό να κυμαίνεται στην Κίνα στο 35.8%. Δεύτερη σε ποσοστά εμφάνισης έρχεται η Ευρώπη με ποσοστό 22.5%, ενώ το μικρότερο ποσοστό αναφέρθηκε στην Ωκεανία (0.8%) (13).

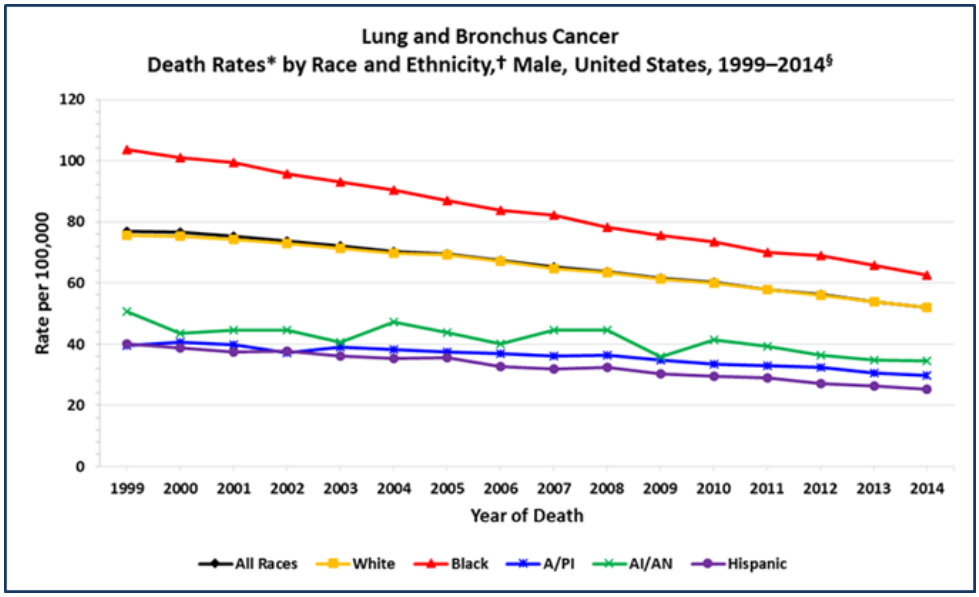


Εικόνα 2: Κατανομή εμφάνισης του ΚΠ ανά φύλο και γεωγραφική περιοχή (μπλε : άντρες, ροζ : γυναίκες) (14).

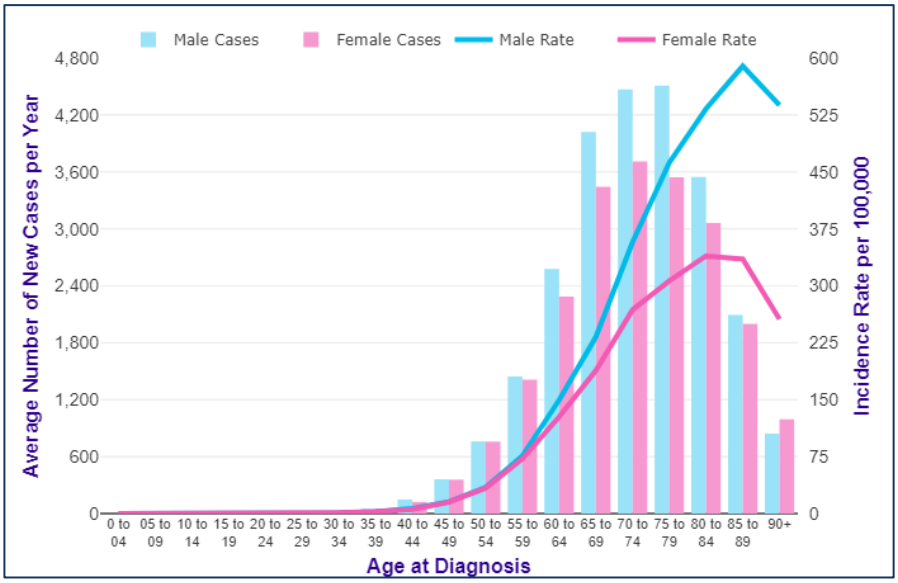
Ο ΚΠ εμφανίζεται με την ίδια συχνότητα τόσο στον καυκάσιο όσο και στον έγχρωμο πληθυσμό. Σύμφωνα όμως με το Surveillance, Epidemiology and End Results Program (SEER) ο έγχρωμος πληθυσμός παρουσιάζει υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας (Εικόνα 3) από ΚΠ σε σχέση με τις άλλες φυλές (καυκάσιοι, έγχρωμοι, αφροαμερικανοί, ασιάτες, ισπανόφωνοι, μη-ισπανόφωνοι) με τα ποσοστά να κυμαίνονται στο 76.1/100.000 στους έγχρωμους, 69.7/100.000 στους καυκάσιους, 38.1/100.000 στους ασιάτες και στο 37.3/100.000 στους ισπανόφωνους (15). Παρ΄όλο που το κάπνισμα φαίνεται να συμβάλλει κατά κύριο λόγο στην εμφάνιση του ΚΠ, αυτό δεν εξηγεί πλήρως τις φυλετικές/εθνικές ανισότητες στην εμφάνιση του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου. Έτσι, άλλοι παράγοντες όπως το γενετικό υπόβαθρο και λοιποί περιβαλλοντικοί παράγοντες (εκτός από το κάπνισμα) μπορεί να συμβάλλουν στη διαφορετική εμφάνιση του ΚΠ σε διαφορετικές φυλές/εθνικότητες (16).

Η πρόγνωση του καρκίνου του πνεύμονα παραμένει επίσης κακή καθώς μέχρι και το 85% των ασθενών διαγιγνώσκονται σε προχωρημένο στάδιο της νόσου. Παρ΄ όλες τις προσπάθειες για πιο άμεση διαχείριση της νόσου, η πρόγνωση των ασθενών με ΚΠ είναι μη ικανοποιητική, με μέση επιβίωση περίπου 1 έτος ενώ το ποσοστό της 5ετούς επιβίωσης παραμένει σε χαμηλά

επίπεδα, γύρω στο 18% (8). Λόγω της αύξησης του ηλικιακού προσδόκιμου ορίου επιβίωσης και του αυξημένου κινδύνου εμφάνισης καρκίνου με την αύξηση της ηλικίας, ο ΚΠ είναι πιο συχνός στους ηλικιωμένους. Περισσότερες από τις μισές περιπτώσεις ΚΠ διαγιγνώσκονται σε ασθενείς ηλικίας > 65 ετών ενώ η μέση ηλικία διάγνωσης κυμαίνεται μεταξύ 64 και 70 ετών (17). Έτσι, ενώ η πιθανότητα προσβολής από ΚΠ στην ηλικία έως 49 ετών είναι 1 στις 682 για τους άντρες και 1 στις 635 για τις γυναίκες, αυξάνεται σημαντικά στις ηλικίες 50-59, σε 1/154 και 1/178 αντίστοιχα για τα δύο φύλα και φτάνει στο 1/16 και 1/21 στις ηλικίες πάνω από 70 έτη (Εικόνα 4) (8). Η ηλικία διάγνωσης εξαρτάται άμεσα από την πολιτική υγείας που ακολουθεί η κάθε χώρα. Έτσι, αν οι ηλικιωμένοι ασθενείς δεν εξετάζονται προληπτικά όταν εμφανίσουν συμπτωματολογία που σχετίζεται με το αναπνευστικό σύστημα, η μέση ηλικία εμφάνισης ΚΠ είναι πιθανό να είναι χαμηλότερη σε σχέση με χώρες όπου οι ηλικιωμένοι ασθενείς εξετάζονται διεξοδικά.



Εικόνα 3: Ποσοστά θνησιμότητας ανά φυλή στους άντρες στις ΗΠΑ (μαύρο : σύνολο, κίτρινο : καυκάσιοι, κόκκινο : έγχρωμοι, μπλε : ασιάτες, πράσινο : ιθαγενείς των ΗΠΑ, μωβ : ισπανόφωνοι) (18).



Εικόνα 4: Μέσος αριθμός νέων περιπτώσεων ΚΠ ανά έτος και ποσοστά επίπτωσης ανά ηλικία/100.000 κατοίκους (Cancer Research UK).

Χρήσιμα στοιχεία για την επιδημιολογία του ΚΠ προέρχονται και από την παγκόσμια τάση εμφάνισής του με βάση τον ιστολογικό υπότυπο. Το κάπνισμα αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης όλων των υποτύπων του ΚΠ, με μεγαλύτερη συχνότητα για καρκίνωμα SCC και SCLC από ότι για AD (19). Το αδενοκαρκίνωμα εμφανίζεται συχνότερα στις γυναίκες (55%) από τους άνδρες (45%) (τόσο στους καπνιστές όσο και στους μη καπνιστές) (20). Διάφορες μελέτες αναφέρουν ότι ο συχνότερος υπότυπος ΚΠ που εμφανίζεται στους άντρες τις τελευταίες δεκαετίες είναι αυτός του AD, σε αντίθεση με την δεκαετία του ΄70 και ΄80 όπου πιο συχνά οι άντρες διαγιγνώσκονταν με SCC (21, 22). Το προφίλ αυτό στις γυναίκες ήταν εντελώς διαφορετικό καθώς οι μελέτες αναφέρουν ότι από την εποχή που ξεκίνησε η «επανάσταση του τσιγάρου» στις γυναίκες, τη δεκαετία του ΄70, ο μεγαλύτερος αριθμός των γυναικών που διαγιγνώσκονταν με ΚΠ είχαν τον υπότυπο του AD (19). Η συχνότητα εμφάνισης AD στις γυναίκες συνεχίζει να αυξάνεται σε σχέση με τους άντρες όπου παρατηρείται μία σταθεροποίηση (19), ενώ η εμφάνιση των

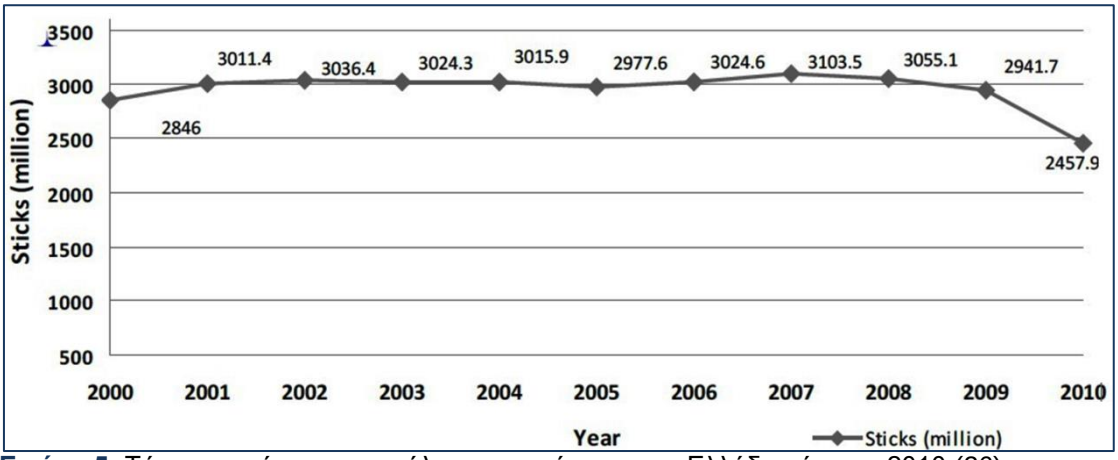
υπόλοιπων υπότυπων του ΚΠ φαίνεται να μειώνεται σταδιακά και στα δύο φύλα (23).

1.2. Επιδημιολογία του καρκίνου του πνεύμονα στην Ελλάδα

Η επιδημιολογία του καρκίνου του πνεύμονα στην Ελλάδα έχει αναφερθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία, με τις περισσότερες μελέτες να αναφέρουν ότι ο ΚΠ είναι ο πιο άμεσα σχετιζόμενος τύπος καρκίνου με το κάπνισμα στην Ελλάδα (Population Attributable Fraction-PFA%) με το ποσοστό να κυμαίνεται από 88.4 έως 89% (24). Ωστόσο, οι επιδημιολογικές μελέτες σε κοινοτικό επίπεδο είναι ελάχιστες στην Ελλάδα, καθώς δεν υπάρχουν εθνικές βάσεις δεδομένων ή μελέτες που θα μπορούσαν να έχουν ήδη αναλάβει αυτές τις πρωτοβουλίες. Το κενό αυτό καλύπτεται εν μέρει από το Κέντρο Καταγραφής του Καρκίνου της Κρήτης (http://www.crc.uoc.gr), το οποίο είναι το μόνο περιφερειακό κέντρο καταγραφής του καρκίνου στην Ελλάδα, με μια μεγάλη βάση δεδομένων και στοιχεία των τελευταίων 20 ετών (25).

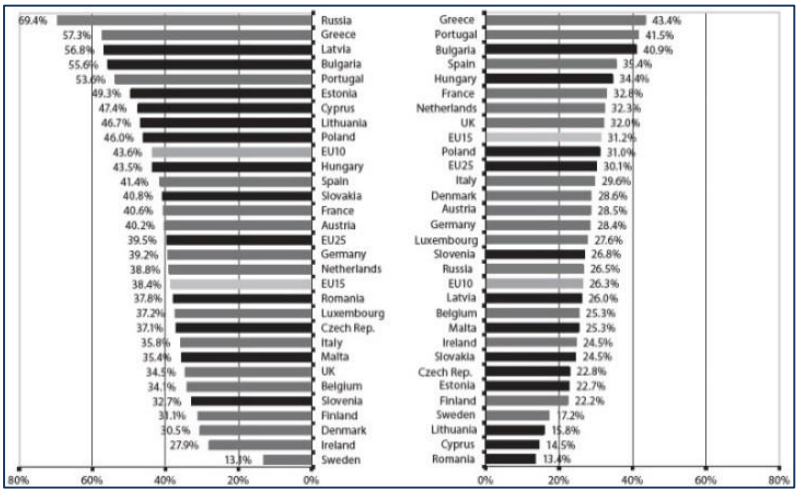
Η Ελλάδα έχει ένα από τα υψηλότερα κατά κεφαλήν ποσοστά κατανάλωσης προϊόντων καπνού μεταξύ των κρατών μελών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ). Σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ., ο πληθυσμός στην Ελλάδα που καπνίζει αυξήθηκε σταθερά από το 2000 έως το 2009, σε αντίθεση με την πτωτική τάση που παρατηρήθηκε σε πολλές άλλες ευρωπαϊκές χώρες (Εικόνα 5). Μείωση στην κατανάλωση προϊόντων καπνού παρουσιάστηκε το 2010 μετά την αύξηση των φόρων στα προϊόντα καπνού. Παρ΄όλα αυτά μόνο το 2010 καταναλώθηκαν 27.7 δισεκατομμύρια τσιγάρα στην Ελλάδα (26). Σήμερα η Ελλάδα συνεχίζει να έχει την μεγαλύτερη κατανάλωση τσιγάρων ανάμεσα στις χώρες της ΕΕ (27). Το 2011, το κάπνισμα ήταν υπεύθυνο για 199.028 εισαγωγές ασθενών σε νοσοκομεία, αντιπροσωπεύοντας το 8.9%

του συνολικού αριθμού των ατόμων που νοσηλεύτηκαν στην Ελλάδα (24). Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι η Ελλάδα έρχεται στη 2η θέση σε ποσοστό καπνιστών ηλικίας 25-44 για τους άντρες και στην 1η θέση για τις γυναίκες στις χώρες της Ευρώπης (Εικόνα 6) (28).



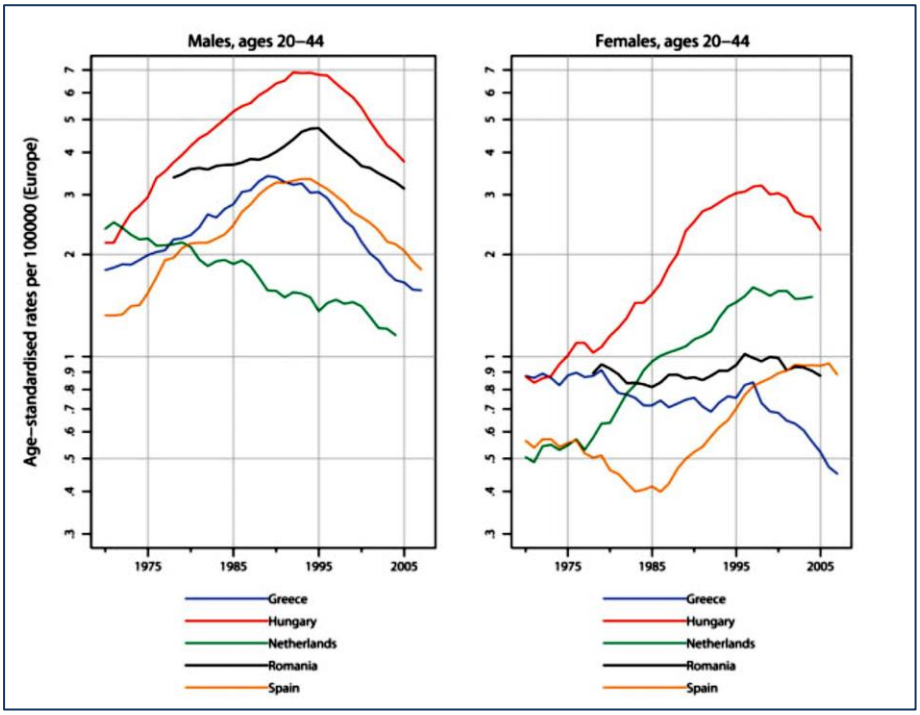
Εικόνα 5: Τάσεις του όγκου κατανάλωσης τσιγάρων στην Ελλάδα μέχρι το 2010 (26).

Σύμφωνα με το Διεθνή Οργανισμό για την Έρευνα του Καρκίνου (International Agency for Research on Cancer - IARC) το 2018 στην Ελλάδα καταγράφηκαν 9.964 νέα περιστατικά ΚΠ που αποτελεί και τον πιο συχνό τύπο καρκίνου. Στους άντρες αποτελεί τον πιο θανατηφόρο τύπο καρκίνου ενώ στις γυναίκες έρχεται 4ος μετά τον καρκίνο του μαστού, τον καρκίνο του παχέος εντέρου και τον καρκίνο της μήτρας (29). Ο IARC προβλέπει ότι έως το 2020, 7.415 άνθρωποι θα πεθάνουν από ΚΠ στην Ελλάδα που ισοδυναμεί με περισσότερους από 20 θανάτους την ημέρα, το οποίο αντιστοιχεί σε μία αύξηση κατά 15.8% σε σχέση με το ποσοστό θνησιμότητας το 2008 (29).



Εικόνα 6: Επικράτηση του καπνίσματος σε ηλικίες 20-44 ετών στην Ευρώπη (σταθμισμένη με βάση τον παγκόσμιο πληθυσμό) (29).

Τις δεκαετίες από το 1970 έως το 2007 παρατηρείται στην Ελλάδα μία μικρή ετήσια μείωση στη θνησιμότητα από ΚΠ. Η μείωση αυτή είναι της τάξης του 0.5% για τους άντρες ενώ στις γυναίκες καταγράφονται αυξητικές τάσεις στις ηλικίες 20-45 ετών (Εικόνα 7). Η μείωση στη θνησιμότητα είναι μικρή σε σχέση με άλλες Ευρωπαϊκές χώρες όπως η Αυστρία, η Κροατία και το Ηνωμένο Βασίλειο που κυμαίνεται σε ποσοστά άνω του 2.5% (30).

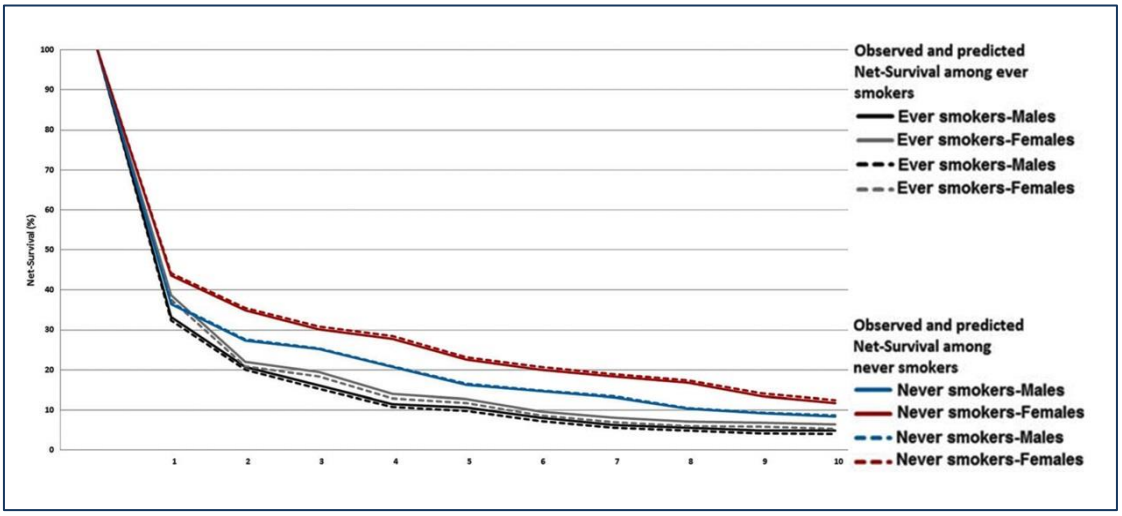


Εικόνα 7: Τάσεις σε ποσοστά θνησιμότητας ΚΠ (Ευρωπαϊκό πρότυπο) ανά χώρα και φύλο για πέντε επιλεγμένες ευρωπαϊκές χώρες. Οι τιμές περιορίζονται σε εύρος ηλικίας 20-44 και εμφανίζονται ως κυμαινόμενοι μέσοι όροι 5 ετών σε ημιλογαριθμική κλίμακα (30).

Συγκριτική μελέτη του 2009 που αφορά τη Βόρεια Ελλάδα, έδειξε ότι τη δεκαετία 1995-2005 παρατηρήθηκε αύξηση του μέσου όρου ηλικίας διάγνωσης του ΚΠ τόσο στους άντρες όσο και στις γυναίκες. Έτσι, από τα 62.35±8.8 έτη για τους άντρες και τα 59.6±9 έτη για τις γυναίκες κατά την δεκαετία 1985-1995, ο μέσος όρος ηλικίας έφτασε τα 65.05±9.2 και 62.5±11.4, αντίστοιχα. Η ίδια μελέτη αναφέρεται και στις διαφορές που προέκυψαν αυτές τις δύο δεκαετίες σε σχέση με τον ιστολογικό τύπο του ΚΠ. Το πλακώδες

καρκίνωμα ήταν ο κυρίαρχος ιστολογικός τύπος στους άνδρες (45.7% όλων των ασθενών) ενώ το αδενοκαρκίνωμα ήταν ο κύριος τύπος στις γυναίκες (52.6%). Κατά τη δεκαετία 1995-2005, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην εμφάνιση πλακώδους καρκινώματος (από 48.0% έως 44.1%) στους άνδρες και ταυτόχρονη αύξηση του αδενοκαρκινώματος (από 15.5% έως 19.4%) (31).

Άλλη μελέτη που περιορίστηκε στον πληθυσμό της Κρήτης, με στοιχεία της δεκαετίας 1992-2013, κατέγραψε τα χαρακτηριστικά των ασθενών με ΚΠ στο νησί. Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή καταγράφηκαν 5.509 περιστατικά ΚΠ, με τα περισσότερα να αφορούν άντρες (87.3%) ηλικίας 65–74 ετών (35.2%) (25). Το 75.1% των ασθενών αυτών ήταν πρώην ή ενεργείς καπνιστές. Η έρευνα αυτή δίνει αρκετά στοιχεία σχετικά με το στάδιο πρώτης διάγνωσης της νόσου. Έτσι, οι περισσότεροι ασθενείς (45.5%) διαγνώστηκαν με ΚΠ σταδίου IV, το 16.1% με σταδίου IIIA και IIIB, ενώ αναφορικά με τα ποσοστά 5ετούς επιβίωσης, αυτά ήταν καλύτερα για τις γυναίκες σε σχέση με τους άντρες (12.8% και 10.6% αντίστοιχα) (Εικόνα 8) (25).



Εικόνα 8: Παρατηρούμενη και προβλεπόμενη επιβίωση (Net-survival) του καρκίνου του πνεύμονα μεταξύ πρώην και ενεργών καπνιστών στην Κρήτη (25).

Κεφάλαιο 2

Παράγοντες κινδύνου

Το κάπνισμα είναι η κύρια αιτία εμφάνισης του καρκίνου του πνεύμονα (32, 33). Μελέτες δείχνουν ότι ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα οφείλεται στο κάπνισμα σε περίπου 90% των ανδρών και στο 80% των γυναικών (34). Πάνω από 5.000 μεμονωμένα συστατικά του καπνού των τσιγάρων έχουν ταυτοποιηθεί, εκ των οποίων τα 60 κατηγοριοποιούνται στις καρκινογόνες ουσίες (35). Σε αυτές περιλαμβάνονται οι νιτροζαμίνες, οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, οι αλδεΰδες, τα οξειδωτικά, τα μέταλλα και οι αρωματικές αμίνες (36). Υπολογίζεται ότι από τους καπνιστές, ένα ποσοστό 15-30% θα αναπτύξει ΚΠ ενώ μόνο το 5-7% των ασθενών με ΚΠ είναι μη καπνιστές (37, 38). Αρκετοί ερευνητές αναφέρουν ότι με την αποτροπή του καπνίσματος, το 20% όλων των θανάτων από καρκίνο θα μπορούσε να αποφευχθεί (39). Η αλλαγή στο σχεδιασμό των τσιγάρων έχει οδηγήσει τις τελευταίες δεκαετίες σε μετατόπιση της ιστολογικής ταξινόμησης (40). Έτσι, όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, από το καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων τα προηγούμενα χρόνια, σήμερα επικρατεί το αδενοκαρκίνωμα (41). Η έκθεση στον καπνό του τσιγάρου αποτελεί επίσης έναν παράγοντα κινδύνου, ο οποίος μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα εμφάνισης ΚΠ σε παθητικούς καπνιστές έως και 26% (42). Οι παθητικοί καπνιστές που εμφανίζουν ΚΠ αποτελούν το 2% έως 3% του συνόλου των περιστατικών (43).

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, περισσότερες από 1000 μελέτες έχουν συσχετίσει «ύποπτα» γονίδια με τη γενετική προδιάθεση στην εμφάνιση ΚΠ,

αλλά λίγες έχουν αποδείξει την άμεση δράση των γονιδίων αυτών στην εμφάνιση αυτού του τύπου καρκίνου (44). Περίπου το 20% των καπνιστών και μη καπνιστών με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΚΠ (45). Οι γενετικές παραλλαγές που επάγουν τον κίνδυνο εμφάνισης ΚΠ εμπίπτουν σε τρεις κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία είναι οι σπάνιες *παραλλαγές υψηλού κινδύνου* (επικράτηση 1% ή λιγότερο), η δεύτερη, οι *παραλλαγές μέτριας επικινδυνότητας* (επικράτηση όχι άνω του 5%) και οι κοινές *παραλλαγές χαμηλού κινδύνου* (επικράτηση πάνω από 5%) (45). Μέχρι σήμερα, ο γενετικός τόπος που έχει κατηγορηθεί άμεσα για την ανάπτυξη του ΚΠ, βρίσκεται στη θέση 6q23-25 και αφορά το γονίδιο RGS17 (46). Τα τελευταία δέκα χρόνια έχουν εντοπιστεί κοινές γενετικές παραλλαγές στις θέσεις 5p15.33 (TERT/CLPTM1L), 6p21.33 (BAT3/MSH5) και 15q25.1 (CHRNA5/CHRNA3/CHRNB4) που επίσης έχουν κατηγορηθεί μόνο για το 10% των περιπτώσεων του ΚΠ (44).

Στην πιο πρόσφατη μετα-ανάλυση του Wang και των συνεργατών του, έγινε εξέταση των συσχετίσεων μεταξύ των γενετικών πολυμορφισμών και του κινδύνου ανάπτυξης ΚΠ, με τη χρήση δεδομένων από 1.018 μελέτες, που αφορούν 2.910 γενετικούς πολυμορφισμούς. 22 γενετικοί πολυμορφισμοί σε 21 γονίδια συσχετίστηκαν άμεσα με τον ΚΠ (Εικόνα 9). Οι πολυμορφισμοί αυτοί επηρεάζουν ρυθμιστικές λειτουργίες των κυττάρων, όπως την τροποποίηση των ιστονών, την υπερευαισθησία της DNάσης I, την αλλαγή του πρωτεϊνικού μοτίβου και της δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων σε πολλαπλούς τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου και του ιστού του πνεύμονα (44).

Genes	Variants*	Frequency (%)†	Ethnicity	Number evaluated		Genetic associations with lung cancer			Heterogeneity		Begg *P*	Venice criteria grades/	Credibility of evidence§
				Studies	Cases/ Controls	Contrast¶	OR(95%CI)	p value	I^2 (%)	P_Q‖			
APEX1	rs1760944(A/C)	47.94	All	8	3588/3783	A vs C	1.16(1.08–1.25)	2.85×10^{-5}	9	0.360	0.386	AAA	Strong
AXIN2	rs2240308(T/C)	37.40	All	3	758/742	T vs C	0.73(0.63–0.85)	6.39×10^{-5}	0	0.398	1.000	AAA	Strong
CHRNA3	rs6495309(T/C)	38.44	All	4	3381/4244	T vs C	0.83(0.77–0.89)	6.55×10^{-8}	0	0.427	1.000	AAA	Strong
CXCR2	rs1126579(T/C)	55.45	All	3	942/964	T vs C	0.84(0.74–0.96)	0.009	0	0.967	1.000	AAA	Strong
CYP2E1	rs6413432(A/T)	22.17	All	14	2944/3347	A vs T	0.78(0.71–0.85)	6.76×10^{-8}	0	0.821	0.827	AAA	Strong
HYKK	rs931794(G/A)	32.89	All	5	2435/3180	G vs A	1.23(1.14–1.34)	1.85×10^{-7}	0	0.864	1.000	AAA	Strong
PON1	rs662(A/G)	46.70	All	3	995/834	A vs G	0.77(0.67–0.88)	2.02×10^{-4}	0	0.701	1.000	AAA	Strong
REV3L	rs462779(T/C)	39.36	Asian‡	4	1937/2335	T vs C	1.11(1.02–1.22)	0.021	0	0.911	0.734	AAC	Strong
ATM	rs189037(A/G)	42.68	Asian‡	5	3036/3415	A vs G	1.09(1.00–1.18)	0.050	29	0.227	0.806	ABC	Moderate
CD3EAP	rs967591(A/G)	32.09	All	3	676/726	A vs G	1.23(1.01–1.49)	0.036	22	0.278	1.000	BAA	Moderate
CYP2A6	rs1801272(A/T)	3.99	Caucasian‡	3	2411/2644	carriers vs non-carriers	0.66(0.52–0.84)	0.001	0	0.674	1.000	BAB	Moderate
HIF1A	rs11549467(A/G)	9.45	All	3	509/566	A vs G	2.27(1.74–2.96)	1.62×10^{-9}	0	0.481	0.296	BAA	Moderate
PDCD5	rs1862214(G/C)	32.06	All	3	737/683	G vs C	1.32(1.12–1.56)	0.001	0	0.395	0.296	BAB	Moderate
PROM1	rs2240688(C/A)	27.37	Asian‡	3	2332/2457	C vs A	0.83(0.76–0.91)	6.92×10^{-5}	0	0.991	0.296	AAB	Moderate
TP53	rs12951053(G/T)	9.93	All	3	475/569	G vs T	1.57(1.11–2.23)	0.011	37	0.203	0.296	BBB	Moderate
TP63	rs10937405(T/C)	42.62	All	4	4927/8794	T vs C	0.87(0.81–0.94)	2.20×10^{-4}	34	0.207	0.308	ABA	Moderate
WWOX	CNV-67048	2.86	Asian‡	4	2942/3074	0 copy vs 2 copies	2.06(1.58–2.70)	1.20×10^{-7}	0	0.911	1.000	BAB	Moderate
XRCC1	rs3213255(G/A)	38.15	All	3	1089/1506	G vs A	1.21(1.08–1.35)	0.001	0	0.457	0.296	AAB	Moderate
AGER	rs1800624(A/T)	34.41	Asian‡	3	1656/1693	A vs T	1.18(1.04–1.33)	0.010	16	0.305	1.000	AAC	Weak
BCL2	rs2279115(A/C)	43.37	All	5	1847/2367	A vs C	0.65(0.46–0.91)	0.011	91	0.000	0.624	ACC	Weak
CHRNA3	rs578776(T/C)	31.98	All	3	1245/2009	T vs C	0.87(0.77–0.98)	0.018	0	0.908	1.000	AAC	Weak
CHRNA3	rs938682(C/T)	28.37	All	3	1240/1986	C vs T	0.86(0.76–0.96)	0.009	0	0.582	0.296	AAC	Weak
CHRNA3	rs12914385(T/C)	35.09	All	4	5356/2873	T vs C	1.20(1.01–1.44)	0.044	76	0.007	0.734	ACA	Weak
CHRNA5	rs16969968(A/G)	32.51	All	11	6222/62452	A vs G	1.23(1.06–1.43)	0.007	80	0.000	0.119	ACC	Weak
CLPTM1L	rs402710(T/C)	32.92	All	13	7214/8051	T vs C	0.89(0.83–0.95)	2.63×10^{-4}	38	0.078	0.669	ABC	Weak
CYP1A1	rs4646903(C/T)	21.88	All	57	9844/12410	C vs T	1.16(1.07–1.25)	1.59×10^{-4}	55	0.000	0.772	ACC	Weak
CYP1A1	rs1048943(G/A)	17.83	All	54	9869/12114	G vs A	1.23(1.11–1.36)	7.64×10^{-5}	67	0.000	0.649	ACC	Weak
CYP1B1	rs1056836(G/C)	38.50	All	12	3033/3866	G vs C	1.13(1.05–1.22)	0.002	0	0.551	0.064	AAC	Weak
CYP2A6	rs5031016(C/T)	9.89	All	3	1527/1138	C vs T	0.57(0.33–1.00)	0.048	73	0.025	0.296	BCC	Weak
CYP2E1	rs2031920(T/C)	17.33	All	23	4983/6628	T vs C	0.86(0.76–0.97)	0.018	50	0.003	0.509	ACA	Weak
ELANE	rs351107(G/T) (−903T > G, Rep_a)	5.31	Caucasian‡	3	745/762	G vs T	0.55(0.34–0.87)	0.011	29	0.246	1.000	BBC	Weak
ELANE	rs7254054(A/G) (−741G > A, Rep_b)	27.20	Caucasian‡	3	754/750	A vs G	0.77(0.61–0.97)	0.030	46	0.155	0.296	BBC	Weak
ERCC1	rs11615(C/T)	51.18	All	12	5731/7058	C vs T	0.90(0.83–0.99)	0.023	52	0.018	0.086	ACC	Weak
ERCC2	rs238406(A/C)	40.05	All	6	1754/2688	A vs C	1.12(1.02–1.23)	0.013	0	0.558	0.260	AAC	Weak
ERCC2	rs13181(C/A)	25.26	All	40	13111/16749	C vs A	1.12(1.05–1.19)	4.18×10^{-4}	49	0.000	0.753	ABC	Weak
ERCC5	rs1047768(T/C)	43.99	All	4	1449/2248	T vs C	0.86(0.74–1.00)	0.049	48	0.123	0.734	ABC	Weak
ERCC6	rs3793784(G/C)	30.82	All	3	1643/1689	G vs C	0.75(0.60–0.92)	0.007	68	0.044	1.000	ACA	Weak
FGFR4	rs351855(A/G)	42.47	All	4	1083/1275	A vs G	0.82(0.69–0.98)	0.025	33	0.214	0.089	ABC	Weak
GSTM1	Present/null	48.85	All	133	33253/37867	null vs present	1.18(1.12–1.23)	2.54×10^{-11}	52	0.000	0.105	ACC	Weak
GSTP1	rs1695(G/A)	30.41	All	46	12521/14411	G vs A	1.08(1.02–1.15)	0.011	55	0.000	0.075	ACC	Weak
GSTT1	GSTT1	26.14	All	77	23009/25365	null vs present	1.10(1.02–1.19)	0.011	58	0.000	0.346	ACC	Weak
HRAS1	VNTR(common alleles/rare alleles)	7.03	Caucasian‡	4	746/1174	rare vs common	2.55(1.01–6.45)	0.048	69	0.023	0.734	BCC	Weak
IL10	rs1800896(G/A)	37.18	All	10	2861/3817	G vs A	1.29(1.05–1.59)	0.017	75	0.000	0.074	ACC	Weak
MAPKAPK2	CNV-30450	9.76	Asian‡	3	2332/2480	4 copies vs 2 copies	1.60(1.04–2.45)	0.031	81	0.005	1.000	BCB	Weak
MDM2	rs2279744(G/T)	41.05	All	19	11076/14434	G vs T	1.10(1.01–1.19)	0.021	75	0.000	0.700	ACC	Weak
MIR146A	rs2910164(C/G)	45.26	All	6	3158/3225	C vs G	1.16(1.06–1.27)	0.001	21	0.274	0.260	AAC	Weak
MMP2	rs243865(T/C)	16.77	All	3	1751/1729	T vs C	0.63(0.45–0.89)	0.009	80	0.007	0.296	BCC	Weak
MTRR	rs1801394(G/A)	43.28	All	3	1668/2291	G vs A	1.13(1.03–1.24)	0.011	0	0.525	1.000	AAC	Weak
NOD2	rs2066847 (3020insC/-)	0.50	All	3	807/4078	carriers vs non-carriers	1.42(1.07–1.90)	0.017	0	0.593	1.000	× AC	Weak
SFTPB	wild type/ variation	5.83	All	3	157/240	variation vs wild	1.92(1.11–3.33)	0.020	0	0.960	0.296	CAB	Weak
SOD2	rs4880(T/C)	51.48	All	9	3738/4467	T vs C	1.20(1.06–1.36)	0.005	61	0.009	0.348	ACA	Weak
TERT	rs2736098(A/G)	33.01	All	7	4660/4825	A vs G	1.20(1.08–1.33)	0.001	67	0.006	0.548	ACB	Weak
UGT1A6	rs6759892(G/T)	25.10	All	3	266/261	G vs T	2.27(1.14–4.53)	0.020	84	0.002	1.000	BCA	Weak
XRCC1	rs1001581(T/C)	34.52	All	5	851/1166	T vs C	1.17(1.00–1.37)	0.044	28	0.232	0.221	ABC	Weak
XRCC1	rs1799782(T/C)	18.19	All	30	11096/13772	T vs C	0.90(0.82–0.98)	0.022	62	0.000	0.372	ACC	Weak
XRCC1	rs3213245(C/T)	11.03	All	5	2795/2865	C vs T	1.29(1.04–1.59)	0.020	68	0.014	0.806	ACC	Weak

Εικόνα 9: Γενετικοί πολυμορφισμοί που έχουν άμεση συσχέτιση με την εμφάνιση ΚΠ σε

μετα-ανάλυση υποομάδων με έντονες ή μέτριες σωρευτικές αποδείξεις. OR = ο λόγος της πιθανότητας, 95%CI = διάστημα εμπιστοσύνης 95%, ins = εισαγωγή, del = διαγραφή, CNV = αλλαγή του αριθμού των αντιγράφων, SCLC = μικροκυτταρικός ΚΠ, NSCLC = μη μικροκυτταρικός ΚΠ, AD = αδενοκαρκίνωμα, SCC = καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων. Η συσχέτιση με την εμφάνιση του ΚΠ με βάση τα στοιχεία κατηγοριοποιείται σε ισχυρή (strong), ενδιάμεση (moderate) και ασθενή (weak) (44).

Σημαντικό σημείο στα παραπάνω στοιχεία αποτελεί η παρατήρηση ότι στους άντρες ηλικίας άνω των 50 ετών, ο ΚΠ δεν συνδέεται με γενετική προδιάθεση, κάτι που παρατηρείται στους άντρες κάτω των 50 ετών (47). Παρ΄όλα αυτά ο αριθμός των ατόμων που διαγιγνώσκονται με ΚΠ σε ηλικία κάτω των 50 ετών είναι σχετικά μικρός και αποτελεί περίπου το 10% του συνολικού αριθμού των ασθενών (48).

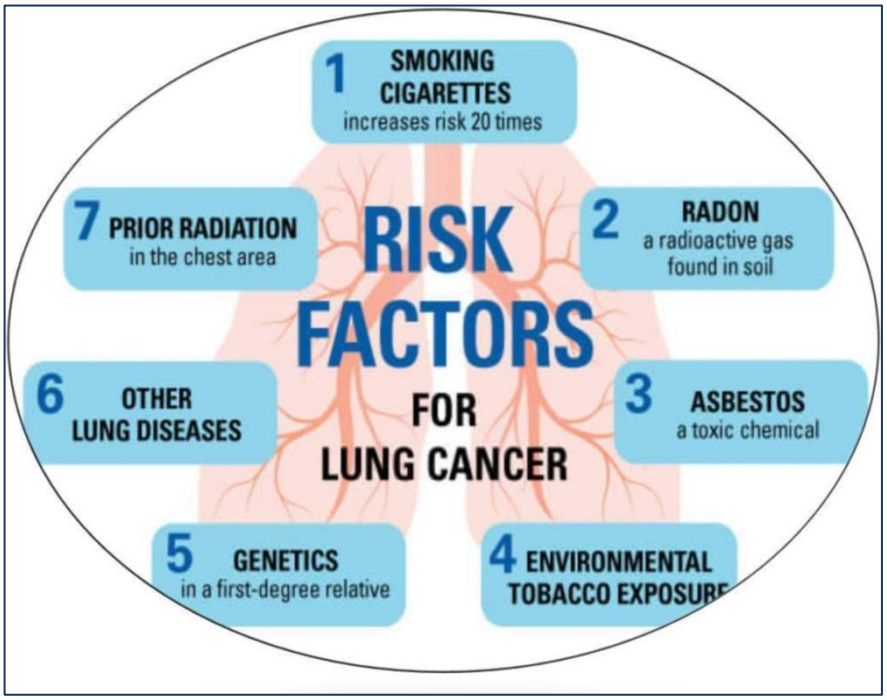
Τα τελευταία χρόνια, η πρωτοφανής εξέλιξη στην ανάλυση του γονιδιώματος στον καρκίνο του πνεύμονα έχει φέρει επανάσταση στην κατανόηση της νόσου σε μοριακό επίπεδο. Κατ΄ αρχήν, η ανάλυση ολόκληρων γονιδιακών οικογενειών (π.χ. κινασών και φωσφατασών τυροσίνης), ως τμήμα του προφίλ του μεταλλαγμένου DNA που αφορά γονίδια που συνδέονται με τον ΚΠ, αποκάλυψε σημαντικά στοιχεία σχετικά με τη μοριακή δομή της νόσου. Η ανακάλυψη μεταλλάξεων που σχετίζονται με τον καρκίνο προέρχεται από τη συστηματική επανεξέταση του γονιδιώματος του καρκινικού κυττάρου. Μία πρόσφατη μελέτη αποκάλυψε πάνω από 1000 σωματικές μεταλλάξεις, μετά από αλληλούχιση 623 γονιδίων με γνωστή ή πιθανή καρκινική δράση. Εντοπίστηκαν 26 γονίδια με σημαντικά υψηλούς ρυθμούς μεταλλαξιγένεσης, που ενδεχομένως να εμπλέκονται στην ογκογένεση (49). Άλλα γονίδια που εμφανίζουν συχνά μεταλλάξεις, περιλαμβάνουν τις κινάσες τυροσίνης, όπως ο EGFR, ομόλογο του ERBB4, και πολλαπλά γονίδια του υποδοχέα Ephrin, όπως τα EPHA3, VEGFR2 (KDR) και NTKR (50). Αυτές οι μελέτες παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τις

βασικές οδούς σηματοδότησης ως προς την ογκογένεση στον ΚΠ, οι οποίες μπορεί να χρησιμεύσουν ως νέοι μοριακοί στόχοι για την ανάπτυξη θεραπευτικών σχημάτων.

Κάποιες γενετικές αλλαγές, που σχετίζονται με την ανάπτυξη του ΚΠ, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 9 είναι μοναδικές για κάθε φυλή και ιστολογικό τύπο του ΚΠ. Έτσι, η μετα-ανάλυση του Wang έδειξε επίσης ότι στον Ασιατικό και Καυκάσιο πληθυσμό αναγνωρίζονται 26 και 19 πολυμορφισμοί, αντίστοιχα, που σχετίζονται με την εμφάνιση του ΚΠ. Όσον αφορά τον ιστολογικό υπότυπο, σημαντική συσχέτιση έχει βρεθεί με 25 πολυμορφισμούς για το υπότυπο NSCLC, 5 για τον SCLC, 15 για το AD, 8 για τον SCC, 3 κοινοί πολυμορφισμοί για τους υπότυπους NSCLC και SCLC και 4 κοινοί πολυμορφισμοί για τους υπότυπους AD και SCC (44).

Πέρα από το κάπνισμα, το οικογενειακό ιστορικό και το γενετικό υπόβαθρο, άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με την εμφάνιση του ΚΠ, είναι αυτοί που συνδέονται άμεσα με την καθημερινότητα και τον τρόπο ζωής του ατόμου. Έτσι, ο ΚΠ έχει συσχετιστεί με την κατανάλωση κόκκινου κρέατος (51), τη φτωχή διατροφή σε β καροτενοειδή (52) και τα χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D (53). Οι μελέτες που συσχετίζουν την εμφάνιση του ΚΠ με την κατανάλωση αλκοόλ και καφέ στηρίζονται κυρίως στο γεγονός ότι τα άτομα με αυτές τις συνήθειες, είναι κατά κύριο λόγο καπνιστές που έχουν συνδυάσει την κατανάλωση του ποτού και του καφέ με μεγάλο αριθμό τσιγάρων (54, 55). Κάποια νοσήματα, όπως η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (56), το άσθμα (57), η φυματίωση (58) και η μόλυνση από το στέλεχος *Chlamydia pneumoniae* (59), έχουν σχετιστεί επίσης με την εμφάνιση του ΚΠ.

Μελέτες που έχουν γίνει σε επιζώντες της ατομικής βόμβας και σε ασθενείς που έλαβαν ακτινοθεραπεία οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ΚΠ (5). Σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την εμφάνιση ΚΠ αποτελεί επίσης η έκθεση σε ραδιενεργό ραδόνιο. Τέτοια έκθεση έχει καταγραφεί σε εργάτες ορυχείων (60) και στο εσωτερικό περιβάλλον των κατοικιών (61). Η Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος των ΗΠΑ θεωρεί ότι η έκθεση σε ραδόνιο στο περιβάλλον του σπιτιού αποτελεί τον δεύτερο πιο σημαντικό παράγοντα στην εμφάνιση ΚΠ (5). Άλλα υλικά τα οποία έχουν σχετιστεί με τον ΚΠ είναι ο αμίαντος (62), το χρώμιο (63), το κάδμιο (64), το αρσενικό (65), το πυρίτιο (66), οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, π.χ. βενζίνη (67), τα μικροσωματίδια του αέρα (68) κ.α. (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα (https://www.nationaljewish.org/health-insights/health-infographics/lung-cancer-risk-factors)

Κεφάλαιο 3

Διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα

Τα συμπτώματα του καρκίνου του πνεύμονα είναι μη ειδικά και συνήθως εμφανίζονται σε προχωρημένο στάδιο της νόσου, καθώς 5-10% των ασθενών δεν εμφανίζουν κάποιο σύμπτωμα κατά την έναρξη της νόσου. Τα συνήθη συμπτώματα του καρκίνου του πνεύμονα περιλαμβάνουν βήχα (45-75%), αιμόπτυση, θωρακικό πόνο (25-50%), δύσπνοια, απώλεια όρεξης, απώλεια βάρους, πνευμονία, αίσθημα κακουχίας και αδυναμία. Πιο σπάνια, οι ασθενείς εμφανίζουν σύνδρομο Horner, όταν οι όγκοι εισβάλλουν στο θωρακικό τοίχωμα, σύνδρομο άνω κοίλης φλέβας (Superior Vena Cava Obstruction – SVCO) και παρανεοπλασματικά σύνδρομα που εμφανίζονται κυρίως σε ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (69). Στον Πίνακα 1 που ακολουθεί, αναφέρονται τα συμπτώματα του καρκίνου πνεύμονα κατά την αρχική κλινική εκτίμηση και η συχνότητα εμφάνισής τους.

Πίνακας 1: Συμπτώματα καρκίνου πνεύμονα κατά την αρχική κλινική εκτίμηση και συχνότητα εμφάνισης (70).

Συμπτώματα	Συχνότητα εμφάνισης (%)
Βήχας	8-75
Απώλεια βάρους	0-68
Δύσπνοια	3-60
Πόνος στο στήθος	20-49
Αιμόπτυση	6-35
Πόνος στα οστά	6-25
Πληκτροδακτυλία	0-20
Πυρετός	0-20
Αδυναμία	0-10
SVCO	0-4
Δυσφαγία	0-2
Συριγμός	0-2

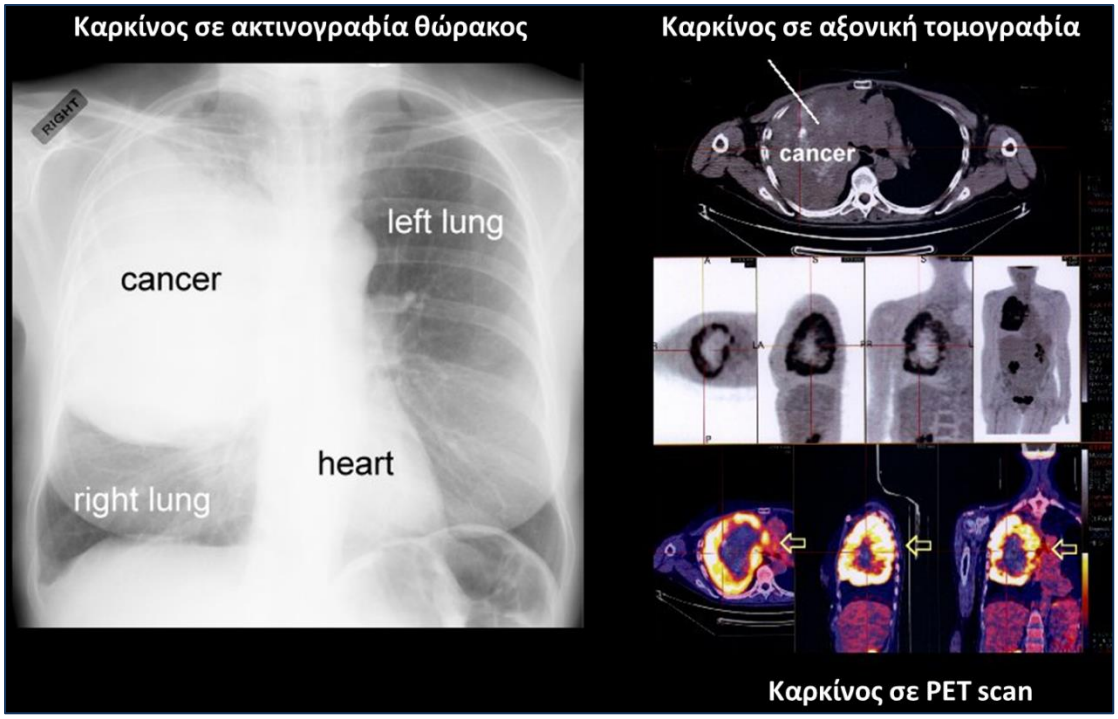
Όταν η κλινική εικόνα ενός ασθενή θέτει την υποψία κακοήθους όγκου του πνεύμονα πρέπει άμεσα να τεθεί η διάγνωση και να καθοριστεί η έκταση της νόσου, δηλαδή η σταδιοποίησή της. Η διάγνωση του ΚΠ βασίζεται συνήθως στη φυσική εξέταση, στα απεικονιστικά ευρήματα και στην ιστολογική ή κυτταρολογική ταυτοποίηση από δείγμα βιοψίας, κυτταρολογικό ή χειρουργικό υλικό.

Η ακτινογραφία θώρακος αποτελεί την πρώτη απεικονιστική μέθοδο για τη διάγνωση του ΚΠ λόγω του χαμηλού της κόστους, της χαμηλής έκθεσης στην ακτινοβολία και της υψηλής ευαισθησίας (Εικόνα 11) (71).

Η κύρια μέθοδος απεικόνισης για τη σταδιοποίηση του ΚΠ είναι η αξονική τομογραφία (CT) θώρακος με χορήγηση σκιαγραφικού μέσου και η CT άνω κοιλίας, έτσι ώστε να έχουμε εικόνα του ήπατος και των επινεφριδίων. Η μαγνητική τομογραφία (MRI) υπερέχει της αξονικής για τον έλεγχο του εγκεφάλου, όπως και για την εκτίμηση των όγκων της κορυφής του πνεύμονα (όγκοι pancoast) και προτιμάται για αυτό το λόγο. Η MRI επίσης εκτιμά καλύτερα τη διήθηση των μεγάλων αγγείων, της τραχείας, του θωρακικού τοιχώματος, του μυοκαρδίου και του διαφράγματος (Εικόνα 11) (72). Το σπινθηρογράφημα οστών με γ-camera (T99), ολοκληρώνει τη σταδιοποίηση και είναι απαραίτητο επί υποψίας επέκτασης της νόσου στα οστά.

Η ολοσωματική τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET) με 18-φθόριο-δεοξυγλυκόζη (F-18 FDG) χρησιμοποιείται ευρέως τα τελευταία χρόνια για τη διάγνωση και σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα (Εικόνα 11). Βασίζεται στον αυξημένο μεταβολισμό της γλυκόζης από τα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα υγιή. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε για τη διευκρίνηση του μονήρους όζου του πνεύμονα και κατά την αρχική σταδιοποίηση. Στη

συνέχεια όμως, οι ενδείξεις της διευρύνθηκαν ώστε να συνεισφέρει στη διάγνωση, σταδιοποίηση και επανασταδιοποίηση μετά από θεραπευτικούς χειρισμούς, τόσο για τον ΚΠ όσο και για άλλα νεοπλάσματα. Η χρήση του PET/CT στην αρχική σταδιοποίηση των ασθενών μειώνει τον αριθμό των άσκοπων θωρακοτομών (73) και θα πρέπει να επιλέγεται σε κάθε περίπτωση που προγραμματίζεται θεραπεία με σκοπό την ίαση.



Εικόνα 11: Απεικόνιση ΚΠ με ακτινογραφία, αξονική τομογραφία και PET scan.

Η ινοοπτική βρογχοσκόπηση (Εικόνα 12) αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για τον καθορισμό της διάγνωσης και του σχεδιασμού θεραπείας, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για κεντρικούς ενδοβρογχικούς όγκους. Ο συνδυασμός της βρογχικής έκπλυσης (washing), των ξεσμάτων (brushing) και της διαβρογχικής FNA/B (TBNA/B) μπορεί να έχει ευαισθησία στην ανίχνευση της κακοήθειας μέχρι και 88%. Ωστόσο, η ευαισθησία της μεθόδου συνδέεται άμεσα με το μέγεθος και τη θέση του όγκου. Έτσι, η ευαισθησία της μεθόδου στην ανίχνευση αλλοιώσεων μικρότερων των 2cm μειώνεται στο 34% (74).

Παρ΄όλα αυτά, η ανάπτυξη πιο εξελιγμένων και εύκαμπτων βρογχοσκοπίων με χρήση ενδοβρογχικού υπερήχου σε πραγματικό χρόνο (real-time EBUS-guided), βελτίωσε την ευαισθησία και την ειδικότητα της μεθόδου μειώνοντας παράλληλα το ποσοστό των επιπλοκών (75). Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της βρογχοσκόπησης με υπερήχους είναι η δυνατότητα σταδιοποίησης του μεσοθωρακίου με λήψη βιοψιών από σταθμούς λεμφαδένων, πυλαίων και μεσοθωρακικών, επιτυγχάνοντας με τον τρόπο αυτό τη διάγνωση και τη σταδιοποίηση ταυτόχρονα.

Εικόνα 12: Βρογχοσκόπηση που δείχνει τον ενδοτραχειακό όγκο (αριστερά) και μετά από χειρουργική αφαίρεσή του (δεξιά) (76).

Οι κλασσικές μέθοδοι βιοψίας, όπως η μεσοθωρακοσκόπηση και η ανοιχτή χειρουργική βιοψία παρέχουν μεγάλη ακρίβεια στο χαρακτηρισμό μίας αλλοίωσης, τείνουν όμως να εγκαταλειφθούν με την πρόοδο των βρογχοσκοπίων και τις EBUS τεχνικές. Ωστόσο, η βιοψία υπό αξονικό τομογράφο ενδείκνυται για την ιστολογική διάγνωση μιας περιφερικής πρωτοπαθούς ή δευτεροπαθούς εστίας, την επιβεβαίωση υποτροπής και την επιβεβαίωση μεταστάσεων σε ασθενείς οι οποίοι δεν δύνανται να υποβληθούν σε βρογχοσκόπηση, απλή ή με EBUS (Εικόνα 13).

Εικόνα 13: Αριστερά, εικόνα αξονικής τομογραφίας μετά την τοποθέτηση της βελόνας βιοψίας σε οζίδιο του δεξιού άνω λοβού. Δεξιά εικόνα υπερήχων μετά την τοποθέτηση της βελόνας βιοψίας.

Κεφάλαιο 4

Ιστολογική ταξινόμηση

Ο καρκίνος του πνεύμονα ταξινομείται σε δύο κύριες κατηγορίες, σύμφωνα με την ιστολογική εμφάνιση : στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) και στην ομάδα των νευροενδοκρινικών όγκων, στους οποίους υπάγεται ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (SCLC) (77, 78). Υπολογίζεται ότι ο NSCLC αντιπροσωπεύει περίπου το 75-90% των όγκων των πνευμόνων, ενώ ο SCLC το 10-25% (79). Ο NSCLC περιλαμβάνει αρκετούς υποτύπους, με διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά. Οι κύριοι υπότυποι του NSCLC περιλαμβάνουν το αδενοκαρκίνωμα (AD), τον καρκίνο από πλακώδη κύτταρα (SCC) και τον μεγαλοκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (LCLC) (77). Το αδενοκαρκίνωμα είναι ο πιο κοινός υπότυπος NSCLC, ιδιαίτερα μεταξύ των γυναικών (77). Ο δεύτερος πιο συχνός υπότυπος NSCLC που συναντάμε είναι ο SCC που αποτελεί το 20% έως 35% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα (77). Οι υπότυποί του είναι 3: κερατινοποιούμενο, μη-κερατινοποιούμενο και βασικοκυτταροειδές (basaloid).

Η ιστολογική κατηγοριοποίηση του SCC είναι γενικά απλή, καθώς χαρακτηρίζεται από εύκολα διακριτές περιοχές κερατινοποίησης και σχετιζόμενη φλεγμονώδη συνιστώσα. Λιγότερο διαφοροποιημένες μορφές, χωρίς κερατινοποίηση και με μικρότερα κύτταρα, μπορεί να ομοιάζουν με στρώματα βασικών κυττάρων του πλακώδους επιθηλίου. Σε αυτή την περίπτωση, μπορεί να απαιτηθεί ανοσοϊστοχημεία (IHC) για την ανίχνευση ειδικών τύπων, καθώς και η ανίχνευση νευροενδοκρινικών δεικτών (80).

Το αδενοκαρκίνωμα περιλαμβάνει μια μορφολογικά ετερογενή ομάδα όγκων που συνδέονται λιγότερο συχνά με το κάπνισμα σε σχέση με τον SCC. Ο τύπος καθορίζεται από την επικρατούσα μορφολογία (predominant pattern) και έχουν εισαχθεί οι όροι AIS (Adenocarcinoma *in situ*), MIA (Minimally Invasive Adenocarcinoma), οι υπότυποι λεπιδικός, κυψελιδοειδές, θηλώδες, μικροθηλώδες και συμπαγές, σε αντικατάσταση όρων της παλαιότερης ταξινόμησης του 2004 (77). Με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους μπορεί να είναι χαμηλού, ενδιάμεσου και υψηλού βαθμού κακοήθειας. Τα αδενοκαρκινώματα είναι δομημένα από αδένες με θηλώδεις δομές ή είναι συμπαγή και παράγουν βλέννα (80). Το βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα (BAC), που είναι συχνό σε γυναίκες που δεν καπνίζουν, εθεωρείτο υποκατηγορία του AD. Σύμφωνα με τη νέα ταξινόμηση των αδενοκαρκινωμάτων (2015) ο όρος βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα – BAC και μικτός υπότυπος AD έχει καταργηθεί. Τα πρώην μη-βλεννώδη BAC κατατάσσονται σε : μη βλεννώδη AIS, MIA, LPA (lepidic predominant AD). Τα πρώην βλεννώδη BAC κατατάσσονται σε : AIS, MIA και διηθητικό AD (77). Στην κλινική πράξη ωστόσο, έχει μεγάλη σημασία η καταγραφή της ετερογένειας των αδενοκαρκινωμάτων και της ταξινόμησης τους βάσει της κυρίαρχης μορφολογίας διότι παρέχονται πλέον σημαντικές πληροφορίες για την πρόγνωση και πρόβλεψη της ανταπόκρισης στις νέες στοχευμένες θεραπείες (80).

Ο LCLC είναι ο λιγότερο συχνός υπότυπος του NSCLC και στερείται τυποποιημένων μορφολογικών διαγνωστικών κριτηρίων. Στην πρόσφατη ταξινόμηση των υποτύπων του καρκίνου του πνεύμονα, τα ιστολογικά κριτήρια του LCLC διαφοροποιήθηκαν. Η διάγνωσή του γίνεται πλέον μόνο

από χειρουργικό παρασκεύασμα και εφόσον παραμένει αδιαφοροποίητο, ακόμα και μετά από την ανοσοϊστοχημική εξέταση. Έτσι, οι αδιαφοροποίητες πλειομορφικές με/ή σαρκωματώδεις αλλοιώσεις, μεταφέρθηκαν σε μια νέα ομάδα που χαρακτηρίζεται ως «σαρκωματώδες καρκίνωμα». Ο LCLC τώρα περιλαμβάνει σπανιότερους τύπους καρκίνου του πνεύμονα, όπως το βασαλοειδές, το λεμφοεπιθηλιακό, το ραβδοειδές, το διαυγοκυτταρικό και το νευροενδοκρινικό καρκίνωμα εκ μεγάλων κυττάρων (LCNEC). Οι περισσότερες περιπτώσεις, χωρίς σαφή σημάδια αδενικής ή πλακώδους διαφοροποίησης, αναφέρονται ως αναπλαστικά καρκινώματα. Επίσης, οι περισσότερες αδιαφοροποίητες περιπτώσεις LCLC, συνήθως επαναταξινομούνται ως AD ή SCC με βάση τα μοριακά τους χαρακτηριστικά (81).

Στους Πίνακες 2 και 3 που ακολουθούν, αναφέρεται η πιο πρόσφατη (2015) γενική ταξινόμηση των καρκινικών όγκων (Πίνακας 2) και η ταξινόμηση του NSCLC (Πίνακας 3) σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ. (77). Οι αλλαγές στην ταξινόμηση αφορούν στα παρακάτω: α) είναι απαραίτητη πλέον η χρήση της ανοσοϊστοχημείας για τη διάγνωση (TTF-1, Napsin A, p40, p63, cytokeratins, CD56, Chromogranine, Synaptophysin κλπ), β) είναι απαραίτητη η διερεύνηση και αξιολόγηση μοριακών και γενετικών αλλοιώσεων με έμφαση στην αντίστοιχη εξειδικευμένη και στοχευμένη θεραπεία (EGFR, EML4 ALK, ROS-1 κλπ), γ) απαιτείται πλέον διαφορετική προσέγγιση του βιοπτικού ή/και κυτταρολογικού υλικού από το χειρουργικό παρασκεύασμα, σύμφωνα με τις οδηγίες των IASLC/ATS/ERS. Βασιζόμενοι στα παραπάνω, όταν πρόκειται για βιοπτικό υλικό οι οντότητες AIS και MIA δεν μπορούν να τεκμηριωθούν, όπως επίσης και το καρκίνωμα από μεγάλα κύτταρα (LCLC) και το

αδενοπλακώδες τα οποία αποδίδονται με τον όρο NSCLC – NOS. Επίσης δεν μπορεί να τεκμηριωθεί το πλειόμορφο και περιγράφεται ως NSCLC με ατρακτόμορφα ή γιγάντια κύτταρα. Τέλος τα νευροενδοκρινή νεοπλάσματα ταξινομούνται πλέον σε μία ενιαία κατηγορία: μικροκυτταρικό, μεγαλοκυτταρικό, άτυπο καρκινοειδές, τυπικό καρκινοειδές και διάχυτη ιδιοπαθής πνευμονική νευροενδοκρινική υπερπλασία (DIPNECH).

Πίνακας 2: Ταξινόμηση των όγκων του πνεύμονα σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (79).

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΤΥΟΙ ΚΑΙ ΥΠΟΤΥΠΟΙ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ WHO 2015	
Επιθηλιακοί όγκοι	Θηλώματα
Αδενοκαρκίνωμα	Πλακώδες θηλώματα
Λεπιδικό αδενοκαρκίνωμα	Εξωφυσικό
Αδενοκαρκίνωμα ακινάρων	Ανεστραμμένο
Θηλώδες αδενοκαρκίνωμα	Αδενικό θήλωμα
Μικροθηλώδες αδενοκαρκίνωμα	Μικτά πλακώδη και αδενικά θηλώματα
Συμπαγές αδενοκαρκίνωμα	Αδενώματα
Διηθητικό βλενώδες αδενοκαρκίνωμα	Σκληρώδες πνευμονοκύτωμα
Μικτό διηθητικό βλεννο- και μη βλέννο-παραγωγό αδενοκαρκίνωμα	Κυψελιδικό αδένωμα
Κολλοειδές αδενοκαρκίνωμα	Θηλοειδές αδένωμα
Εμβρυϊκό αδενοκαρκίνωμα	Βλεννώδες Κυσταδένωμα
Εντερικό αδενοκαρκίνωμα	Αδένωμα του βλεννογόνου
Ελάχιστα διηθητικό αδενοκαρκίνωμα	**Μεσεγχυματικοί όγκοι**
Βλεννώδες	Πνευμονικο αμαρτωμα
Μη βλεννώδες	Χόνδρωμα
Προ-διηθητικές αλλοιώσεις	Όγκοι PEComatous
Άτυπη αδενοματώδης υπερπλασία	Λεμφαγγειοελοίωματομάτωση
Αδενοκαρκίνωμα in situ	PEComa, καλοήθες
Βλεννώδες	Όγκος διαυγών κυττάρων
Μη βλεννώδες	PEComa, κακοήθες
Πλακώδες καρκίνωμα	Συγγενής περιβρογχικός μυοϊνοβλαστικός όγκος
Κερατινοποιημένο πλακώδες καρκίνωμα	Διάχυτη πνευμονική λεμφαγγειομάτωση
Μη κερατινοποιημένο πλακώδες καρκίνωμα	Φλεγμονώδης μυοϊνοβλαστικός όγκος
Βασαλοειδές πλακώδες καρκίνωμα	Επιθηλιοειδές αιμαγγειοενδοθηλίωμα
Προ-διηθητικές αλλοιώσεις	Πλευροπνευμονικό βλάστωμα
Πλακώδες καρκίνωμα in situ	Αρθρικό σάρκωμα
Νευροενδοκρινικοί όγκοι	Σάρκωμα πνευμονικής αρτηρίας
Μικροκυτταρικό καρκίνωμα	Πνευμονικό μυξοειδές σάρκωμα με μετατόπιση EWSR1-CREB1
Συνδυασμένο μικροκυτταρικό καρκίνωμα	Μυοεπιθηλιακοί όγκοι
Μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα	Μυοεπιθηλίωμα
Συνδυασμένο μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα	Μυοεπιθηλιακό καρκίνωμα
Καρκινοειδείς όγκοι	**Λεμφοιστιοκυτταρικοί όγκοι**
Τυπικοί καρκινοειδείς όγκοι	Εξωλεμφαδενικό λέμφωμα οριακής ζώνης του βλεννογόνου
Άτυποι καρκινοειδείς όγκοι	Λεμφοειδής ιστός (λέμφωμα MALT)
Προ-διηθητικές αλλοιώσεις	Διάχυτο μεγαλοκυτταρικό λέμφωμα
Διάχυτη ιδιοπαθής πνευμονο-νευροενδοκρινική κυτταρική υπερπλασία	Λεμφωματώδης κοκκιωμάτωση
Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα	Ενδοαγγειακό λέμφωμα μεγάλων Β κυττάρων
Αδενοπλακώδες καρκίνωμα	Πνευμονική ιστιοκυττάρωση κυττάρων Langerhans
Σαρκωματώδες καρκίνωμα	Ασθένεια Erdheim–Chester
Πλειομορφικό καρκίνωμα	**Όγκοι έκτοπης προέλευσης**
Καρκίνωμα ατρακτοειδών κυττάρων	Όγκοι γεννητικών κυττάρων
Καρκίνωμα γιγαντοκυττάρων	Τεράτωμα, ώριμο
Καρκινοσάρκωμα	Τεράτωμα, ανώριμο
Πνευμονικό βλαστωμα	Ενδοπνευμονικό θυμόμα
Άλλα και μη ταξινομημένα καρκινώματα	Μελανώμα
Καρκίνωμα τύπου λεμφοεπιθηλιώματος	Μηνιγγίωμα, NOS
Καρκίνωμα NUT	**Μεταστατικοί όγκοι**
Όγκοι τύπου σιελογόνων αδένων	
Βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα	
Αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα	
Επιθηλιακό-μυοεπιθηλιακό καρκίνωμα	
Πλειομορφικό αδένωμα	

Πίνακας 3: Ταξινόμηση του ΚΠ σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (77).

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ NSCLC ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ WHO (2015)	
Ιστολογικοί τύποι NSCLS & υπότυποι	**Κωδικός ICDO**
Επιθηλιακοί όγκοι	
Αδενοκαρκίνωμα	8140/3
λεπιδικό αδενοκαρκίνωμα	8250/3
κυψελοειδές αδενοκαρκίνωμα	8551/3
θηλώδες αδενοκαρκίνωμα	8260/3
μικροθηλώδες αδενοκαρκίνωμα	8265/3
συμπαγές αδενοκαρκίνωμα	8230/3
διηθητικό βλεννογόνο αδενοκαρκίνωμα	8253/3
μεικτού τύπου διηθητικό βλεννογόνο & μη βλεννογόνο αδενοκαρκίνωμα	8254/3
κολλοειδές αδενοκαρκίνωμα	8480/3
εμβρυϊκό αδενοκαρκίνωμα	8333/3
εντερικό αδενοκαρκίνωμα	8144/3
ελάχιστα διηθητικό αδενοκαρκίνωμα	
μη βλεννοπαραγωγό	8256/3
βλεννοπαραγωγό	8257/3
προ-διηθητικές αλλοιώσεις	
άτυπη αδενοματοειδής υπερπλασία	8250/0
αδεκοκακρίνωμα *in situ*	
μη βλεννοπαραγωγό	8250/2
βλεννοπαραγωγό	8253/2
Καρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου	8070/3
κερατινοποιημένο καρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου	8071/3
μη κερατινοποιημένο καρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου	8072/3
βασαλοειδές καρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου	8083/3
προ-διηθητικές αλλοιώσεις	
καρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου *in situ*	8070/2
Νευροενδοκρινικοί όγκοι	
μικροκυτταρικό καρκίνωμα	8041/3
μεικτό μικροκυτταρικό καρκίνωμα	8045/3
μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα	8013/3
μεικτό μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα	8013/3
καρκινοειδείς όγκοι	
τυπικοί καρκινοειδείς όγκοι	8240/3
άτυποι καρκινοειδείς όγκοι	8249/3
προ-διηθητικές αλλοιώσεις	
διάχυτη ιδιοπαθής πνευμονική νευροενδοκρινής κυτταρική υπερπλασία	8040/0
μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα	8012/3
αδενοπλακώδες καρκίνωμα	8560/3
σαρκοματώδη καρκινώματα	
πλειομορφικό καρκίνωμα	8022/3
καρκίνωμα ατρακτοκυττάρων	8032/3
καρκίνωμα γιγαντοκυττάρων	8031/3
καρκινοσάρκωμα	8980/3
πνευμονικό βλάστωμα	8972/3
μη κατηγοριοποιημένα καρκινώματα	
λεμφοεπιθηλιακού τύπου καρκίνωμα	8082/3
καρκίνωμα NUT	8023/3
καρκίνωμα σιελογόνου τύπου	
βλεννοεπιδερμικό καρκίνωμα	8430/3
αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα	8200/3
επιθηλιακό μυοεπιθηλιακό καρκίνωμα	8562/3
πλειομορφικό αδένωμα	8940/0

Κεφάλαιο 5

Σύστημα σταδιοποίησης του καρκίνου του πνεύμονα

Το σύστημα σταδιοποίησης του καρκίνου του πνεύμονα βασίζεται στην κλινική ταξινόμηση των παραγόντων TNM. Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν την αριθμητική εκτίμηση της ανατομικής έκτασης της νόσου σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά του πρωτοπαθούς όγκου (T), την προσβολή των επιχώριων λεμφαδένων (N) και την παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (M). Το 2015, η νέα ταξινόμηση του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα, που προτάθηκε από τη Διεθνή Ένωση για τη Μελέτη του Καρκίνου του Πνεύμονα (International Association for the Study of Lung Cancer - IASLC), την Αμερικανική Εταιρεία Θώρακος (American Thoracic Society - ATS) και την Ευρωπαϊκή Πνευμονολογική Εταιρεία (European Respiratory Society - ERS) το 2011 (82), έγινε αποδεκτή από τον Π.Ο.Υ. και περιλαμβάνεται στην πιο πρόσφατη αναφορά της σχετικά με την παθολογία των θωρακικών κακοηθειών (83). Ένα χρόνο αργότερα, η όγδοη έκδοση της ταξινόμησης των όγκων, των λεμφαδένων και των μεταστάσεων (TNM) δημοσιεύθηκε από κοινού από την Διεθνή Ένωση κατά του Καρκίνου (Union for International Cancer Control - UICC), την Αμερικανική Μεικτή Επιτροπή για τον Καρκίνο (American Joint Committee on Cancer - AJCC) και την Διεθνή Ένωση για τη Μελέτη του Καρκίνου του Πνεύμονα (International Association for the Study of Lung Cancer - IASLC) (84). Σύμφωνα με αυτή, η κατηγοριοποίηση των όγκων του πνεύμονα καθορίζεται από το μέγεθος του όγκου, ενώ εισήχθη η έννοια του αδενοκαρκινώματος *in situ* (Adenocarcinoma *in situ* - AIS) και του ελάχιστα διηθητικού αδενοκαρκινώματος (Minimal

Invasive Adenocarcinoma - MIA). Παράλληλα αναφέρεται στον τρόπο μέτρησης του μεγέθους του όγκου, την επαναταξινόμηση ορισμένων υποκατηγοριών, τη συνάφεια της ποσοτικής εκτίμησης της εμφάνισης κακοήθους δορυφορικού όζου, την υποκατηγοριοποίηση των εξωθωρακικών μεταστάσεων και την επαναομαδοποίηση διαφόρων σταδίων (85).

Η κλινική σταδιοποίηση (cTNM, cStage) βασίζεται στις πληροφορίες που συλλέγονται για την κλινική κατάσταση του ασθενούς πριν τη χορήγηση θεραπείας. Η παθολογοανατομική σταδιοποίηση (pTNM, pStage) βασίζεται στα αποτελέσματα της παθολογοανατομικής εξέτασης του παρασκευάσματος που αφαιρέθηκε από τον ασθενή κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης και είναι ακριβέστερη, όσον αφορά τον προσδιορισμό της έκτασης του όγκου και της προσβολής των επιχώριων λεμφαδένων. Τέλος, η σταδιοποίηση για την επανέναρξη θεραπείας (rTNM, rStage-retreatment staging) έχει ως στόχο την εκτίμηση της εξέλιξης της νόσου μετά από την αρχική θεραπεία και είναι χρήσιμη για την επιλογή των επόμενων θεραπευτικών χειρισμών (86).

Η 8^{η} έκδοση της TNM ταξινόμησης για τον καρκίνο του πνεύμονα περιλαμβάνει στοιχεία από 77.156 περιστατικά, από τα οποία τα 70.967 αφορούσαν NSCLC και τα 6.189 SCLC (83). Τα νέα δεδομένα και οι αλλαγές που προκύπτουν από την 8η έκδοση είναι :

α) το μέγεθος του όγκου προσδιορίζεται από τη μεγαλύτερη διάσταση του συμπαγούς μέρους, σύμφωνα με την αξονική τομογραφία ή του χωροκατακτητικού τμήματος της βλάβης. Το στάδιο T1 υποδιαιρείται πλέον σε T1a και T1b. Τα στάδια T2, T3 και T4 ορίζονται από διαστάσεις όγκων 3, 5 και 7 εκ. αντίστοιχα.

β) δορυφόροι όζοι στον ίδιο λοβό του πνεύμονα ταξινομούνται πλέον ως T3 ενώ σε διαφορετικούς λοβούς αλλά ομόπλευρα ως T4.

γ) οι όγκοι που εισβάλλουν στο σπλαχνικό υπεζωκότα και οι όγκοι, ασχέτως της απόστασής τους από την κύρια τρόπιδα της τραχείας ή τη συνυπάρχουσα ατελεκτασία, υποβαθμίστηκαν στην κατηγορία T2,

δ) οι όγκοι που περιλαμβάνουν το διάφραγμα ανήκουν πλέον στην κατηγορία T4, όπως και οι όγκοι της κορυφής.

ε) η πλευριτική ή περικαρδιακή συλλογή ταξινομείται πλέον ως M1a. Οι όγκοι που εμπλέκουν μονήρη εξωθωρακική θέση ταξινομούνται ως M1b ενώ αυτοί που εμπλέκουν πολλαπλές θέσεις ταξινομούνται ως M1c (89).

Οι κατηγορίες T παρουσιάζονται στους Πίνακες 4 και 5 μαζί με τις προτάσεις για τις κατηγορίες N και M (87).

Πίνακας 4: Ταξινόμηση TNM σύμφωνα με την 8η έκδοση (88).

	T (primary tumor)
T0	No primary tumor
Tis	Carcinoma in situ (squamous or adenocarcinoma)
T1	Tumor ≤3 cm
T1mi	Minimally invasive adenocarcinoma
T1a	Superficial spreading tumor in central airways*
T1a	Tumor ≤1 cm
T1b	Tumor >1 but ≤2 cm
T1c	Tumor >2 but ≤3 cm
T2	Tumor >3 but ≤5 cm or tumor involving: visceral pleura,† main bronchus (not carina), atelectasis to hilum†
T2a	Tumor >3 but ≤4 cm
T2b	Tumor >4 but ≤5 cm
T3	Tumor >5 but ≤7 cm or invading chest wall, pericardium, phrenic nerve; or separate tumor nodule(s) in the same lobe
T4	Tumor >7 cm or tumor invading: mediastinum, diaphragm, heart, great vessels, recurrent laryngeal nerve, carina, trachea, esophagus, spine; or tumor nodule(s) in a different ipsilateral lobe
	N (regional lymph nodes)
N0	No regional node metastasis
N1	Metastasis in ipsilateral pulmonary or hilar nodes
N2	Metastasis in ipsilateral mediastinal or subcarinal nodes
N3	Metastasis in contralateral mediastinal, hilar, or supraclavicular nodes
	M (distant metastasis)
M0	No distant metastasis
M1a	Malignant pleural or pericardial effusion‡ or pleural or pericardial nodules or separate tumor nodule(s) in a contralateral lobe
M1b	Single extrathoracic metastasis
M1c	Multiple extrathoracic metastases (1 or >1 organ)

Πίνακας 5: Σταδιοποίηση με βάση το σύστημα TNM (8η έκδοση) (88).

T/M	Subcategory	N0	N1	N2	N3
T1	T1a	IA1	IIB	IIIA	IIIB
	T1b	IA2	IIB	IIIA	IIIB
	T1c	IA3	IIB	IIIA	IIIB
T2	T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB
	T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3	T3	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
T4	T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
M1	M1a	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1b	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1c	IVB	IVB	IVB	IVB

Κεφάλαιο 6

Παθογένεια του καρκίνου πνεύμονα

Η ογκογένεση πολλαπλών σταδίων, η οποία χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη όγκων μέσω μιας σειράς προοδευτικών παθολογικών αλλαγών (προνεοπλασματικές αλλαγές) με αντίστοιχες γενετικές και επιγενετικές ανωμαλίες, είναι χαρακτηριστική πολλών τύπων καρκίνου, όπως του δέρματος (89), του πνεύμονα (90) και του παχέος εντέρου (91). Η υπερπλασία, η πλακώδης μετάπλαση, η δυσπλασία πλακωδών κυττάρων και το καρκίνωμα *in situ* (Carcinoma in situ - CIS) αποτελούν χαρακτηριστικές αλλοιώσεις των μεγάλων αεραγωγών που προηγούνται ή συνοδεύουν το πλακώδες καρκίνωμα. Η δυσπλασία των πλακωδών κυττάρων χαρακτηρίζεται συνήθως από διαφορετικής έντασης αλλοιώσεις, ήπιες, μέτριες και σοβαρές, που καθορίζονται με βάση τις άτυπες μεταβολές που παρατηρούνται μετά από κυτταρολογική και ιστολογική εξέταση (92). Οι διαδοχικές προνεοπλασματικές παθολογικές και μοριακές μεταβολές που εμφανίζονται στον SCC καταδεικνύουν μία βαθμιαία ανάπτυξη σε αυτόν τον υπότυπο ΚΠ (93). Από την άλλη, μελέτες έχουν δείξει ότι η συσσώρευση μοριακών ανωμαλιών, πέρα από ένα συγκεκριμένο όριο, είναι η βάση για την ανάπτυξη του κακοήθους φαινοτύπου και όχι η αλληλουχία των αλλαγών που παρατηρούνται (94). Για παράδειγμα, διαδοχικές προνεοπλασματικές αλλαγές δεν έχουν καταγραφεί επαρκώς για τα αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα, νευροενδοκρινείς όγκους και στο μικροκυτταρικό καρκίνωμα. Η άτυπη αδενωματώδης υπερπλασία (Atypical Adenomatous Hyperplasia - AAH) είναι το μόνο στάδιο μορφολογικής αλλαγής που έχει αναγνωριστεί μέχρι σήμερα

στο αδενοκαρκίνωμα (95). Η διάχυτη ιδιοπαθής πνευμονική νευροενδοκρινής κυτταρική υπερπλασία (Diffuse Idiopathic Pulmonary Neuroendocrine Cell Hyperplasia - DIPNECH), μια σπάνια αλλοίωση των πνευμόνων που περιλαμβάνει τοπικό εξωκυτταρικό πολλαπλασιασμό υπό μορφή όγκων, θεωρείται ότι αποτελεί την πρόδρομη βλάβη για την εμφάνιση των νευροενδοκρινικών καρκινωμάτων του πνεύμονα (96). Παρόλα αυτά δεν έχουν αναγνωριστεί προνεοπλασματικές αλλοιώσεις για τον πιο συνηθισμένο τύπο νευροενδοκρινικών πνευμονικών όγκων, το μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα. Η κατανόηση των πρώιμων συμβάντων στην παθογένεια του καρκίνου του πνεύμονα θα μας επιτρέψει να κατανοήσουμε τον τρόπο με τον οποίο προκύπτει ο κακοήθης φαινότυπος του πνεύμονα. Σε αυτά τα γεγονότα θα αναφερθούμε στη συνέχεια για κάθε τύπο ΚΠ.

6.1. Μοριακή παθογένεια αδενοκαρκινώματος (AD)

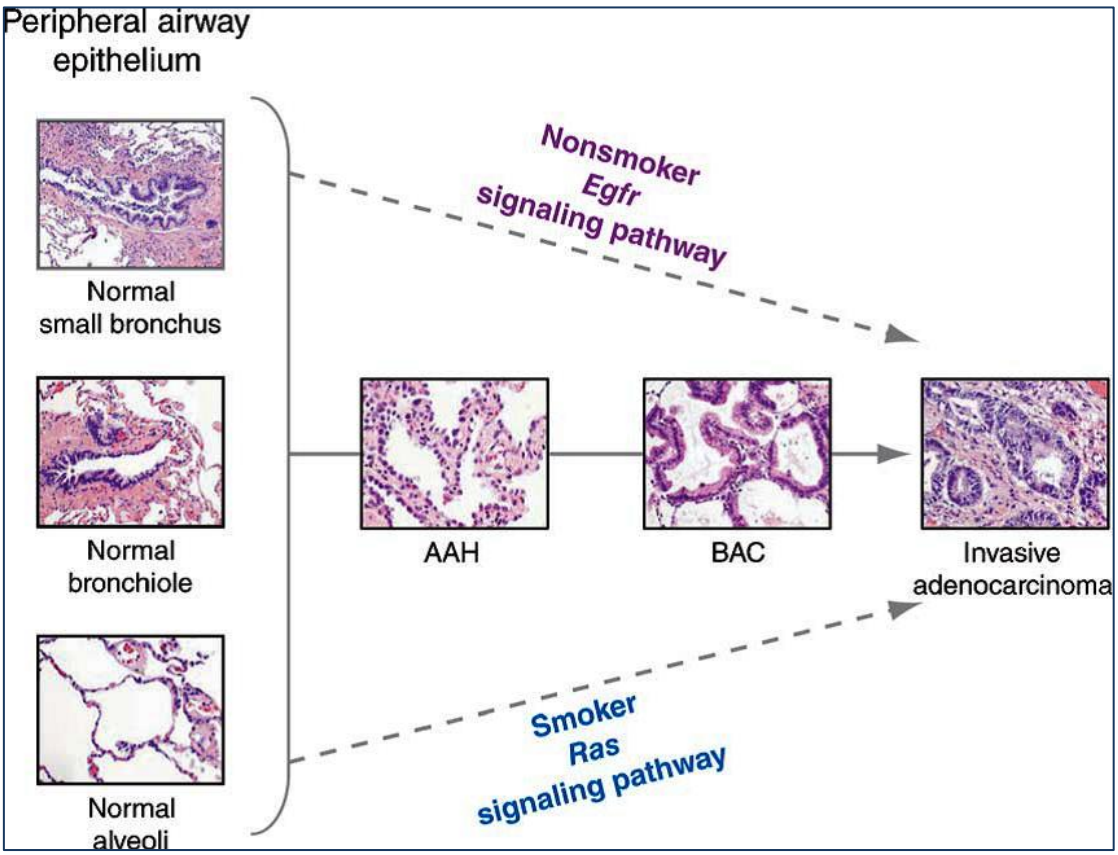
Δύο μοριακές οδοί εμπλέκονται κυρίως στην ανάπτυξη του AD, το μονοπάτι KRAS στους καπνιστές και του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) σε μη καπνιστές ασθενείς, αντίστοιχα (Εικόνα 14). Οι μεταλλάξεις στον EGFR, ιδιαίτερα οι εντός πλαισίου ελλείψεις στο εξόνιο 19 και οι L858R και L861Q πολυμορφισμοί στο εξόνιο 21, σχετίζονται άμεσα με την εμφάνιση αδενοκαρκινώματος σε μη καπνιστές, σε γυναίκες και σε ασιάτες (97). Από την άλλη, οι μεταλλάξεις στο KRAS γονίδιο σχετίζονται με την ανάπτυξη AD στους καπνιστές (98).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η άτυπη αδενωματώδης υπερπλασία (AAH) είναι η ιστολογική αλλαγή που έχει εντοπιστεί μέχρι σήμερα και που σχετίζεται με την ανάπτυξη AD (95). Μελέτες αναφέρουν ότι τόσο τα κύτταρα Clara όσο και τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II (AT2) είναι τα προγονικά

κύτταρα των ADs (99). Λόγω της δυσκολίας στη διάκριση μεταξύ ΑΑΗ και βρογχοκυψελιδικού καρκινώματος (Bronchoalveolar carcinoma - BAC), οι νέες οδηγίες για την ταξινόμηση του AD, αντικατέστησαν την ορολογία BAC, με την ορολογία *in situ* αδενοκαρκινώματος (AIS) (82). Μελέτες σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα στην Ανατολική Ασία αναφέρουν ότι τα περισσότερα, αν όχι όλα, τα περιφερικά αδενοκαρκινώματα μεταφέρονται από τις κυψελίδες μέσω της μορφής ΑΑΗ ως προνεοπλασματική αλλοίωση (98). Από την άλλη, άλλες μελέτες πρότειναν ότι τα αδενοκαρκινώματα μπορεί να προκύψουν από το βρογχιολικό επιθήλιο και τους μικρούς βρόγχους, βασιζόμενοι στην εύρεση μεταλλάξεων του EGFR (π.χ. EGFR p.L858R) σε βρογχιόλια που συνορεύουν με αδενοκαρκινώματα θετικά για EGFR μεταλλάξεις (100).

Έχουν βρεθεί κοινές μοριακές αλλοιώσεις μεταξύ του AD και της ΑΑΗ που επιβεβαιώνουν την άποψη ότι η ΑΑΗ αποτελεί προνεοπλασματική αλλοίωση κατά την παθογένεια του AD (101). Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει ότι το 30 με 40% των ΑΑΗ εμφανίζουν μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 του KRAS (102). Επιπλέον, έχουν αναφερθεί κοινές μεταλλάξεις στον EGFR με παρόμοιες συχνότητες μεταξύ ΑΑΗ, AIS και AD (103). Άλλες μοριακές αλλοιώσεις που έχουν εντοπιστεί σε ΑΑΗ περιλαμβάνουν υπερέκφραση της κυκλίνης D1 (95), της survivin (104), των ERBB2 ογκοπρωτεΐνών (105), απώλεια ετεροζυγωτίας στα χρωμοσώματα 3p (18%), 9p (CDKN2A), 9q (1/TSC1), 17q και 17p (TP53) (92), μειωμένη έκφραση της ογκοκατασταλτικής κινάσης 11 (LKB1) (106) και DNA μεθυλίωση της CDKN2A και της PTPRN2 (107). Τέλος, μελέτες έχουν επίσης δείξει αυξημένα επίπεδα έκφρασης του TITF-1 τόσο σε ΑΑΗ όσο και σε AIS (108). Αν και στον φυσιολογικό ιστό ο

ρόλος του παράγοντα αυτού σχετίζεται με τη μορφογένεση του θυρεοειδή αδένα, των πνευμόνων και του διεγκεφάλου, στο αδενοκαρκίνωμα ο ρόλος του φαίνεται να σχετίζεται με ογκογόνο δράση (98).



Εικόνα 14: Έχουν αναγνωριστεί δύο μοριακές οδοί που εμπλέκονται στην ανάπτυξη του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα, το μονοπάτι KRAS στους καπνιστές και το μονοπάτι του EGFR στους μη καπνιστές. AAH:άτυπη αδενωματώδης υπερπλασία, BAC:βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα (92).

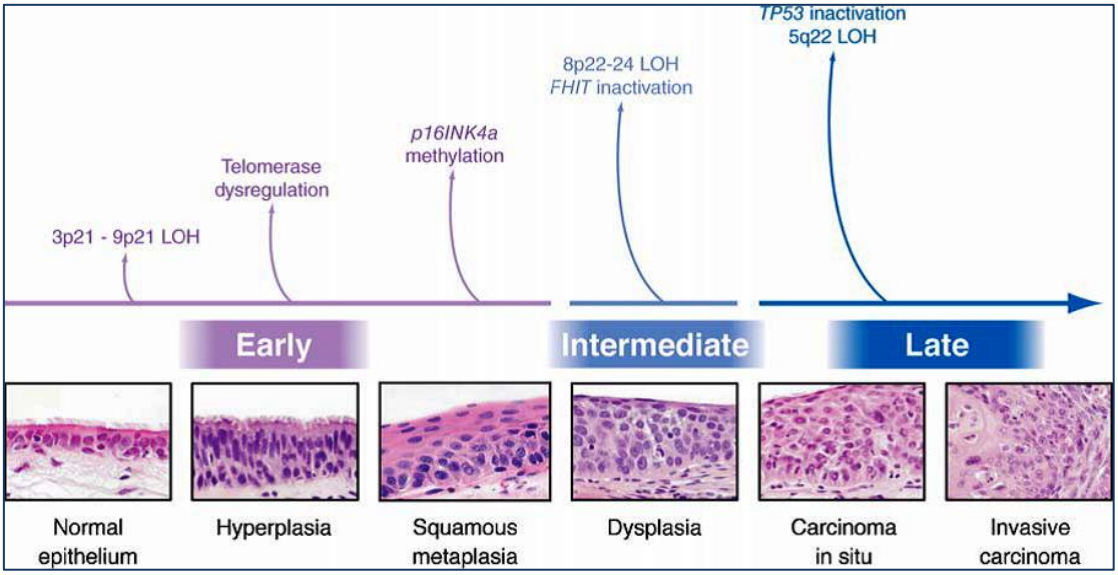
6.2. Μοριακή παθογένεια του καρκίνου εκ πλακωδών κυττάρων του επιθηλίου του πνεύμονα (SCC)

Έχει αποδειχθεί ότι τα βασικά κύτταρα στους μεγάλους αεραγωγούς παρουσιάζουν πολυδύναμη ικανότητα μετά την έκθεση στον καπνό του τσιγάρου, επάγοντας το σχηματισμό μεταπλαστικών και δυσπλαστικών πλακωδών κυττάρων (Εικόνα 15). Αυτά με την σειρά τους αποτελούν πρόδρομα καρκινώματα των πλακωδών κυττάρων (92). Προηγούμενες μελέτες που αποσκοπούσαν στη μελέτη των διαδοχικών μοριακών

ανωμαλιών που παρουσιάζονται στον SCC, έδειξαν ότι οι γενετικές ανωμαλίες πρωτοεμφανίζονται σε ιστολογικά φυσιολογικό επιθήλιο και αυξάνουν με την πρόοδο των ιστοπαθολογικών μεταβολών (93). Ελλείμματα σε πολλαπλές θέσεις στα αλλήλια των χρωμοσωμάτων 3p (3p21, 3p14, 3p22-24 και 3p12) και 9p21 (CDKN2A) ανιχνεύτηκαν σε φυσιολογικά μορφολογικά βρογχικά επιθήλια και θεωρήθηκαν ως οι πρώτες αλλαγές στην παθογένεια του SCC (93). Παράλληλα, σε πλακώδεις προ-επεμβατικές αλλοιώσεις ανιχνεύτηκε ανισορροπία στα αλλήλια 8p21-23, 13q14 (RB1) και 17p13 (TP53) (93, 109). Πρώιμο συμβάν στην εμφάνιση του SCC αποτελεί και η μεθυλίωση της CDKN2A που αυξάνεται με την εξέλιξη του νοσήματος (110). Σε σχέση με τον VEGF και τον υποδοχέα του (VEGFR), έχουν αναφερθεί υψηλά επίπεδα έκφρασής τους στο παθολογικό πλακώδες επιθήλιο των βρόγχων, σε σχέση με το φυσιολογικό (111). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει, σε κάποιο βαθμό, την άποψη ότι η αγγειογένεση επάγεται νωρίς στον καρκίνο του πνεύμονα και μπορεί να αποτελέσει ένα νέο πεδίο στην ανάπτυξη χημειοπροστατευτικών φαρμάκων.

Η έκφραση του ογκογονιδίου SOX2, έχει συσχετιστεί άμεσα με την εμφάνιση του SCC. Η έκφρασή του επάγεται σε SCC, προάγοντας έτσι την διατήρηση των όγκων (112). Συγκεκριμένα τα επίπεδα έκφρασης του SOX2 είναι αυξημένα μόνο σε υψηλού βαθμού βρογχικές δυσπλασίες και όχι σε χαμηλού και ενδιάμεσου βαθμού (113). Αντίθετα, ο Yuan και οι συνεργάτες του, απέδειξαν ότι η έκφραση της SOX2 πρωτεΐνης ήταν πολύ χαμηλή σε αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα (114). Έτσι φαίνεται ότι το ογκογονίδιο SOX2 συμμετέχει στην πρώιμη παθογένεια του SCC, όπως ο NKX2-1 στην παθογένεια του AD. Τέλος σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των προ-

κακοηθών βλαβών των πλακωδών κυττάρων του επιθηλίου του πνεύμονα φαίνεται να παίζει η καταστολή της έκφρασης των ογκοκατασταλτικών γονιδίων RNF20, SSBP2 και TP53 που συνοδεύεται από επαγωγή της έκφρασης των ογκογονιδίων RASGRP3 και MYC, αντίστοιχα (115, 116). Η παρατήρηση αυτή καθιστά την έκφραση των συγκεκριμένων παραγόντων ως δυνητικούς βιοδείκτες για την εμφάνιση του SCC.



Εικόνα 15: Ιστοπαθολογικές και μοριακές μεταβολές κατά τη διάρκεια της παθογένειας του πλακώδους καρκινώματος του πνεύμονα με αναφορά στις μοριακές μεταβολές που πρωτοεμφανίζονται στα πρώιμα στάδια του καρκινώματος και σε ιστολογικά φυσιολογικό αναπνευστικό επιθήλιο. LOH : απώλεια ετεροζυγωτίας (92).

6.3. Μοριακή παθογένεια του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (SCLC)

Σε αντίθεση με τα AD και SCC μέχρι σήμερα, δεν έχει αναφερθεί κάποια φαινοτυπικά αναγνωρίσιμη προνεοπλασματική αλλοίωση στον SCLC. Μια μελέτη που αξιολόγησε την απώλεια ετεροζυγωτίας και την αστάθεια των μικροδορυφόρων σε ιστολογικά φυσιολογικά και υπερπλαστικά βρογχικά επιθήλια, που γειτονεύουν με όγκους του πνεύμονα, κατέδειξε σημαντικά υψηλότερη συχνότητα μεταβολών σε επιθήλια που συνορεύουν με SCLC σε σχέση με αυτά που γειτονεύουν με NSCLCs (117). Τα ευρήματα δείχνουν εκτεταμένη μοριακή βλάβη σε φυσιολογικούς ιστούς που περιβάλλουν τα

SCLCs και υποδηλώνουν ότι το SCLC μπορεί να αναπτυχθεί απευθείας από ιστολογικά φυσιολογικό ή ελαφρώς αλλοιωμένο επιθήλιο χωρίς να διέλθει από μια πιο σύνθετη ιστολογική αλληλουχία. Μελέτες σχετίζουν την ανάπτυξη του SCLC με αδρανοποίηση των TP53 και RB1, την ενεργοποίηση του μονοπατιού hedgehog, την επαγωγή του EGFR1 (118, 119) καθώς και με μεταλλάξεις στους τροποποιητές ιστονών CREBBP, EP300 και MLL (120).

Κεφάλαιο 7

Θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα

Η θεραπεία αντιμετώπισης του ΚΠ εξαρτάται από το στάδιο TNM του όγκου καθώς και από τη γενική κατάσταση του ασθενούς. Επιπλέον, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η συνοσηρότητα και ιδιαίτερα οι παθήσεις που σχετίζονται με το αναπνευστικό και καρδιαγγειακό σύστημα.

7.1. Χειρουργική επέμβαση

Οι χειρουργικές τεχνικές εξαίρεσης του όγκου περιλαμβάνουν τη σφηνοειδή εκτομή, την τμηματεκτομή, την τυπική λοβεκτομή, τη λοβεκτομή δίκην περιχειρίδος (sleeve lobectomy), την πνευμονεκτομή τυπική ή ενδοπερικαρδιακή, την εκτομή πνεύμονα με αφαίρεση τμήματος του θωρακικού τοιχώματος και την πνευμονεκτομή δίκην περιχειρίδος (sleeve pneumonectomy). Περιορισμένες εκτομές, όπως η τμηματεκτομή και η σφηνοειδής εκτομή, συνδέονται με τριπλάσια αύξηση της τοπικής υποτροπής και 30% υψηλότερη θνησιμότητα. Τα τελευταία χρόνια εφαρμόζονται λιγότερο επεμβατικές μέθοδοι, όπως είναι η video θωρακοσκόπηση (VATS), η οποία συντομεύει το χρόνο παραμονής στο νοσοκομείο και έχει μικρότερη νοσηρότητα.

Η επιλογή του τύπου της επέμβασης που θα πραγματοποιηθεί είναι συνάρτηση του σταδίου της νόσου, της γενικής κατάστασης του ασθενούς, της αναπνευστικής του επάρκειας και των καρδιαγγειακών του εφεδρειών. Απαραίτητη προϋπόθεση για χειρουργική εξαίρεση του όγκου αποτελεί η επαρκής πνευμονική λειτουργία.

Η χειρουργική επέμβαση αποσκοπεί στην ίαση και είναι η κύρια επιλογή θεραπείας, εφόσον δεν υπάρχουν κλινικές αντενδείξεις, στα στάδια IA έως IIB. Η λοβεκτομή με συστηματικό λεμφαδενικό καθαρισμό ή δειγματοληψία από τους λεμφαδένες είναι η θεραπεία εκλογής, επιτυγχάνοντας ποσοστά 5ετούς επιβίωσης 69-89% για ασθενείς σταδίου IA, 52-75% για το στάδιο IB, 45-52% για το στάδιο IIA, και 35% για το στάδιο IIB. Οι ασθενείς σταδίου III, σύμφωνα με τις τελευταίες ενδείξεις από τη διεθνή βιβλιογραφία, θα πρέπει να θεωρούνται υποψήφιοι χειρουργικής αφαίρεσης και να εκτιμώνται, πριν τη λήψη οποιασδήποτε θεραπευτικής απόφασης από ομάδα ειδικοτήτων. Σε ασθενείς με νόσο σταδίου IIIA - N1 συνιστάται η χειρουργική επέμβαση με λεμφαδενικό καθαρισμό μεσοθωρακίου, συνοδευόμενη από επικουρική χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία κατά περίπτωση, αποσκοπώντας στη μείωση της τοπικής υποτροπής. Στο στάδιο IIIA – N2 θα πρέπει να χορηγηθεί νεοεπικουρική χημειοθεραπεία με πλατινούχο συνδυασμό με ή χωρίς ακτινοθεραπεία και στη συνέχεια να γίνει χειρουργική εξαίρεση. Στο στάδιο IV, η χειρουργική επέμβαση δεν αποκλείεται υπό προϋποθέσεις, όταν πρόκειται για ασθενείς με μεταστάσεις στον εγκέφαλο και τα επινεφρίδια. Στις ειδικές περιπτώσεις του μικρού περιφερικού καλά διαφοροποιημένου αδενοκαρκινώματος, ακόμη και μια σφηνοειδής εκτομή θεωρείται επαρκής (121). Μελέτες έχουν δείξει ότι οι περιορισμένες εκτομές σχετίζονται με παρόμοια επιβίωση με τη λοβεκτομή σε ασθενείς σταδίου IA, αλλά όχι στους ασθενείς σταδίου IB (122).

7.2. Ακτινοθεραπεία

Η ακτινοθεραπεία εφαρμόζεται ως α) θεραπευτική, σε ανεγχείρητους περιορισμένους όγκους, β) ως ανακουφιστική, σε εκτεταμένους τοπικά

όγκους, και σε μεταστάσεις εγκεφάλου ή οστών, γ) προεγχειρητικά, συνήθως σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία, για τον περιορισμό της έκτασης του όγκου, δ) συμπληρωματικά, μετά από χειρουργική αφαίρεση του όγκου, εφόσον έχει παραμείνει υπολειπόμενη νόσος στο θώρακα. Σύμφωνα με επιδημιολογικές μελέτες, στις ανεπτυγμένες χώρες το 61-76% όλων των ασθενών με NSCLC θα υποβληθεί σε μία από τις μορφές ακτινοθεραπείας, σε κάποιο στάδιο της νόσου. Η ακτινοθεραπεία δεν συνιστάται σε νόσο σταδίου N0-1, εκτός και αν συντρέχουν λόγοι που την επιβάλλουν. Σε περιπτώσεις υπολειπόμενης νόσου μετά από εκτομή ή σε ασθενείς σταδίου N2 έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την τοπική υποτροπή (123).

Η ακτινοθεραπευτική ογκολογία έχει σημειώσει μεγάλη πρόοδο την τελευταία 15ετία με την εισαγωγή νέων τεχνικών: α) τρισδιάστατη σύμμορφη ακτινοθεραπεία (3D-CRT), β) στερεοτακτική ακτινοθεραπεία (SBRT), γ) απεικονιστικά καθοδηγούμενη ακτινοθεραπεία (IGRT) και δ) την ακτινοθεραπεία διαμορφούμενης έντασης δέσμης με απεικονιστική καθοδήγηση (IMRT-IGRT). Οι τεχνικές αποσκοπούν στον καλύτερο δυνατό έλεγχο της τοπικής νόσου με τις λιγότερο δυνατές παρενέργειες στους γύρω υγιείς ιστούς.

7.3. Χημειοθεραπεία

Παρά τη μεγάλη πρόοδο στην εφαρμογή αυστηρών διαδικασιών σταδιοποίησης και χειρουργικής εξαίρεσης, η υποτροπή της νόσου εξακολουθεί να αποτελεί μείζονα περιοριστικό παράγοντα για την πρόγνωση του ΚΠ. Ο συνδυασμός της χειρουργικής με τη συστηματική θεραπεία οδήγησαν στην ανάπτυξη της επικουρικής (adjuvant) και νεοεπικουρικής (neoadjuvant) χημειοθεραπείας. Τα μέχρι σήμερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι

η χημειοθεραπεία σε ασθενείς σταδίου II-III είναι ευεργετική σε αντίθεση με τους ασθενείς IB όπου τα δεδομένα είναι αμφιλεγόμενα καθώς η χορήγησή της δεν φαίνεται να επιφέρει αποτελέσματα στην επιβίωση των ασθενών (124).

7.3.1. Επικουρική χημειοθεραπεία

Η επικουρική χημειοθεραπεία αποτελεί τη συνήθη θεραπεία για ασθενείς με NSCLC σταδίου II ή III, καθώς μελέτες που έγιναν μεταξύ του 1992 και του 2005 έδειξαν ότι βελτιώνει την επιβίωση τους (125). Οι μελέτες CALGB 9633 και JBR10 σε ασθενείς σταδίου IB έδειξαν ότι η χορήγηση χημειοθεραπείας ήταν ευεργετική μόνο σε ασθενείς που είχαν όγκους μεγαλύτερους των 4-5cm (126, 127). Ο χρόνος επιβίωσης ήταν ανεξάρτητος από το φύλο, την ηλικία, τον τύπο εκτομής, την ακτινοθεραπεία και τη δόση της χημειοθεραπείας και ως εκ τούτου η χορήγηση της επικουρικής χημειοθεραπείας έχει υιοθετηθεί από την ESMO (European Society of Medical Oncology) σαν πρακτική αντιμετώπισης του NSCLC σταδίων II-III και υπό συνθήκες του σταδίου IB με όγκους μεγαλύτερους των 4cm (126).

7.3.2. Νεοεπικουρική χημειοθεραπεία

Τα στοιχεία σχετικά με τη νεοεπικουρική χημειοθεραπεία στους ασθενείς με ΚΠ είναι περιορισμένα. Μελέτη σε 519 ασθενείς από 70 κέντρα στο Ηνωμένο Βασίλειο, την Ολλανδία, τη Γερμανία και το Βέλγιο έδειξε ότι η χορήγηση νεοεπικουρικής χημειοθεραπείας ήταν ανεκτή από τους ασθενείς, οι οποίοι στο 49% έδειξαν καλή ανταπόκριση, χωρίς καμία επίδραση στο ποσοστό των επιπλοκών μετεγχειρητικά. Παρόλα αυτά, η ίδια μελέτη έδειξε ότι το ποσοστό επιβίωσης, μεταξύ των ασθενών που έλαβαν χημειοθεραπεία

πριν την επέμβαση και αυτών που δεν έλαβαν, ήταν παρεμφερές (128). Σε σύγκριση με τη νεοεπικουρική θεραπεία, υπάρχουν λιγότερες κλινικές μελέτες που συγκρίνουν το συνδυασμό νεοεπικουρικής χημειοθεραπείας και χειρουργικής επέμβασης σε σχέση με χειρουργική επέμβαση μόνο. Ωστόσο, τα στοιχεία δείχνουν ότι η νεοεπικουρική χημειοθεραπεία προσφέρει πολλά οφέλη, όπως τη μείωση του μεγέθους του όγκου, την εξάλειψη ή πρόληψη εμφάνισης μικρομεταστάσεων, την καλύτερη ανεκτικότητα και καλύτερη συμμόρφωση με τη φαρμακευτική αγωγή κατά την προεγχειρητική περίοδο (129).

7.3.3. Χημειοθεραπευτικά σχήματα

Τις τελευταίες δεκαετίες, η εισαγωγή νέων κυτταροτοξικών παραγόντων, όπως η βινορελμπίνη, η πακλιταξέλη, η δοσεταξέλη, η γεμσιταμπίνη και η πεμετρεξίδη (3^{ης} γενιάς), έδωσαν θετικά αποτελέσματα στην επιβίωση των ασθενών με προχωρημένο NSCLC σε σχέση με της 2^{ης} γενιάς χημειοθεραπευτικά φάρμακα που περιλάμβαναν την ετοποσίδη, την ισοφωσφαμίδη, την μινομυσίνη και την βιντεσίνη (130). Τα φάρμακα 3^{ης} γενιάς συνδυαζόμενα με πλατινούχα σκευάσματα, βελτιώνουν σημαντικά την ανταπόκριση και την επιβίωση σε σχέση με τη μονοθεραπεία (131). Ωστόσο μια μετα-ανάλυση του 2005 δεν διαπίστωσε στατιστικά σημαντική υπεροχή των πλατινούχων συνδυασμών σε σύγκριση με τους μη-πλατινούχους συνδυασμούς, χρησιμοποιώντας φάρμακα 3^{ης} γενιάς όπως η γεμσιταμπίνη, η βινορελμπίνη, η δοσεταξέλη και άλλα (132). Άλλες κλινικές μελέτες έδειξαν ότι η μέση επιβίωση διπλασιάζεται ή και τριπλασιάζεται όταν υπάρχει συνδυασμός δύο ή τριών φαρμάκων. Έτσι για παράδειγμα, ο συνδυασμός της δοσεταξέλης με τη γεμσιταμπίνη ως 1^{ης} γραμμής χημειοθεραπεία σε ασθενείς

σταδίου IIIB/IV, έδειξε μερική ανταπόκριση στο 37.5% των ασθενών, μέση επιβίωση τους 13 μήνες και επιβίωση ενός χρόνου στο 50.7% των ασθενών (133). Άλλοι συνδυασμοί χημειοθεραπευτικών παραγόντων, όπως βινορελμπίνης/σισπλατίνης ακολουθούμενη από συνδυασμό δοσεταξέλης/γεμσιταμπίνης και δοσεταξέλης/σισπλατίνης σε συνδυασμό με bevacizumab, έχουν δείξει επίσης ενθαρρυντικά αποτελέσματα στην επιβίωση των ασθενών (134, 135). Η πλατίνα και τα προαναφερθέντα θεραπευτικά σχήματα αποτελούν τα πιο αποτελεσματικά φάρμακα ενάντια στον καρκίνο, ωστόσο είναι επιτακτική η ανάγκη για δημιουργία νέων σκευασμάτων με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα έναντι των ανθεκτικών όγκων, με πιο στοχευμένη δράση και με λιγότερες παρενέργειες. Η δράση των κύριων χημειοθεραπευτικών παραγόντων καθώς και οι παρενέργειές τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Δράση και τοξικότητα 7 χημειοθεραπευτικών παραγόντων.

Χημειοθεραπευτικός παράγοντας	Μηχανισμός δράσης	Τοξικότητα
Cisplatin/carboplatin	Προκαλεί ενδοκλωνικές και διακλωνικές ενώσεις στο DNA	Εμβοές, Απώλεια ακοής, Τοξική Νευροπάθεια, Μυελοτοξικότητα
Βινορελβίνη	Αναστέλλει τον πολυμερισμό της τουμπουλίνης κατά τη διάρκεια της G2 φάσης του κυτταρικού κύκλου	Ουδετεροπενία, Δυσκοιλιότητα, Κόπωση
Γεμσιταβίνη	Αντιμεταβολίτης που δρα σαν αναστολέας της σύνθεσης του DNA	Μυελοκαταστολή, Flu-like συμπτώματα, Αιμολυτικό Ουραιμικό Σύνδρομο, Τοξικότητα Πνευμόνων
Πακλιταξέλη	Αναστέλλει τον αποπολυμερισμό της τουμπουλίνης στον άξονα κατά τη κυτταρική διαίρεση	Μυελοκαταστολή, Νευροπάθεια, Υπερευαισθησία
Δινατριούχος πεμετρεξίδη	Διαταράσσει τις εξαρτώμενες από το φυλλικό οξύ μεταβολικές διεργασίες που είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων	Κόπωση, Μυελοκαταστολή, Μολύνσεις, Τοξικότητα του Γαστρεντερολογικού συστήματος
Δοσιταξέλη	Αναστέλλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων προάγοντας τη σύνθεση και την παρεμπόδιση της αποσύνθεσης των μικροσωληναρίων	Μυελοκαταστολή, Κατακράτηση υγρών
Ετοποσίδη	Προκαλεί θραύσεις στη μία αλυσίδα του DNA, αναστέλλει την επιδιόρθωση του DNA	Μυελοκαταστολή, Παροδική υπόταση

Κεφάλαιο 8

Προβλεπτικοί και προγνωστικοί παράγοντες

Η ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας οδήγησε στην ανακάλυψη διαφόρων βιοδεικτών η έκφραση των οποίων σχετίζεται με την ανάπτυξη του NSCLC. Ένας προβλεπτικός βιοδείκτης είναι ενδεικτικός της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας, καθώς υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ αυτού και της θεραπευτικής αγωγής. Ένας προγνωστικός βιοδείκτης είναι ενδεικτικός για την επιβίωση του ασθενούς ανεξάρτητα από τη θεραπεία που ακολουθεί, καθώς ο παράγοντας αυτός αποτελεί δείκτη της έμφυτης επιθετικότητας του καρκινικού όγκου. Η ανακάλυψη των βιολογικών αυτών παραγόντων, που μπορεί να χαρακτηρίζονται από ένα μεταλλαγμένο γονίδιο ή από παθολογική έκφρασή του, έδωσε το έναυσμα για την ανάπτυξη αντινεοπλασματικών αναστολέων και τροποποιητών των προϊόντων έκφρασης των παθολογικών αυτών γονιδίων. Ο στόχος πλέον της επιστημονικής κοινότητας είναι η κατηγοριοποίηση των ασθενών με βάση τις γενετικές αλλαγές που παρουσιάζονται στους καρκινικούς όγκους και η αντιμετώπιση τους, μέσω στοχευμένης θεραπείας έναντι των αλλαγών αυτών.

Σε αυτούς τους βιολογικούς παράγοντες περιλαμβάνονται τα ογκογονίδια σύντηξης ALK (π.χ. EML4-ALK), αναδιατάξεις του γονιδίου ROS1, μεταλλάξεις ευαισθητοποίησης του γονιδίου EGFR, μεταλλάξεις στα γονίδια HER2 και BRAF V600E, αναδιατάξεις του γονιδίου RET και μεταλλάξεις στο γονίδιο MET.

8.1. Μεταλλάξεις στον EGFR

Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας αποτελείται από τέσσερεις υποδοχείς : οι ErbB1/EGF receptor/HER1, ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) και ErbB4 (HER4). Όπως αναφέραμε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, οι πιο κοινές και καλύτερα μελετημένες μεταλλάξεις, που αποτελούν το 80 - 90% όλων των μεταλλάξεων του EGFR στον NSCLC, είναι οι διαγραφές στο εξόνιο 19 (E746-A750del) (136) και η αντικατάσταση του αμινοξέος λευκίνη με αργινίνη στη θέση 858 (L858R) στο εξόνιο 21 (137) που συνδέονται σε ποσοστό 40% με την ανάπτυξη του NSCLC (97). Περίπου 10% των ασθενών με NSCLC φέρουν πιο σπάνιες μεταλλάξεις του EGFR, όπως αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων στο εξόνιο 18, με συχνότερη τη G719A (~5%), στο εξόνιο 20 (4-10%) καθώς επίσης και ένθεση νουκλεοτιδίων στο εξόνιο 19 (136). Όλες αυτές οι μεταλλάξεις έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κινάσης τυροσίνης και αμφότερες σχετίζονται με ευαισθησία προς τους μικρούς μοριακούς αναστολείς κινάσης τυροσίνης (TKI), όπως οι erlotinib, gefitinib και afatinib (138). Το gefitinib ήταν χρονολογικά ο πρώτος αναστολέας της τυροσινικής κινάσης, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε ως θεραπεία 3ης γραμμής του τοπικά προχωρημένου ή του μεταστατικού NSCLC, μετά από αποτυχία χημειοθεραπευτικών συνδυασμών με βάση την σισπλατίνη ή τη δοσεταξέλη. Το erlotinib είναι μικρό μόριο/αναστολέας που δρα απευθείας στον EGFR αναστέλλοντας την ενδοκυτταρική αυτοφωσφορυλίωση της κινάσης τυροσίνης σε σύνδεση με τον EGFR, με τελικό αποτέλεσμα τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την επαγωγή της απόπτωσης. Τέλος, το afatinib αποτελεί ένα αναστολέα πολλαπλών υποδοχέων της οικογένειας ErbB, που δρα μέσω της πρόσδεσής του σε μια

ενδοκυτταρική περιοχή της κινάσης τυροσίνης (139). Ο FDA (US Food and Drug Administration) έχει εγκρίνει το afatinib για θεραπεία 1^{ης} γραμμής ασθενών με μεταστατικό μη πλακώδες NSCLC που έχουν μεταλλάξεις στον EGFR και δρα αναστέλλοντας ολόκληρη την οικογένεια των υποδοχέων ErbB/HER, συμπεριλαμβανομένων των EGFR και HER2 (140). Αυτές οι ευαισθητοποιητικές μεταλλάξεις του EGFR εντοπίζονται σε περίπου 10% των καυκάσιων και 50% ασιατών με NSCLC (141) και οι περισσότεροι ασθενείς παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε erlotinib, gefitinib ή afatinib μετά από περίπου 9 έως 13 μήνες θεραπείας με EGFR TKIs (142). Άλλες μεταλλάξεις που σχετίζονται με ευαισθησία στα φάρμακα περιλαμβάνουν σημειακές μεταλλάξεις στο εξόνιο 21 (L861Q) και στο εξόνιο 18 (G719X) (143). Η αντίσταση στη θεραπεία με TKIs σχετίζεται επίσης με μεταλλάξεις στο γονίδιο KRAS, αναδιατάξεις των γονιδίων ALK και ROS1 και με μεταλλάξεις εισαγωγής στο εξόνιο 20 (144). Οι τεχνικές με τις οποίες επιτυγχάνεται η ανίχνευση των σχετιζόμενων με τον EGFR μεταλλάξεων περιλαμβάνουν την άμεση αλληλούχιση του DNA από το εξόνιο 18 έως το εξόνιο 21, multiplex PCR και next-generation sequencing (145).

Οι μελέτες δείχνουν ότι τα erlotinib, gefitinib ή afatinib θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ως θεραπεία πρώτης γραμμής, σε ασθενείς με μεταλλάξεις του EGFR που έχουν τεκμηριωθεί πριν από τη θεραπεία πρώτης γραμμής (146). Η χρήση του erlotinib υπερισχύει και όσον αφορά τις ανεπιθύμητες ενέργειες, που είναι μικρότερες σε σχέση με τη χημειοθεραπεία (146). Παράλληλα το erlotinib φαίνεται από μικρές μελέτες φάσης II, να παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση σε σχέση με το gefitinib στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με NSCLC που εμφανίζουν εγκεφαλικές μεταστάσεις (147). Το

erlotinib χορηγείται επίσης σε ασθενείς ως 2ης ή 3ης γραμμής θεραπεία ανεξάρτητα από το προφίλ των μεταλλάξεων που φέρουν (148). Μια τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III, που περιελάμβανε ασθενείς που έλαβαν afatinib έδειξαν ότι οι ασθενείς αυτοί είχαν μειωμένο βήχα, καλύτερη αναπνευστική λειτουργία και καλύτερη ποιότητα ζωής σε σύγκριση με ασθενείς που λάμβαναν το χημειοθεραπευτικό σχήμα σισπλατίνης/πεμετρεξίδης (149).

Ωστόσο, οι περισσότεροι ασθενείς με μεταλλάξεις στον EGFR που αντιμετωπίζονται με EGFR-TKIs αναπτύσσουν αντοχή στη θεραπεία εντός 9-14 μηνών. Αναγνωρίζονται δύο μηχανισμοί ανθεκτικότητας στους EGFR-TKIs στον NSCLC, ο μηχανισμός της ***εγγενούς αντίστασης***, που δεν έχει πλήρως κατανοηθεί και ορίζεται συνήθως ως η άμεση αναποτελεσματικότητα των EGFR-TKIs και η ***επίκτητη αντίσταση*** που εμφανίζεται συνήθως μετά από παρατεταμένη χορήγηση θεραπείας (150). Η εγγενής αντίσταση είναι συχνά αποτέλεσμα της παρουσίας μη-ευαισθητοποιημένης μετάλλαξης στον EGFR με πιο συχνή την ένθεση στο εξόνιο 20. Η πλειονότητα των μεταλλάξεων ένθεσης στο εξόνιο 20 έχουν σαν αποτέλεσμα μειωμένη συγγένεια πρόσδεσης των EGFR-TKIs, αν και έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις με παρατεταμένη περίοδο ελέγχου της νόσου (151). Παρόλο που η μετάλλαξη T790M είναι ο πιο συνηθισμένος μηχανισμός εμφάνισης επίκτητης αντοχής σε EGFR-TKIs πρώτης γενεάς, σπάνια έχει ταυτοποιηθεί σε όγκους πριν από τη χορήγηση EGFR-TKIs ταυτόχρονα με άλλες πιο συνηθισμένες ευαισθητοποιημένες μεταλλάξεις. Αυτή η σημειακή μετάλλαξη αυξάνει τη συγγένεια του EGFR για το ATP και κατά συνέπεια μειώνει την αποτελεσματικότητα δέσμευσης των EGFR-TKIs (152). Μία ξεχωριστή

μετάλλαξη στον EGFR, που χαρακτηρίζεται από την παραλλαγή III (vIII) εντός πλαισίου ανάγνωσης απαλοιφής στα εξόνια 2-7 στην εξωκυττάρια περιοχή, εμποδίζει τη δέσμευση του EGF και άλλων προσδετών στον EGFRvIII. Η συστηματική σηματοδότηση από τον EGFRvIII και η αντίσταση στην EGFR-στοχευόμενη θεραπεία θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα δομικών αλλαγών στην πρωτεΐνη EGFR που επηρεάζει τη διαμόρφωση της ενδοκυττάριας περιοχής του υποδοχέα και συγκεκριμένα την περιοχή αναγνώρισης της ATP. Η μετάλλαξη αυτή έχει ανιχνευτεί στο 5% των περιπτώσεων SCC και έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη αντοχής σε θεραπεία με TKIs *in vitro.* Έτσι η χορήγηση gefitinib μπορεί να μειώσει τη φωσφορυλίωση του EGFRvIII μετά από μερικές ημέρες θεραπείας χωρίς όμως να επηρεάζει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων (153). Η εγγενής αντίσταση μπορεί επίσης να είναι συνέπεια συνεπαγόμενων μοριακών ή γενετικών αλλαγών που θα μπορούσαν ενδεχομένως να μειώσουν την ευαισθησία των ασθενών με ευαισθητοποιητικές EGFR μεταλλάξεις στη θεραπεία με EGFR-TKIs. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η ικανότητα των όγκων να αποφεύγουν την επαγόμενη από τους TKIs απόπτωση ως αποτέλεσμα πολυμορφισμών διαγραφής ή των χαμηλών επιπέδων σύνθεσης του BIM mRNA. Η BIM είναι μέλος της οικογένειας των προαποπτωτικών γονιδίων Bcl-2 και αποτελεί σημαντικό διαμεσολαβητή της επαγόμενης από EGFR-TKIs απόπτωσης σε NSCLC με μεταλλάξεις στον EGFR. Ασθενείς που φέρουν πολυμορφισμούς διαγραφής στο BIM γονίδιο ή ασθενείς με χαμηλή σύνθεση BIM mRNA παρουσιάζουν μειωμένη κλινική αποτελεσματικότητα όταν υποβάλλονται σε αγωγή με EGFR-TKIs (154). Τέλος, άλλο ένα παράδειγμα εγγενούς μηχανισμού αντίστασης στους EGFR-TKIs αποτελεί η αυξημένη έκφραση της

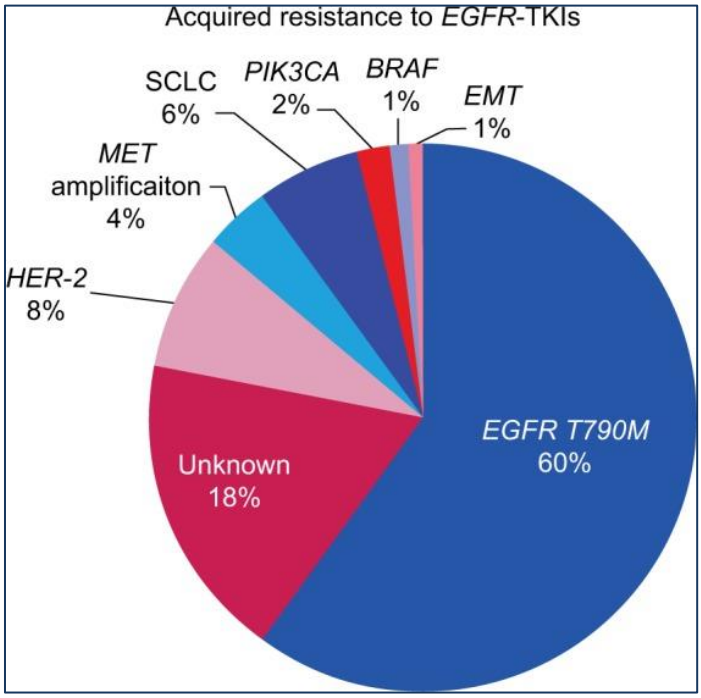
πρωτεΐνης CRIPTO1. Η πρωτεΐνη αυτή αγκυροβόλησης, που είναι συνδεδεμένη με γλυκοζυλοφωσφατιδυλινοσιτόλη, ανήκει στην οικογένεια EGF-CFC και μπορεί να μειώσει την ευαισθησία σε EGFR-TKIs μέσω της ενεργοποίησης των ZEB1 και SRC πρωτεϊνών που επάγουν τη σηματοδότηση μέσω του AKT και MEK μονοπατιού, αντίστοιχα (155).

Η πιο συνηθισμένη δευτερογενής μετάλλαξη που είναι υπεύθυνη για την απόκτηση αντοχής στους EGFR-TKIs εμφανίζεται στο εξόνιο 20 (T790M). Η παρουσία της μετάλλαξης T790M παρατηρήθηκε σε περίπου 50% των περιπτώσεων στις οποίες ελήφθη βιοψία κατά το χρόνο υποτροπής, μετά από θεραπεία με gefitinib ή erlotinib σε ασθενείς που έφεραν απαλοιφή στο εξόνιο 19 ή τη μετάλλαξη L858R στον EGFR. Ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση ότι ασθενείς των οποίων οι όγκοι φέρουν τη μετάλλαξη T790M παρουσιάζουν πιο ευνοϊκή πρόγνωση από τους ασθενείς με αρνητικούς για την μετάλλαξη όγκους. Ωστόσο, ακόμη και οι ασθενείς με επίκτητη αντοχή σε gefitinib, erlotinib και afatinib με τη μετάλλαξη T790M παρουσιάζουν ταχεία υποτροπή και μειωμένη επιβίωση (156). Πρόσφατη δημοσίευση του Hata και των συνεργατών του, αναφέρει ότι τα ανθεκτικά EGFRT790M κύτταρα είτε προϋπάρχουν σαν κλώνοι είτε δημιουργούνται *de novo* από αρνητικά για την μετάλλαξη ανθεκτικά κύτταρα (157). Παρομοίως με τους EGFR αναστολείς πρώτης γενιάς, η εμφάνιση δευτερογενών μεταλλάξεων έχει περιγραφεί ως μηχανισμός επίκτητης αντοχής και τους TKIs τρίτης γενιάς. Η πρώτη αναφορά επαγωγής EGFR μετάλλαξης μετά από θεραπεία με EGFR-TKIs τρίτης γενεάς ταυτοποιήθηκε σε δείγμα καρκίνου του πνεύμονα από έναν ασθενή που εμφάνισε ανθεκτικότητα στο AZD9291. Η μετάλλαξη C797S στον EGFR αφορά την αντικατάσταση της κυστεΐνης 797, που είναι απαραίτητη για την

ομοιοπολική σύνδεση των αναστολέων τρίτης γενιάς, με σερίνη. Σε μία μελέτη αλληλούχισης του DNA που απομονώθηκε από 15 ασθενείς με αντοχή στο AZD9291, προσδιορίστηκαν διαφορετικοί EGFR γονότυποι πριν και μετά την αγωγή με AZD9291. Έτσι, στο 40% των ασθενών ανιχνεύθηκε επίκτητη C797S μετάλλαξη μαζί με T790M μετάλλαξη, στο 33% μετάλλαξη T790M χωρίς μετάλλαξη C797S και η απώλεια της T790M μετάλλαξης χωρίς μετάλλαξη C797S στο 27% των ασθενών (158).

Η ενεργοποίηση εναλλακτικών οδών σηματοδότησης αντιπροσωπεύει το δεύτερο πιο κοινό μηχανισμό αντίστασης στους EGFR-TKIs. Ειδικότερα, η ενίσχυση του ογκογονιδίου MET, αντιπροσωπεύει το 5-20% των επίκτητων αιτίων αντίστασης. Το MET είναι ένας υποδοχέας διαμεμβρανικής κινάσης τυροσίνης, ο οποίος αφού ενεργοποιηθεί από τον προσδέτη του, HGF (hepatocyte growth factor), προάγει την ενεργοποίηση του AKT μονοπατιού, που αποτελεί τη βασική οδό σηματοδότησης για τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και των αντιαποπτωτικών σημάτων των κυττάρων. Η ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του MET είναι ογκογόνος και διευκολύνει τη διηθητική και μεταστατική συμπεριφορά των ανθεκτικών στους EGFR-TKIs κυττάρων (159). Η υπερενεργοποίηση του MET στους περισσότερους ανθεκτικούς στους EGFR-TKI όγκους, προκαλείται μέσω αύξησης της μεταγραφής, ενώ η ενίσχυση του MET γονιδίου ανιχνεύεται στο 22% των περιπτώσεων. Επιπλέον, πάνω από 20 ογκογόνες μεταλλάξεις έχουν εντοπιστεί στο γονίδιο MET και η πλειονότητα αυτών αφορούν τα γεννητικά κύτταρα. Ομοίως, ενώ η ενίσχυση του γονιδίου ErbB2 είναι ένα σπάνιο γεγονός στο αδενοκαρκίνωμα όταν δεν έχει προηγηθεί θεραπεία (1% των περιπτώσεων), είναι υπεύθυνο για την απόκτηση αντοχής στο 12% των περιπτώσεων. Ο ErbB2 έχει ισχυρή

δραστικότητα κινάσης αλλά δεν έχει προσδιοριστεί μέχρι σήμερα περιοχή δέσμευσης προσδέματος. Έτσι, πρέπει να σχηματίσει ετεροδιμερή με τα άλλα μέλη της οικογένειας ώστε να ενεργοποιηθεί. Όταν ο ErbB2 φέρει μετάλλαξη στην περιοχή της κινάσης, καθίσταται ανεξάρτητος από τον EGFR και παρουσιάζει ανθεκτικότητα στους EGFR-TKIs (160). Τόσο η ενίσχυση του γονιδίου MET όσο και του γονιδίου ErbB2, με ταυτόχρονη απώλεια της T790M, αναφέρονται ως μηχανισμοί επίκτητης αντοχής στους αναστολείς τρίτης γενιάς AZD9291. Στην Εικόνα 16 αναφέρονται τα ποσοστά εμφάνισης των μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για την εμφάνιση ανθεκτικότητας στους EGFR-TKIs.



Εικόνα 16: Μηχανισμοί υπεύθυνοι για την επίκτητη αντοχή στους EGFR-TKIs (161).

Μια άλλη εναλλακτική οδός που εμπλέκεται στην αντίσταση στους EGFR-TKIs είναι αυτή του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα ινσουλίνης τύπου 1 (IGF-1R). Ενεργοποίηση του συγκεκριμένου μονοπατιού έχει ανιχνευθεί σε πολλαπλές κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα που εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε gefitinib ή erlotinib. Ο IGF-1R μπορεί να ενεργοποιηθεί από

ετεροδιμερισμό με τον EGFR μετά από θεραπεία με erlotinib με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση καθοδικών σηματοδοτικών μονοπατιών όπως των AKT και MAPK που ενισχύουν την επιβίωση (162). Και άλλες μεταλλάξεις που οδηγούν στην ενεργοποίηση κυτταρικών υποδοχέων ή σηματοδοτικών μονοπατιών που οδηγούν στην αύξηση του πολλαπλασιασμού, επιβίωσης και ανθεκτικότητας των καρκινικών κυττάρων, έχουν αναφερθεί πρόσφατα, όπως ο υποδοχέας FGFR1,2,3, και οι μεταλλάξεις στα γονίδια BRAF (Val600Glu, Gly469Ala, 1%) και PIK3CA (5%) (150).

8.2. Αναδιατάξεις στο γονίδιο ALK

Εκτιμάται ότι το 2% έως 7% των ασθενών με NSCLC φέρουν αναδιατάξεις στο γονίδιο ALK και παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε θεραπεία με αναστολείς κινάσης τυροσίνης παρ΄όλο που εμφανίζουν τα ίδια κλινικά χαρακτηριστικά με ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις στον EGFR (163). Άλλα χαρακτηριστικά των ασθενών με τις συγκεκριμένες γονιδιακές αναδιατάξεις είναι ότι συνήθως εμφανίζονται σε άρρενες ασθενείς μικρότερης ηλικίας με μη πλακώδες καρκίνωμα (163, 164). Η ανίχνευση των αναδιατάξεων στο γονίδιο ALK γίνεται με *in situ* υβριδοποίηση, ανοσοϊστοχημεία και next-generation sequencing (165).

Σαν θεραπευτική προσέγγιση για τη συγκεκριμένη κατηγορία ασθενών (και ασθενών με αναδιατάξεις στο γονίδιο ROS1) προτείνεται η χρήση crizotinib, που είναι ένας αναστολέας των ALK και ROS1. Ασθενείς που ανταποκρίνονται στο crizotinib μπορεί να έχουν ταχεία βελτίωση των συμπτωμάτων, όπως ο βήχας και η δύσπνοια (166), ενώ κλινικές δοκιμές φάσης III έχουν δείξει καλύτερη ανταπόκριση σαν 1^{η} και 2^{η} γραμμή θεραπείας σε σχέση με τη χημειοθεραπεία με σισπλατίνη/καρβοπλατίνη (167) και

μονοθεραπεία με δοσεταξέλη/πεμετρεξίδη (168), αντίστοιχα. Στην κλινική μελέτη Profile 1014 επιβεβαιώθηκε η ανωτερότητα της χορήγησης crizotinib σε σχέση με τη χημειοθεραπεία με πλατίνη-πεμετρεξίδη σε ALK-θετικούς ασθενείς που δεν είχαν λάβει προηγουμένως θεραπεία. Έτσι, τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν βελτίωση στο ORR (74% έναντι 45%), στο mPFS (HR: 0,45, 10,9 μήνες έναντι 7 μηνών) και κυρίως στην ποιότητα ζωής των ασθενών που έλαβαν crizotinib. Παρ΄όλα αυτά δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη συνολική επιβίωση (OS) (167).

Το ceritinib ήταν ο πρώτος αναστολέας 2^{ης} γενιάς που επέδειξε όφελος στη θεραπεία του NSCLC σε ALK-θετικούς ασθενείς που εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στο crizotinib. Σε σύγκριση με το crizotinib, το ceritinib παρουσιάζει 20 φορές ισχυρότερη ανασταλτική δράση της ALK ενώ αποτελεί έναν ισχυρό αναστολέα ορισμένων από τις μεταλλάξεις που προκαλούν ανθεκτικότητα (169). Κλινική μελέτη φάσης III που συνέκρινε το ceritinib με τη χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα σε ασθενείς με ALK αναδιατάξεις, έδειξε ότι η χορήγηση ceritinib παρουσίασε αυξημένη ORR (72% έναντι 27%) και mPFS (HR: 0,55, 16,6 μήνες έναντι 8,1 μηνών). Παράλληλα σε ένα σχετικά μικρό αριθμό ασθενών, με μετρήσιμες εγκεφαλικές μεταστάσεις, που έλαβαν ceritinib, το ποσοστό ενδοκρανιακής ανταπόκρισης ήταν στο 72%, με μικρότερο όμως mPFS σε σχέση με ασθενείς χωρίς εγκεφαλικές μεταστάσεις (170).

Το alectinib αποτελεί έναν 3^{ης} γενιάς αναστολέα του ALK που εμφανίζει καλά ποσοστά ανταπόκρισης, σε ασθενείς με πρόοδο της νόσου υπό crizotinib. Ευεργετική είναι η χορήγηση alectinib ειδικά σε καταστάσεις όπου παρουσιάζονται μεταστάσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα, με τη μέση

διάρκεια ανταπόκρισης να φτάνει τους 11,1 μήνες (171). Πολλές μελέτες ανέδειξαν την ανωτερότητα του alectinib σε σύγκριση με crizotinib, σε ALK-θετικούς ασθενείς με NSCLC, τόσο σε επίπεδο αποτελεσματικότητας όσο και στο βαθμό τοξικότητας (172).

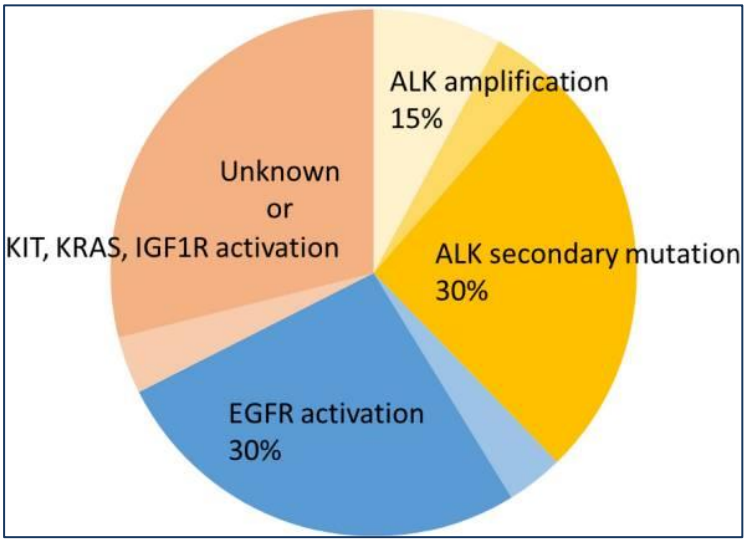
Το brigatinib είναι ένας ALK αναστολέας επόμενης γενιάς, με ισχυρή αποτελεσματικότητα σε ασθενείς με NSCLC, θετικούς σε ALK μεταλλάξεις, που είναι ανθεκτικοί στο crizotinib. Το brigatinib έχει χρησιμοποιηθεί και σε ασθενείς με NSCLC θετικούς για ROS1 αναδιατάξεις, με καλά αποτελέσματα. Παράλληλα αποτελεί τον μοναδικό ALK αναστολέα με δραστικότητα σε κυτταρικές σειρές που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο του EGFR. Στην κλινική δοκιμή AP26113 (ALTA) που περιελάμβανε 222 ασθενείς με NSCLC, με ALK μεταλλάξεις και ανθεκτικότητα στο crizotinib, η χορήγηση του brigatinib, στο συνιστώμενο δοσολογικό σχήμα (180mg/ημέρα), συσχετίστηκε με υψηλά ποσοστά συστηματικής και ανταπόκρισης στο ΚΝΣ, με μέση επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου τους 16,7 μήνες. Η ίδια αγωγή συσχετίστηκε με παρόμοια επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (16,3 μηνών) μεταξύ των ασθενών που έλαβαν crizotinib στη φάση 1-2 της κλινικής δοκιμής. Αυτές οι επιβιώσεις χωρίς εξέλιξη της νόσου ήταν υψηλότερες από εκείνες που παρατηρούνται με άλλους ALK αναστολείς επόμενης γενιάς, συμπεριλαμβανομένων των alectinib, ceritinib, ensartinib και lorlatinib (173).

Παρά την αρχική απόκριση, οι ασθενείς που υποβάλλονται σε αγωγή με ALK αναστολείς, μετά από κάποιο χρονικό διάστημα υποτροπιάζουν καθώς αναπτύσσουν επίκτητη ανθεκτικότητα στη θεραπεία. Όπως και στην περίπτωση των EGFR-TKIs, η ανάλυση των βιοψιών μετά την εξέλιξη της νόσου σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με ALK αναστολείς, συμβάλλει

σημαντικά στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στην ανθεκτικότητα. Αυτοί οι μηχανισμοί έχουν ταξινομηθεί σε δύο κατηγορίες, στην πρώτη ανήκουν οι ALK-εξαρτώμενοι μηχανισμοί, όπου η επιβίωση του καρκινικού κυττάρου εξαρτάται από τη σηματοδότηση μέσω του ALK μονοπατιού και στη δεύτερη οι ALK-ανεξάρτητοι μηχανισμοί στους οποίους τα καρκινικά κύτταρα δεν εξαρτώνται πλέον από το ALK μονοπάτι (172).

Ο συνηθέστερος μηχανισμός αντοχής είναι η ανάπτυξη δευτερογενών μεταλλάξεων στην περιοχή της κινάσης τυροσίνης του ALK. Σε ασθενείς που είναι ανθεκτικοί σε crizotinib, αυτές οι δευτερογενείς μεταλλάξεις εμφανίζονται στο 20-30% των ασθενών. Οι πιο κοινές μεταλλάξεις σε αυτή την περίπτωση οι μεταλλάξεις L1196M και G1269A. Αντίθετα με τον EGFR-θετικό σε μεταλλάξεις NSCLC, που όπως αναφέραμε η κύρια μετάλλαξη που προκαλεί ανθεκτικότητα είναι η T790M, στον ALK-θετικό NSCLC έχει αναγνωριστεί μεγάλος αριθμός δευτερευουσών μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στους ALK αναστολείς. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται οι μεταλλάξεις οι C1156Y, G1202R, I1171T, S1206Y και E1210K. Σε ασθενείς που χορηγούνται ισχυρότεροι και δομικά διαφορετικοί ALK αναστολείς 2^{ης} γενιάς, η συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων που προσδίδουν ανθεκτικότητα στους ALK αναστολείς αυξάνεται πάνω από 50%, ενώ και το φάσμα των μεταλλάξεων αυτών αλλάζει, με τη συχνή εμφάνιση της μετάλλαξης G1202R. Προκλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι, ανάλογα με το είδος της μετάλλαξης-αντίστασης στον ALK αλλάζει και η ευαισθησία σε ALK αναστολείς 2^{ης} γενιάς. Το lorlatinib, ένας ALK αναστολέας 3^{ης} γενιάς, αποδείχθηκε ότι είναι δραστικό έναντι όλων των μεμονωμένων μεταλλάξεων αντίστασης ALK, συμπεριλαμβανομένης και της μετάλλαξης G1202R (174).

Όπως και στην περίπτωση των μεταλλάξεων στον EGFR, σημαντικό ρόλο στην απόκτηση ανθεκτικότητας διαδραματίζει και η ενεργοποίηση εναλλακτικών μονοπατιών σηματοδότησης. Στα εναλλακτικά αυτά μονοπάτια περιλαμβάνονται ο EGFR, το HER2, MET, KIT καθώς και ο IGF-1R (172). Τέλος, σαν παράγοντας απόκτησης ανθεκτικότητας, έχει επίσης αναφερθεί, η μετάπτωση των επιθηλιακών σε μεσεγχυματικά κύτταρα, αποτέλεσμα ενός κυτταρικού επαναπρογραμματισμού, που οδηγεί σε μία μορφολογική αλλαγή των κυττάρων σε μια πιο αψιδωτή μορφολογία με πιο έντονη επεμβατική συμπεριφορά (175). Στην Εικόνα 17 αναφέρονται τα ποσοστά εμφάνισης των μηχανισμών που είναι υπεύθυνοι για την εμφάνιση ανθεκτικότητας στους ALK αναστολείς.



Εικόνα 17: Μηχανισμοί υπεύθυνοι για την επίκτητη αντοχή στους ALK αναστολείς (176).

8.3. Αναδιατάξεις στο γονίδιο ROS1

Εκτιμάται ότι το 1% έως 2% των ασθενών με NSCLC φέρουν αναδιατάξεις στο γονίδιο ROS1 (c-ros oncogene 1). Παρόλο που ο ROS1 είναι διαφορετικός υποδοχέας κινάσης τυροσίνης, μοιάζει δομικά με τους ALK υποδοχείς και τα μέλη της οικογένειας των υποδοχέων της ινσουλίνης (177). Αναδιατάξεις στο γονίδιο ROS1 εμφανίζονται πιο συχνά σε μη καπνίστριες

γυναίκες μικρότερης ηλικίας με αδενοκαρκίνωμα, που είναι αρνητικές για μεταλλάξεις των EGFR και KRAS και αρνητικές για αναδιατάξεις στο γονίδιο ALK (178). Όπως αναφέραμε και παραπάνω, η χορήγηση crizotinib σε ασθενείς με αναδιατάξεις στο γονίδιο ROS1 είναι πολύ αποτελεσματική, με το βαθμό απόκρισης στη θεραπεία να φτάνει το 70% (166). Η ανίχνευση των αναδιατάξεων στο γονίδιο ROS1, όπως και για το ALK, γίνονται με *in situ* υβριδοποίηση, ανοσοϊστοχημεία και next-generation sequencing (165).

Σε αντίθεση με τους ασθενείς που φέρουν αναδιατάξεις στο γονίδιο ALK, οι ασθενείς με αναδιατάξεις του ROS1 γονιδίου παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε θεραπεία με alectinib (179). Οι ALK και ROS1 υποδοχείς έχουν διατηρηθεί πολύ κοντά εξελικτικά και έτσι παρουσιάζουν ομοιότητα στο 77% στην αμινοξική τους αλληλουχία στις θέσεις πρόσδεσης του ATP που αποτελεί και περιοχή δράσης των αναστολέων (180). Παρά την πολλά υποσχόμενη αποτελεσματικότητα του crizotinib, οι μετασχηματισμένοι, με ROS1 μεταλλάξεις, όγκοι, ανέπτυξαν επίκτητη αντοχή στο crizotinib μετά από διάμεση επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου των 19,2 μηνών (181). Μέχρι σήμερα, μόνο δύο μεταλλάξεις στον ROS1 υποδοχέα έχουν αναφερθεί να επάγουν την ανθεκτικότητα στη δράση του crizotinib στον NSCLC. Αυτές οι μεταλλάξεις είναι οι G2032R και D2033N (180).

8.4. Μεταλλάξεις στο γονίδιο KRAS

Όπως αναφέραμε και σε προηγούμενο κεφάλαιο, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο KRAS είναι πολύ συχνές στο αδενοκαρκίνωμα ενώ συνδέονται άμεσα με το κάπνισμα (98). Μεταλλάξεις στο γονίδιο KRAS αποτελούν προγνωστικό βιοδείκτη για την ανάπτυξη ΚΠ καθώς ασθενείς που φέρουν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη έχουν χαμηλότερη επιβίωση σε σχέση με αυτούς που φέρουν το

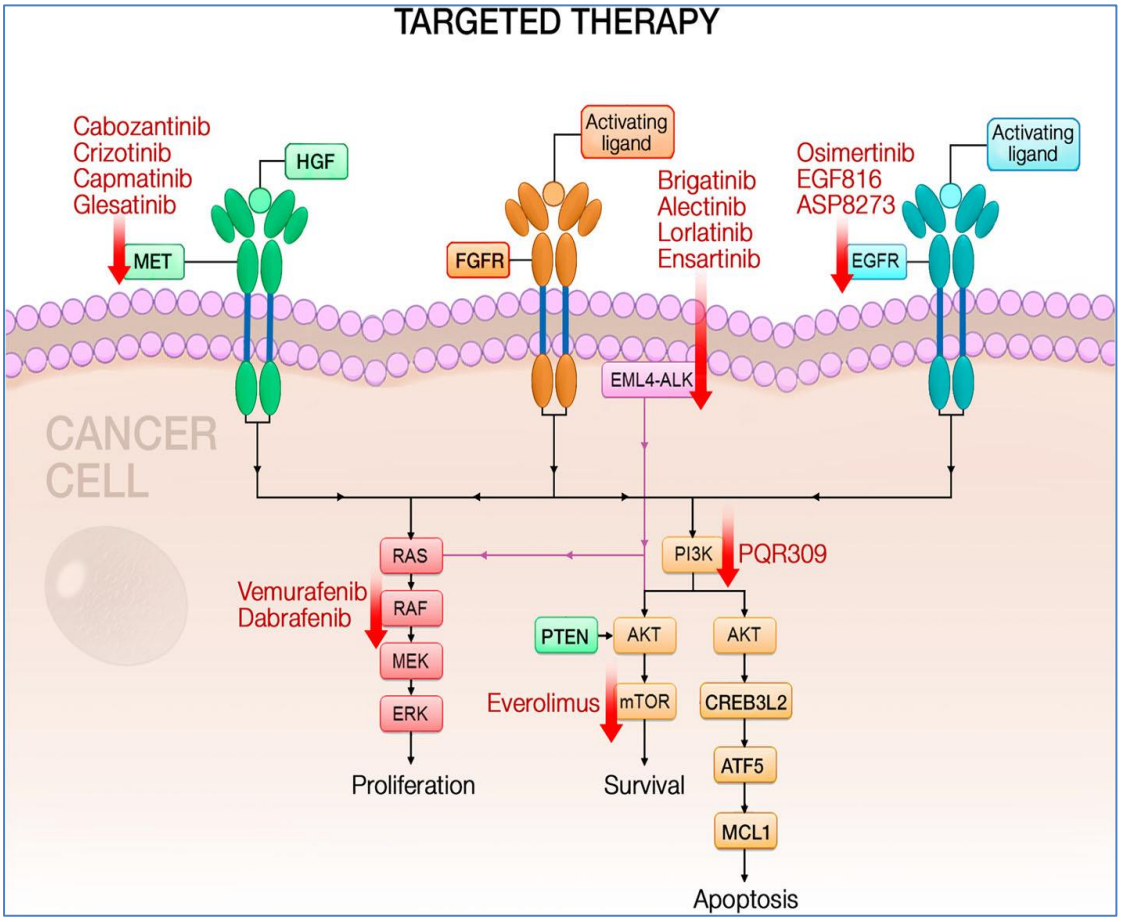
φυσιολογικό, wild type γονίδιο (182). Ασθενείς με μετάλλαξη στο KRAS γονίδιο παρουσιάζουν ανθεκτικότητα σε θεραπεία με αναστολείς του EGFR ενώ δεν φαίνεται οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις να επηρεάζουν τη δράση της χημειοθεραπείας (183). Στοχευμένη θεραπεία για τη συγκεκριμένη κατηγορία ασθενών δεν είναι μέχρι σήμερα διαθέσιμη, παρόλα αυτά μελέτη φάσης II σε 87 ασθενείς με KRAS μεταλλάξεις που συνέκρινε τη χορήγηση δοσεταξέλης με ή χωρίς selumetinib, που είναι ένας ισχυρός αναστολέας των κινασών MEK1 και MEK2, ανέφερε ευεργετικά αποτελέσματα για τους ασθενείς (184). Στην Εικόνα 18 που ακολουθεί, συνοψίζονται τα μόρια-στόχοι για τη στοχευμένη θεραπεία του ΚΠ εστιάζοντας σε θεραπευτικά σχήματα που βρίσκονται σε κλινικές δοκιμές.

8.5. Μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF

Ο BRAF είναι μέλος της οικογένειας RAF κινασών και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις οδούς σηματοδότησης πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα. Οι παραλλαγές του BRAF έχουν διερευνηθεί σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως στον καρκίνο του παχέος εντέρου, στο μελάνωμα, στον καρκίνο των ωοθηκών αλλά και στον NSCLC. Οι γονιδιακές παραλλαγές συσχετίζονται στενά με συγκεκριμένα κλινικά παθολογικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένου του φύλου, του καπνίσματος ή μη, της ιστολογίας του όγκου και της κλινικής φάσης του ασθενή. Αν και οι μεταλλάξεις BRAF έχουν βρεθεί σε NSCLC εδώ και αρκετά χρόνια, η συσχέτιση μεταξύ των BRAF μεταλλάξεων και του NSCLC δεν έχει μελετηθεί αρκετά (185). Τα στοιχεία από την πιο πρόσφατη μετα-ανάλυση του Guanghui και των συνεργατών του αναφέρει ότι η συχνότητα BRAF μεταλλάξεων σε ασθενείς με NSCLC κυμαίνεται στο 2,6%, δεν σχετίζεται με το κάπνισμα και

εμφανίζεται πιο συχνά στον ιστολογικό τύπο του αδενοκαρκινώματος. Η BRAFV600E είναι η πιο συχνή μετάλλαξη στο BRAF γονίδιο, που εμφανίζεται πιο συχνά σε γυναίκες μη καπνίστριες με NSCLC (185).

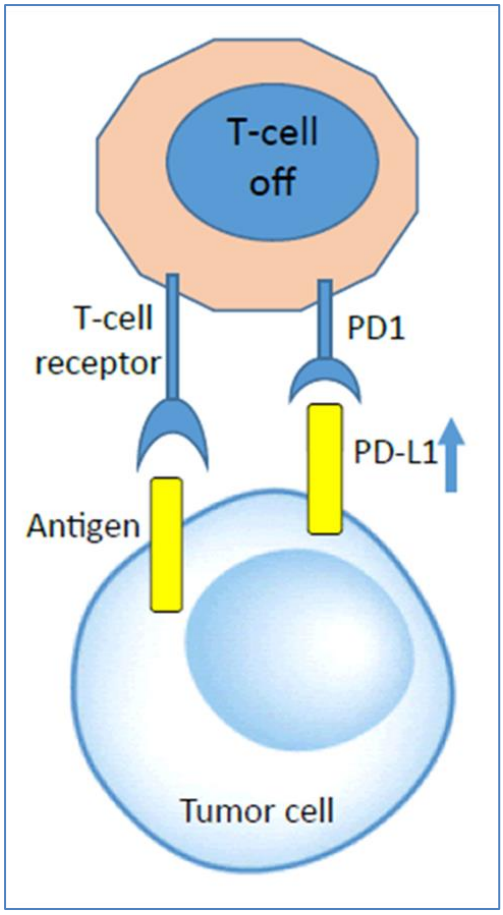
Η δραστικότητα της μονοθεραπείας με τους BRAF αναστολείς vemurafenib ή dabrafenib έχει αποδειχθεί να είναι ευεργετική σε πολλές περιπτώσεις αδενοκαρκινωμάτων του πνεύμονα. Ωστόσο, ανθεκτικότητα σε θεραπεία με BRAF αναστολείς αναπτύσσεται αναπόφευκτα μετά από λίγους μήνες θεραπείας, με αποτέλεσμα την πρόοδο της νόσου. Πρόσφατη μελέτη (case study), έδειξε ότι η ανθεκτικότητα που αναπτύσσεται σε θεραπεία με BRAF αναστολείς μπορεί να αντιμετωπιστεί με χορήγηση συνδυαστικής dabrafenib–trametinib θεραπείας σε ασθενείς με NSCLC που φέρουν τη μετάλλαξη BRAFV600E (186).



Εικόνα 18: Μοριακοί στόχοι και ανασταλτικοί παράγοντες που έχουν εκτιμηθεί σε μελέτες φάσης I/II ως πιθανή θεραπεία για ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (187).

8.6. Ανοσολογικοί προβλεπτικοί παράγοντες

Ο υποδοχέας PD-1 (programmed cell death-1 receptor) παρουσιάζεται στην επιφάνεια των κυτταροτοξικών και ρυθμιστικών Τ λεμφοκυττάρων, όταν τα κύτταρα αυτά ενεργοποιηθούν σε απόκριση στη φλεγμονή στους περιφερειακούς ιστούς (Εικόνα 19). Η προσάρτηση του προσδέτη του PD-1, PD-L1 στον υποδοχέα του PD-1 οδηγεί στην καταστολή της ενεργοποίησης των κυττάρων ώστε να περιοριστεί η ανοσοαπόκριση στο ερέθισμα, με τελικό αποτέλεσμα την ανοσοκαταστολή. Τα καρκινικά κύτταρα υπερεκφράζουν τον PD-1 με αποτέλεσμα να «κρύβονται» από την ανοσοαπόκριση. Η θεραπεία με χρήση αντισωμάτων έναντι του PD-1 υποδοχέα αποτρέπει τη δέσμευση του προσδέτη στον υποδοχέα του, με αποτέλεσμα τα Τ κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα να παραμένουν ενεργά και να «επιτίθενται» στα καρκινικά κύτταρα (188). Ωστόσο, η έκφραση του PD-L1 στον καρκινικό όγκο μέσω ενδογενών μηχανισμών του κυττάρου, μπορεί να μην έχει βασικό ρόλο στην επαγωγή της ανοσοκαταστολής. Το PD-L1, όπως και το PD-L2, μπορεί επίσης να έχουν διεγερτική δράση, παρατήρηση που επιβεβαιώνεται από προκλινικές μελέτες όπου η αναστολή του PD-1/PD-L1 μονοπατιού δεν οδήγησε σε αποτελεσματική αντινεοπλασματική απόκριση. Πρόσφατη δημοσίευση, αλλά και προγενέστερες μελέτες, ανέφερε την εκρηκτική πρόοδο του NSCLC σε ασθενή που μετείχε σε κλινική μελέτη μετά από χορήγηση ανοσοθεραπείας με anti-PD-1 αντισώματα (pembrolizumab), μία κατάσταση που αναφέρεται ως *hyperprogression* (189).



Εικόνα 19: Παρουσίαση του υποδοχέας PD-1 στην επιφάνεια των κυτταροτοξικών και ρυθμιστικών Τ λεμφοκυττάρων, όταν τα κύτταρα αυτά ενεργοποιηθούν σε απόκριση στη φλεγμονή στους περιφερειακούς ιστούς.

Τα πιο γνωστά anti-PD-1 αντισώματα που έχουν αναφερθεί σε αρκετές κλινικές μελέτες είναι τα nivolumab και pembrolizumab. Πιο πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί τα αντισώματα atezolizumab, durvalumab, avelumab και BMS-936559, τα οποία στοχεύουν το μόριο PD-L1, καθώς και το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του υποδοχέα CTLA-4, ipilimumab. Η δράση των αντισωμάτων αυτών έχει δειχθεί σε αρκετές μελέτες να είναι ευεργετική σε ασθενείς με πλακώδη και μη πλακώδη καρκινώματα (190).

Όπως αναφέρθηκε ήδη, υπάρχουν δύο αντισώματα-αναστολείς PD-1 εγκεκριμένα για θεραπεία του NSCLC, το nivolumab και το pembrolizumab. Η δράση του nivolumab εξετάστηκε ως θεραπεία 2ης γραμμής σε ασθενείς με πλακώδες και μη πλακώδες NSCLC, όπου τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χορήγησή του ήταν ευεργετική για τους ασθενείς έναντι της χημειοθεραπείας

με δοσεταξέλη. Η δράση του nivolumab ήταν ανεξάρτητη από το ποσοστό έκφρασης του PD-1 στα κύτταρα (191, 192). Αντίθετα, η κλινική δραστικότητα του pembrolizumab, συσχετίστηκε άμεσα με την έκφραση του PD-L1 στα καρκινικά NSCLC κύτταρα. Έτσι άτομα με NSCLC, με έκφραση PD-L1 τουλάχιστον σε 1% των καρκινικών κυττάρων και τα οποία έλαβαν αρχική θεραπεία με pembrolizumab είχαν διάμεσο χρόνο επιβίωσης 4-8 μήνες μεγαλύτερο από αυτούς που υποβλήθηκαν μόνο σε χημειοθεραπεία (193). Αντίστοιχα PD-L1 έκφραση σε τουλάχιστον 50% των καρκινικών κυττάρων συσχετίστηκε με αυξημένη αποτελεσματικότητα του pembrolizumab, όταν χορηγήθηκε ως μονοθεραπεία, σε σχέση με τη χημειοθεραπεία (194). Το pembrolizumab σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία, έδειξε επίσης πλεονέκτημα όταν χορηγήθηκε και ως θεραπεία δεύτερης γραμμής σε μελέτη φάσης II / III, σε σχέση με τη χημειοθεραπεία με δοσεταξέλη (195). Ο Reck και οι συνεργάτες του εξέτασαν τη δράση του pembrolizumab ως θεραπεία πρώτης γραμμής σε NSCLC με έκφραση του PD-L1 σε τουλάχιστον 50% των κυττάρων του όγκου. Η χορήγηση pembrolizumab συσχετίστηκε με αυξημένη PFS, OS και ποσοστά ανταπόκρισης (44,8% έναντι 27,8%) ενώ οι ανεπιθύμητες ενέργειες ήταν σχετικά λίγες (κυρίως υπο- και υπερθυρεοειδισμός, πνευμονίτιδα κ.α.) (196).

Η ανάλυση υποκατηγοριών της κλινικής μελέτης Checkmate 026 για την χορήγηση nivolumab ως 1^{η} γραμμή θεραπείας του NSCLC, ανέδειξαν σαν προγνωστικό μάρτυρα, εκτός από την έκφραση του PD-L1, και το φορτίο μεταλλάξεων του όγκου (TMB - Tumor Mutation Burden). Το TMB, είναι ένας ποσοτικός βιολογικός δείκτης που χαρακτηρίζει το συνολικό αριθμό των μεταλλάξεων που φέρουν τα καρκινικά κύτταρα. Καρκινικά κύτταρα με υψηλό

TMB, έχουν υψηλότερα επίπεδα νεοαντιγόνων, τα οποία πιστεύεται ότι βοηθούν το ανοσοποιητικό σύστημα να αναγνωρίσει τους όγκους και να επάγει την αύξηση του αριθμού και της δράσης των Τ κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων ενάντια στον καρκινικό όγκο (197).

Πρόσφατη μελέτη του Roszik και των συνεργατών του αναφέρει ότι οι ασθενείς με υψηλό TMB εμφάνισαν καλύτερη πρόγνωση μετά από θεραπεία με pembrolizumab (198). Έτσι, το TMB έχει προσελκύσει τα τελευταία χρόνια την προσοχή ως βιοδείκτης της ανοσοκαταστολής αλλά εξακολουθεί να είναι ασαφές πώς το TMB επηρεάζει τη συμπεριφορά του καρκινικού όγκου.

Τέλος το avelumab, ένα ανθρώπινο anti-PD-L1 IgG1 αντίσωμα, έχει δειχθεί ότι έχει ανθεκτική αντικαρκινική δράση και ανεκτό προφίλ ασφάλειας σε μια σειρά συμπαγών όγκων. Σε μια μεγάλη κλινική μελέτη φάσης I, με συμμετοχή 1758 ασθενών, με διάφορους συμπαγείς όγκους, που έλαβαν avelumab, συμμετείχε και μία ομάδα 184 ασθενών με NSCLC, που είχαν ήδη λάβει θεραπεία με βάση την πλατίνα και έλαβαν avelumab ως θεραπεία 2^{ης} γραμμής ή μεταγενέστερη θεραπεία. Σε αυτή την ομάδα, το ποσοστό των ασθενών που πέτυχαν αντικειμενική ανταπόκριση ήταν 14%, η οποία αυξανόταν με την αύξηση των επιπέδων έκφρασης του PD-L1 στα καρκινικά κύτταρα (ORR, 25.4% - 42.9%). Παράλληλα η χορήγηση του avelumab παρουσίασε την ίδια τοξικότητα και αντικαρκινική δράση με τα υπόλοιπα anti-PD1 και anti-PD-L1 αντισώματα (199).

Κεφάλαιο 9

Μοριακή βιολογία του καρκινικού κυττάρου

Πέρα από τους αυξητικούς παράγοντες και τα πρωτο-ογκογονίδια που αναφέρθηκαν στα Κεφάλαια 6 και 8, σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του ΚΠ διαδραματίζουν μόρια που σχετίζονται με την διαδικασία της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης και της επιδιόρθωσης των βλαβών στο DNA. Αλλαγές στη φυσιολογική λειτουργία των μορίων αυτών σχετίζεται με την επαγωγή της καρκινογένεσης καθώς και στην ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία σε ασθενείς με ΚΠ.

9.1. Η απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα

Η απόπτωση είναι μια γενετικά προγραμματισμένη διαδικασία κυτταρικού θανάτου που απαιτείται, υπό φυσιολογικές συνθήκες, για τη διατήρηση της ομοιόστασης και την ανταπόκριση του κυττάρου σε διάφορα εσωτερικά και εξωτερικά ερεθίσματα. Τα κύτταρα που οδηγούνται στην απόπτωση χαρακτηρίζονται από διογκώσεις στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, συρρίκνωση του κυτταροπλάσματος, συμπύκνωση της χρωματίνης και τον κατακερματισμό του DNA. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για την αποφυγή της επαγόμενης από τη χημειοθεραπεία απόπτωσης (200).

Σημαντικά γονίδια στη διαδικασία της απόπτωσης είναι τα p53 και το πρωτο-ογκογονίδιο bcl-2. Το γονίδιο bcl-2 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 18 και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που αναστέλλει την απόπτωση. Η Bcl-2 αποτελεί ένα βασικό ρυθμιστή της μιτοχονδριακής αποπτωτικής οδού, που αναστέλλει

τον αποπτωτικό μηχανισμό μέσω αναστολής προσαρμογέων που είναι απαραίτητοι για την ενεργοποίηση και διάσπαση των κασπασών, ως απάντηση σε διάφορα ερεθίσματα, όπως είναι η πρόκληση βλαβών στο DNA, η ανεπάρκεια των αυξητικών παραγόντων και η επίδραση των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων (201). Η έκφρασή του φαίνεται να είναι πιο αυξημένη στον SCLC από ότι στον NSCLC, γεγονός που είναι απρόσμενο καθώς οι SCLC είναι πιο ευαίσθητοι στη χημειοθεραπεία σε σχέση με τους NSCLC (202). Η έκφραση του bcl-2 στους καρκινικούς όγκους σχετίζεται με αυξημένη επιβίωση ασθενών με NSCLC. Η πρωτεΐνη Bax, που σχετίζεται με τον Bcl-2, προάγει την απόπτωση και αποτελεί μεταγραφικό στόχο της p53. Η αντίστροφη έκφραση των Bax και Bcl-2 σχετίζεται με νευροενδοκρινικούς καρκίνους. Έτσι, υψηλή έκφραση Bcl-2 και χαμηλή έκφραση του Bax παρατηρούνται στις περισσότερες περιπτώσεις SCLC, που συνήθως έχουν ανεπάρκεια της p53 (202). Τα αποτελέσματα των μελετών για την αξιολόγηση της έκφρασης του Bcl-2 σαν προγνωστικό μάρτυρα της πορείας του NSCLC είναι αμφιλεγόμενα. Έτσι, μία μετα-ανάλυση 28 κλινικών μελετών ανέδειξε θετική συσχέτιση στην έκφραση του Bcl-2 με την αυξημένη επιβίωση (203), πολλές ανεξάρτητες μελέτες δεν προσδίδουν στην Bcl-2 προγνωστική αξία (204), ενώ πολυάριθμες μελέτες σχετίζουν την έκφραση της Bcl-2 με κακή πρόγνωση του NSCLC (205, 206).

Η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της Bcl-2 με την απόκριση στη χημειοθεραπεία έχει αναφερθεί σε αρκετές μελέτες. Οι ταξάνες και τα αλκαλοειδή της vinca φωσφορυλιώνουν την Bcl-2 με αποτέλεσμα την απενεργοποίησή της και την επαγωγή της απόπτωσης. Διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς SW626 (επιθηλιακό καρκίνωμα ωοθηκών) με φορέα

υπερέκφρασης της Bax οδήγησε σε ενδοκυττάρια συσσώρευση πακλιταξέλης και έτσι η αυξημένη έκφραση της Bax έχει συσχετιστεί με καλή απόκριση των ασθενών στην πακλιταξέλη σε προχωρημένο καρκίνο των ωοθηκών (207). Από την άλλη, υποέκφραση της Bcl-2 έχει σχετιστεί με αντίσταση στη δράση της σισπλατίνης στην κυτταρική σειρά μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα H69 (208).

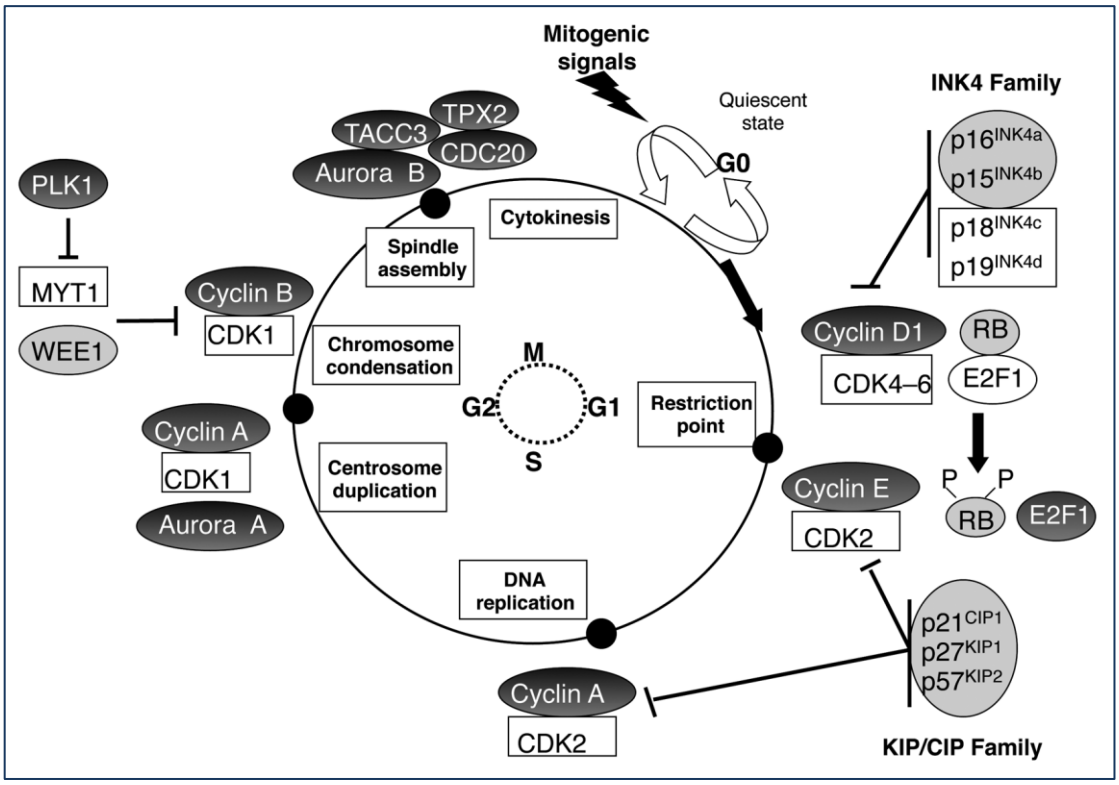
Το p53 (TP53) είναι ένα από τα καλύτερα μελετημένα γονίδια που εμπλέκονται στην εμφάνιση και/ή την εξέλιξη του καρκίνου. Παραδοσιακά, η p53 πιστεύεται ότι καταστέλλει την επαγωγή και την εξέλιξη του καρκίνου επάγοντας την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου (π.χ. $p21^{WAF1/CIP1}$), την απόπτωση (π.χ. BAX) και την επιδιόρθωση του DNA (π.χ. GADD45). Όταν υπάρξει κάποια βλάβη στο DNA, το γονίδιο p53 εκφράζεται και ρυθμίζει τη μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παροδική αναστολή του κυτταρικού κύκλου, παρέχοντας έτσι το χρόνο στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου να επιδιορθώσουν τη βλάβη του DNA, είτε να το οδηγήσει σε απόπτωση. Πιο πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η p53 μπορεί επίσης να αναστείλει τη λειτουργία του καρκινικού κυττάρου μέσω της ρύθμισης του μεταβολισμού, της τροποποίησης των επιπέδων των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS - reactive oxygen species), της μεταβολής της έκφρασης των μη κωδικών-RNA και την επαγωγή της αυτοφαγίας και του κυτταρικού θανάτου εξαρτώμενου από τα ιόντα σιδήρου (ferroptosis). Το p53 ασκεί τις παραπάνω διεργασίες δρώντας ως μεταγραφικός παράγοντας που προσδένεται σε ειδικές αλληλουχίες του υποκινητή γονιδίων επηρεάζοντας έτσι την έκφρασή τους (209). Οι

μεταλλάξεις στο γονίδιο p53 αποτελούν την πιο συχνή γενετική αλλοίωση στον καρκίνο γενικότερα και εμφανίζεται πιο συχνά στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (70-80%), από ό,τι στο μη μικροκυτταρικό (50%). Αν υπάρχει μετάλλαξη στο γονίδιο p53 τότε η εκφραζόμενη πρωτεΐνη αποτυγχάνει να αναστείλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων είτε να τα οδηγήσει σε απόπτωση (210). Μία μετα-ανάλυση του 2000 αναφέρει ότι οι μεταλλάξεις στο p53 αποτελούν δείκτη κακής πρόγνωσης και χαμηλής επιβίωσης σε ασθενείς με NSCLC (211). Μελέτες σε *in vivo* και *in vitro* μοντέλα έχουν δείξει ότι τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα τα οποία επάγουν την απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα απαιτούν την έκφραση ενεργού και wild type p53 γονιδίου για τη δράση τους. Μελέτη του 2008 σε 35 ασθενείς με προχωρημένο στάδιο NSCLC, που έλαβαν 3 κύκλους θεραπείας με σισπλατίνη και ετοποσίδη και 1 κύκλο ακτινοθεραπείας έδειξε ότι η παρουσία μεταλλαγμένου p53 γονιδίου ήταν ενδεικτική της ανθεκτικότητας στη χημειοθεραπεία (212).

9.2. Η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στο καρκινικό κύτταρο

Ο κυτταρικός κύκλος καθορίζεται από κάποια κύρια σημεία ελέγχου τα οποία είναι βασικά για τη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος και της χρωμοσωμιακής σταθερότητας, σε απόκριση επαγόμενων ή αυθόρμητων αλλοιώσεων του DNA που συμβαίνουν συχνά στη διάρκεια ζωής ενός κυττάρου. Αποτελούν επομένως ένα φυσιολογικό φράγμα που προστατεύει από την πρόοδο των καρκινικών όγκων από πρώιμα στάδια σε κακοήθεις βλάβες (213). Μετά από μία βλάβη στο DNA, αυτά τα σημεία ελέγχου δίνουν στα κύτταρα το χρόνο για να επιδιορθώσουν τη βλάβη, διακόπτοντας την πορεία του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1, S ή G2. Εάν οι βλάβες είναι μη

αναστρέψιμες επάγεται ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος. Οι κύριοι ρυθμιστές αυτών των οδών είναι οι σχετιζόμενες με την κινάση, ATM (ataxia telangiectasia mutated), AT (ataxia telangiectasia), ATR (RAD3-related protein) και οι καθοδικοί τελεστές τους, οι κινάσες των σημείων ελέγχου CHK1 και CHK2 (214). Η οδός ATM/CHK2 ρυθμίζει κυρίως το σημείο ελέγχου G1, μέσω ενεργοποίησης του p53, που με τη σειρά του οδηγεί στη μεταγραφική ενεργοποίηση του CDKI $p21^{WAF1/CIP1}$ που εμποδίζει τα κύτταρα να εισέλθουν στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Ο αναστολέας $p21^{WAF1/CIP1}$ ασκεί την παραπάνω δράση μέσω διαφορετικών μηχανισμών που περιλαμβάνουν την αναστολή των συμπλόκων cyclinD1/CDK4 και cyclin E/CDK2 στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου και του συμπλόκου cyclinA/CDK2 κατά τη μετάβαση από την S στη G1 φάση (213). Στον NSCLC, θετική έκφραση του $p21^{WAF1/CIP1}$ ανιχνεύεται πιο συχνά σε ασθενείς σταδίου I ή II σε σχέση με ασθενείς σταδίου IIIA ενώ μελέτες έχουν δείξει ότι ασθενείς με όγκους που εκφράζουν τον συγκεκριμένο παράγοντα παρουσιάζουν μεγαλύτερη επιβίωση (215). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η p21 παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιπολλαπλασιαστική δράση του Gefitinib (216), ενώ ανοσοϊστοχημική μελέτη της έκφρασης του παράγοντα έδειξε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της έκφρασής του και της κλινικής πορείας ασθενών με NSCLC, σταδίου IIIB ή IV που λάμβαναν πρώτη γραμμή χημειοθεραπείας με πλατίνη/γεμσιταβίνη (217). Άλλοι παράγοντες που συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση παρουσιάζονται στην Εικόνα 20.



Εικόνα 20: Ανεπάρκεια των μορίων-ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου σε καρκινικούς όγκους των πνευμόνων. Ανωμαλίες στη δράση των μορίων-ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου σε όγκους του πνεύμονα συμβαίνουν καθ΄όλη τη διάρκεια των διαφορετικών φάσεων του κυτταρικού κύκλου. Η διαδοχική συσσώρευσή τους συμβάλλει στον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς και στην αστάθεια του γενώματος. Οι ανοιχτόχρωμοι γκρι κύκλοι υποδεικνύουν απώλεια έκφρασης της αντίστοιχης πρωτεΐνης και οι σκουρόχρωμοι υποδηλώνουν υπερέκφραση. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις (άσπροι κύκλοι), οι ανωμαλίες είναι πολύ σπάνιες ή δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς (213).

9.3. Επιδιορθωτικοί μηχανισμοί του DNA στο καρκινικό κύτταρο

Ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες προκαλούν συνεχώς βλάβες στο DNA. Έτσι το κύτταρο έχει αναπτύξει πολλαπλές οδούς για την επιδιόρθωση των βλαβών αυτών. Αναφέρονται πέντε κύριες οδοί επιδιόρθωσης του DNA: Η επιδιόρθωση εκτομής νουκλεοτιδίων (NER - Nucleotide Excision Repair), η επιδιόρθωση εκτομής βάσεων (BER - Base-Excision Repair), η επιδιόρθωση αναντιστοιχίας βάσεων (MMR - Mismatch Repair), ο ομόλογος ανασυνδυασμός (HRc - Homologous Recombination) και η μη ομόλογη ένωση των άκρων (NHEJ - Non-Homologous End-Joining). Κάθε μία από αυτές τις οδούς εμπλέκεται στην επιδιόρθωση διαφορετικών ειδών βλαβών

στο DNA και σε αυτές εμπλέκονται διαφορετικοί παράγοντες που αλληλεπιδρούν για να επιδιορθώσουν τις βλάβες και να συμβάλλουν στη σταθερότητα του γονιδιώματος (Εικόνα 21). Η NER οδός εμπλέκεται στην επιδιόρθωση βλαβών που προκαλούν αλλοιώσεις στη διπλή έλικα του DNA και οφείλονται σε παράγοντες όπως η υπεριώδης ακτινοβολία (UV), ο καπνός και τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα με βάση την πλατίνα. Η οξειδωτική βλάβη στο DNA που προκαλείται από τις ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) επιδιορθώνεται από την οδό BER ενώ η MMR δρα για τη διόρθωση σφαλμάτων κατά την αντιγραφή του DNA. Τέλος, οι οδοί HRc και NHEJ εμπλέκονται στην επιδιόρθωση θραυσμάτων στις δύο αλυσίδες του DNA που μπορεί να προκληθούν από μεταβολικό στρες, που επάγει το σχηματισμό ROS και νουκλεασών, την ιονίζουσα ακτινοβολία κ.α.

Τα φάρμακα με βάση την πλατίνα ασκούν την αντικαρκινική τους δράση κυρίως μέσω της δημιουργίας σταθερών παραγώγων DNA που προκαλούν στρεβλώσεις στην ίδια τη δομή του DNA. Τα παράγωγα σισπλατίνης/DNA οδηγούν περαιτέρω στον σχηματισμό γεφυρών μεταξύ δύο σημείων της ίδιας (intra strand crosslink) ή της αντιπαράλληλης (inter strand crosslink) αλυσίδας του DNA. Οι θέσεις των παραγώγων σισπλατίνης/DNA αναγνωρίζονται από το κύτταρο ως βλάβες και έτσι ενεργοποιούνται οι κυτταρικοί μηχανισμοί που τελικά οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο (218).

Σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση βλαβών στο DNA διαδραματίζουν οι ενδονουκλεάσες. Ένα συχνό είδος βλάβης που εμφανίζει το DNA είναι ο σχηματισμός απουρινικών/απυριμιδινικών θέσεων (AP sites). Οι θέσεις AP μπορούν να δημιουργηθούν είτε αυθόρμητα μέσω της μεσολαβούμενης από το νερό αποπουρίνωσης ή αποπυριμιδίνωσης είτε μετά την απομάκρυνση

οξειδωμένων και τροποποιημένων βάσεων από τις DNA-γλυκοζυλάσες. Χιλιάδες τέτοιες AP θέσεις δημιουργούνται καθημερινά στο γονιδίωμα ενός ανθρώπινου κυττάρου, που είναι μεταλλαξιγόνες και μπορούν να αναστείλουν την αντιγραφή και τη μεταγραφή του DNA. Το πρωτεύον ένζυμο που επιδιορθώνει τις AP θέσεις στα κύτταρα των θηλαστικών είναι η ενδονουκλεάση APE1 (apurinic – apirimidinic endonuclease 1), η οποία λειτουργεί μέσω της οδού BER. Αρχικά η APE1 αναγνωρίστηκε ως ένζυμο επιδιόρθωσης του DNA που παίζει κύριο ρόλο στην επιδιόρθωση των αυθόρμητα παραγόμενων AP θέσεων καθώς και των οξειδωτικών και αλκυλιωτικών βλαβών του DNA. Η APE1 πρωτεΐνη λειτουργεί επίσης ως ενεργοποιητής της οξειδοαναγωγής πολλών μεταγραφικών παραγόντων, καθώς επίσης και ως συμπαράγοντας ρύθμισης της έκφρασης πολλών γονιδίων (219).

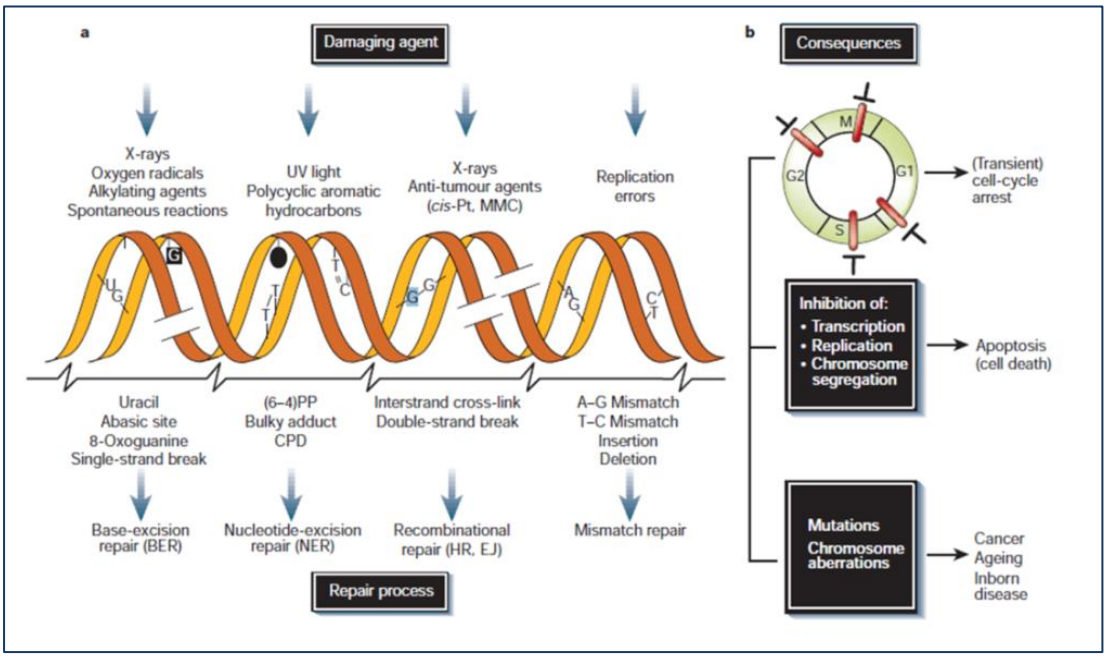
Πρόσφατα, πολλές μελέτες σε διαφορετικά είδη καρκίνου έχουν αναδείξει ένα προγνωστικό ρόλο στην έκφραση του APE1. Σε αρκετούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου κεφαλής και τραχήλου, του καρκίνου των ωοθηκών, στο οστεοσάρκωμα, στο μελάνωμα αλλά και στον καρκίνο του πνεύμονα, η χαμηλότερη έκφραση της APE1 αποτελεί δείκτη καλύτερης πρόγνωσης ενώ οι ασθενείς έχουν θετική απόκριση τόσο στη χημειοθεραπεία όσο και στην ακτινοθεραπεία. Μία μελέτη σε 103 ασθενείς με NSCLC, έδειξε ότι το 70% των ασθενών εμφάνισαν υψηλότερη έκφραση της APE1, τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα, σε σχέση με κύτταρα που απομονώθηκαν από υγιή πνευμονικό ιστό. Οι ασθενείς με υψηλή έκφραση APE1 παρουσίασαν σημαντικά μικρότερο χρόνο επιβίωσης, σε σχέση με τους υπόλοιπους ασθενείς. 73 ασθενείς της μελέτης έλαβαν

θεραπεία με σισπλατίνη, και από αυτούς που ανέπτυξαν αντίσταση, το 80% έκφραζε υψηλά επίπεδα APE1. Προκλινικές μελέτες στην κυτταρική σειρά καρκίνου του πνεύμονα, A549, έδειξε ότι η αποσιώπηση, μέσω της siRNA τεχνολογίας, της έκφρασης της APE1 οδήγησε στην ευαισθητοποίηση των κυττάρων στη θεραπεία με σισπλατίνη. Αντίθετα, σε κάποιους τύπους καρκίνου, όπως το γλοίωμα και ο καρκίνος του μαστού, η χαμηλή έκφραση της APE1 σχετίστηκε με μειωμένη επιβίωση και κακή ανταπόκριση σε ακτινοθεραπεία και ορμονοθεραπεία (220). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το κλινικοπαθολογικό αποτέλεσμα της έκφρασης της APE1 εξαρτάται κυρίως από το είδος του καρκινικού όγκου.

Άλλο ένα σημαντικό μόριο που συμμετέχει στην επιδιόρθωση του DNA και συγκεκριμένα μέσω της HRc οδού είναι η πρωτεΐνη BRCA1 που αρχικά αναγνωρίστηκε ως μόριο που σχετίζεται με τον καρκίνο του μαστού και των ωοθηκών. Πρόσφατα το προϊόν του γονιδίου σχετίστηκε με διάφορους καρκινικούς όγκους συμπεριλαμβανομένου και του NSCLC. Προ-κλινικά μοντέλα έδειξαν ότι η BRCA1 είναι ένας ρυθμιστής της κυτταρικής απόκρισης στην πλατίνα και τους παράγοντες των αντι-μικροσωληνίσκων. Συγκεκριμένα, η έκφραση της BRCA1 προσδίδει ευαισθησία στους παράγοντες αντι-μικροσωληνίσκων και αντοχή στην πλατίνα (221). Η πρώτη απόδειξη ενός πιθανού προγνωστικού ρόλου της έκφρασης της BRCA1 στον ΚΠ δημοσιεύθηκε το 2004, όπου συσχετίστηκε η χαμηλή σύνθεση του *BRCA1* mRNA με καλή απόκριση των ασθενών σε χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα (222). Σε μία κλινική μελέτη φάσης II, ασθενείς χωρίς μεταλλάξεις του EGFR, υποβλήθηκαν σε μια εξατομικευμένη προσέγγιση χημειοθεραπείας. Έτσι, οι ασθενείς που εξέφραζαν χαμηλά επίπεδα του *BRCA1* mRNA έλαβαν

σισπλατίνη και γεμσιταβίνη, οι ασθενείς που εξέφραζαν ενδιάμεσα επίπεδα του γονιδίου υποβλήθηκαν σε θεραπεία με σισπλατίνη και δοσεταξέλη και όταν τα επίπεδα έκφρασης του BRCA1 ήταν υψηλά έλαβαν μόνο δοσεταξέλη. Το διάμεσο OS για τους τρεις τύπους θεραπείας ήταν 11, 9 και 11 μήνες αντίστοιχα, υποδεικνύοντας έτσι ότι δεν υπήρχε καμία επιβλαβής δράση στους ασθενείς που λάμβαναν μόνο δοσεταξέλη (218). Σε άλλη μελέτη με 126 ασθενείς που δεν είχαν λάβει ακόμα χημειοθεραπεία παρά μόνο χειρουργική αφαίρεση του όγκου, το μειωμένο OS σχετίστηκε με τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του BRCA1 (HR 1.98; 95% CI 1.11–6.00; P=0.02). Σε ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης της BRCA1, η μέση επιβίωση δεν επιτεύχθηκε ενώ για τα άτομα με υψηλά επίπεδα έκφρασης η επιβίωση κυμαίνονταν στους 29 μήνες (223).

Ο ρόλος του BRCA1 ως βιοδείκτη για την ανταπόκριση της χημειοθεραπείας σε ασθενείς με NSCLC δεν είναι ακόμη σαφής και θα πρέπει να αξιολογηθεί με περαιτέρω μελέτες.



Εικόνα 21: Βλάβες του DNA, μηχανισμοί επιδιόρθωσης και συνέπειες. a. Πάνω, παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA, στη μέση, παραδείγματα βλαβών που προκαλούνται από τους παράγοντες αυτούς και κάτω, ο υπεύθυνος μηχανισμός για την

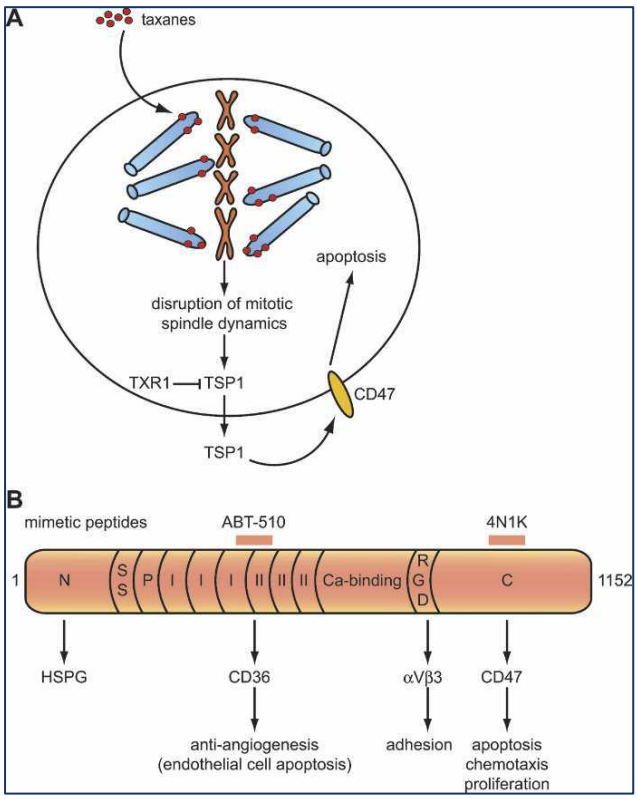
επιδιόρθωση των παραπάνω βλαβών. b. Οξεία επίδραση των βλαβών του DNA στην πορεία του κυτταρικού κύκλου που οδηγούν σε παροδική αναστολή των φάσεων G1, S, G2 και M (πάνω) και του μεταβολισμού του DNA (στη μέση). Οι μακροπρόθεσμες συνέπειες των βλαβών του DNA (κάτω) περιλαμβάνουν μόνιμες αλλαγές στην αλληλουχία του DNA (σημειακές μεταλλάξεις που επηρεάζουν μεμονωμένα γονίδια ή χρωμοσωμικές αναδιατάξεις που μπορεί να περιλαμβάνουν πολλά γονίδια) και οι βιολογικές τους συνέπειες. Συντομογραφίες : cis-Pt και MMC : σισπλατίνη και μιτομυκίνη C αντίστοιχα (αμφότεροι παράγοντες που σχηματίζουν γέφυρες στο DNA). (6-4) PP και CPD : φωτοπροϊόν πυριμιδίνης-πυριμιδίνης στις θέσεις C6 και C4 και διμερή κυκλοβουτανίου πυριμιδίνης αντίστοιχα (αμφότερα προκαλούνται από υπεριώδη ακτινοβολία), BER : επιδιόρθωση εκτομής βάσεων, NER : επιδιόρθωση εκτομής νουκλεοτιδίων, HR : ομόλογος ανασυνδυασμός, EJ : μη ομόλογη ένωση άκρων (224).

9.4. Χημειοανθεκτικότητα στις ταξάνες

Οι ταξάνες, όπως είναι η πακλιταξέλη και η δοσεταξέλη, αντιπροσωπεύουν μια σημαντική κατηγορία αντινεοπλασματικών παραγόντων. Η δράση τους σχετίζεται με τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων, και συγκεκριμένα της β-τουμπουλίνης, που οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου, καθώς δεν επιτρέπεται η μετάβαση από τη G2 στην M φάση, που τελικώς οδηγεί σε απόπτωση (225). Παρά την καλή απόκριση που εμφανίζουν οι ασθενείς στη χορήγηση χημειοθεραπευτικών φαρμάκων με βάση τις ταξάνες κατά την έναρξη της θεραπείας, η επακόλουθη ανάπτυξη αντοχής αποδείχθηκε ότι είναι ένας σημαντικός περιοριστικός παράγοντας στη μακροχρόνια χορήγηση των παραγόντων αυτών (226). Ένας μεγάλος αριθμός μελετών, σε κάποιες από τις οποίες αναφερθήκαμε στις προηγούμενες υποενότητες, σχετίζουν την έκφραση συγκεκριμένων γενετικών παραγόντων με την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία στο NSCLC. Ήδη αναφέρθηκε η συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου BRCA1 με την ανθεκτικότητα σε χημειοθεραπεία με βάση τη δοσεταξέλη. Ένας άλλος μηχανισμός ο οποίος σχετίζεται με την αντίσταση σε θεραπεία με ταξάνες είναι αυτός του γονιδίου Taxol Resistance Gene 1 (TXR1). Το γονίδιο TXR1 κωδικοποιεί μία μικρή πρωτεΐνη 18 kDa που μέχρι σήμερα δεν φαίνεται να φέρει κάποιες λειτουργικές υπομονάδες ή κάποια

συγκεκριμένα μοτίβα (227). Υπερέκφραση της πρωτεΐνης TXR1, στην καρκινική σειρά NCI-60, που απομονώθηκε από διαφορετικούς τύπους καρκίνου, φαίνεται να αναστέλλει τη διαδικασία της απόπτωσης στα κύτταρα αυτά. Η δράση αυτή διαμεσολαβείται από την καταστολή, σε μεταγραφικό επίπεδο της έκφρασης της προαποπτωτικής γλυκοπρωτεΐνης θρομβοσπονδίνης 1 (Thrombospondin 1 - TSP1). Το αποτέλεσμα αυτής της δράσης είναι η αναστολή της επαγόμενης από τις ταξάνες απόπτωση των καρκινικών κυττάρων και αύξηση της κυτταροτοξικότητάς τους είτε μέσω αδρανοποίησης της TXR1 είτε μέσω της ενεργοποίησης του μορίου CD47 από την TSP1 (226). Η αντι-αγγειογενετική και προαποπτωτική δράση της TSP1 στην καρκινογένεση είχε ήδη αναφερθεί (227). Η διαπίστωση ότι η TSP1 εμπλέκεται στην κυτταροτοξικότητα της ταξάνης είναι σύμφωνη με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι η θεραπεία με δοσεταξέλη καρκινικών κυτταρικών σειρών καρκινώματος εκ πλακωδών κυττάρων κεφαλής και τραχήλου είχε σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της TSP-1 (227). Μια μελέτη σε 96 ασθενείς με NSCLC-αδενοκαρκίνωμα που έλαβαν θεραπεία με δοσεταξέλη/γεμσιταμπίνη, επιβεβαίωσε *in vivo* τις παραπάνω παρατηρήσεις, καθώς η υπερέκφραση του TXR1 συσχετίστηκε σημαντικά με την καταστολή της έκφρασης της TSP1 (P <0,0001) και η έκφραση των δύο γονιδίων με την έκβαση της θεραπείας. Έτσι, ασθενείς με χαμηλά επίπεδα *TXR1* mRNA εμφάνισαν μεγαλύτερο διάμεσο χρόνο στην εξέλιξη του όγκου (TTP, P <0,0001) και διάμεση συνολική επιβίωση (mOS, P = 0,001) σε σύγκριση με ασθενείς με υψηλή έκφραση *TXR1*, ενώ οι ασθενείς με υψηλή σύνθεση *TSP1* mRNA εμφάνισαν μεγαλύτερη TTP (P = 0,002) και mOS (P <0,0001) σε σύγκριση με ασθενείς με χαμηλή σύνθεση *TSP1*. Τέλος, ασθενείς με υψηλή

TSP1 και χαμηλή *TXR1* mRNA σύνθεση, εμφάνισαν μεγαλύτερο TTP (P = 0.009) και mOS (P <0.0001) σε σύγκριση με ασθενείς με υψηλή *TXR1* και χαμηλή *TSP1* γονιδιακή έκφραση.



Εικόνα 22: Οι πολλαπλοί ρόλοι της θρομβοσπονδίνης (TSP1). (A) Η TSP1 παίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της απόπτωσης μέσω του CD47, μετά από επαγόμενες από τις ταξάνες βλάβες στο δίκτυο των μικροσωληνίσκων. Η υπερέκφραση του TXR1 οδηγεί σε αντίσταση στις ταξάνες μέσω καταστολής της έκφρασης της TSP1. (B) Η TSP1, που αποτελείται από 1152 αμινοξέα, είναι ένα από τα 5 μέλη της οικογένειας των θρομβοσπονδινών. Ένας αριθμός ρυθμιστικών περιοχών έχουν αναγνωριστεί στην TSP1 πρωτεΐνη που κάθε μία σχετίζεται με συγκεκριμένες βιολογικές λειτουργίες. Μεταξύ των πιο γνωστών παραγόντων που αλληλεπιδρούν με την TSP1 είναι οι πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαράνης (HSPGs), ιντεργκρίνες και οι επιφανειακοί υποδοχείς CD36 και CD47. Η μελέτη του ρόλου της δράσης της TSP1 είναι δύσκολη, καθώς παρουσιάζει διαφορετική λειτουργία που εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο που εκφράζεται και τους επιφανειακούς δείκτες που παρουσιάζονται στα κύτταρα αυτά.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η διερεύνηση μοριακών και ιστοπαθολογικών παραμέτρων που καθορίζουν την αντοχή του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (NSCLC) σε διαφορετικά σχήματα χημειοθεραπείας. Στη μελέτη αυτή αναλύθηκαν ανοσοϊστοχημικά, ιστολογικά δείγματα από ασθενείς πάσχοντες από NSCLC, οι οποίοι εισήχθησαν σε τυχαιοποιημένο πρωτόκολλο χημειοθεραπείας με δοσεταξέλη / σισπλατίνη έναντι δοσεταξέλης / γεμσιταμπίνης.

Συγκεκριμένα, αρχικά μελετήθηκε ο ρόλος των ενδονουκλεασών, που συμμετέχουν στη διαδικασία της επιδιόρθωσης των βλαβών του DNA, και των γονιδίων p53, p21 και bcl-2, που ελέγχουν τη διαδικασία της απόπτωσης, στην αντοχή του NSCLC σε χημειοθεραπεία με δοσεταξέλη/σισπλατίνη έναντι δοσεταξέλης/γεμσιταμπίνης. Στη συνέχεια της μελέτης αυτής, εκτιμήθηκε η συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης των BRCA1, TXR1 και TSP1 με την έκβαση της θεραπείας των ασθενών με NSCLC σταδίου IIIB-IV υπό χημειοθεραπεία 1^{ης} γραμμής που περιελάμβανε δοσεταξέλη.

Η μελέτη αναμένεται να συμβάλλει στην κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους δρα η κυτταροτοξική θεραπεία στον NSCLC και της μοριακής βάσης της αντοχής σε διαφορετικούς κυτταροτοξικούς παράγοντες.

ΙΙΙ. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ασθενείς, Μέθοδοι & Υλικά

1. Ασθενείς και χημειοθεραπευτικά σχήματα

1.1. Κριτήρια επιλογής ασθενών

Στην παρούσα μελέτη εντάχθηκαν συνολικά 131 ασθενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) σταδίου IIIB (με υπεζωκοτική συλλογή) και IV. Το στάδιο της νόσου τεκμηριώθηκε ιστολογικά (βιοψία ή χειρουργικό παρασκεύασμα) και απεικονιστικά (αξονική τομογραφία θώρακα, άνω-κάτω κοιλίας και εγκεφάλου). Συγκεκριμένα, τα κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη περιελάμβαναν: NSCLC σταδίου IIIB με πλευριτική συλλογή (με κυτταρολογική θετική για κακοήθεια) και σταδίου IV, κλινική κατάσταση κατά ECOG 0-2 και προσδόκιμο επιβίωσης ≥12 εβδομάδων. Επιπλέον, οι ασθενείς που επιλέχθηκαν έπρεπε να έχουν αιματολογικό έλεγχο και επαρκή ηπατική και νεφρική λειτουργία, η οποία αξιολογήθηκε βάσει των ακόλουθων εργαστηριακών τιμών αναφοράς: αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων (WBC) ≥2500/μL, απόλυτος αριθμός ουδετερόφιλων (ANC) ≥1500/μL, αριθμός αιμοπεταλίων ≥ 100.000/μL, κρεατινίνη ορού ≤ 1.5 x ανώτερο επιτρεπτό όριο (ULN), πρωτεΐνη ούρων ≤ 2 g/24 h, ολική χολερυθρίνη ορού ≤ 3 mg/dL, AST (SGOT)/ALT (SGPT) ≤ 2 x ULN. Ασθενείς με ιστορικό άλλης νεοπλασίας, καρδιακής νόσου, περιφερικής νευροπάθειας, σοβαρής ψυχιατρικής διαταραχής ή ενεργούς λοίμωξης, εξαιρέθηκαν από τη μελέτη.

Η συλλογή των δειγμάτων ιστού έγινε μεταξύ Ιανουαρίου 2003 και Δεκεμβρίου 2007 στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου και το Γενικό Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών «Σωτηρία». Στη μελέτη εντάχθηκαν ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς

δοσεταξέλης/γεμσιταμπίνης ή δοσεταξέλης/σισπλατίνης ως 1^{ης} γραμμής θεραπεία. Όλοι οι ασθενείς έπρεπε να είχαν συμπληρώσει το 18^{ο} έτος της ηλικίας τους. Πριν την ένταξη των ασθενών στη μελέτη, ήταν υποχρεωτική η φυσική τους εξέταση και η αναλυτική λήψη ιστορικού. Όλοι οι ασθενείς αποδέχτηκαν εγγράφως να χρησιμοποιηθεί το βιοπτικό υλικό του όγκου για μοριακό και ανοσοϊστοχημικό έλεγχο, χωρίς επιβάρυνση δική τους ή του νοσοκομείου. Η μελέτη έχει πάρει την έγκριση της επιστημονικής επιτροπής Ηθικής και Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου και του Νοσοκομείου «Σωτηρία», ενώ τα στοιχεία των ασθενών δεν έχουν χρησιμοποιηθεί ή παρουσιαστεί σε άλλη μελέτη.

Στη μελέτη συμμετείχαν 131 ασθενείς με NSCLC (106 άντρες και 25 γυναίκες) με εύρος ηλικίας 37 έως 78 έτη. Το 73% των ασθενών ήταν σταδίου IV ενώ οι μισοί περίπου ασθενείς διαγνώστηκαν με αδενοκαρκίνωμα (52%) και οι υπόλοιποι με πλακώδες ή άλλου τύπου καρκίνωμα (43% και 5% αντίστοιχα). Η πλειονότητα των ασθενών ήταν σε καλή φυσική κατάσταση, όλοι ικανοί να αυτοεξυπηρετηθούν (PS κατά ECOG, 0-2). Το δείγμα των ασθενών με βάση την πρώτη γραμμή θεραπείας ήταν αντιπροσωπευτικό, καθώς στους 64 χορηγήθηκε συνδυαστική θεραπεία δοσεταξέλης / σισπλατίνης και στους 67 δοσεταξέλης / γεμσιταμπίνης. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Χαρακτηριστικά των ασθενών

Χαρακτηριστικά	Ασθενείς	
	Αριθμός	%
Φύλο		
Άντρες	106	88
Γυναίκες	25	12
Ηλικία		
Διάμεσος	60	
Εύρος	37 – 78	
Κατάσταση απόδοσης κατά ECOG		
0	67	51
1	52	40
2	12	9
Στάδιο		
IIIB	35	27
IV	96	73
Ιστολογίκός τύπος		
Αδενοκαρκίνωμα	68	52
Πλακώδες καρκίνωμα	56	43
Άλλο	7	5
Χημειοθεραπευτικό σχήμα		
δοσεταξέλη/σισπλατίνη	64	49
δοσεταξέλη/γεμσιταβίνη	67	51
Αντικειμενική ανταπόκριση (CR+PR)	40	30
PFS (μήνες, 95% CI)	4.2 (2.7 – 5.7)	
Διάμεση συνολική επιβίωση (OS) (μήνες, 95% CI)	11.1 (9.7 – 14.6)	

Συντομογραφίες: CR: πλήρης ανταπόκριση (complete response), PR: μερική ανταπόκριση (partial response), PFS: επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (Progression-free survival), OS: συνολική επιβίωση (overall survival), CI: διάστημα εμπιστοσύνης, ECOG: Συνεργατική Ογκολογική Ομάδα (Eastern Cooperative Oncology Group).

1.2. Χημειοθεραπευτικά σχήματα

Από το σύνολο των 131 ασθενών με NSCLC που συμμετείχαν στην μελέτη οι 64 (49%) λάμβαναν συνδυαστική θεραπεία με δοσεταξέλη και σισπλατίνη ενώ οι υπόλοιποι 67 (51%) λάμβαναν συνδυαστική θεραπεία με δοσεταξέλη και γεμσιταμπίνη. Συγκεκριμένα, το θεραπευτικό σχήμα δοσεταξέλης / γεμσιταμπίνης περιελάμβανε την χορήγηση των φαρμάκων με τη σειρά που αναφέρονται :

1. Γεμσιταμπίνη 1100mg/m^2 (Gemzar; Eli Lilly, Indianapolis, USA), με ενδοφλέβια έγχυση, διάρκειας 30min στις μέρες θεραπείας 1 και 8.
2. Δοσεταξέλη 100mg/m^2 (Taxotere; Sanofi-Aventis, Collegeville, USA), με ενδοφλέβια έγχυση, διάρκειας 1h, την ημέρα 1 (μετά τη χορήγηση της γεμσιταμπίνης), (Διάρκεια κύκλου θεραπείας, 21 ημέρες).

Το θεραπευτικό σχήμα δοσεταξέλης/σισπλατίνης περιλάμβανε τη χορήγηση των φαρμάκων με τη σειρά που αναφέρονται :

1. Δοσεταξέλη 75mg/m^2 (Taxotere; Sanofi-Aventis, Collegeville, USA), με ενδοφλέβια έγχυση, διάρκειας 1h, την ημέρα 1.
2. Σισπλατίνη 75mg/m^2, με ενδοφλέβια έγχυση, διάρκειας 1h, την ημέρα 1 (Διάρκεια κύκλου θεραπείας, 21 ημέρες).

Όλοι οι ασθενείς έλαβαν dexamethasone σαν προφυλακτική θεραπεία κατά της κατακράτησης υγρών και αντιδράσεων υπερευαισθησίας. Η πρώτη δόση των 8mg χορηγήθηκε 12h πριν από τη θεραπεία. Οι τρεις επόμενες δόσεις χορηγήθηκαν την ημέρα της θεραπείας (ημέρα 1) το πρωί, 1 ώρα πριν από την έγχυση της δοσεταξέλης και το βράδυ. Οι δύο τελευταίες δόσεις χορηγήθηκαν την ημέρα μετά την αγωγή (ημέρα 2), το πρωί και το βράδυ. Επιπλέον, ασθενείς που λάμβαναν σισπλατίνη λάμβαναν και αντιεμετικό σχήμα με οντασεντρόνη. Δευτερογενής προφυλακτική αγωγή με ανασυνδυασμένο ανθρώπινο αυξητικό παράγοντα των ουδετερόφιλων (rhG-CSF; Granocyte; Sanofi-Aventis, Bridgewater, NJ, USA) χορηγήθηκε στους ασθενείς μετά την ολοκλήρωση του πρώτου κύκλου θεραπείας. Σε περίπτωση αιματολογικής τοξικότητας επιτρέπονταν μέχρι δύο διαδοχικές μειώσεις των δόσεων της σισπλατίνης, γεμσιταμπίνης και δοσεταξέλης (25% μείωση κάθε φορά).

1.3. Αξιολόγηση της θεραπείας

Η ανταπόκριση των ασθενών στη χορήγηση των χημειοθεραπευτικών σχημάτων με βάση τη δοσεταξέλη καθορίστηκε σύμφωνα με τα Κριτήρια Αξιολόγησης της Ανταπόκρισης στους Συμπαγείς Όγκους (RECIST-Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) (228). Οι δημοσιευμένοι αυτοί κανόνες καθορίζουν πότε οι συμπαγείς καρκινικοί όγκοι, σε έναν ασθενή μειώνονται, παραμένουν ίδιοι ή αυξάνονται σε απόκριση σε ένα φαρμακευτικό σχήμα. Το φορτίο της νόσου καθορίζεται από τις επιλεγμένες βλάβες-στόχους.

Σύμφωνα με τα κριτήρια RECIST κατά την έναρξη της θεραπείας οι καρκινικοί όγκοι χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, στους μετρήσιμους όγκους όπου η βλάβη μπορεί να μετρηθεί επακριβώς σε μία τουλάχιστο διάσταση, με τη μεγαλύτερη διάμετρο να καταγράφεται (≥20mm με συμβατικές τεχνικές ή ≥10mm με σπειροειδή αξονική τομογραφία), μη μετρήσιμες βλάβες - nonmeasurable (<20mm με συμβατικές τεχνικές ή <10mm με σπειροειδή αξονική τομογραφία) και πραγματικά μη μετρήσιμες βλάβες - truly nonmeasurable. Όλες οι μετρήσιμες βλάβες, με μέγιστο αριθμό των πέντε αλλοιώσεων ανά όργανο και δέκα αλλοιώσεις στο σύνολο, αντιπροσωπευτικών για όλα τα προσβληθέντα όργανα, χαρακτηρίζονται ως βλάβες-στόχοι, οι οποίες καταγράφονται και μετριούνται με CT ή MRI κατά την έναρξη της μελέτης. Το άθροισμα της μεγαλύτερης διαμέτρου (Sum of the Longest Diameter) για όλες τις βλάβες-στόχους υπολογίζεται κατά την έναρξη της θεραπείας και αποτελεί το σημείο αναφοράς για το χαρακτηρισμό της απόκρισης των καρκινικών όγκων στα χημειοθεραπευτικά σχήματα. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η απόκριση των καρκινικών όγκων στα χημειοθεραπευτικά σχήματα κατηγοριοποιείται ως εξής :

Πλήρης Ανταπόκριση (Complete Response-CR) : στη μέτρηση μετά την έναρξη της θεραπείας παρατηρείται εξάλειψη όλων των βλαβών-στόχων.

Μερική Ανταπόκριση (Partial Response-PR) : στη μέτρηση μετά την έναρξη της θεραπείας παρατηρείται μείωση τουλάχιστον 30% στο άθροισμα της μεγαλύτερης διαμέτρου για όλες τις βλάβες-στόχους.

Πρόοδος νόσου (Progressive Disease-PD) : στη μέτρηση μετά την έναρξη της θεραπείας παρατηρείται αύξηση τουλάχιστον 20% στο άθροισμα της μεγαλύτερης διαμέτρου για όλες τις βλάβες-στόχους ή ανίχνευση νέων αλλοιώσεων.

Σταθερή νόσος (Stable Disease-SD) : σε αυτή την περίπτωση δεν παρατηρείται ούτε επαρκής συρρίκνωση των βλαβών-στόχων ώστε να ανήκουν στην κατηγορία PR αλλά παράλληλα δεν παρατηρείται επαρκής αύξηση ώστε να κατηγοριοποιηθούν στην PD. Ως σημείο αναφοράς λαμβάνεται το μικρότερο άθροισμα μεγαλύτερης διαμέτρου των βλαβών-στόχων από το σημείο έναρξης της θεραπείας.

Η αντικειμενική απόκριση (objective response-OR) στην παρούσα μελέτη υπολογίστηκε με βάση το άθροισμα των κατηγοριών (CR+PR). Η επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (Progression free survival - PFS), μετρήθηκε από την ημέρα 1 της έναρξης της θεραπείας μέχρι την ημέρα της 1^{ης} απεικονιστικής επιβεβαίωσης της εξέλιξης της νόσου ή το θάνατο του ασθενή, ενώ η διάμεση συνολική επιβίωση (median overall survival - mOS) υπολογίστηκε από την ημέρα διάγνωσης της μεταστατικής νόσου μέχρι το θάνατο του ασθενή.

Εν συντομία, η εκτίμηση της κατάστασης του ασθενή πριν την έναρξη της θεραπείας περιελάμβανε φυσική εξέταση, ακτινογραφία θώρακος, ηλεκτροκαρδιογράφημα, γενική αίματος, βιοχημικό έλεγχο και αξονική

τομογραφία (CT) θώρακος, άνω-κάτω κοιλίας και εγκεφάλου για τη σταδιοποίηση της νόσου. Οι ασθενείς υποβλήθηκαν επίσης, σε ολόσωμο σπινθηρογράφημα οστών και επιπλέον ακτινολογικό έλεγχο όποτε αυτό απαιτούνταν. Σε κάθε κύκλο θεραπείας υποβάλλονταν σε φυσική εξέταση, ηλεκτροκαρδιογράφημα καθώς και αιματολογικό και βιοχημικό έλεγχο. Βλάβες που ήταν μετρήσιμες με την κλινική εξέταση καταγράφονταν μετά από κάθε κύκλο θεραπείας, ενώ η απάντηση των ασθενών στη χημειοθεραπεία εκτιμούνταν με αξονική τομογραφία κάθε 3 κύκλους χημειοθεραπείας και κατηγοριοποιούνταν με βάση τα κριτήρια που αναφέραμε παραπάνω.

1.4. Εκτίμηση Τοξικότητας

Σύμφωνα με το National Cancer Institute (NCI) ως ανεπιθύμητη ενέργεια ή τοξικότητα θεωρείται οποιοδήποτε αρνητικό σύμπτωμα, σημάδι ή νόσος, συμπεριλαμβανομένων και των μη φυσιολογικών εργαστηριακών ευρημάτων, το οποίο συνδέεται χρονικά με τη χορήγηση μιας ιατρικής θεραπείας ή διαδικασίας, που μπορεί να θεωρηθεί ή όχι ότι σχετίζεται με την καθεαυτή λήψη της θεραπείας ή διαδικασίας (229). Η κλίμακα με βάση την οποία γίνεται η εκτίμηση της τοξικότητας στη χημειοθεραπεία παρουσιάζεται στον Πίνακα 8, που ακολουθεί.

Πίνακας 8: Κλίμακα εκτίμησης της τοξικότητας.

Βαθμός τοξικότητας	Χαρακτηρισμός
0	Καμία ανεπιθύμητη ενέργεια ή εντός φυσιολογικών ορίων
1	Ήπιες ανεπιθύμητες ενέργειες
2	Μέτριες ανεπιθύμητες ενέργειες
3	Σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες
4	Απειλητικές για τη ζωή ανεπιθύμητες ενέργειες
5	Θάνατος που οφείλεται σε παρενέργειες

Η εκτίμηση της τοξικότητας της χημειοθεραπείας γινόταν κάθε φορά μετά το τέλος του κάθε κύκλου θεραπείας, με τη χρήση ειδικών ερωτηματολογίων και εργαστηριακών εξετάσεων (γενική εξέταση αίματος, αριθμός αιμοπεταλίων, κ.α.) και η διαβάθμιση γινόταν σύμφωνα με τα κοινά κριτήρια τοξικότητας για τις ανεπιθύμητες ενέργειες του NCI (229). Οι πιο συχνά εμφανιζόμενες παρενέργειες της χημειοθεραπείας ήταν η αναιμία, η ουδετεροπενία και η θρομβοπενία (αιματολογική τοξικότητα) καθώς και η κόπωση, ναυτία/έμετος, ανορεξία, διάρροια, εμπύρετη ουδετεροπενία κ.α. (μη αιματολογική τοξικότητα).

1.5. Ερευνητικά κέντρα

Τα ερευνητικά κέντρα επιλέχθηκαν βάσει της δυνατότητάς τους να εντάξουν έναν ικανοποιητικό αριθμό ασθενών που πληρούσαν τα κριτήρια εισαγωγής της μελέτης. Τα κέντρα αυτά ήταν τα ακόλουθα:

- Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου
- Γενικό Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών «Σωτηρία».

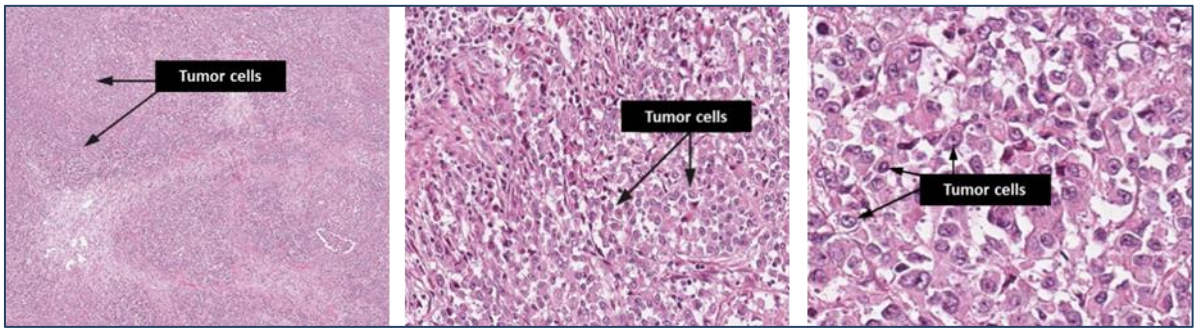
2. Μέθοδοι & Υλικά

2.1. Μονιμοποίηση ιστού σε μπλοκ παραφίνης/χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης

Για την ανοσοϊστοχημική παρατήρηση χρησιμοποιήθηκαν βιοπτικά δείγματα από τον πρωτοπαθή όγκο ασθενών με NSCLC που εισήχθησαν στο τυχαιοποιημένο πρωτόκολλο χημειοθεραπείας με συνδυασμό δοσεταξέλης με σισπλατίνη ή γεμσιταμπίνη. Οι ιστοί αυτοί μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλίνης 4% και στη συνέχεια εγκλείστηκαν σε παραφίνη. Από τον κάθε κύβο παραφίνης ελήφθησαν τομές, με την χρήση μικροτόμου, πάχους 5μm

που τοποθετήθηκαν σε ειδικές αντικειμενοφόρες πλάκες. Η εντόπιση της παθολογικής αλλοίωσης του ιστού έγινε μέσω μικροσκοπικής παρατήρησης μετά τη χρώση των παρασκευασμάτων με ειδικές χρωστικές (αιματοξυλίνη–ηωσίνη).

Ο διχρωματισμός που προκύπτει από τον συνδυασμό των δύο αυτών χρωστικών επιτρέπει την μικροσκοπική παρατήρηση του ιστού που υπάρχει στην τομή της αντικειμενοφόρου πλάκας και τον διαχωρισμό των παθολογικών και μη περιοχών του ιστού (Εικόνα 23). Τα βήματα που ακολουθούνται για την χρώση των παρασκευασμάτων με τη χρώση αιμοτοξυλίνης/ηωσίνης παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.



Εικόνα 23: Παρασκεύασμα αδενοκαρκινώματος σταδίου ΙΙ μετά τη χρώση με αιματοξυλίνη/ηωσίνη. Οι εικόνες προέρχονται από φωτονικό μικροσκόπιο με αυξανόμενη μεγέθυνση.

Η παρατήρηση των παρασκευασμάτων έγινε με τη χρήση φωτονικού μικροσκοπίου και η απομόνωση επιθυμητών περιοχών πλούσιων σε καρκινικά κύτταρα, με τη βοήθεια μικροσκοπίου-micro dissector.

Πίνακας 9: Βήματα χρώσης των παρασκευασμάτων με αιματοξυλίνη/ηωσίνη.

Βήμα	Διαλυμα	Χρόνος	Στάδιο
1	υδατόλουτρο 50-55˚C	5-10min	Αποπαραφίνωση
2	Ξυλόλη	5min	
3	Ξυλόλη	5min	
4	Αιθανόλη 100 %	2mim	Απομάκρυνση Ξυλόλης
5	Αιθανόλη 100 %	2mim	
6	Αιθανόλη 95 %	1min	Ενυδάτωση
7	Αιθανόλη 95 %	1min	
8	Νερό βρύσης	15min	
9	Διάλυμα Αιματοξυλίνης	5-15min	Χρώση
10	Διαφοροποίηση	3-5min	
11	Νερό βρύσης	πλύση	
12	Αμμωνιούχο νερό	3-5 καταδύσεις	
13	Νερό βρύσης	πλύση	
14	Διάλυμα Ηωσίνης	15sec-2min	
15	Αιθανόλη 95 %	2mim	Αφυδάτωση
16	Αιθανόλη 95 %	2mim	
17	Αιθανόλη 100 %	2mim	
18	Αιθανόλη 100 %	2mim	
19	Ξυλόλη	2mim	Διαύγαση
20	Ξυλόλη	2mim	

2.2. Ανοσοϊστοχημεία

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μία εργαστηριακή τεχνική που συνδυάζει την ιστοπαθολογία με την ανοσολογία και τη χημεία. Στην τεχνική αυτή ένα συγκεκριμένο σημασμένο αντίσωμα αναγνωρίζει ένα ειδικό αντιγόνο-στόχο με αποτέλεσμα τη δημιουργία μίας χημικής αντίδρασης που καθιστά ορατό το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος όταν το σύμπλοκο αυτό είναι παρόν. Δύο τρόποι αναφέρονται για την ανίχνευση του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος, ο **άμεσος** τρόπος όπου το πρωτογενές αντίσωμα που αντιδρά άμεσα με το αντιγόνο είναι σημασμένο με ένα χρωμοφόρο (π.χ. FITC) (αντίδραση ενός βήματος) και ο **έμμεσος** τρόπος, που περιλαμβάνει ένα αντίσωμα που αναγνωρίζει το αντιγόνο και ένα δεύτερο σημασμένο αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει το πρωτογενές αντίσωμα. Ο έμμεσος τρόπος είναι πιο

ευαίσθητος λόγω της ενίσχυσης του σήματος μέσω αρκετών αντιδράσεων του δευτερογενούς αντισώματος, με διαφορετικές αντιγονικές θέσεις του πρωτεύοντος αντισώματος.

Η τεχνική δύναται να διακριθεί σε επιμέρους στάδια τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 10, που ακολουθεί.

Για την ειδικότητα των πρωτογενών αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκαν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες (control). Για αρνητικό μάρτυρα, οι τομές του ιστού επεξεργάστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Πίνακα 9, χωρίς όμως την προσθήκη του πρωτογενούς αντισώματος. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκαν και τομές από μη προσβεβλημένες περιοχές. Η ανίχνευση του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος έγινε με τη χρήση ολοκληρωμένου συστήματος αντιδραστηρίων Dako EnVision+System-HRP (DAB) (Dako, Glostrup, Denmark). Στον Πίνακα 11 αναφέρεται το σύνολο των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Πίνακας 10: Βήματα ανοσοϊστοχημικής χρώσης των παρασκευασμάτων.

Βήμα	Διαλυμα	Χρόνος	Στάδιο
1	Υδατόλουτρο 50-55˚C	5-10min	Αποπαραφίνωση
2	Ξυλόλη	5min	
3	Ξυλόλη	5min	
4	Ξυλόλη	5min	
5	Αλκοόλη 100%	1min	Ενυδάτωση
6	Αλκοόλη 100%	1min	
7	Αλκοόλη 96%	1min	
8	Αλκοόλη 80%	1min	
9	Αλκοόλη 70%	1min	
10	$C_6H_8O_7$ (pH 6) και βρασμός (MW)	2min (800W) & 7min (300W)	Ανάδειξη αντιγονικού επιτόπου
ή	EDTA (pH 8)και βρασμός (MW)	5min (800W) & 5min (500W) & 5min (300W)	
11	Θερμοκρασία δωματίου	20min	
12	Νερό	πλύση	
13	Θερμοκρασία δωματίου	10min	
14	Νερό	πλύση	
15	H_2O_2 (2-3%)	10min στο σκοτάδι	Αναστολή ενδογενούς υπεροξειδάσης
13	Tris Buffered Saline	3 x 5min πλύσεις	
14	Επώαση με 1° αντίσωμα (Πίνακας 10)	2h	Δέσμευση 1^{ου} αντισώματος
15	Tris Buffered Saline	3 x 5min πλύσεις	
16	Dako EnVision+ System-HRP	30min	Σήμανση συνδέσμου
17	Tris Buffered Saline	3 x 5min πλύσεις	
18	DAB (1: 50 αραίωση)	2min	Δέσμευση χρωμογόνου
19	Tris Buffered Saline	2 x 5min πλύσεις	
20	Αιμοτοξυλίνη	1min	Χρώση αιματοξυλίνης
21	Οξινισμένη αλκοόλη	15sec	
22	Νερό	πλύση	
23	Αιθανόλη 95 %	2min	Αφυδάτωση
24	Αιθανόλη 95 %	2min	
25	Αιθανόλη 100 %	2min	
26	Αιθανόλη 100 %	2min	
27	Ξυλόλη	2mim	Διαύγαση
28	Ξυλόλη	2mim	

Συντομογραφίες: $C_6H_8O_7$: κιτρικό οξύ, EDTA: αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ, MW: φούρνος μικροκυμάτων, H_2O_2: υπεροξείδιο του υδρογόνου, DAB: διάμινο-βενζιδίνη.

Πίνακας 11: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Αντίσωμα	Κλωνικότητα	Πηγή	Κλώνος	Αραίωση	Ανάδειξη Αντιγόνου	Χρόνος επώασης
BCL2	Monoclonal	DAKO, Denmark	Clone: 124	1:50	0.01M $C_6H_8O_7$ PH 6.0	2h RT
p53	Monoclonal	DAKO, Denmark	Clone: DO-7	1:50	0.01M $C_6H_8O_7$ PH 6.0	2h RT
$p21^{WAF1/Cip1}$	Monoclonal	DAKO, Denmark	Clone: SX118	1:100	0.01M $C_6H_8O_7$ PH 6.0	2h RT
HAP1	Polyclonal	OXFORD UNIVERSITY (Prof. Ian Hickson)		1:100	1.2 mM EDTA PH 8.0	2h RT

Συντομογραφίες: RT: Θερμοκρασία δωματίου

2.2.1. Εκτίμηση ανοσοϊστοχημικής χρώσης

Για τη μείωση της υποκειμενικότητας, η εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης σε όλες τις τομές έγινε τυφλά για κάθε περιστατικό από δύο Παθολογοανατόμους (Ε.Λ. και Ε.Σ.). Η εκτίμηση της έντασης και της κατανομής της ανοσοθετικότητας των καρκινικών και μη κυττάρων έγινε με την παρατήρηση των παρασκευασμάτων σε φωτονικό μικροσκόπιο.

Η εκτίμηση του ανοσοεντοπισμού έγινε με βάση ένα ημιποσοτικό σύστημα βαθμονόμησης, όπου για κάθε τομή προέκυπτε βαθμολογία από 0 έως 6 που ήταν το αποτέλεσμα του αθροίσματος της έντασης (0-3) και της κατανομής των θετικών κυττάρων (0-3) (0=αρνητική, 1=ασθενής έκφραση, 2=μέτρια έκφραση, 3=ισχυρή έκφραση). Τα παρασκευάσματα στα οποία παρατηρήθηκε χρώση σε >10% των κυττάρων, θεωρήθηκαν θετικά για την έκφραση των υπό μελέτη πρωτεϊνών (230). Φωτογραφίες των ιστολογικών τομών ελήφθησαν με τη χρήση της ψηφιακής κάμερας Nikon DXM 1200C η οποία είναι προσαρμοσμένη σε μικροσκόπιο Nikon Eclipse 80i και τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος ACT-1C (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA). Η επιλογή των κατάλληλων περιοχών του ιστού για την απομόνωση ολικού RNA, πραγματοποιήθηκε, όπως προαναφέρθηκε, με την χρήση μικροτόμου (MicroDissector, Eppendorf AG, Hamburg, Germany).

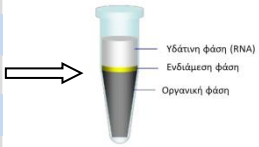
2.3. Απομόνωση ολικού RNA από ιστό και Reverse transcription – PCR (RT-PCR)

Η απομόνωση ολικού RNA από ιστό έγινε με τη χρήση ειδικού ολοκληρωμένου συστήματος που στηρίζεται στις ιδιότητες της τριζόλης (Trizol LS, Invitrogen, Carlsbad, CA,USA). Η τριζόλη προκαλεί τη διάρρηξη της μεμβράνης των κυττάρων ώστε να εκχυλιστούν τα κυτταροπλασματικά υλικά

στα οποία περιέχεται και το RNA. Ο διαχωρισμός του RNA από τα υπόλοιπα κυτταροπλασματικά και πυρηνικά υλικά (DNA, πρωτεΐνες κ.α.) επιτυγχάνεται μέσω του διαλύματος χλωροφορμίου. Η διαδικασία της απομόνωσης περιγράφεται στον Πίνακα 12.

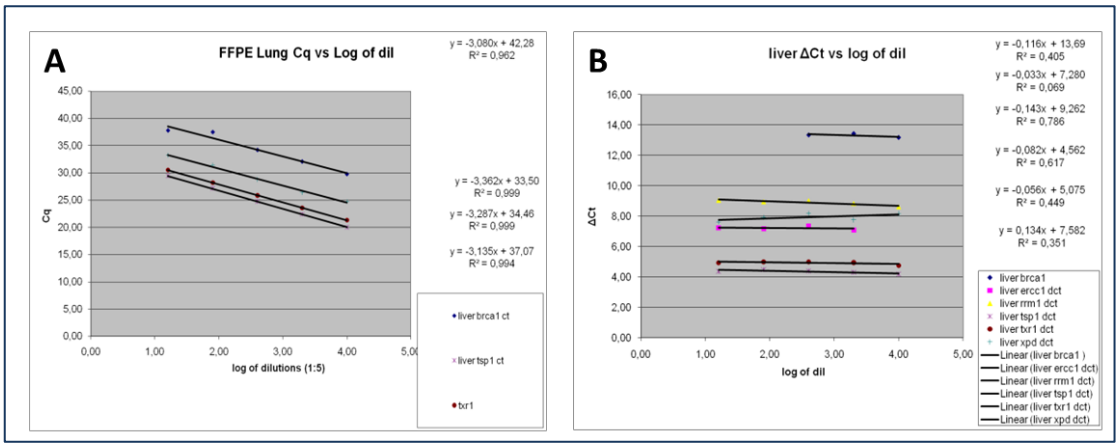
Πίνακας 12: Διαδικασία απομόνωσης ολικού RNA από ιστό με χρήση τριζόλης

Βήμα	Διαδικασία
1	Προσθήκη 0.75mL TRIzol™ LS Reagent ανά 0.25mL όγκο ιστού
2	Ομογενοποίηση του ιστού στη τριζόλη για 1-2min με χρήση αυτόματης πιπέτας
3	Επώαση για 5min σε θερμοκρασία δωματίου
4	Προσθήκη 0.2mL χλωροφορμίου ανά 0.75mL τριζόλης
5	Επώαση για 2-3min σε θερμοκρασία δωματίου
6	Φυγοκέντρηση του δείγματος για 15min, 12.000 × g, 4°C
7	Μεταφορά της υδάτινης φάσης σε καινούργιο Eppendorf
8	Προσθήκη 0.5mL ισοπροπανόλης ανα 0.75mL τριζόλης
9	Επώαση για 10min σε θερμοκρασία δωματίου
10	Φυγοκέντρηση του δείγματος για 10min, 12.000 × g, 4°C
11	Απόρριψη του υπερκείμενου με αυτόματη πιπέτα
12	Επαναιώρηση της πελέτας με το RNA με 1mL of 75% ETOH/0.75mL τριζόλης
13	Ελαφρία ανάδευση του αιωρήματος με αυτόματο αναδευτήρα (vortex)
14	Φυγοκέντρηση του δείγματος για 5min, 7.500 × g, 4°C
15	Απόρριψη του υπερκείμενου με αυτόματη πιπέτα
16	Στεγνώνουμε την πελέτα του RNA 5-10min υπο κενό
17	Επαναιώρηση της πελέτας σε 20–50μL of RNase-free νερό, 0.1mM EDTA
18	Αποθήκευση των δειγμάτων στους -80°C μέχρι τη χρήση τους



Ο ποσοτικός προσδιορισμός του RNA που απομονώθηκε από το κάθε μπλοκ ιστού έγινε με τη χρήση φωτομέτρου μικροποσοτήτων Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) στις οπτικές απορροφήσεις 260 και 280nm (A_{260}, A_{280}). Η απορρόφηση στα 260nm παρέχει τη συνολική περιεκτικότητα του δείγματος σε νουκλεϊνικά οξέα (ελεύθερα νουκλεοτίδια, RNA, ssDNA και dsDNA) και ο υπολογισμός της τελικής συγκέντρωσης του δείγματος σε RNA γίνεται με βάση τον τύπο A_{260} × αραίωση × 40 = μg RNA/mL. Ο λόγος A_{260}/A_{280} καθορίζει την καθαρότητα του δείγματος (περιεκτικότητα πρωτεϊνών στο διάλυμα των νουκλεϊκών οξέων).

Για δείγματα RNA, ο λόγος $A_{260}/A_{280} \approx 2$ υποδηλώνει μεγάλη καθαρότητα του δείγματος. Η ποιότητα του εκχυλισμένου RNA αξιολογήθηκε επίσης και με την ενίσχυση της έκφρασης της β-ακτίνης (b-actin) πριν την διαδικασία της RT-qPCR. Μόνο δείγματα με Cq <30 θεωρήθηκαν κατάλληλα για περαιτέρω ανάλυση σύμφωνα με προκαταρκτικά πειράματα που έγιναν για την επικύρωση των συνθηκών δράσης των εκκινητών και των ανιχνευτών (Εικόνα 24).



Εικόνα 24: Προκαταρκτικά πειράματα PCR για τον καθορισμό των συνθηκών δράσης των εκκινητών και ανιχνευτών σε διαδοχικές αραιώσεις RNA απομονωμένο από διαφορετικούς ιστούς (A: ιστός πνεύμονα, B: ιστός από ήπαρ). Ο καθορισμός έγινε με βάση την τιμή Cq (A) και ΔCq (B).

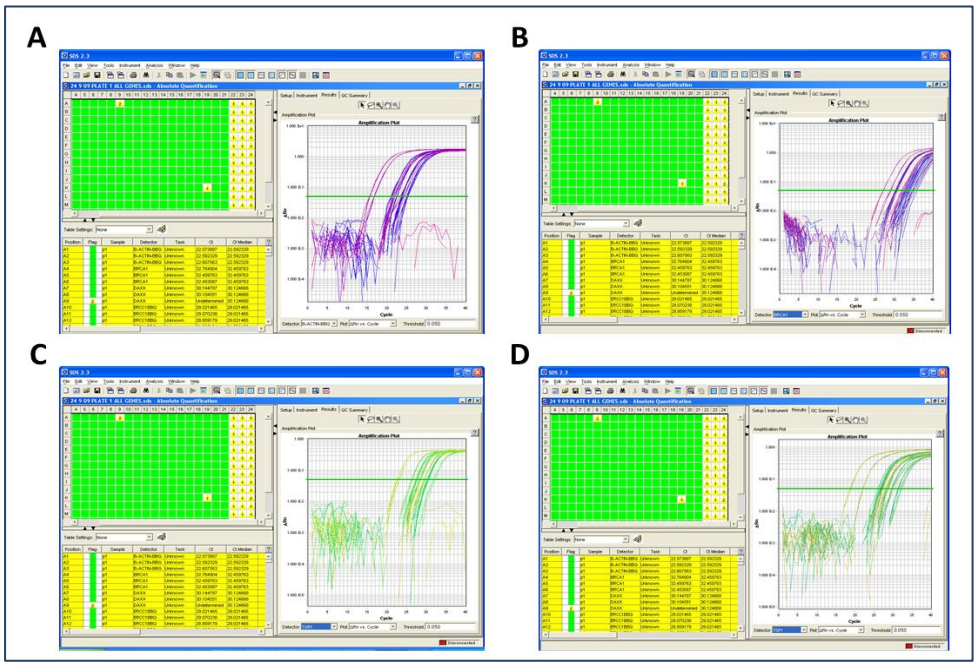
Μετά την απομόνωση του RNA και του υπολογισμού της συγκέντρωσής του, ακολουθεί η σύνθεση του cDNA από κάθε δείγμα με τη χρήση της αντίστροφης μεταγραφάσης που παρέχεται στο ολοκληρωμένο σύστημα αντιδραστηρίων SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής του ολικού RNA σε cDNA (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) που πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του θερμικού κυκλοποιητή περιγράφεται στον Πίνακα 13 που ακολουθεί.

Πίνακας 13: Διαδικασία σύνθεσης cDNA από ολικό RNA με RT-PCR

Βήμα	Διαδικασία	
1	Σε PCR tubes προσθέτουμε:	300ng RNA 50–250ng random primers 1 μl 10mM dNTP Mix Σε τελικό όγκο 13μl σε νερό
2	Θέρμανση του δείγματος στους 65°C για 5min	
3	Άμεση μεταφορά του δείγματος σε πάγο για 1min	
4	Ελαφριά φυγοκέντρηση των δειγμάτων	
5	Στα δείγματα προσθέτουμε:	4μl 5X First-Strand Buffer 1μl 0.1 M DTT 1μl RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor 1μl of SuperScript™ III RT (200 units/μl)
6	Ανάδευση των δειγμάτων με αυτόματη πιπέτα	
7	Θέρμανση των δειγμάτων στον κυκλοποιητή στους 25°C για 5min	
8	Θέρμανση των δειγμάτων στον κυκλοποιητή στους 50°C για 50min	
9	Θέρμανση των δειγμάτων στον κυκλοποιητή στους 70°C για 15min	
10	Αποθήκευση των δειγμάτων στους -80°C μέχρι τη χρήση τους	

2.4. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR)

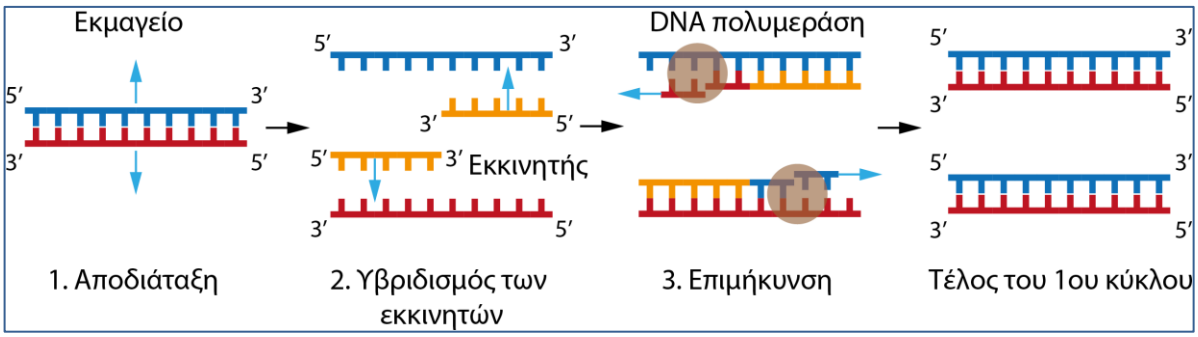
Τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης των παραγόντων BRCA1, TXR1 και TSP1 αναλύθηκαν με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-qPCR) στον κυκλοποιητή ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) (Εικόνα 25).



Εικόνα 25: Καμπύλες ενίσχυσης, A. για τη β-ακτίνη, B. για το BRCA1, C. για το TXR1, D. για το TSP1, μετά από ανάλυση με το υπολογιστικό πρόγραμμα SDS έκδοση 2.3 (Applied Biosystems).

Η PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων DNA *in vitro*. Μία τυπική αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά. Αυτά τα στάδια είναι, η αποδιάταξη όπου οι δύο αλυσίδες του DNA αποδιατάσσονται υπό την επίδραση της θερμοκρασίας (94-95°C), η υβριδοποίηση όπου οι εκκινητές (ολιγονουκλεοτίδια 18-25bp που οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να ενισχυθεί) υβριδοποιούνται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA (55-65°C) και το στάδιο της επιμήκυνσης όπου το ένζυμο της αντίδρασης, η πολυμεράση, επιμηκύνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία του DNA ως εκμαγείο (72°C) (Εικόνα 26). Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται από 25 έως 35 φορές σε θερμικό κυκλοποιητή, μία συσκευή που φέρει μία θερμαινόμενη πλάκα ικανή να εναλλάσσει διάφορες θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια.

Το προϊόν μίας PCR αντίδρασης μπορεί να υποβληθεί σε αλληλούχιση, σε κλωνοποίηση σε πλασμιδιακούς φορείς, σε ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης ή ακρυλαμίδης, ή σε πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Το αποτέλεσμα μίας κλασικής PCR αντίδρασης είναι πάντα ποιοτικό και απαντά σε ερωτήματα όπως «υπάρχει ή δεν υπάρχει έκφραση», όπως για παράδειγμα «ο παράγοντας X εκφράζεται ή δεν εκφράζεται στον ιστό Y». Είναι προφανές λοιπόν ότι η κλασσική PCR δεν απαντάει στο ερώτημα «πόσο», δηλαδή «πόσο εκφράζεται ο παράγοντας X στον ιστό Y». Το ερώτημα αυτό ήρθε να απαντήσει η qPCR (quantitive PCR - qPCR).

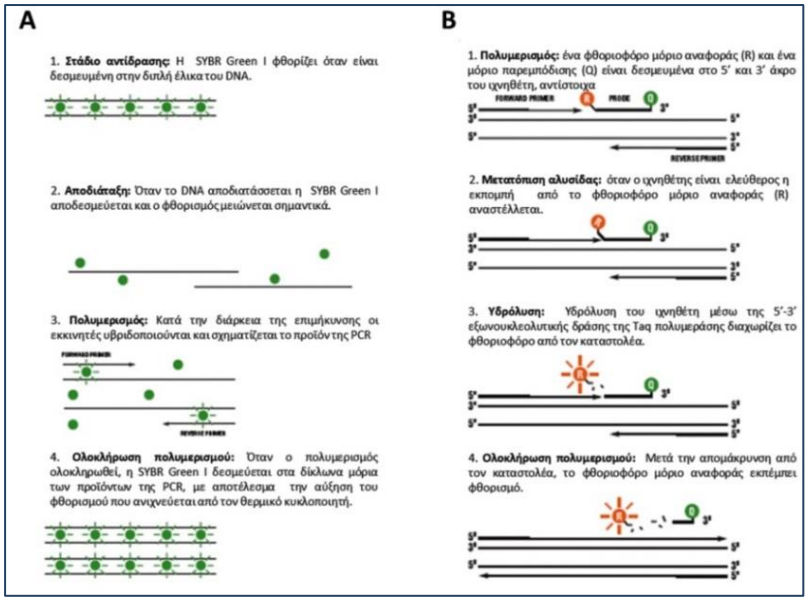


Εικόνα 26: Βασικά στάδια ενός κύκλου PCR αντίδρασης.

Η ποσοτική PCR πραγματοποιείται σε εξειδικευμένους θερμικούς κυκλοποιητές πραγματικού χρόνου (Real time PCR) οι οποίοι φέρουν ένα πολύπλοκο σύστημα κατόπτρων και φίλτρων που ανιχνεύουν τον φθορισμό ο οποίος εκπέμπεται από διάφορες φθορίζουσες χρωστικές που ενσωματώνονται στα προϊόντα της PCR κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Έτσι στη Real-time PCR η ενίσχυση του DNA στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα στο ίδιο σωληνάριο. Στις φθορίζουσες αυτές ουσίες ανήκουν το σύστημα SYBR Green I (μη εδικές φθορίζουσες ουσίες) και οι ιχνηθέτες τύπου Taqman (ειδικές φθορίζουσες ουσίες).

Στο σύστημα SYBR Green I η φθορίζουσα ουσία προστίθεται στο διάλυμα της αντίδρασης και παρουσιάζει μηδενικό ή ελάχιστο φθορισμό όταν είναι ελεύθερη στο διάλυμα. Όταν όμως η ουσία ενσωματωθεί στη μικρή αύλακα των δίκλωνων μορίων DNA, η ουσία αυτή εκπέμπει φθορισμό ο οποίος ανιχνεύεται και το σήμα φθορισμού μετράται από το σύστημα κατόπτρων και φίλτρων του θερμικού κυκλοποιητή (Εικόνα 27Α). Αντίθετα, στο σύστημα με τη χρήση ιχνηθετών υδρόλυσης τύπου Taqman (Taqman probes), οι φθορίζουσες χρωστικές (πχ. φλουορεσκείνη) δεν προστίθενται ελεύθερες στο διάλυμα αλλά είναι προσδεδεμένες πάνω σε μικρά μόρια DNA 25-30 βάσεων που υβριδοποιούνται στο γονίδιο-στόχο ανάμεσα στους δύο εκκινητές. Οι ιχνηθέτες που χρησιμοποιούνται είναι ειδικοί για κάθε-γονίδιο στόχο,

καθιστώντας τη μέθοδο αυτή πιο αποτελεσματική και με μεγαλύτερη ακρίβεια, σε σχέση με το σύστημα SYBR Green I, καθώς τα διμερή εκκινητών ή άλλα παραπροϊόντα που παράγονται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης δεν μετέχουν στην ποσοτικοποίηση (Εικόνα 27Β).

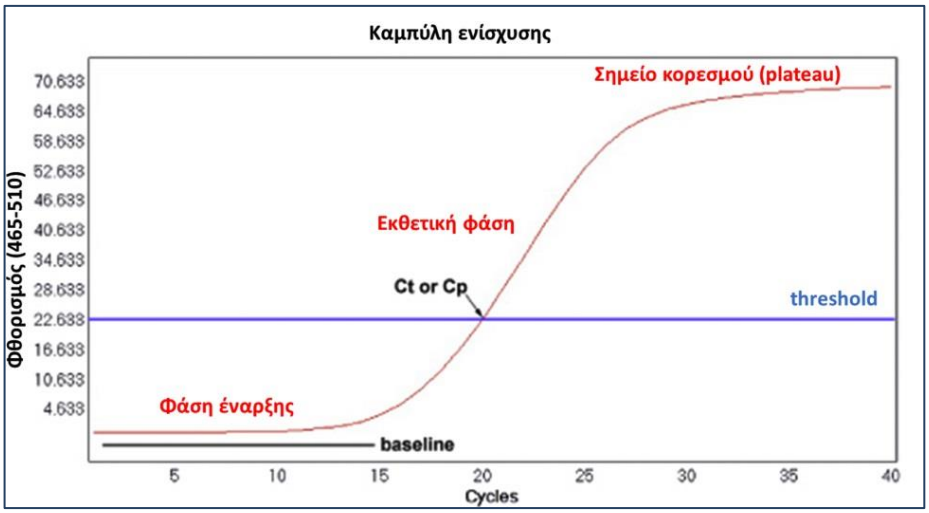


Εικόνα 27: Μηχανισμός δράσης των φθοριζουσών χρωστικών, Α. Σύστημα SYBR Green I, Β. Σύστημα ιχνηθετών τύπου Taqman.

Στη Real-Time PCR, η μέτρηση της συγκέντρωσης του νεοσυντιθέμενου προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της ανίχνευσης της αύξησης του φθορισμού που μετριέται σε κάθε κύκλο της PCR. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης προκύπτει μία καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot) (Εικόνα 28), που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση στην ανίχνευση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος.

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού (Εικόνα 28). Κατά την εκθετική φάση (exponential phase) πραγματοποιείται ο ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα συστατικά για την PCR αντίδραση

(dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Στη γραμμική φάση, κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται. Στη φάση αυτή η αντίδραση της ενίσχυσης του προϊόντος της PCR επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά επιβραδύνεται σημαντικά, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού είναι διαφορετικό για διαφορετικά δείγματα και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους. Σημαντική παράμετρος στην ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή q (Quantification). Η τιμή Cq καθορίζει τον αριθμό των κύκλων της PCR αντίδρασης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίσει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold), η τιμή του οποίου ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή Cq εξαρτάται απόλυτα από την αρχική συγκέντρωση του δείγματος. Έτσι, όσο πιο μεγάλη είναι η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος, τόσο μικρότερη είναι η τιμή Cq.



Εικόνα 28: Φάσεις της καμπύλης ενίσχυσης της PCR αντίδρασης.

Στην παρούσα μελέτη, ο σχεδιασμός των εκκινητών και ανιχνευτών έγινε με τη χρήση του ειδικού υπολογιστικού προγράμματος Primer Express 2.0

Software (AB, Foster City, CA, USA) (Πίνακας 14) ενώ η ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το ολοκληρωμένο σύστημα αντιδραστηρίων Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) και τον θερμικό κυκλοποιητή ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Ο ποσοτικός προσδιορισμός της σχετικής γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη συγκριτική μέθοδο Cq με τη χρήση της β-ακτίνης ως ενδογενές γονίδιο ελέγχου (normalizer) και εμπορικά διαθέσιμα RNA-μάρτυρες (Stratagene, La Jolla, CA, USA) ως βαθμονομητές (calibrators). Επιπρόσθετα, RNA που απομονώθηκε από πνευμονικό ιστό ενός υγιή δότη (χειρουργική επέμβαση μετά από ατύχημα) χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο φυσιολογικής έκφρασης σε όλα τα πειράματα RT-qPCR ανάλυσης. Τα αποτελέσματα κανονικοποιήθηκαν με βάση τον τύπο $2^{-(\Delta Ct_{\text{δείγματος}}-\Delta Ct_{\text{calibrator}})}$, όπου $\Delta Ct = Ct_{\text{γονιδίου αναφοράς}} - Ct_{\text{calibrator ή δείγματος}}$ (231). Όλα τα πειράματα επαναλήφθηκαν τρεις φορές και δεκτά ήταν τα αποτελέσματα που είχαν $SD_{Ct} < 0.25$ σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (AB 7900 and SDS 2.3 User guide; AB). Η ποσοτική PCR ανάλυση απέδωσε τιμές που εκφράστηκαν ως αναλογία (λόγος) μεταξύ δύο απόλυτων μετρήσεων (γονίδιο-στόχος/εσωτερικό γονίδιο αναφοράς). Τα σημεία αποκοπής (cutoff points) υπολογίστηκαν σύμφωνα με την διάμεση τιμή της mRNA έκφρασης του κάθε γονιδίου (222). Δείγματα με mRNA έκφραση μεγαλύτερη ή ίση με τη διάμεση τιμή θεωρήθηκαν ως δείγματα με υψηλή έκφραση, ενώ δείγματα με τιμή κάτω από τη διάμεση τιμή ως δείγματα με χαμηλότερη έκφραση. Τα βήματα της RT-qPCR αντίδρασης παρουσιάζονται στον Πίνακα 15.

Πίνακας 14: Αλληλουχία εκκινητών και ανιχνευτών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων στόχων με RT-qPCR.

Γονίδιο	Αλληλουχία	Μέγεθος
β-actin-F	5'-TGA GCG CGG CTA CAG CTT-3'	
β-actin-R	5'-TCC TTA ATG TCA CGC ACG ATT T-3'	60bp
β-actin-6FAM	5'-ACC ACC ACG GCC GAG CGG-3'	
TXR1-F	5′-GCA GAA GAA AAT GAA GAA AGC TCA TAA-3′	
TXR1-R	5′-GGA ATG CTT GCC ATG CTT GT-3′	82bp
TXR1-6FAM	5′-ATG CAC AAG CAC CAA AAG CAC CAC AAG TAC-3′	
TSP1-F	5′-TGG TGT GCG TGG CCA AT-3′	
TSP1-R	5′-TGC CCT GAG TTG GGA AGG T-3′	70bp
TSP1-6FAM	5′-CGA CTT ACC ACT GCA AAA AGG ATA ATT GCC C-3′	
BRCA1-F	5'-GGC TAT CCT CTC AGA GTG ACA TTT TA-3'	
BRCA1-R	5'-GCT TTA TCA GGT TAT GTT GCA TGG T-3'	69bp
BRCA1-6FAM	5'-CCA CTC AGC AGA GGG-3'	

Συντομογραφίες: F= forward (πρόσθιος) εκκινητής, R= reverse (οπίσθιος) εκκινητής, 6FAM= αλληλουχία ανιχνευτή με το χρωμοφόρο 6-Carboxyfluorescein, bp= ζεύγη βάσεων

Πίνακας 15: Ποσότητες και συνθήκες αντίδρασης RT-qPCR στον κυκλοποιητή ABI Prism 7900HT Sequence Detection System

Βήμα		Διαδικασία	
1	Σε PCR tubes προσθέτουμε:	2.5μl cDNA 6.25μl Taqman Universal Master Mix 0.21μl probe (τελική συγκέντρωση 0.05 μM) 1.25μl forward primer (τελική συγκέντρωση 0.9 μM) 1.25μl reverse primer (τελική συγκέντρωση 0.9 μM) Σε τελικό όγκο 12.5μl σε νερό	
2	Πρόγραμμα αντίδρασης:	95°C για 10 min (αποδιάταξη) 95°C για15 sec (αποδιάταξη) 60°C για 1 min (υβριδισμός/ επέκταση	40 κύκλοι

3. Στατιστική ανάλυση

Η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης SPSS έκδοση 15.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 0,05 (5%).

Η πιθανή συσχέτιση μεταξύ των βασικών χαρακτηριστικών των ασθενών, της απόκρισης στη θεραπεία και των επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης, συγκρίθηκε είτε με τον αμφίπλευρο ακριβή έλεγχο του Fisher (two – tailed Fisher's exact test), είτε με τη δοκιμή Chi-square για μεταβλητές χωρισμένες

σε κατηγορίες και με τον έλεγχο Kruskal-Wallis για τις συνεχείς μεταβλητές. Ο αμφίπλευρος ακριβής έλεγχος του Fisher είναι ένας μη παραμετρικός έλεγχος, ανεξαρτησίας και ομοιογένειας. Χρησιμοποιείται για την ανάλυση διακριτών δεδομένων (π.χ. έκφραση mRNA, είδος θεραπείας), όταν τα δυο ανεξάρτητα δείγματα έχουν μικρό μέγεθος. Τα αποτελέσματα αυτών των δειγμάτων αντιστοιχούν στη μια από τις δύο τυχαίες κατηγορίες και κάθε στοιχείο αυτών είναι δυνατό να έχει το ένα από τα δύο χαρακτηριστικά. Η μηδενική υπόθεση στην παρούσα μελέτη, είναι ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της πληθυσμιακής κατηγορίας του δείγματος και της γονιδιακής έκφρασης.

Το κριτήριο χ^2 (δοκιμή Chi-square) μας επιτρέπει να εκτιμήσουμε την απόκλιση ανάμεσα στις θεωρητικά αναμενόμενες συχνότητες και στις παρατηρούμενες. Στην παρούσα εργασία, ορίστηκε ως επίπεδο σημαντικότητας το 5% (όριο εμπιστοσύνης 95%). Πιθανότητα μεγαλύτερη του επιπέδου σημαντικότητας σημαίνει συμφωνία, δηλαδή τα αποτελέσματά μας δεν παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντική διαφορά.

Ο έλεγχος Kruskal-Wallis είναι μία μη παραμετρική διαδικασία που μπορεί να εφαρμοστεί για τη σύγκριση τριών ή περισσότερων πληθυσμών. Αν η μηδενική υπόθεση απορριφθεί, τότε τουλάχιστον δύο πληθυσμοί διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά ως προς τη διάμεση τιμή τους.

Οι συνεχείς μεταβλητές ελέγχθηκαν ως προς την κανονικότητα (ή μη) της κατανομής τους με το Kolmogorov-Smirnov's test, προκειμένου να διευκρινιστεί η χρήση παραμετρικών (ή μη) δοκιμασιών. Η δοκιμή Spearman, που παρέχει ένα μη-παραμετρικό μέτρο της στατιστικής εξάρτησης μεταξύ δύο μεταβλητών, χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης των *BRCA1, TXR1* και *TSP1* mRNAs.

Οι καμπύλες Kaplan-Meier χρησιμοποιήθηκαν για να περιγράψουν την αναλογία των ασθενών που παρέμειναν απαλλαγμένοι από γεγονότα που σχετίζονταν με την πρόοδο της νόσου κατά την περίοδο παρακολούθησης (μη-παραμετρική μέθοδος εκτίμησης της συνάρτησης επιβίωσης). Το μοντέλο αναλογικής διακινδύνευσης του Cox (ημι-παραμετρικό μοντέλο), με αναφορά στην αναλογία κινδύνου (hazard ratio-HR) και 95% CI, χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί η σχέση μεταξύ του κάθε δυνητικά προγνωστικού παράγοντα, της συνολικής επιβίωσης (OS) και της επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου (PFS). Το μοντέλο αναλογικής διακινδύνευσης του Cox χρησιμοποιήθηκε και για την εκτίμηση της διαφοράς στην έκφραση του mRNA στις 2 κατηγορίες θεραπείας (δοσεταξέλη / σισπλατίνη-DS και δοσεταξέλη / γεμσιταμπίνη-DG). Για κάθε γονιδιακή έκφραση του mRNA, ελέχθησαν δύο υποθέσεις: (1) εάν η επίδραση στην επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (PFS) και στη συνολική επιβίωση (OS) εξαρτιόταν από το είδος θεραπείας (DS ή DG) και (2) εάν η επίδραση στην επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (PFS) και στη συνολική επιβίωση (OS) εξαρτιόταν από την ιστολογία του όγκου (πλακώδες ή μη).

Αποτελέσματα

1. Χαρακτηριστικά ασθενών

Κλινικά χαρακτηριστικά και αντιπροσωπευτικά δείγματα από τους πρωτοπαθείς όγκους συλλέχθηκαν από 131 ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με βάση την δοσεταξέλη σε συνδυασμό με σισπλατίνη ή γεμσιταμπίνη. Όλα τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών ήταν τυπικά για NSCLC και συνοψίζονται στον Πίνακα 7.

Μια ανάλυση με βάση τη θεραπεία (intention-to-treat analysis), έδειξε ότι επετεύχθη πλήρης απόκριση (CR) σε 2 ασθενείς (2%) και μερική απόκριση (PR) σε 38 ασθενείς (28%), με συνέπεια το συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης (RR) να κυμανθεί στο 30% (95% CI, εύρος 24.3–39.2%). Μετά από μία διάμεση περίοδο παρακολούθησης 9,7 μηνών (εύρος 1,3-84,5 μήνες), το ελεύθερο νόσου διάστημα (PFS) ήταν 4,2 μήνες (95% CI, εύρος 2,7-5,7 μήνες) και η διάμεση συνολική επιβίωση (OS) 11,1 μήνες (95% CI, εύρος 9,7-14,6 μήνες) (Πίνακας 7).

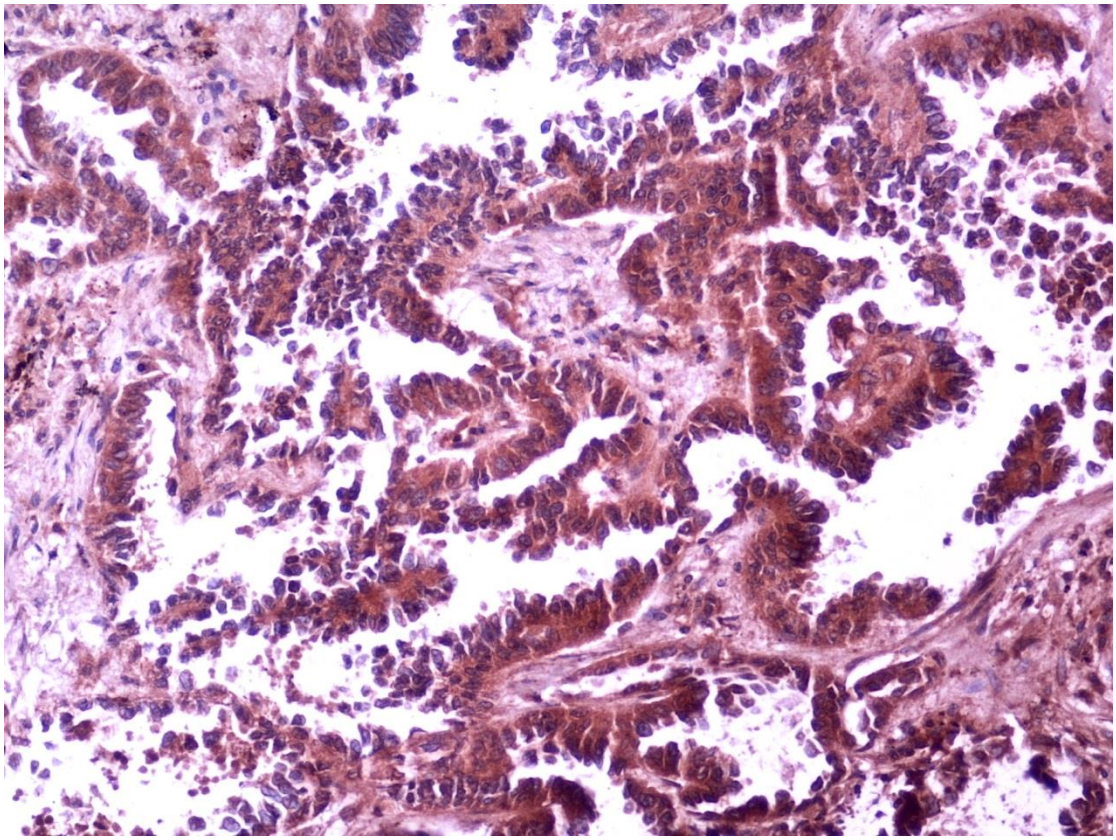
2. Έκφραση των πρωτεϊνών BCL2, p53, p21WAF1 και APE1 στον NSCLC

Μελετήθηκε αρχικά η ανοσοϊστοχημική έκφραση των πρωτεϊνών Bcl2, p53, $p21^{WAF1}$ και APE1 σε τομές παραφίνης από 100 ασθενείς που είχαν ενταχθεί στο πρωτόκολλο θεραπείας. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται στον Πίνακα 16 που ακολουθεί. Η ανάλυση με βάση την θεραπεία ήταν παρόμοια με αυτή που παρουσιάστηκε για το συνολικό αριθμό των ασθενών της μελέτης (131 ασθενείς), που αναφέρονται στον Πίνακα 7 και περιγράφονται στην προηγούμενη ενότητα.

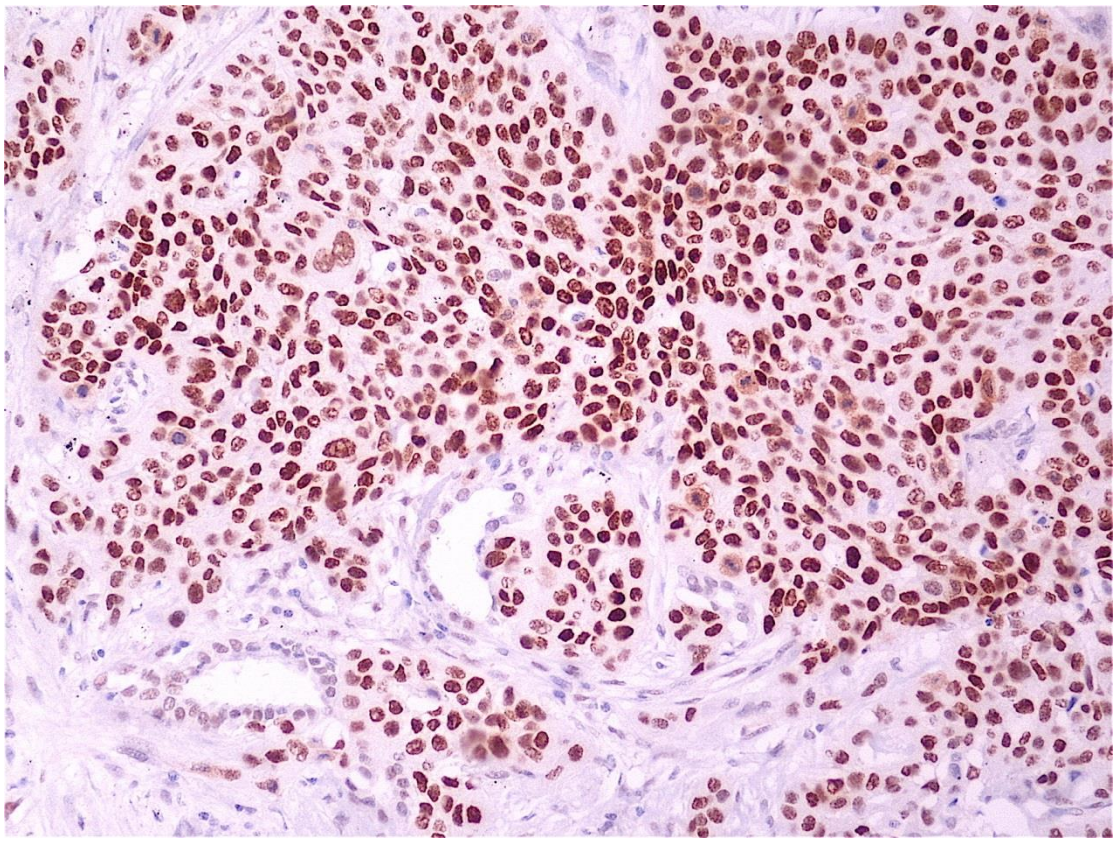
Πίνακας 16: Χαρακτηριστικά των ασθενών

Χαρακτηριστικά	Ασθενείς	
	Αριθμός	%
Φύλο		
Άντρες	89	89
Γυναίκες	11	11
Ηλικία		
Διάμεσος	59	
Εύρος	37 – 78	
Κατάσταση απόδοσης κατά ECOG		
0	50	50
1	42	42
2	8	8
Στάδιο		
IIIB	30	30
IV	70	70
Ιστολογίκός τύπος		
Αδενοκαρκίνωμα	52	52
Πλακώδες καρκίνωμα	44	44
Άλλο	4	4
Χημειοθεραπευτικό σχήμα		
δοσεταξέλη/σισπλατίνη	49	49
δοσεταξέλη/γεμσιταβίνη	51	51
Αντικειμενική ανταπόκριση (CR+PR)	40	30
PFS (μήνες, 95% CI)	4.1 (2.3 – 5.9)	
Διάμεση συνολική επιβίωση (OS) (μήνες, 95% CI)	11 (9.6 – 14.8)	

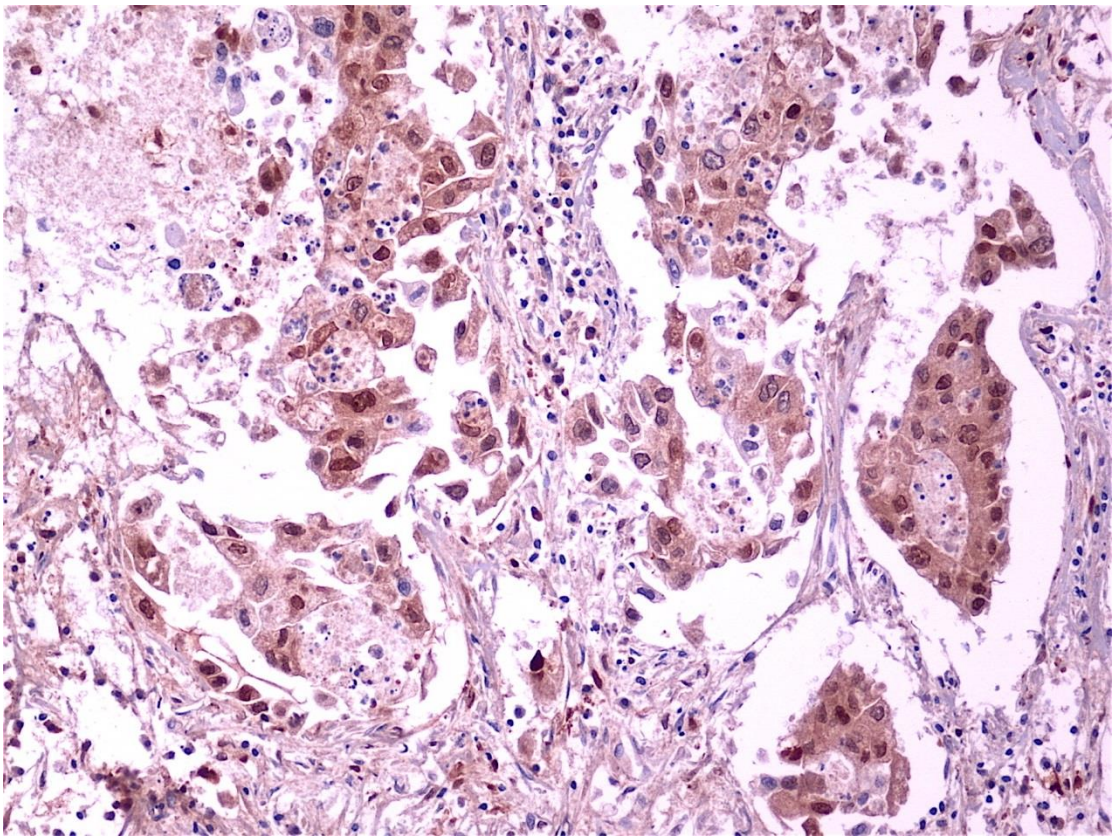
Η πρωτεΐνη Bcl2 ανιχνεύθηκε σε 33/100 ασθενείς με NSCLC, παρουσιάζοντας μία ετερογένεια στη κυτταροπλασματική έκφρασή της (Εικόνα 29). Όσον αφορά την ανίχνευση των p53 (Εικόνα 30), p21 (Εικόνα 31) και APE1 (Εικόνα 32), αυτή κυμάνθηκε στο 58%, 53% και 79% αντίστοιχα, στους καρκινικούς όγκους. Δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ της ηλικίας, του φύλου, της PS κατά ECOG ή του σταδίου της νόσου και της ανίχνευσης των ανωτέρω πρωτεϊνών (P>0.05). Αναφορικά με την έκφραση των πρωτεϊνών αυτών ανά ιστολογικό τύπο, ήταν σχεδόν ίδια μεταξύ των δύο ιστολογικών ομάδων (διάμεσος, για όλες τις πρωτεΐνες, ≈ 50%, P>0.05) (Πίνακας 17).



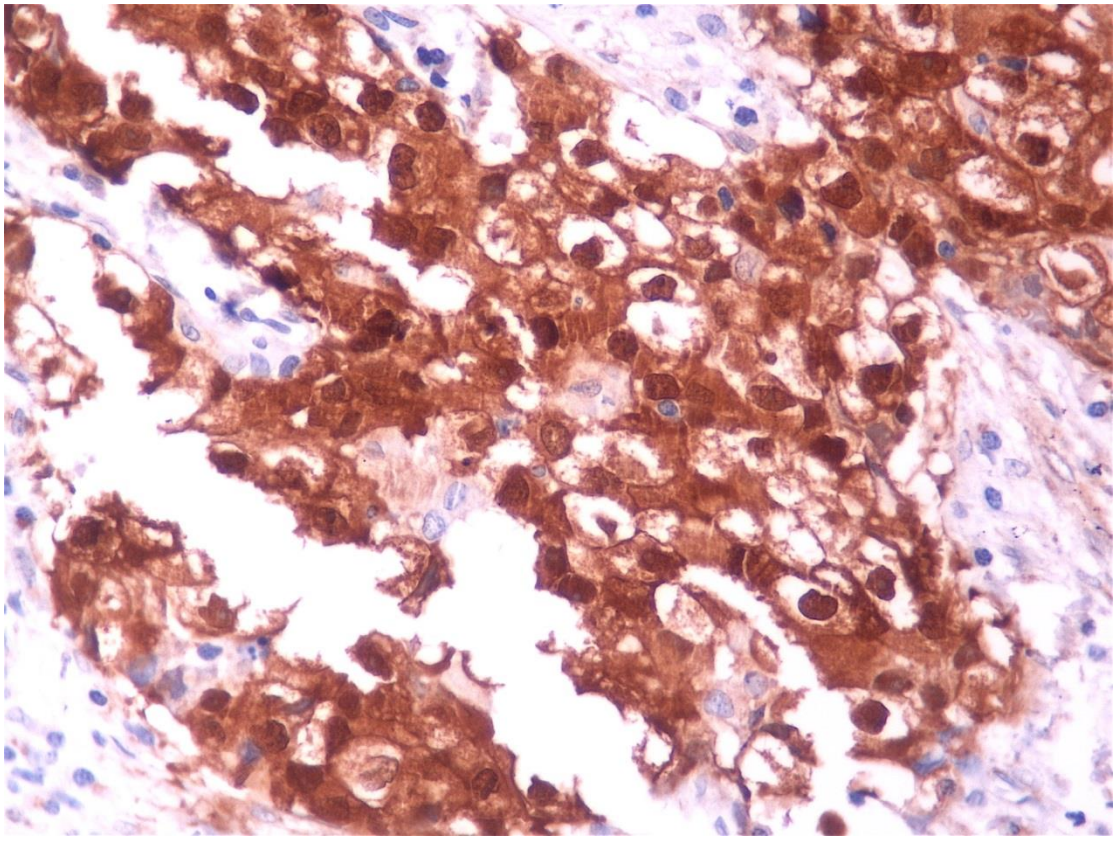
Εικόνα 29 : Έκφραση της Bcl2 σε ιστό από ασθενή με NSCLC (μεγέθυνση x 200).



Εικόνα 30 : Έκφραση της p53 σε ιστό από ασθενή με NSCLC (μεγέθυνση x 200)



Εικόνα 31 : Έκφραση της p21 σε ιστό από ασθενή με NSCLC (μεγέθυνση x 200)



Εικόνα 32 : Έκφραση της APE1 σε ιστό από ασθενή με NSCLC (μεγέθυνση x 400)

Πίνακας 17: Ανίχνευση των πρωτεϊνών Bcl2, p53, p21 και APE1 ανά ιστολογικό υπότυπο

		Σύνολο ασθενών	**Πλακώδες**	**Μη-πλακώδες**
Αριθμός ασθενών (%)		100 (100)	44 (44)	52 (52)
Bcl2	*Θετική έκφραση (%)*	33 (33)	22(50)	26 (50)
	Αρνητική έκφραση (%)	67 (67)	22(50)	26 (50)
	*p value**	*NS*	*NS*	*NS*
p53	*Θετική έκφραση (%)*	58 (58)	26 (59)	22 (42)
	Αρνητική έκφραση (%)	42 (42)	18 (41)	30 (58)
	*p value**	*NS*	*NS*	*NS*
p21	*Θετική έκφραση (%)*	53 (53)	20 (45)	29 (56)
	Αρνητική έκφραση (%)	47 (47)	24 (55)	23 (44)
	*p value**	*NS*	*NS*	*NS*
APE1	*Θετική έκφραση (%)*	79 (79)	23 (52)	26 (50)
	Αρνητική έκφραση (%)	21 (21)	21 (48)	26 (50)
	*p value**	*NS*	*NS*	*NS*

Συντομογραφίες : NS, μη στατιστικώς σημαντικό (non significant), Σύγκριση με βάση τον μη παραμετρικό έλεγχο Mann–Whitney U-test, P-value.*

Ακολούθησε η συσχέτιση των επιπέδων πρωτεϊνικής έκφρασης με την έκβαση της θεραπείας με βάση το θεραπευτικό σχήμα (DS ή DG). Δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ της θετικής έκφρασης για τις πρωτεΐνες Bcl2, p53, p21 και APE1 και του PFS (έλεγχος αλληλεπίδρασης με P=0.62, 0.59, 0.51 και 0.56, αντίστοιχα) και mOS (έλεγχος αλληλεπίδρασης με P=0.628, 0.687, 0.731 και 0.713, αντίστοιχα) σε ασθενείς που έλαβαν είτε DS είτε DG ως 1^{ης} γραμμής θεραπείας για τον NSCLC (Πίνακας 18).

Πίνακας 18 : Συσχέτιση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης των Bcl2, p53, p21 και APE1 στον πρωτογενή όγκο και η αποτελεσματικότητα της αγωγής σε διαφορετικά θεραπευτικά σχήματα.

Θεραπεία	Πρωτεΐνες	Αριθμός ασθενών	PFS (μήνες)			OS (μήνες)		
			Διάμεσος (95% CI)	Log-rank *p* value	Interaction *p* value	Διάμεσος (95% CI)	Log-rank *p* value	Interaction *p* value
Δοσεταξέλη /Γεμσιταβίνη	*Bcl2* -	33 (66)	6.1 (4.0-8.8)	0.913	0.62	11.1 (6.5-14.8)	0.458	0.628
	Bcl2 +	17 (34)	6.2 (4.2-8.1)			11.2 (3.6-15.6)		
Δοσεταξέλη /Σισπλατίνη	*Bcl2* -	34 (68)	6.8 (4.0-8.2)	0.874		11.2 (9.3-17.1)	0.982	
	Bcl2 +	16 (32)	6.1 (5.1-7.4)			11.1 (8.9-16.6)		
Δοσεταξέλη /Γεμσιταβίνη	*p53* -	21 (42)	7.2 (4.9-9.7)	0.924	0.59	11.8 (7.2-15.9)	0.513	0.687
	p53 +	29 (58)	7.3 (5.0-9.5)			11.5 (5.1-14.8)		
Δοσεταξέλη /Σισπλατίνη	*p53* -	21 (42)	7.4 (4.0-9.8)	0.632		11.2 (5.2-13.8)	0.817	
	p53 +	29 (58)	7.7 (5.4-10.2)			11.1 (4.9-12.3)		
Δοσεταξέλη /Γεμσιταβίνη	*p21* -	23 (46)	6.4 (2.1-8.8)	0.437	0.51	11.5 (7.4-16.4)	0.606	0.731
	p21 +	27 (54)	6.8 (4.3-10.0)			11.7 (6.9-16.6)		
Δοσεταξέλη /Σισπλατίνη	*p21* -	24 (48)	6.4 (1.6-9.1)	0.582		11.1 (6.4-17.7)	0.802	
	p21 +	26 (52)	6.6 (2.3-10.8)			11.4 (6.7-17.1)		
Δοσεταξέλη /Γεμσιταβίνη	*APE* -	10 (20)	6.5 (2.1-9.8)	0.413	0.56	11.1 (6.8-15.5)	0.658	0.713
	APE +	40 (80)	6.2 (4.2-8.9)			11.2 (5.9-17.6)		
Δοσεταξέλη /Σισπλατίνη	*APE* -	11 (22)	6.6 (3.7-9.8)	0.474		11.2 (8.3-16.6)	0.812	
	APE +	39 (78)	6.1 (4.5-7.7)			11.1 (8.4-15.6)		

Συντομογραφίες: PFS : ελεύθερο νόσου διάστημα (Progression-free survival), OS : συνολική επιβίωση (overall survival), CI : διάστημα εμπιστοσύνης, Log-rank p value : τιμή p που προκύπτει από έλεγχο επιβίωσης (Log-rank test), Interaction p value : τιμή p που προκύπτει από έλεγχο αλληλεπίδρασης (interaction test).

3. Γονιδιακή έκφραση των *BRCA1, TXR1* και *TSP1* mRNA στον NSCLC με βάση τον ιστολογικό τύπο

Καθώς τα αποτελέσματα της μελέτης των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης των παραγόντων Bcl2, p53, $p21^{WAF1}$ και APE1 δεν έδωσε ενθαρρυντικά αποτελέσματα, στο δεύτερο μέρος της παρούσας διατριβής προχωρήσαμε στην ανίχνευση των επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης των *BRCA1, TXR1* και *TSP1* mRNA στα ίδια δείγματα ασθενών.

Τα διάμεσα επίπεδα έκφρασης mRNA ήταν 4,28 για το *BRCA1* mRNA (εύρος 0,86-42,45), 1,21 για το *TXR1* (εύρος 0,02-7,8) και 0,24 για *TSP1* mRNA (εύρος 0,02-1,87). Δεν υπήρξε οποιαδήποτε συσχέτιση μεταξύ της ηλικίας, του φύλου, της PS κατά ECOG ή σταδίου της νόσου και των επιπέδων έκφρασης του mRNA των παραπάνω γονιδίων (P> 0.05). Αναφορικά με την έκφραση ανά ιστολογικό τύπο, η έκφραση του *BRCA1* ήταν σημαντικά υψηλότερη σε πλακώδες καρκίνωμα (διάμεσος 8.1, εύρος 1.73 –

42.45) σε σχέση με το μη πλακώδες καρκίνωμα (διάμεσος 3.62, P=0.001). Από την άλλη, η έκφραση των *TXR1* και *TSP1* ήταν σχεδόν ίδια μεταξύ των δύο ιστολογικών ομάδων (*TXR1*, πλακώδες, διάμεσος 1.19, μη πλακώδες, διάμεσος 1.21, P=0.92 / *TSP1*, πλακώδες, διάμεσος 0.23, μη πλακώδες, διάμεσος 0.24, P=1.0), παρατήρηση που συμφωνεί με προηγούμενα δεδομένα (232). Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε η αντίστροφη συσχέτιση της έκφρασης των *TXR1* και *TSP1* mRNA (έλεγχος Spearman, -0.37, P=0.001) (Πίνακας 19). Όπως αναφέρθηκε ήδη, τα σημεία αποκοπής (cutoff points) υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη διάμεση τιμή της mRNA έκφρασης του κάθε γονιδίου. Για το γονίδιο *BRCA1*, καθώς τα επίπεδα έκφρασής του ήταν σημαντικά υψηλότερα στα πλακώδη καρκινώματα σε σύγκριση με τα αδενοκαρκινώματα (P=0.001), οι τιμές αποκοπής, υπολογίστηκαν σύμφωνα με τα επίπεδα της μέσης έκφρασης του γονιδίου για κάθε ιστολογικό υπότυπο (πλακώδες και μη-πλακώδες καρκίνωμα). Με βάση αυτές τις τιμές αποκοπής, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 18, παρατηρήθηκε χαμηλή (μικρότερη από τη διάμεση έκφραση) έκφραση του *BRCA1* σε 28/56 (50%) πλακώδη και 38/75 (50%) μη πλακώδη καρκινώματα, ενώ υψηλή (μεγαλύτερη ή ίση με τη διάμεση έκφραση) σε 28/56 (50%) και 37/75 (50%) ασθενών με πλακώδες και μη-πλακώδες καρκίνωμα, αντίστοιχα. Η έκφραση (υψηλότερη ή μικρότερη από τη διάμεση έκφραση) των *TXR1* και *TSP1* ακολούθησε το ίδιο πρότυπο με την έκφραση του *BRCA1* (50% των ασθενών για τον κάθε ιστολογικό τύπο), εδώ όμως δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά της έκφρασής τους σε πλακώδες και μη-πλακώδες τύπου καρκινώματος (*TRX1* P=0.92, *TSP1* P=1.0) (Πίνακας 18).

Πίνακας 19: Έκφραση των *BRCA1, TXR1* και *TSP1* mRNA ανά ιστολογικό υπότυπο

		Σύνολο ασθενών	Πλακώδες	Μη-πλακώδες	*p* value*
Αριθμός ασθενών (%)		131 (100)	56 (43)	75 (52)	
	Διάμεση τιμή έκφρασης (εύρος)	4.28 (0.86-42.45)	8.1 (1.73-42.45)	3.62 (0.72-39.31)	0.001
BRCA1	*Υψηλή έκφραση (%)*	65 (50)	28(50)	37 (50)	
	Χαμηλή έκφραση (%)	66 (50)	28(50)	38 (50)	
	Διάμεση τιμή έκφρασης (εύρος)	1.21 (0.02-7.8)	1.19 (0.02-6.7)	1.21 (0.12-7.8)	0.92
TXR1	*Υψηλή έκφραση (%)*	65 (50)	28(50)	36 (50)	
	Χαμηλή έκφραση (%)	66 (50)	28(50)	38 (50)	
	Διάμεση τιμή έκφρασης (εύρος)	0.24 (0.02-1.87)	0.23 (0.02-1.54)	0.24 (0.02-1.87)	1.0
TSP1	*Υψηλή έκφραση (%)*	65 (50)	28(50)	36 (50)	
	Χαμηλή έκφραση (%)	66 (50)	28 (50)	38 (50)	

** Σύγκριση με βάση τον μη παραμετρικό έλεγχο Mann–Whitney U-test, P-value.*

4. Γονιδιακή έκφραση των *BRCA1, TXR1* και *TSP1* mRNA στον NSCLC με βάση την ανταπόκριση στα χημειοθεραπευτικά σχήματα

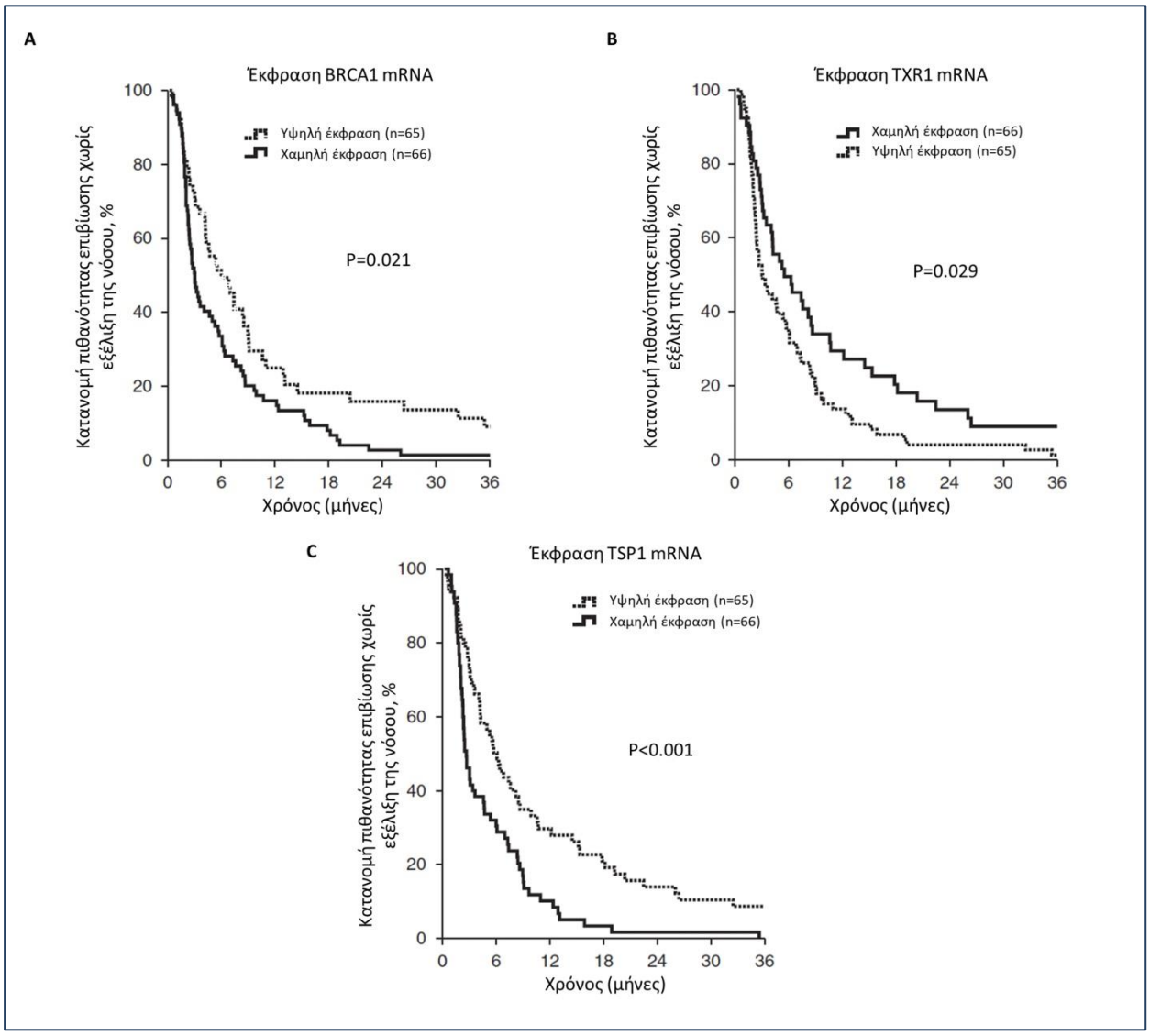
Στη συνέχεια μελετήθηκαν τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των *BRCA1*, *TXR1* και *TSP1* mRNA και η συσχέτιση της έκφρασής τους με την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία (DS, DG). Τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου συσχετισμού παρουσιάζονται στον Πίνακα 20. Έτσι, ασθενείς με υψηλή έκφραση *BRCA1* mRNA παρουσίασαν αυξημένο PFS (6.0 έναντι 3.0 μήνες, P=0.021) και αυξημένη συνολική απόκριση στη χημειοθεραπεία (RR, 42 έναντι 20%; P=0.028) σε σχέση με τους ασθενείς με χαμηλά επίπεδα γονιδιακής έκφρασης (Εικόνα 33A). Αντίθετα, η έκφραση του *BRCA1* mRNA δεν συσχετίστηκε, θετικά ή αρνητικά, με τη διάμεση συνολική επιβίωση (OS) (10.5 έναντι 11.2 μήνες, P=0.4; Εικόνα 34A). Η σχέση της γονιδιακής έκφρασης του *TXR1* με τους παράγοντες PFS, RR και OS ήταν αντίστροφη. Έτσι, χαμηλή έκφραση του παράγοντα οδήγησε σε αυξημένο PFS (5.5 έναντι 3.0 μήνες, P=0.029, Εικόνα 33B), OS (19.1 έναντι 10.0 μήνες, P=0.003, Εικόνα 29B) και RR (45 έναντι 18%, P=0.018) σε σχέση με ασθενείς με

αυξημένη έκφραση του *TXR1* στον πρωτογενή όγκο. Τέλος, αναφορικά με την έκφραση του *TSP1,* η αυξημένη έκφρασή του σχετίστηκε θετικά τόσο με την αύξηση του PFS (6.1 έναντι 2.6 μήνες, P<0.001, Εικόνα 33C) και της συνολικής απόκρισης στη χημειοθεραπεία (RR, 41 έναντι 22%, P=0.035), όσο και με την αυξημένη συνολική επιβίωση (OS, 25.1 έναντι 8.4 μήνες, P=0.001, Εικόνα 34C) σε σχέση με ασθενείς με χαμηλή mRNA έκφραση του παράγοντα.

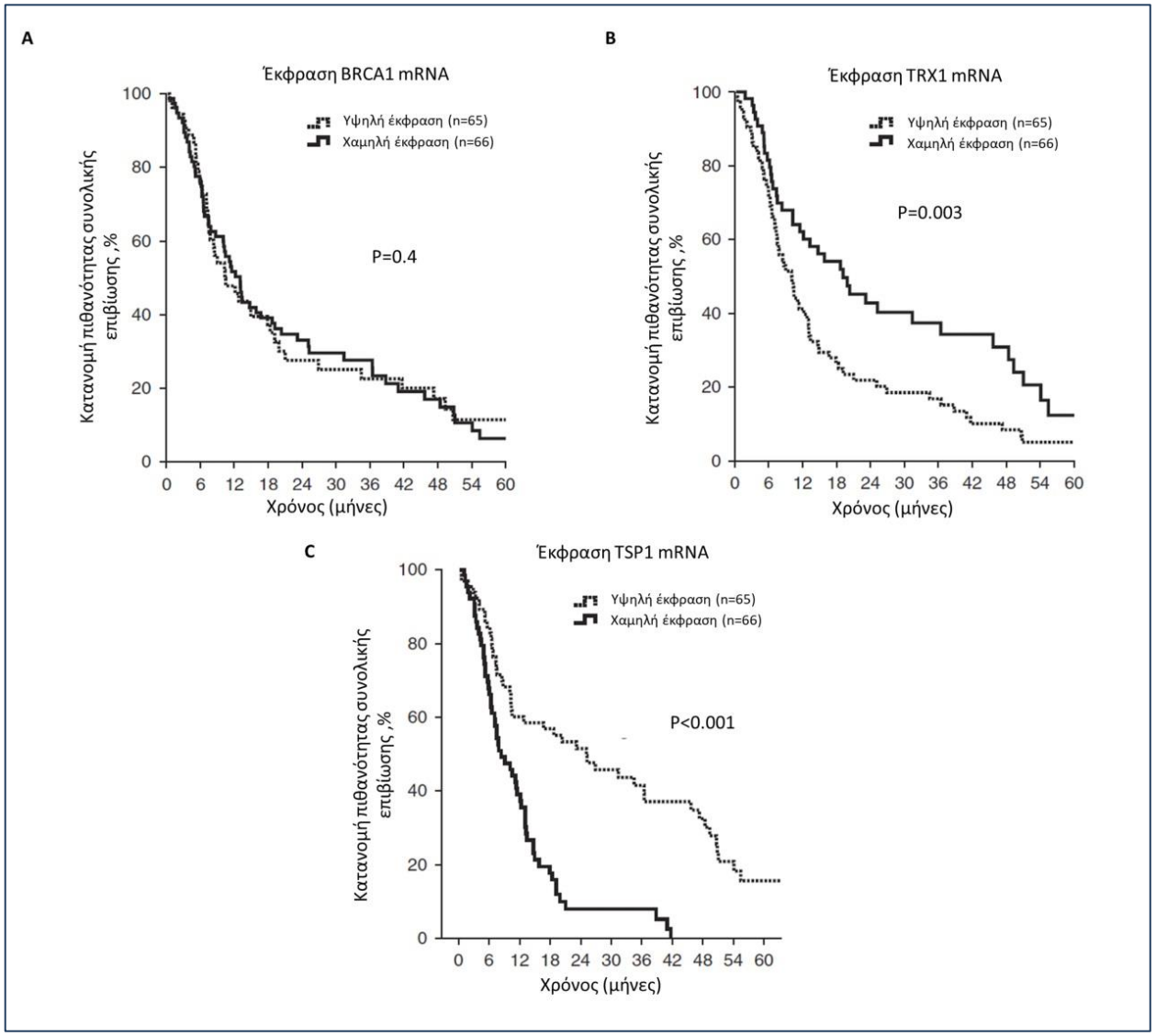
Πίνακας 20: Γονιδιακή έκφραση των *BRCA1, TXR1* και *TSP1* mRNA στον πρωτογενή όγκο και ανταπόκριση στη θεραπεία

		PFS (μήνες)		OS (μήνες)		RR, *N* (%)		
Γονίδια	**Αριθμός ασθενών**	**Διάμεσος (95% CI)**	***p****	**Διάμεσος (95% CI)**	***p****	**CR+PR (%)**	**SD+PD (%)**	***p****
***BRCA1* Low**	66 (50)	3.0 (2.3-3.7)	0.021	10.5 (6.2-14.8)	0.4	20	80	0.028
***BRCA1* High**	65 (50)	6.0 (3.5-8.5)		11.2 (7.2-15.3)		42	58	
***TXR1* Low**	66 (50)	5.5 (2.1-8.9)	0.029	19.1 (10.4-27.9)	0.003	45	55	0.018
***TXR1* High**	65 (50)	3.0 (1.8-4.0)		10.0 (7.4-12.7)		18	82	
***TSP1* Low**	66 (50)	2.6 (2.0-3.3)	<0.001	8.4 (5.2-11.6)	<0.001	22	78	0.035
***TSP1* High**	65 (50)	6.1 (4.4-7.7)		25.1 (11.1-39.2)		41	59	

*Συντομογραφίες: PFS: ελεύθερο νόσου διάστημα (Progression-free survival), OS: συνολική επιβίωση (overall survival), RR: βαθμός απόκρισης (response rate), CR: πλήρης ανταπόκριση (complete response), PR: μερική ανταπόκριση (partial response), SD: σταθερή νόσος (Stable Disease), PD: πρόοδος νόσου (Progressive Disease), CI: διάστημα εμπιστοσύνης, * τιμή p που προκύπτει από έλεγχο επιβίωσης (Log-rank test).*



Εικόνα 33 : Καμπύλες Kaplan-Meier που δείχνουν τη συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης των *BRCA1* (A), *TXR1* (B) και *TSP1* (C) mRNA σε συνάρτηση με την πιθανότητα επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου (%).



Εικόνα 34 : Καμπύλες Kaplan-Meier που δείχνουν τη συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης των *BRCA1* (A), *TXR1* (B) και *TSP1* (C) mRNA σε συνάρτηση με την πιθανότητα συνολικής επιβίωσης (%).

5. Γονιδιακή έκφραση των *BRCA1, TXR1* και *TSP1* mRNA στον NSCLC και έκβαση της θεραπείας σύμφωνα με τον ιστολογικό υπότυπο και τη χημειοθεραπευτική αγωγή 1^{ης} γραμμής

Στη συνέχεια μελετήθηκε η συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης των *BRCA1, TXR1* και *TSP1* mRNA με την έκβαση της θεραπείας με βάση τον ιστολογικό υπότυπο και το θεραπευτικό σχήμα (DS ή DG). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 21, η συσχέτιση μεταξύ της υψηλής έκφρασης του *BRCA1* mRNA και του αυξημένου PFS ήταν στατιστικώς σημαντική τόσο για τους ασθενείς με πλακώδη όσο και για τους ασθενείς με μη-πλακώδη ιστολογία (έλεγχος αλληλεπίδρασης με P=0.61). Η ίδια συσχέτιση δεν αποδείχθηκε σημαντική για τη γονιδιακή έκφραση και τη συνολική επιβίωση για κανένα ιστολογικό υπότυπο (έλεγχος αλληλεπίδρασης με P=0.97, Πίνακας 21). Όσον αφορά τη συσχέτιση της χαμηλής γονιδιακής έκφρασης του *TXR1* και μειωμένου PFS (έλεγχος αλληλεπίδρασης με P=0.21) και mOS (έλεγχος αλληλεπίδρασης με P=0.19) φαίνεται να είναι στατιστικώς σημαντική και για τους δύο ιστολογικούς υπότυπους (Πίνακας 21). Τέλος, η υψηλή έκφραση του *TSP1* mRNA συντηρεί την προγνωστική του ιδιότητα για το αυξημένο PFS (έλεγχος αλληλεπίδρασης με P=0.34) και mOS (έλεγχος αλληλεπίδρασης με P=1,0) μεταξύ των ασθενών με πλακώδη και μη-πλακώδη ιστολογία (Πίνακας 21).

Πίνακας 21: Η συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης των *BRCA1, TXR1* και *TSP1* mRNA στον πρωτογενή όγκο και η αποτελεσματικότητα της αγωγής σε διαφορετικούς ιστολογικούς υποτύπους.

Ιστολογία	Γονίδια	Αριθμός ασθενών	PFS (μήνες)			OS (μήνες)		
			Διάμεσος (95% CI)	Log-rank *p* value	Interaction *p* value	Διάμεσος (95% CI)	Log-rank *p* value	Interaction *p* value
Πλακώδες	***BRCA1* Low**	28 (50)	4.0 (1.5-7.6)	0.047	0.61	11.3 (5.5-17.2)	0.99	0.97
	***BRCA1* High**	28 (50)	7.4 (4.7-10.1)			9.8 (4.8-17.0)		
μη-Πλάκώδες	***BRCA1* Low**	38 (51)	3.8 (2.1-5.5)	0.041		11.2 (8.3-16.1)	0.91	
	***BRCA1* High**	37 (49)	7.2 (4.3-9.1)			11.1 (8.8-15.6)		
Πλακώδες	***TXR1* Low**	28 (50)	7.1 (3.4-9.7)	0.038	0.21	16.4 (10.9-19.5)	0.022	0.19
	***TXR1* High**	28 (50)	4.2 (1.6-7.8)			8.3 (2.6-12.1)		
μη-Πλάκώδες	***TXR1* Low**	38 (51)	6.4 (3.8-9.6)	0.027		23.2 (10.2-38.1)	0.007	
	***TXR1* High**	37 (49)	3.3 (1.9-3.6)			8.7 (5.2-12.3)		
Πλακώδες	***TSP1* Low**	28 (50)	3.6 (1.4-7.3)	0.019	0.34	9.0 (4.6-13.5)	0.001	1.00
	***TSP1* High**	28 (50)	6.1 (3.8-10.6)			25.2 (10.2-47.8)		
μη-Πλάκώδες	***TSP1* Low**	38 (51)	2.3 (2.1-2.5)	0.001		7.9 (3.0-12.7)	0.001	
	***TSP1* High**	37 (49)	6.3 (3.2-10.3)			23.2 (10.4-41.8)		

Συντομογραφίες: PFS: ελεύθερο νόσου διάστημα (Progression-free survival), OS: συνολική επιβίωση (overall survival), CI: διάστημα εμπιστοσύνης, Log-rank p value: τιμή p που προκύπτει από έλεγχο επιβίωσης (Log-rank test), Interaction p value: τιμή p που προκύπτει από έλεγχο αλληλεπίδρασης (interaction test)

Ακολούθησε η συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης με την έκβαση της θεραπείας με βάση το θεραπευτικό σχήμα (DS ή DG). Έτσι, η συσχέτιση μεταξύ υψηλής έκφρασης *TXR1* mRNA και μειωμένου PFS (έλεγχος αλληλεπίδρασης με P=0.56) και mOS (έλεγχος αλληλεπίδρασης με P=0.38) παρατηρήθηκε σε ασθενείς που έλαβαν είτε DS είτε DG ως θεραπεία 1^{ης} γραμμής για τον NSCLC (Πίνακας 22). Παρομοίως, το PFS (έλεγχος αλληλεπίδρασης με P=0.48) και η mOS (έλεγχος αλληλεπίδρασης με P=0.93) συσχετίστηκαν σημαντικά με τα επίπεδα έκφρασης του *TSP1* mRNA και στα δύο χημειοθεραπευτικά σχήματα με βάση τη δοσεταξέλη (Πίνακας 22). Αντίθετα, η υψηλή έκφραση του *BRCA1* mRNA συσχετίστηκε σημαντικά με αυξημένο PFS μόνο σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με DG, αλλά όχι με ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με DC (έλεγχος αλληλεπίδρασης με P=0.006), ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης με τη mOS σε καμία από τις δύο γραμμές θεραπείας (έλεγχος αλληλεπίδρασης με P=0.61, Πίνακας 22).

Τέλος, 42 ασθενείς (63%) που ακολούθησαν θεραπεία 1ης γραμμής με DG, ακολούθησαν θεραπεία 2ης γραμμής με βάση τη σισπλατίνη. Στους ασθενείς αυτούς, η έκφραση μόνο του *BRCA1* mRNA συσχετίστηκε σημαντικά με το PFS (5.7 έναντι 2.2 μήνες για ασθενείς με χαμηλό και υψηλό επίπεδο έκφρασης *BRCA1* mRNA, P=0.01) ενώ δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση με τα επίπεδα έκφρασης των δύο άλλων παραγόντων ούτε με το PFS ούτε με τη mOS.

Πίνακας 22: Η συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης των *BRCA1, TXR1* και *TSP1* mRNA στον πρωτογενή όγκο και η αποτελεσματικότητα της αγωγής σε διαφορετικά θεραπευτικά σχήματα.

Θεραπεία	Γονίδια	Αριθμός ασθενών	PFS (μήνες)			OS (μήνες)		
			Διάμεσος (95% CI)	Log-rank *p* value	Interaction *p* value	Διάμεσος (95% CI)	Log-rank *p* value	Interaction *p* value
Δοσεταξέλη /Γεμσιταβίνη	*BRCA1* Low	34 (51)	3.5 (2.1-4.8)	0.013	0.006	11.1 (6.8-15.5)	0.458	0.613
	BRCA1 High	33 (49)	6.2 (4.1-8.5)			10.2 (3.9-17.6)		
Δοσεταξέλη /Σισπλατίνη	*BRCA1* Low	32 (50)	6.8 (3.7-10.0)	0.874		11.2 (8.3-16.1)	0.912	
	BRCA1 High	32 (50)	6.1 (4.5-7.7)			11.1 (8.8-15.6)		
Δοσεταξέλη /Γεμσιταβίνη	*TXR1* Low	34 (51)	7.2 (4.9-9.7)	0.024	0.56	15.8 (8.2-25.9)	0.013	0.387
	TXR1 High	33 (49)	3.3 (2.1-4.4)			8.5 (4.1-12.8)		
Δοσεταξέλη /Σισπλατίνη	*TXR1* Low	32 (50)	7.4 (4.2-10.3)	0.032		23.2 (10.2-38.1)	0.007	
	TXR1 High	32 (50)	3.7 (1.4-5.2)			8.7 (3.9-12.3)		
Δοσεταξέλη /Γεμσιταβίνη	*TSP1* Low	34 (51)	3.4 (2.1-4.8)	0.007	0.48	7.5 (5.4-11.4)	0.006	0.931
	TSP1 High	33 (49)	6.8(4.6-9.7)			26.7 (10.9-43.6)		
Δοσεταξέλη /Σισπλατίνη	*TSP1* Low	32 (50)	4.4 (1.6-8.1)	0.002		9.1 (5.4-12.7)	0.002	
	TSP1 High	32 (50)	7.6 (4.3-12.8)			36.4 (16.7-50.1)		

Συντομογραφίες: PFS: ελεύθερο νόσου διάστημα (Progression-free survival), OS: συνολική επιβίωση (overall survival), CI: διάστημα εμπιστοσύνης, Log-rank p value: τιμή p που προκύπτει από έλεγχο επιβίωσης (Log-rank test), Interaction p value: τιμή p που προκύπτει από έλεγχο αλληλεπίδρασης (interaction test)

6. Μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση

Τα αποτελέσματα μονοπαραγοντικής ανάλυσης που παρουσιάζονται στον Πίνακα 23, έδειξαν ότι τα υψηλά επίπεδα γονιδιακής έκφρασης του *TRX1* mRNA (P=0.002) και NSCLC σταδίου IV (P=0.02), συσχετίστηκαν στατιστικώς σημαντικά με μειωμένο PFS. Αντίθετα, η υψηλή έκφραση των *TSP1* και *BRCA1* mRNA συσχετίστηκαν με αυξημένο PFS (P<0.001 και P=0.02, αντίστοιχα). Επιπλέον, η κλινική κατάσταση βαθμού 2 (PS 2, P=0.04) και το στάδιο IV (P=0.04), η υψηλή έκφραση του *TXR1* mRNA (P=0.003) και η χαμηλή του *TSP1* mRNA (P<0.001), συσχετίστηκαν σημαντικά με μειωμένη

OS (Πίνακας 23). Καμία συσχέτιση δεν αναδείχθηκε μεταξύ της γονιδιακής έκφρασης των παραγόντων με την ηλικία και το φύλο σε σχέση με το PFS και την OS. Τέλος, η αμφίδρομη έκφραση των *TRX1* και *TSP1* (χαμηλή *TXR1* και υψηλή *TSP1*, P<0.001) με το PS βαθμού 2 (p=0.04) και NSCLC σταδίου IV (0.04) ανέδειξαν στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με τη συνολική επιβίωση (OS) αλλά όχι με το PFS (Πίνακας 23).

Τα αποτελέσματα της πολυπαραγοντικής ανάλυσης ήταν επίσης ενδιαφέροντα. Έτσι, η ανάλυση του μοντέλου αναλογικού κινδύνου του Cox έδειξε ότι η αμφίδρομη έκφραση των *TXR1* και *TSP1* mRNA (χαμηλή έκφραση *TXR1* / υψηλή έκφραση *TSP1*) (HR 0.49, 95% CI 0.32–0.76, P<0.001) με την έκφραση του *BRCA1* mRNA (HR 0.53, 95% CI 0.37-0.78, P=0 .001) δρούν ως ανεξάρτητοι παράγοντες που σχετίζονται με αυξημένο PFS (Πίνακας 24). Αναφορικά με τη συνολική επιβίωση (OS), ανεξάρτητοι παράγοντες πρόγνωσης αναδείχτηκαν η κλινική κατάσταση βαθμού 2 (PS 2 vs 0-1, HR 1.92, 95% CI 1.02-3.60, P=0.04) και η αμφίδρομη έκφραση των *TXR1* και *TSP1* mRNA (χαμηλή έκφραση *TXR1* / υψηλή *TSP1*, HR 0.37, 95% CI 0.23-0.58, P<0.001, Πίνακας 24). Καμία άλλη σχέση μεταξύ PFS/OS και των υπόλοιπων προγνωστικών παραγόντων δεν αναδείχτηκε.

Πίνακας 23 : Μονοπαραγοντική ανάλυση για το PFS και OS.

	Αναλογία κινδύνου (HR)	95% CI	p-value
PFS			
Έκφραση BRCA1 (High vs. Low)	**0.65**	**0.45 – 0.94**	**0.02**
Έκφραση TXR1 (High vs. Low)	**1. 61**	**1.17 – 2.43**	**0.002**
Έκφραση TSP1 (High vs. Low)	**0.49**	**0.34– 0.72**	**<0.001**
Έκφραση TXR1-TSP1 (Low TXR1/High TSP1 vs. other)	**0.6**	**0.39-0.90**	**0.01**
PS (2 vs. 0-1)	1.66	0.89 – 3.10	0.13
Ηλικία (>70y vs. ≤70y)	1.17	0.77 – 1.84	0.48
Φύλο (άρρεν vs. θήλυ)	1.3	0.72 - 2.33	0.38
Στάδιο νόσου (IV vs. IIIβ)	**1.9**	**1.15 – 2.58**	**0.02**
OS			
Έκφραση BRCA1 (High vs. Low)	1.02	0.69 – 1.50	0.93
Έκφραση TXR1 (High vs. Low)	**1.83**	**1.23 – 2.73**	**0.003**
Έκφραση TSP1 (High vs. Low)	**0.34**	**0.22 – 0. 53**	**<0.001**
Έκφραση TXR1-TSP1 (Low TXR1/High TSP1 vs. other)	**0.38**	**0.24-0.62**	**<0.001**
PS (2 vs. 0-1)	**1.92**	**1.02 – 3.58**	**0.04**
Ηλικία (>70y vs. ≤70y)	1.27	0.79 – 2.04	0.33
Φύλο (άρρεν vs. θήλυ)	1.57	0.77 - 3.59	0.18
Στάδιο νόσου (IV vs. IIIβ)	**1.73**	**1.03– 2.24**	**0.04**

Συντομογραφίες: PFS: ελεύθερο νόσου διάστημα (Progression-free survival), OS: συνολική επιβίωση (overall survival), CI: διάστημα εμπιστοσύνης, PS: κλινική κατάσταση (performance status), HR: αναλογία κινδύνου (Hazard ratio), τιμές με έντονη γραφή παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 24 : Πολυπαραγοντική ανάλυση για το PFS και OS.

	Αναλογία κινδύνου (HR)	95% CI	p-value
PFS			
Στάδιο νόσου (IV vs. IIIβ)	1.41	0.94 – 1.66	0.09
Έκφραση BRCA1 (High vs. Low)	**0.53**	**0.37 – 0.78**	**0.001**
Έκφραση TXR1-TSP1 (Low TXR1/High TSP1 vs. other)	**0.49**	**0.32 – 0.76**	**< 0.001**
OS			
Στάδιο νόσου (IV vs. IIIβ)	1.42	0.92-2.74	0.2
Έκφραση TXR1-TSP1 (Low TXR1/High TSP1 vs. other)	**0.37**	**0.23 – 0.58**	**<0.001**
PS (0-1 vs. 2)	**1.92**	**1.02 – 3.60**	**0. 04**

Συντομογραφίες: PFS: ελεύθερο νόσου διάστημα (Progression-free survival), OS: συνολική επιβίωση (overall survival), CI: διάστημα εμπιστοσύνης, PS: κατάσταση απόδοσης (performance status), HR: αναλογία κινδύνου (Hazard ratio), τιμές με έντονη γραφή παρουσιάζουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

Συμπεράσματα-Συζήτηση

Στη μελέτη αυτή αξιολογήθηκε η κλινική σημασία συγκεκριμένων κυτταρικών μορίων των οποίων η έκφραση έχει συσχετισθεί άμεσα με τη πρόγνωση και την ανταπόκριση στη θεραπεία σε ασθενείς με NSCLC. Συγκεκριμένα, θελήσαμε να μελετήσουμε αν η έκφραση των μορίων αυτών σχετιζόταν με την αντοχή του NSCLC σε διαφορετικά σχήματα χημειοθεραπείας (σχήματα με την προσθήκη ή μη σισπλατίνης). Έτσι, αναλύθηκε ανοσοϊστοχημικά η έκφραση συγκεκριμένων μορίων (p53, p21, Bcl2, APE1) από ιστολογικά δείγματα ασθενών με NSCLC, οι οποίοι εισήχθησαν σε τυχαιοποιημένο πρωτόκολλο χημειοθεραπείας με δοσεταξέλη/σισπλατίνη έναντι δοσεταξέλη/γεμσιταμπίνη και σε επίπεδο mRNA (*TSP1, TXR1, BRCA1*), που απομονώθηκε από τους ίδιους ιστούς.

Η APE1 είναι μία ενδονουκλεάση που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση των βλαβών στο DNA και την οξειδοαναγωγική σηματοδότηση ενώ έχει συσχετιστεί με τη χημειοαντίσταση. Αποτελεί επίσης ένα μεταγραφικό συνενεργοποιητή πολυάριθμων οδών σηματοδότησης, συμπεριλαμβανομένων των NF-KB, Myb, HIF-1a, PAX, p53 και AP-1. Στην δική μας μελέτη, η αυξημένη έκφραση του APE1 δεν συσχετίστηκε με το PFS και mOS σε ασθενείς με NSCLC σταδίου IIIB και IV, που υποβλήθηκαν σε χημειοθεραπευτική αγωγή με συνδυασμό δοσεταξέλης/γεμσιταμπίνης ή δοσεταξέλης/σισπλατίνης. Σε προηγούμενες μελέτες, ο πολυμορφισμός APE1 (APE1-141) έχει δειχθεί ότι σχετίζεται με υψηλή ανοχή στην τοξικότητα στο γαστρεντερικό σύστημα, αλλά κανένα στοιχείο δεν έδειξε, όπως και στην μελέτη μας, συσχετισμό με την πορεία της νόσου σε ασθενείς με προχωρημένο NSCLC που υποβλήθηκαν σε χημειοθεραπευτική αγωγή με βάση την πλατίνα (233). Τα αποτελέσματα για τη δράση του APE1 στον

καρκίνο είναι αμφιλεγόμενα. Έτσι, σε κάποιες μελέτες η υπερέκφραση του APE1 έχει συσχετιστεί με κακή πρόγνωση, όπως στον καρκίνο του στομάχου, τον καρκίνο του οισοφάγου από πλακώδη κύτταρα (ESCC) και τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, ενώ σε άλλους τύπους καρκίνου, όπως το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC) και ο καρκίνος του μαστού, η υπερέκφραση του APE1 έχει σχετιστεί με καλή πρόγνωση της νόσου (234). Έτσι φαίνεται ότι απαιτούνται περισσότερες μελέτες, με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών, διαφορετικών σταδίων, ώστε να εξακριβωθεί ο ρόλος της έκφρασης του APE1 στην πορεία του NSCLC. Παράλληλα, οι μελέτες αυτές θα πρέπει να στοχεύουν στην διαφορετική έκφραση του APE1 στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα του καρκινικού κυττάρου. Μελέτες έχουν δείξει ότι τόσο τα επίπεδα της πυρηνικής όσο και της κυτταροπλασματικής έκφρασης του παράγοντα αυτού, μπορούν να μεταβληθούν στον καρκίνο, αλλά εξακολουθεί να είναι ασαφές πώς η πυρηνική και κυτταροπλασματική έκφραση του APE1 μεταβάλλεται ειδικά και επηρεάζει διαφορετικούς τύπους καρκίνου (235).

Στους ίδιους ασθενείς αξιολογήθηκαν ανοσοϊστοχημικά και τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών p53, Bcl-2 και $p21^{WAF1/CIP1}$. Οι πρωτεΐνες αυτές συμμετέχουν στη ρύθμιση της απόπτωσης και του κυτταρικού κύκλου και αποτελούν πιθανούς δείκτες στην πρόβλεψη της ανταπόκρισης και της έκβασης της χημειοθεραπείας. Τα αποτελέσματα της μελέτης δεν ανέδειξαν συσχέτιση της έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών με το PFS και mOS σε ασθενείς με NSCLC σταδίου IIIB και IV, με πλακώδες ή μη καρκίνωμα, που υποβλήθηκαν σε χημειοθεραπευτική αγωγή με συνδυασμό δοσεταξέλης/γεμσιταμπίνης ή δοσεταξέλης/σισπλατίνης. Η αυξημένη έκφραση του Bcl-2 έχει σχετιστεί με θετική πρόγνωση κυρίως σε NSCLC σταδίου I και

όχι τόσο σε πιο προχωρημένες μορφές NSCLC (236), όπως στην παρούσα μελέτη. Παρά τον μεγάλο αριθμό μελετών, η σχέση της έκφρασης του Bcl-2 με την έκβαση του NSCLC παραμένει αμφιλεγόμενη. Μετα-ανάλυση 13 ανοσοϊστοχημικών μελετών που αξιολόγησαν το Bcl-2 αποκάλυψε ότι η υπερέκφραση της Bcl-2 συσχετίστηκε με καλύτερη επιβίωση των ασθενών. Παρόλα αυτά, σε άλλες μελέτες η έκφραση του Bcl-2 έχει αναφερθεί ως αρνητικός προγνωστικός δείκτης ενώ η πλειονότητα των μελετών αναφέρουν ότι η έκφραση του Bcl-2 δεν έχει επίδραση στην επιβίωση (204).

Παρομοίως και για τις πρωτεΐνες p53 και p21 δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της έκφρασής τους με το PFS και την mOS των ασθενών ανεξάρτητα του χημειοθεραπευτικού σχήματος που χορηγήθηκε. Οι πρωτεΐνες αυτές ανιχνεύθηκαν σε μεγαλύτερα επίπεδα στους περισσότερους καρκινικούς όγκους (58% για το p53 και 53% για το p21) γεγονός που συμφωνεί με άλλες μελέτες που σχετίζουν την έκφραση των συγκεκριμένων παραγόντων με την πρόοδο του NSCLC (237). Μελέτη του 2014 επιβεβαιώνει τα αποτελέσματά μας σχετικά με τη σχέση της έκφρασης των p53/p21 με την πρόοδο της νόσου. Έτσι, σε ασθενείς με χαμηλότερα στάδια της νόσου (tumor grade G1 / G2), τόσο η υψηλή έκφραση του p53 όσο και του p21 οδήγησαν σε μείωση του mOS. Αντίθετα, ούτε η έκφραση του p53 ή του p21 είχε αντίκτυπο στη συνολική επιβίωση των ασθενών με προχωρημένη νόσο (tumor grade G3) (237). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι τα επίπεδα έκφρασης των p53 και p21 δεν επηρεάζουν περαιτέρω την πρόοδο του όγκου σε ασθενείς με NSCLC προχωρημένου σταδίου.

Τα διαφορετικά αποτελέσματα που προκύπτουν από την παρούσα εργασία και την τρέχουσα βιβλιογραφία σχετικά με την έκφραση των ανωτέρω

μορίων στον NSCLC, οφείλονται κυρίως στις διαφορετικές μεθοδολογίες που χρησιμοποιήθηκαν στην ανοσοϊστοχημεία, τη χρήση διαφορετικών αντισωμάτων, την έλλειψη αναπαραγωγιμότητας και την έλλειψη ανεξάρτητης επικύρωσης των αποτελεσμάτων. Ο στόχος της μελέτης αυτής ήταν η αντικειμενική εκτίμηση της έκφρασης των APE1, Bcl-2, p53 και p21 στο NSCLC για τον προσδιορισμό της προγνωστικής τους αξίας σε ασθενείς προχωρημένου σταδίου.

Η καταστολή της έκφρασης του TSP1 μέσω της υπερέκφρασης του TXR1 έχει προταθεί ως ένας νέος μηχανισμός που ρυθμίζει την κυτταροτοξικότητα των ταξανών *in vitro* (226). Ο ρυθμιστικός αυτός μηχανισμός επιβεβαιώθηκε, σε κλινική βάση, σε προηγούμενη δημοσίευση του εργαστηρίου μας, σε ομάδα ασθενών με αδενοκαρκίνωμα που υποβλήθηκαν σε χημειοθεραπευτική αγωγή με συνδυασμό δοσεταξέλης/γεμσιταμπίνης (232). Στο δεύτερο κομμάτι της διδακτορικής αυτής διατριβής, σκοπός μας ήταν να αξιολογήσουμε την προγνωστική αξία της αμφίδρομης γονιδιακής έκφρασης των *TXR1* και *TSP1* mRNA (υψηλή έκφραση *TXR1* / χαμηλή έκφραση *TSP1*) σε συνδυασμό με την έκφραση του *BRCA1* mRNA, σε δείγματα ασθενών όλων των ιστολογικών υποτύπων του NSCLC που λάμβαναν 1^{ης} γραμμής θεραπεία με βάση τη δοσεταξέλη (δοσεταξέλη/σισπλατίνη, δοσεταξέλη/γεμσιταμπίνη).

Παρατηρήθηκε ότι η διάμεση τιμή γονιδιακής έκφρασης των *TXR1* και *TSP1* mRNA ήταν σχεδόν ταυτόσημες μεταξύ πλακώδους και μη-πλακώδους καρκινώματος (P-value=0.92 και 1.0, αντίστοιχα, Πίνακας 16) και επιβεβαιώθηκε ότι η αυξημένη έκφραση του *TXR1* σχετίζεται στατιστικώς σημαντικά με τη χαμηλή έκφραση του *TSP1* mRNA (P=0.001). Επιπλέον, η πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι η αμφίδρομη έκφραση των δύο αυτών

παραγόντων (χαμηλή έκφραση *TXR1* / υψηλή έκφραση *TSP1*) ήταν ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για την αύξηση του PFS και της συνολικής επιβίωσης (OS) και συσχετίστηκε με 51% και 63% μείωση του κινδύνου για πρόοδο της νόσου ή θάνατο, αντίστοιχα. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι η προγνωστική αξία της έκφρασης των *TXR1* και *TSP1* για το PFS και την OS διατηρήθηκε ανεξάρτητα από την ιστολογία του πρωτογενούς όγκου. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με ήδη δημοσιευμένες *in vitro* και *in vívo* μελέτες σχετικά με το ρόλο της έκφρασης των *TXR1-TSP1* στην αντοχή σε θεραπείες με βάση τις ταξάνες, τόσο στον καρκίνο του πνεύμονα (226, 232) όσο και σε άλλους τύπους καρκίνου, όπως τον καρκίνο του μαστού (238) και τον γαστρικό καρκίνο (239). Οι παρατηρήσεις αυτές καθιστούν την έκφραση των *TXR1-TSP1* ένα σημαντικό προγνωστικό μάρτυρα για την ανταπόκριση των ασθενών σε θεραπευτικά σχήματα με βάση τις ταξάνες.

Παράλληλα, στην παρούσα μελέτη μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης και του *BRCA1* mRNA στους διαφορετικούς ιστολογικούς τύπους του NSCLC. Η BRCA1 είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη καταστολής όγκων, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο σε βασικές κυτταρικές διεργασίες, όπως η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η αντιγραφή, η συναρμολόγηση της μιτωτικής ατράκτου, η ρύθμιση της μεταγραφής, η απόκριση σε βλάβες στο DNA (DDR) και η απόπτωση (240). Σε αντίθεση με τα μόρια *TXR1-TSP1*, η διάμεση έκφραση του *BRCA1* mRNA αποδείχτηκε να είναι διαφορετική ανάμεσα στα πλακώδη και μη πλακώδη καρκινώματα (P=0.001, Πίνακας 16). Η παρατήρηση αυτή έχει επιβεβαιωθεί και σε προηγούμενη μελέτη με παρόμοιο αριθμό ασθενών με NSCLC σταδίου IB, II και IIIA (223).

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η αυξημένη έκφραση του *BRCA1* mRNA συσχετίστηκε θετικά με υψηλότερη RR και PFS αλλά όχι με τη mOS. Μία πιο πρόσφατη μελέτη συσχετίζει την αυξημένη έκφραση της *BRCA1* και με αυξημένη OS σε 377 ασθενείς σταδίου IIIB και IV που λάμβαναν θεραπεία με βάση την πλατίνη. Παρόλα αυτά, δεν καταγράφεται η συσχέτιση της αυξημένης έκφρασης του *BRCA1* mRNA με την OS ανάλογα με το είδος της 1^{ης} γραμμής θεραπείας (πακλιταξέλη, γεμσιταμπίνη, δοσεταξέλη ή βινορελμπίνη) (241). Η προγνωστική αξία της έκφρασης του *BRCA1* mRNA στο PFS ήταν στατιστικώς σημαντική τόσο σε ασθενείς με πλακώδες όσο και σε ασθενείς με μη-πλακώδες καρκίνωμα (έλεγχος αλληλεπίδρασης P=0.61, Πίνακας 18). Τα αυξημένα επίπεδα του *BRCA1* mRNA συσχετίστηκαν στατιστικώς σημαντικά με την αύξηση του PFS σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία 1^{ης} γραμμής με DG, αλλά όχι σε αυτούς που έλαβαν θεραπεία με DC (έλεγχος αλληλεπίδρασης, P=0.006, Πίνακας 19). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα τρέχοντα δεδομένα για τη διαφορετική προγνωστική αξία του BRCA1, καθώς χαμηλή έκφραση του BRCA1 προσδίδει αυξημένη ευαισθησία στη σισπλατίνη (221, 242-244) και αντοχή σε φάρμακα έναντι των μικροσωληνίσκων, όπως η δοσεταξέλη, ενώ η υψηλή έκφραση του σχετίζεται με αντοχή στη σισπλατίνη (222, 242, 243, 245) και ευαισθησία στη δοσεταξέλη (244-246). Επιπλέον, η υπερέκφραση του *BRCA1* συσχετίζεται σημαντικά με την έκφραση των *ERCC1* και *RRM1* σε αρκετές μελέτες (223, 246-248), δίνοντας μια άλλη εξήγηση για την έλλειψη συσχέτισης του BRCA1 με τη συνολική επιβίωση.

Η αυξημένη έκφραση του *BRCA1* mRNA έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής σε ασθενείς με πρώιμο στάδιο NSCLC (στάδιο IB-IIB)

(247), ενώ ο απλότυπος BRCA1 μπορεί να προβλέψει την ανταπόκριση των ασθενών με NSCLC, κυρίως με πλακώδες καρκίνωμα, που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα (249). Τα ευρήματα θα μπορούσαν να εξηγήσουν την έλλειψη συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης του *BRCA1* mRNA και της ανταπόκρισης των ασθενών στο χημειοθεραπευτικό σχήμα DC που παρατηρήθηκε σε αυτή τη μελέτη. Παρομοίως, η έκφραση της BRCA1 πρωτεΐνης δεν ήταν ένας προγνωστικός παράγοντας για ασθενείς με εγχειρήσιμο NSCLC που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με DC ως νεοεπικουρική θεραπεία (250). Τέλος, η έλλειψη συσχέτισης της έκφρασης του BRCA1 με την OS που παρατηρήθηκε, ειδικά σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με DG, θα μπορούσε να εξηγηθεί εν μέρει από το γεγονός ότι η χημειοθεραπεία 2^{ης} γραμμής με σισπλατίνη είναι πιο αποτελεσματική σε ασθενείς με χαμηλή έκφραση του *BRCA1* όπως έχει αναφερθεί σε προγενέστερη μελέτη (246).

Η επίδραση της έκφρασης του *TXR1-TSP1* mRNA στην κυτταροτοξικότητα των ταξανών είναι ανεξάρτητη από τον MDR φαινότυπο (η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να εκκρίνουν ταξάνες μέσω της αύξησης των εξαρτώμενων από την ATP γλυκοπρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης) (251) καθώς η υπερέκφραση του TXR1 δεν επηρεάζει την κυτταρική συσσώρευση της [^{3}H] -σημασμένης-πακλιταξέλης στα ανθεκτικά κύτταρα και δεν μειώνει την ευαισθησία σε άλλους παράγοντες που επίσης αποβάλλονται από τα καρκινικά κύτταρα μέσω του MDR (226). Επίσης, φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από το σχηματισμό της τουμπουλίνης (μεταλλάξεις στο γονίδιο της β-τουμπουλίνης που μπορεί να σχετίζονται με τις θέσεις πρόσδεσης των ταξανών στους μικροσωληνίσκους) (252-255), καθώς ποσοτική βιοχημική ανάλυση σε κυτταρικές σειρές που είναι ανθεκτικές στις ταξάνες έδειξε την ίδια

δυναμική στην τουμπουλίνη με εκείνη των γονικών (ευαίσθητων) κυττάρων και καμία αύξηση των ισομορφών των μικροσωληνίσκων που συνήθως αυξάνονται στη σχετιζόμενη με τουμπουλίνη αντίσταση στις ταξάνες (226, 251).

Λόγω της έλλειψης μιας ομάδας ελέγχου, που δεν υποβλήθηκε σε θεραπεία με ταξάνες, δεν μπορούμε να επιβεβαιώσουμε ότι η επίδραση της έκφρασης του TSP1 ήταν ειδική για τις ταξάνες και όχι ένας απλός προγνωστικός δείκτης της απόκρισης των ασθενών στη χημειοθεραπεία. Σε πολλούς τύπου καρκίνου, η έκφραση του TSP1 σχετίζεται αντιστρόφως με την πρόοδο της νόσου ενώ έχει αναφερθεί ως ένας ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης (256, 257). Ωστόσο, πειράματα cDNA microarrays, έχουν δείξει ότι η επαγωγή του TSP1 σε κυτταρικές σειρές πλακώδους καρκινώματος κεφαλής και τραχήλου, στις οποίες χορηγήθηκε δοσεταξέλη, οδήγησε σε αύξηση της κυτταροτοξικότητας (258). Η TSP1 θεωρείται μια προαποπτωτική πρωτεΐνη που δρα μέσω της ενεργοποίησης του υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας CD47 (226). Η επαγωγή της TSP1 έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί σε απόπτωση εξαρτώμενη (259) και μη (260) από κασπάσες. Επιπλέον, το TSP1 είναι ένας ισχυρός αναστολέας της αγγειογένεσης και μειωμένα επίπεδα κυκλοφορούντος TSP1 σε ορισμένα συγγενή στελέχη ποντικού σχετίζονται με αύξηση του αριθμού πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων στην κυκλοφορία και ευαισθησία στην ανάπτυξη καρκίνου (261). Στον NSCLC, η μειωμένη πρωτεϊνική έκφραση του TSP1 έχει συσχετιστεί με αυξημένο αριθμό μικροαγγείων και δυσμενή πρόγνωση (262). Από την άλλη, η υπερέκφραση του TSP1 έχει επίσης συσχετιστεί με την επιθετικότητα και την αυξημένη αγγειογένεση στον καρκίνο του πνεύμονα (263). Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι

αυξημένα επίπεδα του TSP1 στον ορό ασθενών με πρωτοπαθή NSCLC συσχετίστηκε με μείωση του κινδύνου θανάτου. Συγκεκριμένα, για κάθε 10 μονάδες αύξησης των επιπέδων του TSP1, ο κίνδυνος θανάτου μειώθηκε κατά 85% (264).

Παρά το γεγονός ότι τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής πρέπει να ερμηνευθούν με προσοχή εξαιτίας της αναδρομικής φύσης της, φαίνεται ότι η έκφραση των *TXR1-TSP1* mRNA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης για ασθενείς με NSCLC που έλαβαν χημειοθεραπεία με βάση τη δοσεταξέλη. Ήδη η έκφραση των *TXR1 / TSP1* αξιολογείται στη χημειοευαισθησία στις ταξάνες σε άλλους τύπους καρκίνου, όπως του μαστού (238) και των ωοθηκών (265), όπου οι ταξάνες χρησιμοποιούνται συνήθως στην καθημερινή κλινική πράξη. Πρόσφατα ξεκίνησαν προσπάθειες για την αξιολόγηση της κλινικής σημασίας της έκφρασης των *TXR1/TSP1* με κατάλληλα σχεδιασμένες κλινικές δοκιμές.

Βιβλιογραφία

1. Sadeghi-Gandomani H, Asgari-Tarazoj A, Ghoncheh M, Yousefi S, Delaram M, Salehiniya H. LUNG CANCER IN THE WORLD: THE INCIDENCE, MORTALITY RATE AND RISK FACTORS. WORLD CANCER RESEARCH JOURNAL. 2017;4(3).

2. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. 2013. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2014.

3. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. CA: a cancer journal for clinicians. 2015;65(2):87-108.

4. Forouzanfar MH, Afshin A, Alexander LT, Anderson HR, Bhutta ZA, Biryukov S, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. The Lancet. 2016;388(10053):1659-724.

5. Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P. Risk factors for lung cancer worldwide. Eur Respir J. 2016;48(3):889-902.

6. Didkowska J, Wojciechowska U, Manczuk M, Lobaszewski J. Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide. Annals of translational medicine. 2016;4(8):150.

7. Torre LA, Siegel RL, Jemal A. Lung Cancer Statistics. Advances in experimental medicine and biology. 2016;893:1-19.

8. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. CA Cancer J Clin. 2018;68(1):7-30.

9. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015;136(5):E359-86.

10. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. Eur J Cancer. 2013;49(6):1374-403.

11. Pakzad R, Mohammadian-Hafshejani A, Ghoncheh M, Pakzad I, Salehiniya H. The incidence and mortality of lung cancer and their relationship to development in Asia. Translational lung cancer research. 2015;4(6):763-74.

12. Alberg AJ, Brock MV, Ford JG, Samet JM, Spivack SD. Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. Chest. 2013;143(5 Suppl):e1S-e29S.

13. Ferlay J, Bray F, Steliarova-Foucher E, Forman D. Cancer incidence in five continents, CI5plus. IARC CancerBase. 2014(9).

14. Cancer IAfRo. GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. 2012.

15. Centers for Disease C, Prevention. Racial/Ethnic disparities and geographic differences in lung cancer incidence --- 38 States and the District of Columbia, 1998-2006. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2010;59(44):1434-8.

16. Houston KA, Mitchell KA, King J, White A, Ryan BM. Histologic Lung Cancer Incidence Rates and Trends Vary by Race/Ethnicity and Residential County. J Thorac Oncol. 2018;13(4):497-509.

17. Maione P, Rossi A, Sacco PC, Bareschino MA, Schettino C, Ferrara ML, et al. Treating advanced non-small cell lung cancer in the elderly. Ther Adv Med Oncol. 2010;2(4):251-60.

18. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. CA: a cancer journal for clinicians. 2014;64(1):9-29.

19. Lortet-Tieulent J, Soerjomataram I, Ferlay J, Rutherford M, Weiderpass E, Bray F. International trends in lung cancer incidence by histological subtype: adenocarcinoma stabilizing in men but still increasing in women. Lung Cancer. 2014;84(1):13-22.

20. Noone A-M, Cronin KA, Altekruse SF, Howlader N, Lewis DR, Petkov VI, et al. Cancer incidence and survival trends by subtype using data from the Surveillance Epidemiology and End Results Program, 1992-2013. Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers. 2016:cebp. 0520.2016.

21. Devesa SS, Bray F, Vizcaino AP, Parkin DM. International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. Int J Cancer. 2005;117(2):294-9.

22. Janssen-Heijnen ML, Coebergh JW. The changing epidemiology of lung cancer in Europe. Lung Cancer. 2003;41(3):245-58.

23. Meza R, Meernik C, Jeon J, Cote ML. Lung cancer incidence trends by gender, race and histology in the United States, 1973-2010. PloS one. 2015;10(3):e0121323.

24. Tsalapati K, Vardavas CI, Athanasakis K, Thireos E, Vozikis A, Pavi E, et al. Going up in ashes? Smoking-attributable morbidity, hospital admissions and expenditure in Greece. European journal of public health. 2014;24(3):477-9.

25. Sifaki-Pistolla D, Lionis C, Georgoulias V, Kyriakidis P, Koinis F, Aggelaki S, et al. Lung cancer and tobacco smoking in Crete, Greece: reflections from a population-based cancer registry from 1992 to 2013. Tob Induc Dis. 2017;15:6.

26. Lagiou P, Trichopoulos D. The Greek Tobacco Epidemic: Faculty of the Harvard School of Public Health; 2011.

27. Rachiotis G, Barbouni A, Katsioulis A, Antoniadou E, Kostikas K, Merakou K, et al. Prevalence and determinants of current and secondhand smoking in Greece: results from the Global Adult Tobacco Survey (GATS) study. BMJ Open. 2017;7(1):e013150.

28. Zatonski W, Przewozniak K, Sulkowska U, West R, Wojtyla A. Tobacco smoking in countries of the European Union. Ann Agric Environ Med. 2012;19(2):181-92.

29. (IARC) AfRoC. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 2012 [

30. Bray FI, Weiderpass E. Lung cancer mortality trends in 36 European countries: secular trends and birth cohort patterns by sex and region 1970-2007. Int J Cancer. 2010;126(6):1454-66.

31. Kontakiotis T, Manolakoglou N, Zoglopitis F, Iakovidis D, Sacas L, Papagiannis A, et al. Epidemiologic trends in lung cancer over two decades in Northern Greece: an analysis of bronchoscopic data. Monaldi Arch Chest Dis. 2009;71(4):147-52.

32. Doll R, Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. Br Med J. 1950;2(4682):739-48.

33. Wynder EL, Graham EA. Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma; a study of 684 proved cases. J Am Med Assoc. 1950;143(4):329-36.

34. D'Addario G, Felip E, Group EGW. Non-small-cell lung cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology. 2009;20 Suppl 4:68-70.

35. Thielen A, Klus H, Muller L. Tobacco smoke: unraveling a controversial subject. Exp Toxicol Pathol. 2008;60(2-3):141-56.

36. Rodgman A, Perfetti TA. The chemical components of tobacco and tobacco smoke: CRC press; 2016.

37. Brennan P, Crispo A, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, Lissowska J, et al. High cumulative risk of lung cancer death among smokers and nonsmokers in Central and Eastern Europe. Am J Epidemiol. 2006;164(12):1233-41.

38. Pineros M, Sierra MS, Forman D. Descriptive epidemiology of lung cancer and current status of tobacco control measures in Central and South America. Cancer Epidemiol. 2016;44 Suppl 1:S90-S9.

39. Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Erratum: Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. Int. J. Cancer, 83, 18-29 (1999). Int J Cancer. 1999;83(6):870-3.

40. Gray N. The consequences of the unregulated cigarette. Tob Control. 2006;15(5):405-8.

41. Schabath MB, Cress D, Munoz-Antonia T. Racial and Ethnic Differences in the Epidemiology and Genomics of Lung Cancer. Cancer Control. 2016;23(4):338-46.

42. Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. Bmj. 1997;315(7114):980-8.

43. Besaratinia A, Pfeifer GP. Second-hand smoke and human lung cancer. Lancet Oncol. 2008;9(7):657-66.

44. Wang J, Liu Q, Yuan S, Xie W, Liu Y, Xiang Y, et al. Genetic predisposition to lung cancer: comprehensive literature integration, meta-analysis, and multiple evidence assessment of candidate-gene association studies. Sci Rep. 2017;7(1):8371.

45. Brownson RC, Alavanja MC, Caporaso N, Berger E, Chang JC. Family history of cancer and risk of lung cancer in lifetime non-smokers and long-term ex-smokers. Int J Epidemiol. 1997;26(2):256-63.

46. Musolf AM, Simpson CL, de Andrade M, Mandal D, Gaba C, Yang P, et al. Familial Lung Cancer: A Brief History from the Earliest Work to the Most Recent Studies. Genes (Basel). 2017;8(1).

47. Kanwal M, Ding XJ, Cao Y. Familial risk for lung cancer. Oncol Lett. 2017;13(2):535-42.

48. Jemal A, Simard EP, Dorell C, Noone AM, Markowitz LE, Kohler B, et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2009, featuring the burden and trends in human papillomavirus(HPV)-associated cancers and HPV vaccination coverage levels. Journal of the National Cancer Institute. 2013;105(3):175-201.

49. Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. Nature. 2008;455(7216):1069-75.

50. El-Telbany A, Ma PC. Cancer genes in lung cancer: racial disparities: are there any? Genes & cancer. 2012;3(7-8):467-80.

51. Sinha R, Kulldorff M, Curtin J, Brown CC, Alavanja MC, Swanson CA. Fried, well-done red meat and risk of lung cancer in women (United States). Cancer Causes Control. 1998;9(6):621-30.

52. Goralczyk R. Beta-carotene and lung cancer in smokers: review of hypotheses and status of research. Nutr Cancer. 2009;61(6):767-74.

53. Herr C, Greulich T, Koczulla RA, Meyer S, Zakharkina T, Branscheidt M, et al. The role of vitamin D in pulmonary disease: COPD, asthma, infection, and cancer. Respir Res. 2011;12:31.

54. Bandera EV, Freudenheim JL, Vena JE. Alcohol consumption and lung cancer: a review of the epidemiologic evidence. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2001;10(8):813-21.

55. Guertin KA, Freedman ND, Loftfield E, Graubard BI, Caporaso NE, Sinha R. Coffee consumption and incidence of lung cancer in the NIH-AARP Diet and Health Study. Int J Epidemiol. 2016;45(3):929-39.

56. Mayne ST, Buenconsejo J, Janerich DT. Previous lung disease and risk of lung cancer among men and women nonsmokers. Am J Epidemiol. 1999;149(1):13-20.

57. Qu YL, Liu J, Zhang LX, Wu CM, Chu AJ, Wen BL, et al. Asthma and the risk of lung cancer: a meta-analysis. Oncotarget. 2017;8(7):11614-20.

58. Aoki K. Excess incidence of lung cancer among pulmonary tuberculosis patients. Jpn J Clin Oncol. 1993;23(4):205-20.

59. Littman AJ, Jackson LA, Vaughan TL. Chlamydia pneumoniae and lung cancer: epidemiologic evidence. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2005;14(4):773-8.

60. Peto J, Darby S. Lung cancer. Radon risk reassessed. Nature. 1994;368(6467):97-8.

61. Darby S, Hill D, Auvinen A, Barros-Dios JM, Baysson H, Bochicchio F, et al. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of

individual data from 13 European case-control studies. Bmj. 2005;330(7485):223.

62. Gilham C, Rake C, Burdett G, Nicholson AG, Davison L, Franchini A, et al. Pleural mesothelioma and lung cancer risks in relation to occupational history and asbestos lung burden. Occup Environ Med. 2016;73(5):290-9.

63. Hayes RB. The carcinogenicity of metals in humans. Cancer Causes Control. 1997;8(3):371-85.

64. Chen C, Xun P, Nishijo M, He K. Cadmium exposure and risk of lung cancer: a meta-analysis of cohort and case-control studies among general and occupational populations. J Expo Sci Environ Epidemiol. 2016;26(5):437-44.

65. Ferdosi H, Dissen EK, Afari-Dwamena NA, Li J, Chen R, Feinleib M, et al. Arsenic in Drinking Water and Lung Cancer Mortality in the United States: An Analysis Based on US Counties and 30 Years of Observation (1950-1979). J Environ Public Health. 2016;2016:1602929.

66. Poinen-Rughooputh S, Rughooputh MS, Guo Y, Rong Y, Chen W. Occupational exposure to silica dust and risk of lung cancer: an updated meta-analysis of epidemiological studies. BMC public health. 2016;16(1):1137.

67. Benbrahim-Tallaa L, Baan RA, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, et al. Carcinogenicity of diesel-engine and gasoline-engine exhausts and some nitroarenes. Lancet Oncol. 2012;13(7):663-4.

68. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, Weinmayr G, et al. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). Lancet Oncol. 2013;14(9):813-22.

69. Ellis PM, Vandermeer R. Delays in the diagnosis of lung cancer. J Thorac Dis. 2011;3(3):183-8.

70. Beckles MA, Spiro SG, Colice GL, Rudd RM. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes. Chest. 2003;123(1 Suppl):97S-104S.

71. Ilonen I. Non-small cell lung cancer: studies on pathogenesis, tumour targeting and treatment outcomes. 2011.

72. Shim SS, Lee KS, Kim BT, Chung MJ, Lee EJ, Han J, et al. Non-small cell lung cancer: prospective comparison of integrated FDG PET/CT and CT alone for preoperative staging. Radiology. 2005;236(3):1011-9.

73. Vansteenkiste JF, Stroobants SG, De Leyn PR, Dupont PJ, Verschakelen JA, Nackaerts KL, et al. Mediastinal lymph node staging with FDG-PET scan in patients with potentially operable non-small cell lung cancer: a prospective analysis of 50 cases. Leuven Lung Cancer Group. Chest. 1997;112(6):1480-6.

74. Rivera MP, Mehta AC, American College of Chest P. Initial diagnosis of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). Chest. 2007;132(3 Suppl):131S-48S.

75. Yasufuku K, Nakajima T, Motoori K, Sekine Y, Shibuya K, Hiroshima K, et al. Comparison of endobronchial ultrasound, positron emission

tomography, and CT for lymph node staging of lung cancer. Chest. 2006;130(3):710-8.

76. Kaya S, Yigit LP, Erelel M, Toker A. Expectoration of a tumor tissue: metastatic endobronchial leiomyosarcoma treated with endoscopy. Current Thoracic Surgery. 2016;1(1).

77. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. J Thorac Oncol. 2015;10(9):1243-60.

78. Travis WD, Brambilla E, Riely GJ. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2013;31(8):992-1001.

79. Morgensztern D, Ng SH, Gao F, Govindan R. Trends in stage distribution for patients with non-small cell lung cancer: a National Cancer Database survey. J Thorac Oncol. 2010;5(1):29-33.

80. Selvaggi G, Scagliotti GV. Histologic subtype in NSCLC: does it matter? Oncology (Williston Park). 2009;23(13):1133-40.

81. Davidson MR, Gazdar AF, Clarke BE. The pivotal role of pathology in the management of lung cancer. J Thorac Dis. 2013;5 Suppl 5:S463-78.

82. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma: executive summary. Proc Am Thorac Soc. 2011;8(5):381-5.

83. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. Introduction to The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart. J Thorac Oncol. 2015;10(9):1240-2.

84. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. CA Cancer J Clin. 2017;67(2):93-9.

85. Rami-Porta R, Call S, Dooms C, Obiols C, Sanchez M, Travis WD, et al. Lung cancer staging: a concise update. Eur Respir J. 2018;51(5).

86. Sculier JP, Chansky K, Crowley JJ, Van Meerbeeck J, Goldstraw P, International Staging C, et al. The impact of additional prognostic factors on survival and their relationship with the anatomical extent of disease expressed by the 6th Edition of the TNM Classification of Malignant Tumors and the proposals for the 7th Edition. J Thorac Oncol. 2008;3(5):457-66.

87. Rami-Porta R, Bolejack V, Giroux DJ, Chansky K, Crowley J, Asamura H, et al. The IASLC lung cancer staging project: the new database to inform the eighth edition of the TNM classification of lung cancer. J Thorac Oncol. 2014;9(11):1618-24.

88. Detterbeck FC. The eighth edition TNM stage classification for lung cancer: What does it mean on main street? J Thorac Cardiovasc Surg. 2018;155(1):356-9.

89. Yuspa SH. The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis--thirty-third G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture. Cancer Res. 1994;54(5):1178-89.

90. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. Trends Genet. 1993;9(4):138-41.

91. Cho KR, Vogelstein B. Suppressor gene alterations in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. Journal of cellular biochemistry Supplement. 1992;16G:137-41.

92. Wistuba, II, Gazdar AF. Lung cancer preneoplasia. Annual review of pathology. 2006;1:331-48.

93. Wistuba, II, Behrens C, Milchgrub S, Bryant D, Hung J, Minna JD, et al. Sequential molecular abnormalities are involved in the multistage development of squamous cell lung carcinoma. Oncogene. 1999;18(3):643-50.

94. Kadara H, Wistuba, II. Field cancerization in non-small cell lung cancer: implications in disease pathogenesis. Proc Am Thorac Soc. 2012;9(2):38-42.

95. Westra WH. Early glandular neoplasia of the lung. Respir Res. 2000;1(3):163-9.

96. Carr LL, Chung JH, Duarte Achcar R, Lesic Z, Rho JY, Yagihashi K, et al. The clinical course of diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia. Chest. 2015;147(2):415-22.

97. Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers--a different disease. Nat Rev Cancer. 2007;7(10):778-90.

98. Imielinski M, Berger AH, Hammerman PS, Hernandez B, Pugh TJ, Hodis E, et al. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. Cell. 2012;150(6):1107-20.

99. Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. Cell. 2005;121(6):823-35.

100. Tang X, Varella-Garcia M, Xavier AC, Massarelli E, Ozburn N, Moran C, et al. Epidermal growth factor receptor abnormalities in the pathogenesis and progression of lung adenocarcinomas. Cancer Prev Res (Phila). 2008;1(3):192-200.

101. Kitamura H, Kameda Y, Ito T, Hayashi H. Atypical adenomatous hyperplasia of the lung. Implications for the pathogenesis of peripheral lung adenocarcinoma. American journal of clinical pathology. 1999;111(5):610-22.

102. Westra WH, Baas IO, Hruban RH, Askin FB, Wilson K, Offerhaus GJ, et al. K-ras oncogene activation in atypical alveolar hyperplasias of the human lung. Cancer research. 1996;56(9):2224-8.

103. Yatabe Y. EGFR mutations and the terminal respiratory unit. Cancer metastasis reviews. 2010;29(1):23-36.

104. Nakanishi K, Kawai T, Kumaki F, Hiroi S, Mukai M, Ikeda E. Survivin expression in atypical adenomatous hyperplasia of the lung. American journal of clinical pathology. 2003;120(5):712-9.

105. Tominaga M, Sueoka N, Irie K, Iwanaga K, Tokunaga O, Hayashi S, et al. Detection and discrimination of preneoplastic and early stages of lung

adenocarcinoma using hnRNP B1 combined with the cell cycle-related markers p16, cyclin D1, and Ki-67. Lung Cancer. 2003;40(1):45-53.

106. Ghaffar H, Sahin F, Sanchez-Cepedes M, Su GH, Zahurak M, Sidransky D, et al. LKB1 protein expression in the evolution of glandular neoplasia of the lung. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2003;9(8):2998-3003.

107. Selamat SA, Galler JS, Joshi AD, Fyfe MN, Campan M, Siegmund KD, et al. DNA methylation changes in atypical adenomatous hyperplasia, adenocarcinoma in situ, and lung adenocarcinoma. PloS one. 2011;6(6):e21443.

108. Yatabe Y, Mitsudomi T, Takahashi T. TTF-1 expression in pulmonary adenocarcinomas. The American journal of surgical pathology. 2002;26(6):767-73.

109. Wistuba, II, Behrens C, Virmani AK, Mele G, Milchgrub S, Girard L, et al. High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. Cancer Res. 2000;60(7):1949-60.

110. Wistuba, II, Behrens C, Virmani AK, Milchgrub S, Syed S, Lam S, et al. Allelic losses at chromosome 8p21-23 are early and frequent events in the pathogenesis of lung cancer. Cancer Res. 1999;59(8):1973-9.

111. Merrick DT, Haney J, Petrunich S, Sugita M, Miller YE, Keith RL, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor and its receptors in bronchial dypslasia demonstrated by quantitative RT-PCR analysis. Lung Cancer. 2005;48(1):31-45.

112. Hussenet T, Dali S, Exinger J, Monga B, Jost B, Dembele D, et al. SOX2 is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous cell carcinomas. PloS one. 2010;5(1):e8960.

113. McCaughan F, Pole JC, Bankier AT, Konfortov BA, Carroll B, Falzon M, et al. Progressive 3q amplification consistently targets SOX2 in preinvasive squamous lung cancer. Am J Respir Crit Care Med. 2010;182(1):83-91.

114. Yuan P, Kadara H, Behrens C, Tang X, Woods D, Solis LM, et al. Sex determining region Y-Box 2 (SOX2) is a potential cell-lineage gene highly expressed in the pathogenesis of squamous cell carcinomas of the lung. PloS one. 2010;5(2):e9112.

115. Nakachi I, Rice JL, Coldren CD, Edwards MG, Stearman RS, Glidewell SC, et al. Application of SNP microarrays to the genome-wide analysis of chromosomal instability in premalignant airway lesions. Cancer Prev Res (Phila). 2014;7(2):255-65.

116. Ooi AT, Gower AC, Zhang KX, Vick JL, Hong L, Nagao B, et al. Molecular profiling of premalignant lesions in lung squamous cell carcinomas identifies mechanisms involved in stepwise carcinogenesis. Cancer Prev Res (Phila). 2014;7(5):487-95.

117. Wistuba, II, Berry J, Behrens C, Maitra A, Shivapurkar N, Milchgrub S, et al. Molecular changes in the bronchial epithelium of patients with small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2000;6(7):2604-10.

118. Meuwissen R, Linn SC, Linnoila RI, Zevenhoven J, Mooi WJ, Berns A. Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model. Cancer Cell. 2003;4(3):181-9.

119. Park KS, Martelotto LG, Peifer M, Sos ML, Karnezis AN, Mahjoub MR, et al. A crucial requirement for Hedgehog signaling in small cell lung cancer. Nature medicine. 2011;17(11):1504-8.

120. Peifer M, Fernandez-Cuesta L, Sos ML, George J, Seidel D, Kasper LH, et al. Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. Nat Genet. 2012;44(10):1104-10.

121. Lackey A, Donington JS. Surgical management of lung cancer. Semin Intervent Radiol. 2013;30(2):133-40.

122. El-Sherif A, Gooding WE, Santos R, Pettiford B, Ferson PF, Fernando HC, et al. Outcomes of sublobar resection versus lobectomy for stage I non-small cell lung cancer: a 13-year analysis. The Annals of thoracic surgery. 2006;82(2):408-15; discussion 15-6.

123. Pass HI, Carbone DP, Johnson DH, Minna JD, Scagliotti GV, Turrisi AT. Principles and Practice of Lung Cancer: the official reference text of the International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC): Lippincott Williams & Wilkins; 2012.

124. McElnay P, Lim E. Adjuvant or neoadjuvant chemotherapy for NSCLC. J Thorac Dis. 2014;6 Suppl 2:S224-7.

125. Felip E, Rosell R, Maestre JA, Rodriguez-Paniagua JM, Moran T, Astudillo J, et al. Preoperative chemotherapy plus surgery versus surgery plus adjuvant chemotherapy versus surgery alone in early-stage non-small-cell lung cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2010;28(19):3138-45.

126. Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology. 2017;28(suppl_4):iv1-iv21.

127. Strauss GM, Herndon JE, 2nd, Maddaus MA, Johnstone DW, Johnson EA, Harpole DH, et al. Adjuvant paclitaxel plus carboplatin compared with observation in stage IB non-small-cell lung cancer: CALGB 9633 with the Cancer and Leukemia Group B, Radiation Therapy Oncology Group, and North Central Cancer Treatment Group Study Groups. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2008;26(31):5043-51.

128. Ball D, Mitchell A, Giroux D, Rami-Porta R, Committee IS, Participating I. Effect of tumor size on prognosis in patients treated with radical radiotherapy or chemoradiotherapy for non-small cell lung cancer. An analysis of the staging project database of the International Association for the Study of Lung Cancer. J Thorac Oncol. 2013;8(3):315-21.

129. Group NM-aC. Preoperative chemotherapy for non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of individual participant data. Lancet. 2014;383(9928):1561-71.

130. Sculier JP, Meert AP. Third-generation chemotherapy agents in the treatment of advanced non-small cell lung cancer: a meta-analysis. J Thorac Oncol. 2008;3(3):320; author reply -2.

131. Georgoulias V, Ardavanis A, Agelidou A, Agelidou M, Chandrinos V, Tsaroucha E, et al. Docetaxel versus docetaxel plus cisplatin as front-line treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer: a randomized, multicenter phase III trial. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2004;22(13):2602-9.

132. D'Addario G, Pintilie M, Leighl NB, Feld R, Cerny T, Shepherd FA. Platinum-based versus non-platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of the published literature. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2005;23(13):2926-36.

133. Georgoulias V, Kouroussis C, Androulakis N, Kakolyris S, Dimopoulos MA, Papadakis E, et al. Front-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer with docetaxel and gemcitabine: a multicenter phase II trial. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 1999;17(3):914-20.

134. Kentepozidis N, Kotsakis A, Soultati A, Agelaki S, Christophylakis C, Agelidou M, et al. Docetaxel plus cisplatin and bevacizumab for untreated patients with advanced/metastatic non-squamous non-small-cell lung cancer: a multicenter phase II study of the Hellenic Oncology Research Group. Cancer Chemother Pharmacol. 2013;71(3):605-12.

135. Pallis AG, Agelidou A, Papakotoulas P, Tsaroucha A, Agelidou M, Agelaki S, et al. A multicenter phase II study of sequential vinorelbine and cisplatin followed by docetaxel and gemcitabine in patients with advanced non-small cell lung cancer. Lung Cancer. 2006;52(2):165-71.

136. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. Nat Rev Cancer. 2007;7(3):169-81.

137. Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, Goddard AD, Heldens SL, Herbst RS, et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2005;23(25):5900-9.

138. Langer CJ. Epidermal growth factor receptor inhibition in mutation-positive non-small-cell lung cancer: is afatinib better or simply newer? Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2013;31(27):3303-6.

139. Bronte G, Rolfo C, Giovannetti E, Cicero G, Pauwels P, Passiglia F, et al. Are erlotinib and gefitinib interchangeable, opposite or complementary for non-small cell lung cancer treatment? Biological, pharmacological and clinical aspects. Crit Rev Oncol Hematol. 2014;89(2):300-13.

140. Dungo RT, Keating GM. Afatinib: first global approval. Drugs. 2013;73(13):1503-15.

141. Hirsch FR, Bunn PA, Jr. EGFR testing in lung cancer is ready for prime time. Lancet Oncol. 2009;10(5):432-3.

142. Zhou C, Yao LD. Strategies to Improve Outcomes of Patients with EGRF-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: Review of the Literature. J Thorac Oncol. 2016;11(2):174-86.

143. Jin Y, Chen M, Yu X. Differences among lesions with exon 19, exon 21 EGFR mutations and wild types in surgically resected non-small cell lung cancer. Sci Rep. 2016;6:31636.

144. Oxnard GR, Lo PC, Nishino M, Dahlberg SE, Lindeman NI, Butaney M, et al. Natural history and molecular characteristics of lung cancers harboring EGFR exon 20 insertions. J Thorac Oncol. 2013;8(2):179-84.

145. Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, Akerley W, Bauman J, Chirieac LR, et al. Non–small cell lung cancer, version 5.2017, NCCN clinical practice guidelines in oncology. Journal of the National Comprehensive Cancer Network. 2017;15(4):504-35.

146. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol. 2012;13(3):239-46.

147. Zimmermann S, Dziadziuszko R, Peters S. Indications and limitations of chemotherapy and targeted agents in non-small cell lung cancer brain metastases. Cancer Treat Rev. 2014;40(6):716-22.

148. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. The New England journal of medicine. 2005;353(2):123-32.

149. Yang JC, Hirsh V, Schuler M, Yamamoto N, O'Byrne KJ, Mok TS, et al. Symptom control and quality of life in LUX-Lung 3: a phase III study of afatinib or cisplatin/pemetrexed in patients with advanced lung adenocarcinoma with EGFR mutations. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2013;31(27):3342-50.

150. Morgillo F, Della Corte CM, Fasano M, Ciardiello F. Mechanisms of resistance to EGFR-targeted drugs: lung cancer. ESMO Open. 2016;1(3):e000060.

151. De Pas T, Toffalorio F, Manzotti M, Fumagalli C, Spitaleri G, Catania C, et al. Activity of epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in patients with non-small cell lung cancer harboring rare epidermal growth factor receptor mutations. J Thorac Oncol. 2011;6(11):1895-901.

152. Costa C, Molina MA, Drozdowskyj A, Gimenez-Capitan A, Bertran-Alamillo J, Karachaliou N, et al. The impact of EGFR T790M mutations and BIM mRNA expression on outcome in patients with EGFR-mutant NSCLC treated with erlotinib or chemotherapy in the randomized phase III EURTAC trial. Clin Cancer Res. 2014;20(7):2001-10.

153. Duan J, Wang Z, Bai H, An T, Zhuo M, Wu M, et al. Epidermal growth factor receptor variant III mutation in Chinese patients with squamous cell cancer of the lung. Thorac Cancer. 2015;6(3):319-26.

154. Faber AC, Corcoran RB, Ebi H, Sequist LV, Waltman BA, Chung E, et al. BIM expression in treatment-naive cancers predicts responsiveness to kinase inhibitors. Cancer Discov. 2011;1(4):352-65.

155. Park KS, Raffeld M, Moon YW, Xi L, Bianco C, Pham T, et al. CRIPTO1 expression in EGFR-mutant NSCLC elicits intrinsic EGFR-inhibitor resistance. The Journal of clinical investigation. 2014;124(7):3003-15.

156. Oxnard GR, Arcila ME, Sima CS, Riely GJ, Chmielecki J, Kris MG, et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation. Clin Cancer Res. 2011;17(6):1616-22.

157. Hata AN, Niederst MJ, Archibald HL, Gomez-Caraballo M, Siddiqui FM, Mulvey HE, et al. Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition. Nature medicine. 2016;22(3):262-9.

158. Niederst MJ, Hu H, Mulvey HE, Lockerman EL, Garcia AR, Piotrowska Z, et al. The Allelic Context of the C797S Mutation Acquired upon Treatment with Third-Generation EGFR Inhibitors Impacts Sensitivity to Subsequent Treatment Strategies. Clin Cancer Res. 2015;21(17):3924-33.

159. Engelman JA, Zejnullahu K, Gale CM, Lifshits E, Gonzales AJ, Shimamura T, et al. PF00299804, an irreversible pan-ERBB inhibitor, is effective in lung cancer models with EGFR and ERBB2 mutations that are resistant to gefitinib. Cancer Res. 2007;67(24):11924-32.

160. Roskoski R, Jr. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. Pharmacol Res. 2014;79:34-74.

161. Mazza V, Cappuzzo F. Treating EGFR mutation resistance in non-small cell lung cancer - role of osimertinib. Appl Clin Genet. 2017;10:49-56.

162. Nurwidya F, Andarini S, Takahashi F, Syahruddin E, Takahashi K. Implications of Insulin-like Growth Factor 1 Receptor Activation in Lung Cancer. Malays J Med Sci. 2016;23(3):9-21.

163. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2009;27(26):4247-53.

164. Sun JM, Lira M, Pandya K, Choi YL, Ahn JS, Mao M, et al. Clinical characteristics associated with ALK rearrangements in never-smokers with pulmonary adenocarcinoma. Lung Cancer. 2014;83(2):259-64.

165. Shackelford RE, Vora M, Mayhall K, Cotelingam J. ALK-rearrangements and testing methods in non-small cell lung cancer: a review. Genes & cancer. 2014;5(1-2):1-14.

166. Gupta SK. Role of Crizotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. South Asian J Cancer. 2014;3(2):138-40.

167. Solomon BJ, Mok T, Kim DW, Wu YL, Nakagawa K, Mekhail T, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. The New England journal of medicine. 2014;371(23):2167-77.

168. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, Crino L, Ahn MJ, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. The New England journal of medicine. 2013;368(25):2385-94.

169. Sullivan I, Planchard D. ALK inhibitors in non-small cell lung cancer: the latest evidence and developments. Ther Adv Med Oncol. 2016;8(1):32-47.

170. Soria JC, Tan DSW, Chiari R, Wu YL, Paz-Ares L, Wolf J, et al. First-line ceritinib versus platinum-based chemotherapy in advanced ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-4): a randomised, open-label, phase 3 study. Lancet. 2017;389(10072):917-29.

171. Gandhi L, Ou SI, Shaw AT, Barlesi F, Dingemans AC, Kim DW, et al. Efficacy of alectinib in central nervous system metastases in crizotinib-resistant ALK-positive non-small-cell lung cancer: Comparison of RECIST 1.1 and RANO-HGG criteria. European journal of cancer. 2017;82:27-33.

172. Rothenstein JM, Chooback N. ALK inhibitors, resistance development, clinical trials. Curr Oncol. 2018;25(Suppl 1):S59-S67.

173. Camidge DR, Kim HR, Ahn MJ, Yang JC, Han JY, Lee JS, et al. Brigatinib versus Crizotinib in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. The New England journal of medicine. 2018;379(21):2027-39.

174. Gainor JF, Dardaei L, Yoda S, Friboulet L, Leshchiner I, Katayama R, et al. Molecular Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer. Cancer Discov. 2016;6(10):1118-33.

175. Katayama R, Shaw AT, Khan TM, Mino-Kenudson M, Solomon BJ, Halmos B, et al. Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers. Sci Transl Med. 2012;4(120):120ra17.

176. Isozaki H, Takigawa N, Kiura K. Mechanisms of Acquired Resistance to ALK Inhibitors and the Rationale for Treating ALK-positive Lung Cancer. Cancers (Basel). 2015;7(2):763-83.

177. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. Oncogene. 2000;19(49):5548-57.

178. Kim HR, Lim SM, Kim HJ, Hwang SK, Park JK, Shin E, et al. The frequency and impact of ROS1 rearrangement on clinical outcomes in never smokers with lung adenocarcinoma. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology. 2013;24(9):2364-70.

179. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. The New England journal of medicine. 2014;371(21):1963-71.

180. Facchinetti F, Loriot Y, Kuo MS, Mahjoubi L, Lacroix L, Planchard D, et al. Crizotinib-Resistant ROS1 Mutations Reveal a Predictive Kinase Inhibitor Sensitivity Model for ROS1- and ALK-Rearranged Lung Cancers. Clin Cancer Res. 2016;22(24):5983-91.

181. Song A, Kim TM, Kim DW, Kim S, Keam B, Lee SH, et al. Molecular Changes Associated with Acquired Resistance to Crizotinib in ROS1-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer. Clin Cancer Res. 2015;21(10):2379-87.

182. Kriegshauser G, Auner V, Zeillinger R. New and potential clinical applications of KRAS as a cancer biomarker. Expert Opin Med Diagn. 2010;4(5):383-95.

183. Mao C, Qiu LX, Liao RY, Du FB, Ding H, Yang WC, et al. KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies. Lung Cancer. 2010;69(3):272-8.

184. Janne PA, Shaw AT, Pereira JR, Jeannin G, Vansteenkiste J, Barrios C, et al. Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. Lancet Oncol. 2013;14(1):38-47.

185. Cui G, Liu D, Li W, Fu X, Liang Y, Li Y, et al. A meta-analysis of the association between BRAF mutation and nonsmall cell lung cancer. Medicine (Baltimore). 2017;96(14):e6552.

186. Schmid T, Buess M. Overcoming resistance in a BRAF V600E-mutant adenocarcinoma of the lung. Curr Oncol. 2018;25(3):e217-e9.

187. Dholaria B, Hammond W, Shreders A, Lou Y. Emerging therapeutic agents for lung cancer. J Hematol Oncol. 2016;9(1):138.

188. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. Nature. 2011;480(7378):480-9.

189. Champiat S, Dercle L, Ammari S, Massard C, Hollebecque A, Postel-Vinay S, et al. Hyperprogressive Disease Is a New Pattern of Progression in Cancer Patients Treated by Anti-PD-1/PD-L1. Clin Cancer Res. 2017;23(8):1920-8.

190. Naylor EC, Desani JK, Chung PK. Targeted Therapy and Immunotherapy for Lung Cancer. Surg Oncol Clin N Am. 2016;25(3):601-9.

191. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. The New England journal of medicine. 2015;373(17):1627-39.

192. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crino L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. The New England journal of medicine. 2015;373(2):123-35.

193. Dang TO, Ogunniyi A, Barbee MS, Drilon A. Pembrolizumab for the treatment of PD-L1 positive advanced or metastatic non-small cell lung cancer. Expert Rev Anticancer Ther. 2016;16(1):13-20.

194. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. The New England journal of medicine. 2015;372(21):2018-28.

195. Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Perez-Gracia JL, Han JY, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. Lancet. 2016;387(10027):1540-50.

196. Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csoszi T, Fulop A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. The New England journal of medicine. 2016;375(19):1823-33.

197. Carbone DP, Reck M, Paz-Ares L, Creelan B, Horn L, Steins M, et al. First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer. The New England journal of medicine. 2017;376(25):2415-26.

198. Roszik J, Haydu LE, Hess KR, Oba J, Joon AY, Siroy AE, et al. Novel algorithmic approach predicts tumor mutation load and correlates with immunotherapy clinical outcomes using a defined gene mutation set. BMC Med. 2016;14(1):168.

199. Gulley JL, Rajan A, Spigel DR, Iannotti N, Chandler J, Wong DJL, et al. Avelumab for patients with previously treated metastatic or recurrent non-small-cell lung cancer (JAVELIN Solid Tumor): dose-expansion cohort of a multicentre, open-label, phase 1b trial. Lancet Oncol. 2017;18(5):599-610.

200. Singh CR, Kathiresan K. Molecular understanding of lung cancers-A review. Asian Pac J Trop Biomed. 2014;4(Suppl 1):S35-41.

201. Laudanski J, Chyczewski L, Niklinska WE, Kretowska M, Furman M, Sawicki B, et al. Expression of bcl-2 protein in non-small cell lung cancer: correlation with clinicopathology and patient survival. Neoplasma. 1999;46(1):25-30.

202. Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD. Lung cancer. 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. Thorax. 2003;58(10):892-900.

203. Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Ghisdal L, Mascaux C, et al. Role of Bcl-2 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. Br J Cancer. 2003;89(1):55-64.

204. Anagnostou VK, Lowery FJ, Zolota V, Tzelepi V, Gopinath A, Liceaga C, et al. High expression of BCL-2 predicts favorable outcome in non-small cell lung cancer patients with non squamous histology. BMC Cancer. 2010;10:186.

205. Borner MM, Brousset P, Pfanner-Meyer B, Bacchi M, Vonlanthen S, Hotz MA, et al. Expression of apoptosis regulatory proteins of the Bcl-2 family and p53 in primary resected non-small-cell lung cancer. Br J Cancer. 1999;79(5-6):952-8.

206. Groeger AM, Esposito V, De Luca A, Cassandro R, Tonini G, Ambrogi V, et al. Prognostic value of immunohistochemical expression of p53, bax, Bcl-2 and Bcl-xL in resected non-small-cell lung cancers. Histopathology. 2004;44(1):54-63.

207. Krug LM, Miller VA, Filippa DA, Venkatraman E, Ng KK, Kris MG. Bcl-2 and bax expression in advanced non-small cell lung cancer: lack of correlation with chemotherapy response or survival in patients treated with docetaxel plus vinorelbine. Lung Cancer. 2003;39(2):139-43.

208. Kumar Biswas S, Huang J, Persaud S, Basu A. Down-regulation of Bcl-2 is associated with cisplatin resistance in human small cell lung cancer H69 cells. Molecular cancer therapeutics. 2004;3(3):327-34.

209. Duffy MJ, Synnott NC, Crown J. Mutant p53 as a target for cancer treatment. European journal of cancer. 2017;83:258-65.

210. Robles AI, Linke SP, Harris CC. The p53 network in lung carcinogenesis. Oncogene. 2002;21(45):6898-907.

211. Mitsudomi T, Hamajima N, Ogawa M, Takahashi T. Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. Clin Cancer Res. 2000;6(10):4055-63.

212. Kandioler D, Stamatis G, Eberhardt W, Kappel S, Zochbauer-Muller S, Kuhrer I, et al. Growing clinical evidence for the interaction of the p53 genotype and response to induction chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. J Thorac Cardiovasc Surg. 2008;135(5):1036-41.

213. Eymin B, Gazzeri S. Role of cell cycle regulators in lung carcinogenesis. Cell Adh Migr. 2010;4(1):114-23.

214. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. Nat Rev Cancer. 2003;3(3):155-68.

215. Shoji T, Tanaka F, Takata T, Yanagihara K, Otake Y, Hanaoka N, et al. Clinical significance of p21 expression in non-small-cell lung cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2002;20(18):3865-71.

216. Zhao YF, Wang CR, Wu YM, Ma SL, Ji Y, Lu YJ. P21 (waf1/cip1) is required for non-small cell lung cancer sensitive to Gefitinib treatment. Biomed Pharmacother. 2011;65(3):151-6.

217. Joerger M, deJong D, Burylo A, Burgers JA, Baas P, Huitema AD, et al. Tubulin, BRCA1, ERCC1, Abraxas, RAP80 mRNA expression, p53/p21 immunohistochemistry and clinical outcome in patients with advanced non small-cell lung cancer receiving first-line platinum-gemcitabine chemotherapy. Lung Cancer. 2011;74(2):310-7.

218. Bonanno L, Favaretto A, Rosell R. Platinum drugs and DNA repair mechanisms in lung cancer. Anticancer Res. 2014;34(1):493-501.

219. Roychoudhury S, Nath S, Song H, Hegde ML, Bellot LJ, Mantha AK, et al. Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease (APE1) Is Acetylated at DNA Damage Sites in Chromatin, and Acetylation Modulates Its DNA Repair Activity. Molecular and cellular biology. 2017;37(6).

220. Doherty R, Madhusudan S. DNA Repair Endonucleases: Physiological Roles and Potential as Drug Targets. J Biomol Screen. 2015;20(7):829-41.

221. Quinn JE, Kennedy RD, Mullan PB, Gilmore PM, Carty M, Johnston PG, et al. BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. Cancer Res. 2003;63(19):6221-8.

222. Taron M, Rosell R, Felip E, Mendez P, Souglakos J, Ronco MS, et al. BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. Hum Mol Genet. 2004;13(20):2443-9.

223. Rosell R, Skrzypski M, Jassem E, Taron M, Bartolucci R, Sanchez JJ, et al. BRCA1: a novel prognostic factor in resected non-small-cell lung cancer. PloS one. 2007;2(11):e1129.

224. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature. 2001;411(6835):366-74.

225. Horwitz SB. Mechanism of action of taxol. Trends Pharmacol Sci. 1992;13(4):134-6.

226. Lih CJ, Wei W, Cohen SN. Txr1: a transcriptional regulator of thrombospondin-1 that modulates cellular sensitivity to taxanes. Genes & development. 2006;20(15):2082-95.

227. van Amerongen R, Berns A. TXR1-mediated thrombospondin repression: a novel mechanism of resistance to taxanes? Genes & development. 2006;20(15):1975-81.

228. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer,

National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. Journal of the National Cancer Institute. 2000;92(3):205-16.

229. Institute NC. Common toxicity criteria. National Cancer Institute Bethesda; 1998.

230. Taylor CR. Quantifiable internal reference standards for immunohistochemistry: the measurement of quantity by weight. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2006;14(3):253-9.

231. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat Protoc. 2008;3(6):1101-8.

232. Papadaki C, Mavroudis D, Trypaki M, Koutsopoulos A, Stathopoulos E, Hatzidaki D, et al. Tumoral expression of TXR1 and TSP1 predicts overall survival of patients with lung adenocarcinoma treated with first-line docetaxel-gemcitabine regimen. Clin Cancer Res. 2009;15(11):3827-33.

233. Peng Y, Li Z, Zhang S, Xiong Y, Cun Y, Qian C, et al. Association of DNA base excision repair genes (OGG1, APE1 and XRCC1) polymorphisms with outcome to platinum-based chemotherapy in advanced nonsmall-cell lung cancer patients. Int J Cancer. 2014;135(11):2687-96.

234. Yuan CL, He F, Ye JZ, Wu HN, Zhang JY, Liu ZH, et al. APE1 overexpression is associated with poor survival in patients with solid tumors: a meta-analysis. Oncotarget. 2017;8(35):59720-8.

235. Li Z, Qing Y, Guan W, Li M, Peng Y, Zhang S, et al. Predictive value of APE1, BRCA1, ERCC1 and TUBB3 expression in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) receiving first-line platinum-paclitaxel chemotherapy. Cancer Chemother Pharmacol. 2014;74(4):777-86.

236. Yaren A, Oztop I, Kargi A, Ulukus C, Onen A, Sanli A, et al. Bax, bcl-2 and c-kit expression in non-small-cell lung cancer and their effects on prognosis. International journal of clinical practice. 2006;60(6):675-82.

237. Xie D, Lan L, Huang K, Chen L, Xu C, Wang R, et al. Association of p53/p21 expression and cigarette smoking with tumor progression and poor prognosis in non-small cell lung cancer patients. Oncol Rep. 2014;32(6):2517-26.

238. Zhang H, Qu X, Ma X, Wang T, Yang Y, Ge Z, et al. TXR1 and TSP1 expression varies by the molecular subtypes of breast cancer patients who received previous docetaxel-based first-line chemotherapy. Exp Biol Med (Maywood). 2016;241(17):1919-23.

239. Liu L, Bai Z, Ma X, Wang T, Yang Y, Zhang Z. Effects of taxol resistance gene 1 expression on the chemosensitivity of SGC-7901 cells to oxaliplatin. Exp Ther Med. 2016;11(3):846-52.

240. Gachechiladze M, Skarda J. The role of BRCA1 in non-small cell lung cancer. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2012;156(3):200-3.

241. Liang JG, Jin ZY, Gao XD, Te MR, Ge LH, Wang CL. Predictive role of RRM1 and BRCA1 mRNA expression on the clinical outcome of advanced non-small cell lung cancer. Genet Mol Res. 2014;13(3):5292-8.

242. Husain A, He G, Venkatraman ES, Spriggs DR. BRCA1 up-regulation is associated with repair-mediated resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II). Cancer Res. 1998;58(6):1120-3.

243. Lafarge S, Sylvain V, Ferrara M, Bignon YJ. Inhibition of BRCA1 leads to increased chemoresistance to microtubule-interfering agents, an effect that involves the JNK pathway. Oncogene. 2001;20(45):6597-606.

244. Quinn JE, James CR, Stewart GE, Mulligan JM, White P, Chang GK, et al. BRCA1 mRNA expression levels predict for overall survival in ovarian cancer after chemotherapy. Clin Cancer Res. 2007;13(24):7413-20.

245. Rosell R, Perez-Roca L, Sanchez JJ, Cobo M, Moran T, Chaib I, et al. Customized treatment in non-small-cell lung cancer based on EGFR mutations and BRCA1 mRNA expression. PloS one. 2009;4(5):e5133.

246. Boukovinas I, Papadaki C, Mendez P, Taron M, Mavroudis D, Koutsopoulos A, et al. Tumor BRCA1, RRM1 and RRM2 mRNA expression levels and clinical response to first-line gemcitabine plus docetaxel in non-small-cell lung cancer patients. PloS one. 2008;3(11):e3695.

247. Bartolucci R, Wei J, Sanchez JJ, Perez-Roca L, Chaib I, Puma F, et al. XPG mRNA expression levels modulate prognosis in resected non-small-cell lung cancer in conjunction with BRCA1 and ERCC1 expression. Clin Lung Cancer. 2009;10(1):47-52.

248. Wang L, Wei J, Qian X, Yin H, Zhao Y, Yu L, et al. ERCC1 and BRCA1 mRNA expression levels in metastatic malignant effusions is associated with chemosensitivity to cisplatin and/or docetaxel. BMC Cancer. 2008;8:97.

249. Kim HT, Lee JE, Shin ES, Yoo YK, Cho JH, Yun MH, et al. Effect of BRCA1 haplotype on survival of non-small-cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2008;26(36):5972-9.

250. Kang CH, Jang BG, Kim DW, Chung DH, Kim YT, Jheon S, et al. The prognostic significance of ERCC1, BRCA1, XRCC1, and betaIII-tubulin expression in patients with non-small cell lung cancer treated by platinum- and taxane-based neoadjuvant chemotherapy and surgical resection. Lung Cancer. 2010;68(3):478-83.

251. Gottesman MM, Ling V. The molecular basis of multidrug resistance in cancer: the early years of P-glycoprotein research. FEBS letters. 2006;580(4):998-1009.

252. Giannakakou P, Gussio R, Nogales E, Downing KH, Zaharevitz D, Bollbuck B, et al. A common pharmacophore for epothilone and taxanes: molecular basis for drug resistance conferred by tubulin mutations in human cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000;97(6):2904-9.

253. Giannakakou P, Poy G, Zhan Z, Knutsen T, Blagosklonny MV, Fojo T. Paclitaxel selects for mutant or pseudo-null p53 in drug resistance associated with tubulin mutations in human cancer. Oncogene. 2000;19(27):3078-85.

254. Giannakakou P, Sackett DL, Kang YK, Zhan Z, Buters JT, Fojo T, et al. Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization. The Journal of biological chemistry. 1997;272(27):17118-25.

255. Kavallaris M, Kuo DY, Burkhart CA, Regl DL, Norris MD, Haber M, et al. Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered

expression of specific beta-tubulin isotypes. The Journal of clinical investigation. 1997;100(5):1282-93.

256. Guerrero D, Guarch R, Ojer A, Casas JM, Ropero S, Mancha A, et al. Hypermethylation of the thrombospondin-1 gene is associated with poor prognosis in penile squamous cell carcinoma. BJU Int. 2008;102(6):747-55.

257. Neal CP, Garcea G, Doucas H, Manson MM, Sutton CD, Dennison AR, et al. Molecular prognostic markers in resectable colorectal liver metastases: a systematic review. European journal of cancer. 2006;42(12):1728-43.

258. Yoo GH, Piechocki MP, Ensley JF, Nguyen T, Oliver J, Meng H, et al. Docetaxel induced gene expression patterns in head and neck squamous cell carcinoma using cDNA microarray and PowerBlot. Clin Cancer Res. 2002;8(12):3910-21.

259. Manna PP, Dimitry J, Oldenborg PA, Frazier WA. CD47 augments Fas/CD95-mediated apoptosis. The Journal of biological chemistry. 2005;280(33):29637-44.

260. Mateo V, Lagneaux L, Bron D, Biron G, Armant M, Delespesse G, et al. CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. Nature medicine. 1999;5(11):1277-84.

261. Shaked Y, Bertolini F, Man S, Rogers MS, Cervi D, Foutz T, et al. Genetic heterogeneity of the vasculogenic phenotype parallels angiogenesis; Implications for cellular surrogate marker analysis of antiangiogenesis. Cancer Cell. 2005;7(1):101-11.

262. Yamaguchi M, Sugio K, Ondo K, Yano T, Sugimachi K. Reduced expression of thrombospondin-1 correlates with a poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. Lung Cancer. 2002;36(2):143-50.

263. Ioachim E, Michael MC, Salmas M, Damala K, Tsanou E, Michael MM, et al. Thrombospondin-1 expression in urothelial carcinoma: prognostic significance and association with p53 alterations, tumour angiogenesis and extracellular matrix components. BMC Cancer. 2006;6:140.

264. Rouanne M, Adam J, Goubar A, Robin A, Ohana C, Louvet E, et al. Osteopontin and thrombospondin-1 play opposite roles in promoting tumor aggressiveness of primary resected non-small cell lung cancer. BMC Cancer. 2016;16:483.

265. Pontikakis S, Papadaki C, Tzardi M, Trypaki M, Sfakianaki M, Koinis F, et al. Predictive value of ATP7b, BRCA1, BRCA2, PARP1, UIMC1 (RAP80), HOXA9, DAXX, TXN (TRX1), THBS1 (TSP1) and PRR13 (TXR1) genes in patients with epithelial ovarian cancer who received platinum-taxane first-line therapy. Pharmacogenomics J. 2017;17(6):506-14.

Παράρτημα Ι (Συντομογραφίες)

3D-CRT	Three Dimensional (3D) Conformal Radiation Therapy (σύμμορφη τρισδιάστατη ακτινοθεραπεία)
6FAM	6-Carboxyfluorescein
AAH	Atypical Adenomatous Hyperplasia (άτυπη αδενωματώδης υπερπλασία)
AD	Adenocarcinoma (αδενοκαρκίνωμα)
AIS	Adenocarcinoma in situ
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
ALT	Alanine Transaminase
ANC	Absolute Neutrophil Count
APAAP	Alkaline Phosphatase anti-Alkaline Phosphatase
APE1	Apurinic – Apirimidinic Endonuclease 1
AST	Aspartate Transaminase
AT	Ataxia Telangiectasia
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosine Triphosphate (τριφωσφορική αδενοσίνη)
ATR	RAD3-related protein
ATS	American Thoracic Society
AZD9291	Osimertinib
BAC	Bronchioloalveolar carcinoma (βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα)
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BER	Base Excision Repair
BIM	Bcl-2-like protein 11
Bp	base pairs (ζεύγη βάσεων)
BRAF	proto-oncogene B-Raf
BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility protein
$C_6H_8O_7$	Κιτρικό οξύ
CD95	Cluster of differentiation 95
CDKI	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor protein
CDKN2A	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
cDNA	complementary DNA
CHK1, 2	Checkpoint 1,2
CI	Conditional Independence
CIS	Carcinoma in situ
CR	Complete Response
CREBBP	cAMP Response Element-Binding Protein
CRIPTO1	Teratocarcinoma-derived growth factor 1
CT	Computed Tomography (αξονική τομογραφία)
Ct	threshold cycle
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

cTNM	Κλινική σταδιοποίηση
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DC	Docetaxel / Cisplatin (δοσεταξέλη / σισπλατίνη)
DG	Docetaxel / Gemcitabine (δοσεταξέλη / γεμσιταμπίνη)
DIPNECH	Diffuse Idiopathic Pulmonary Neuroendocrine Cell Hyperplasia (διάχυτη ιδιοπαθής πνευμονική νευροενδοκρινική κυτταρική υπερπλασία)
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxyribonucleotide triphosphates (τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια)
dsDNA	double strand DNA
DTT	Dithiothreitol
EBUS	Endobronchial Ultrasound (ενδοβρογχικός υπέρηχος)
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF-CFC	Epidermal Growth Factor-CFC
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EML4	Echinoderm Microtubule-associated protein-like 4
EP300	Histone acetyltransferase p300
EPHA3	Ephrin type-A receptor 3
ERCC1	DNA Excision Repair protein ERCC-1
ERS	European Respiratory Society
ESCC	Esophageal Squamous Cell Carcinoma (καρκίνωμα οισοφάγου εκ πλακωδών κυττάρων)
ESMO	European Society of Medical Oncology
ETOH	Ethanol
F-18 FDG	Fludeoxyglucose F 18 Injection
FDA	US Food and Drug Administration
FGFR1,2,3	Fibroblast Growth Factor Receptor 1,2,3
FNA	Fine Needle Aspiration (παρακέντηση με λεπτή βελόνη)
GADD45	Growth Arrest and DNA Damage
H_2O_2	Υπεροξείδιο του υδρογόνου
HCC	Hepatocellular Carcinoma (ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα)
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HR	Hazard Ratio
HRc	Homologous Recombination (ομόλογος ανασυνδυασμός)
HRP	Horseradish Peroxidase
HSPG	Heparan Sulfate Proteoglycan
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
IARC	International Agency for Research on Cancer
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer
IGF-1R	Insulin-like Growth Factor 1 Receptor
IgG1	Immunoglobulin G1 (ανοσοσφαιρίνη G1)

IGRT	Image-guided Radiation Therapy (απεικονιστικά καθοδηγούμενη ακτινοθεραπεία)
IHC	Immunohistochemistry (ανοσοϊστοχημεία)
IMRT-IGRT	Intensity Modulated Radiation Therapy with Image Guidance (ακτινοθεραπεία διαμορφούμενης έντασης καθοδηγούμενη από εικόνες)
KIT	Proto-oncogene c-Kit
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma virus
LCLC	Large-cell Lung Carcinoma (μεγαλοκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα)
LCNEC	Large-cell Neuroendocrine Carcinoma (νευροενδοκρινικό καρκίνωμα εκ μεγάλων κυττάρων)
LKB1	Liver Kinase B1
LOH	Loss of heterozygosity (απώλεια ετεροζυγωτίας)
LPA	Lepidic Predominant Adenocarcinoma
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MDR	Multidrug Resistance protein
MEK	Mitogen-activated protein kinase
MET	Tyrosine-protein kinase Met
MIA	Minimally Invasive Adenocarcinoma (ελάχιστα διηθητικό αδενοκαρκίνωμα)
MLL	Mixed-lineage Leukemia 1
MMR	Mismatch Repair
mOS	Median overal survival (μέση συνολική επιβίωση)
MRI	Magnetic Resonance Imaging (μαγνητική τομογραφία)
mRNA	messenger RNA
MW	Microwave (φούρνος μικροκυμμάτων)
NCI	National Cancer Institute
NER	Nucleotide Excision Repair
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NHEJ	Non Homologous End Joining
NKX 2-1	NK2 homeobox 1 ή TTF-1
NS	Non Significant (μη στατιστικώς σημαντικό)
NSCLC	Non-small Cell Lung Cancer (μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα)
NSCLC–NOS	Non Small Cell Lung Cancer-Not Otherwise specified
NTKR	Neurotrophic tyrosine kinase
OR	Objective Response
ORR	Overall Response Rate
PD	Progressive Disease
PD-1	Programmed cell Death-1 receptor
PD-L1	Programmed Death-Ligand
PET	Positron Emission Tomography (τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων)
PFA	Population Attributable Fraction
PFS	Progression-free survival (ελεύθερο νόσου διάστημα)
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase

PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PR	Partial Response
PS	Performance Status (κλινική κατάσταση)
pTNM	Παθολογοανατομική σταδιοποίηση
PTPRN2	Receptor-type Tyrosine-protein Phosphatase N2
RT-qPCR	quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction
RASGRP3	Ras guanyl-releasing protein 3
RB1	Retinoblastoma protein
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
RET	RET proto-oncogene
rhG-CSF	Granulocyte-colony Stimulating Factor
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive Oxygen Species (ελεύθερες ρίζες οξυγόνου)
ROS1	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS
RR	Response Rate (βαθμός ανταπόκρισης)
RRM1	Ribonucleoside-diphosphate Reductase large subunit
RT	Room Temperature (θερμοκρασία δωματίου)
rTNM	Σταδιοποίηση για την επανέναρξη θεραπείας
RT-PCR	Reverse transcription Polymerase Chain Reaction
SBRT	Stereotactic Body Radiation Therapy (στερεοτακτική ακτινοθεραπεία σώματος)
SCC	Squamous Cell Carcinoma (καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων)
SCLC	Small Cell Lung Cancer (μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα)
SD	Stable Disease
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results Program
SGOT	Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase
SGPT	Serum Glutamate Pyruvate Transaminase
SRC	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
SSBP2	Single-stranded DNA-binding protein 2
ssDNA	single strand DNA
SVCO	Superior Vena Cava Obstruction (σύνδρομο άνω κοίλης φλέβας)
TBNA	Transbronchial Needle Aspiration Technique (διαβρογχική παρακέντηση με βελόνη)
TKI	Tyrosine Kinase Inhibitor (αναστολέας κινάσης τυροσίνης)
TMB	Tumor Mutation Burden (φορτίο μεταλλάξεων του όγκου)
TNF	Tumor necrosis factor (παράγοντας νέκρωσης όγκου)
TSP1	Thrombospondin 1 (θρομβοσπονδίνη 1)
TTF-1	Thyroid Transcription Factor 1
TXR1	Taxane-resistance protein 1
TXR1	Taxol Resistance gene 1
UICC	Union for International Cancer Control
ULN	Upper Limit of Normal

UV	Ultraviolet (υπεριώδης ακτινοβολία)
VATS	Video-assisted Thoracoscopic Surgery (υποβοηθούμενη με βίντεο θωρακοσκοπική χειρουργική)
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
WBC	White Blood Cells (λευκοκύτταρα)
ZEB1	Zinc finger E-box-binding homeobox 1
ΕΕ	Ευρωπαϊκή Ένωση
ΗΠΑ	Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
ΚΠ	Καρκίνος του Πνεύμονα
Π.Ο.Υ.	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

Παράρτημα ΙΙ (Δημοσιεύσεις)

British Journal of Cancer (2011) 104, 316–323
© 2011 Cancer Research UK All rights reserved 0007–0920/11
www.bjcancer.com

Correlation of *BRCA1*, *TXR1* and *TSP1* mRNA expression with treatment outcome to docetaxel-based first-line chemotherapy in patients with advanced/metastatic non-small-cell lung cancer

C Papadaki[1,6], E Tsaroucha[2,6], L Kaklamanis[3], E Lagoudaki[4], M Trypaki[1], K Tryfonidis[1,5], D Mavroudis[1,5], E Stathopoulos[4], V Georgoulias[1,5] and J Souglakos[*,1,5]

[1]Laboratory of Tumor Cell Biology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece; [2]8th Department of Pulmonary Diseases, 'Sotiria' General Hospital, Athens, Greece; [3]Department of Pathology, Onassis Center for Cardiovascular Diseases, Athens, Greece; [4]Department of Pathology, University General Hospital of Heraklion, Crete, Greece; [5]Department of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, Voutes and Stavrakia, PO BOX 1352, Heraklion, Crete, Greece

BACKGROUND: We explored the predictive significance of *BRCA1*, *TXR1* and *TSP1* expression in non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients treated with docetaxel in association with cisplatin or gemcitabine.

METHODS: To analyse *BRCA1*, *TXR1* and *TSP1* mRNA expression from microdissected primary tumours of 131 patients with stage IIIB (wet) and IV NSCLC, RT–qPCR was used.

RESULTS: The mRNA levels of *TXR1/TSP1* were inversely correlated (Spearman's test: −0.37; $P=0.001$). Low *TXR1* mRNA levels were associated with higher response rate (RR; $P=0.018$), longer median progression-free survival (PFS; $P=0.029$) and median overall survival (mOS $P=0.003$), whereas high *TSP1* expression was correlated with higher RR ($P=0.035$), longer PFS ($P<0.001$) and mOS ($P<0.001$). Higher *BRCA1* mRNA expression was associated with higher RR ($P=0.028$) and increased PFS ($P=0.021$), but not mOS ($P=0.4$). Multivariate analysis demonstrated that low *TXR1*/high *TSP1* expression was an independent factor for increased PFS (HR 0.49; 95% CI 0.32–0.76; $P<0.001$) and mOS (HR 0.37; 95% CI 0.2–0.58; $P<0.001$), whereas high *BRCA1* expression was correlated with increased PFS (HR 0.53; 95% CI 0.37–0.78; $P=0.001$).

CONCLUSIONS: These data indicate that *TXR1/TSP1* and *BRCA1* expression could be used for the prediction of taxanes' resistance in the treatment of NSCLC.

British Journal of Cancer (2011) **104,** 316–323. doi:10.1038/sj.bjc.6606027 www.bjcancer.com
Published online 14 December 2010
© 2011 Cancer Research UK

Keywords: *BRCA1*; NSCLC; taxanes; *TSP1*; *TXR1*

Molecular Diagnostics

Non-small-cell lung cancer (NSCLC) is the most common visceral malignancy worldwide for both sexes, accounting for ~1.0 million cancer deaths per year (Jemal *et al*, 2009). Several drugs are used for disease control but the combinations of cisplatin with taxanes, vinorelbine and gemcitabine, have been established as the new standards of care. Treatment of patients with advanced/metastatic NSCLC with regimens combining platinum compounds and taxanes have extended the median survival time to 8–11 months and the 1-year survival rate to 30–40% (Georgoulias *et al*, 2001; Schiller *et al*, 2002).

There is a growing body of evidence regarding the genetic factors that could predict response to chemotherapy in NSCLC. The *BRCA1* has emerged as one of the most appealing genetic markers for the customisation of chemotherapy in NSCLC. It has multiple roles not only in DNA damage repair but also in cell cycle regulation, transcriptional control, ubiquitination and apoptosis (Georgoulias *et al*, 2001; Mullan *et al*, 2001; Kennedy *et al*, 2002), and it may be a regulator of mitotic spindle assembly as it colocalises to the microtubules of the mitotic spindle and to the centromeres (Lotti *et al*, 2002). Decreased *BRCA1* mRNA expression in a breast cancer cell line led to a greater sensitivity to cisplatin and etoposide and to a greater resistance to the microtubule-interfering agents paclitaxel and vincristine (Lafarge *et al*, 2001). Reconstitution of wild-type *BRCA1* into *BRCA1*-negative HCC1937 breast cancer cells resulted in a 20-fold increase in cisplatin resistance and, in contrast, a 1000- to 10 000-fold increase in sensitivity to paclitaxel and vinorelbine (Quinn *et al*, 2003). This differential modulating effect of *BRCA1* mRNA expression was also observed in tumour cells isolated from malignant effusions of NSCLC or gastric cancer patients (Wang *et al*, 2008), as well as in patients with ovarian cancer (Quinn *et al*, 2007), where high *BRCA1* mRNA levels correlated negatively with cisplatin sensitivity and positively with docetaxel sensitivity. The value of the *BRCA1* as a predictive marker for the treatment customisation in NSCLC has, also, been investigated in several retrospective studies (Taron *et al*, 2004; Boukovinas *et al*, 2008) and in one prospective trial (Boukovinas *et al*, 2008; Rosell *et al*, 2009).

*Correspondence: Dr J Souglakos; E-mail: georgsec@med.uoc.gr
[6]These authors contributed equally to this work.
Received 18 August 2010; revised 3 November 2010; accepted 8 November 2010; published online 14 December 2010

Another mechanism of taxane resistance, which has been recently described, suggests that overexpression of a previously unknown gene, the *taxol resistance gene 1* (*TXR1*) or proline rich 13 (*PRR13*), prevents apoptosis in a human prostate cancer cell line (Lih *et al*, 2006). This effect was mediated by the down-regulation of the antiangiogenic and proapoptotic glycoprotein *thrombospondin 1* (*TSP1*). Moreover, the sensitivity of cells in taxanes was increased by either inactivation of *TXR1* using siRNA or by activating signalling through the integrin-associated protein (CD47 receptor) (Lih *et al*, 2006). A retrospective study conducted, from our group in 96 adenocarcinoma NSCLC patients treated with docetaxel–gemcitabine, provided evidence for *in vivo* relevance of this model. Our results confirmed the *in vitro* evidence that overexpression of *TXR1* was significantly correlated with downregulation of *TSP1* expression ($P<0.0001$), and the expression of both genes was significantly correlated with treatment outcome (Papadaki *et al*, 2009).

Based on these data we decided to conduct a retrospective study in order to investigate the predictive significance of *BRCA1* and *TXR1–TSP1* mRNA expression in NSCLC patients treated with docetaxel-based doublets. The main goal of the study was to validate, in an independent patients' cohort, the predictive significance of *TXR1–TSP1* expression in different histologies of NSCLC and across with chemotherapy regimens combining docetaxel with platinum compounds (DC) or gemcitabine (DG).

PATIENTS AND METHODS

Patients

A total of 131 consecutive patients with histologically confirmed stage IIIB (with pleural effusion) and IV NSCLC and available tumour material for molecular analysis, who were treated with docetaxel–gemcitabine or docetaxel–cisplatin regimens as first-line treatment, at the University Hospital of Heraklion (Crete, Greece) between January 2003 and December 2007 were enroled. The above group of patients represents an independent patients' cohort (consecutive patients, not overlapping cases with those of the previous report) and was used as a confirmatory group (patients with different histologies and different taxanes regimens) in order to validate the results reported previously (Boukovinas *et al*, 2008; Papadaki *et al*, 2009). The study has been approved by the institutional ethics committee and all patients gave their informed consent for the use of the tissue material for translational research.

Specimens' characteristics and assay methods

In order to ensure the validity of the specimen and select the most appropriate area for microdissection, all paraffin-embedded tumours were reviewed by two independent pathologists (EL and ES). Serial sections of 5 μm thickness were prepared and then stained with nuclear Fast Red (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Cancer cells were procured using an Eppendorf piezoelectric microdissector (Eppendorf, Hamburg, Germany) (Harsch *et al*, 2001).

The pellet of microdissected cells was subsequently submitted for RNA extraction with Trizol LS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and the SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) was used to prepare cDNA from 50 ng of total RNA for each gene as previously described (Papadaki *et al*, 2009). The quality of the extracted RNA was evaluated with amplification of β-actin before RT–qPCR. Only samples with cycle quantification (Cq) <30 were considered suitable for further analysis based on the validation experiments for the performance of the set of primers and probes (Supplementary Figure 1a and b). The primers and probe sets were designed using Primer Express 2.0 Software (AB, Foster City, CA, USA). All primers and probes sequence were previously reported (Boukovinas *et al*, 2008; Papadaki *et al*, 2009). Relative cDNA quantification for *BRCA1*, *TXR1*, *TSP1* and *β-actin* as an internal reference gene was done using the ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (AB) (Supplementary Figures 2a–d).

Relative gene expression quantification was performed according to the comparative Ct method using β-actin as an endogenous control and commercial RNA controls (mRNA from lung and liver; Stratagene, La Jolla, CA, USA) as calibrators. In addition, RNA extracted from FFPE lung tissue of a normal individual (who was operated after an accident) was used as internal standard during the whole experiment. Final results were determined as follows: $2^{-(\Delta Ct\ \text{sample}-\Delta Ct\ \text{calibrator})}$, where ΔC_T values of the calibrator and sample were determined by subtracting the C_T value of the target gene from the value of the reference gene. In all experiments, only triplicates with s.d. of the Ct value <0.25 were accepted, according to the manufacturer suggestions (AB 7900 and SDS 2.3 User guide; AB). In addition, genomic DNA contamination of each sample has been excluded by non-reverse transcription of RNA.

Study design and statistics

This study was a retrospective analysis aiming to explore the predictive significance of *BRCA1*, *TXR1* and *TSP1* mRNA expression in patients with NSCLC treated with front-line DG or DC regimen, in an independent, confirmatory group of patients. All appropriate specimens of the primary tumour with >100 cells per section were included in the analysis. Objective responses were recorded according to the RECIST criteria (Therasse *et al*, 2000). All efficacy results were assessed on an intention-to-treat basis. Median progression-free survival (PFS) was measured from the date of first-line therapy initiation to the first radiographic documentation of disease progression or death and median overall survival (mOS) was calculated from the date of diagnosis of metastatic disease to death from any cause. Quantitative PCR analyses yielded values that were expressed as ratios between two absolute measurements (gene of interest: internal reference gene). Cutoff points were calculated according to the median value for the mRNA expression of each gene (Rosell *et al*, 2003; Taron *et al*, 2004). Samples with mRNA expression above or equal to the median were considered as samples with high expression, whereas those with value below the median as samples with low expression. All laboratory analyses were performed blinded to the clinical data.

Associations between treatment response and mRNA expression or baseline characteristics were assessed using Fisher's exact test for dichotomous variables or logistic regression for continuous variables. Kaplan–Meier curves were used to describe the proportion of subjects who remained free of events over the follow-up period. Associations between prognostic factors and PFS or OS were examined using Cox proportional hazards regression models; we report hazard ratio (HR) estimates and their 95% confidence intervals (CIs).

Cox regression models with interaction terms were used to assess whether mRNA expression effects varied across treatment subgroups. For each gene mRNA expression, two hypotheses were tested: (1) whether effect on first-line PFS and mOS varied according to regimen (DG or DC); and (2) whether the effect on first-line PFS and mOS varied according to tumour histology (squamous or non-squamous). All reported *P*-values were two sided and not adjusted for multiple testing.

RESULTS

Patients' characteristics

Clinical data and representative samples from the primary tumours were collected from 131 consecutive patients treated with

© 2011 Cancer Research UK

docetaxel-containing doublets in our centre. Successful amplification of both genes was achieved in all 131 specimens. Patient characteristics were all typical for NSCLC and are summarised in Table 1a.

In an intention-to-treat analysis, complete response (CR) was observed in 2 (2%) and partial response (PR) in 38 (28%) patients (overall response rate (RR) 30%; 95% CI 24.3–39.2%). After a median follow-up period of 9.7 months (range 1.3–84.5), the median PFS was 4.2 months (95% CI 2.7–5.7) and the median OS was 11.1 months (95% CI 9.7–14.6).

Table 1a Patients' characteristics

	Patients treated with DG or DC	
	Number	**%**
Gender		
Male	106	88
Female	25	12
Age (years)		
Median	60	
Range	37–78	
Performance status (ECOG)		
0	67	51
1	52	40
2	12	9
Stage		
IIIB (wet)	35	27
IV	96	73
Histology		
Adenocarcinoma	68	52
Squamous	56	43
Other	7	5
Regimen		
Docetaxel cisplatin	64	49
Docetaxel Gemcitabine	67	51
Response rate (CR+PR)	40	30
PFS (months, 95% CI)	4.2 (2.7–5.7)	
Median OS (months, 95% CI)	11.1 (9.7–14.6)	

Abbreviations: CR = complete response; PR = partial response; PFS = progression-free survival; OS = overall survival; CI = confidence interval; ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group; DG = docetaxel and gemcitabine; DC = docetaxel and cisplatin.

Genes' mRNA expression levels and response to treatment

The median mRNA expression levels were 4.28 (range 0.86–42.45) for *BRCA1*, 1.21 (range 0.02–7.8) for *TXR1* and 0.24 (range 0.02–1.87) for *TSP1*. There was no correlation between age, gender, performance status or stage of disease and *BRCA1*, *TXR1* or *TSP1* mRNA levels (all *P*-values >0.05). In comparison with non-squamous tumours (median 3.62; $P=0.001$), *BRCA1* was significantly higher in squamous tumours (median 8.1),whereas *TXR1* and *TSP1* expression was almost identical between the two histology groups (Table 1b) and in the same range with those reported for the previous patients' cohort (Papadaki *et al*, 2009). Furthermore, we observed the same inverse correlation between *TXR1* and *TSP1* mRNA expression (Spearman's test −0.37; $P=0.001$). For the *BRCA1,* as the expression values were significantly higher in squamous cell carcinomas in comparison with the adenocarcinomas ($P=0.001$), the cutoff values were calculated according to median expression levels in each group of squamous and non-squamous histology. Using these cutoff values, low (below the median) tumoural *BRCA1* expression was observed in 28 (50%) squamous and 38 (50%) non-squamous specimens, whereas high (above or equal to the median) in 28 (50%) and 37 (50%) patients with squamous and non-squamous tumours, respectively.

BRCA1, *TXR1*, and *TSP1* expression levels and treatment outcome

Table 2 summarises the treatment outcomes according to *BRCA1*, *TXR1* and *TSP1* mRNA expression. Patients with high *BRCA1* mRNA expression had increased PFS (6.0 *vs* 3.0 months; $P=0.021$; Figure 1A) and RR (42 *vs* 20%; $P=0.028$) in comparison with those with low *BRCA1* mRNA levels. Conversely, there was no difference in terms of OS according to the *BRCA1* mRNA expression (10.5 *vs* 11.2 months; $P=0.4$; Figure 2A). Patients with low *TXR1* expression experienced a longer PFS (5.5 *vs* 3.0 months; $P=0.029$; Figure 1B), OS (19.1 *vs* 10.0 months; $P=0.003$; Figure 2B) and RR (45 *vs* 18%, $P=0.018$) when compared with patients whose tumours had high *TXR1* mRNA expression. In addition, patients with high *TSP1* expression presented longer PFS (6.1 *vs* 2.6 months; $P<0.001$; Figure 1C), OS (25.1 *vs* 8.4 months; $P<0.001$; Figure 2C) and RR (41 *vs* 22%; $P=0.035$) when compared with patients with low *TSP1* mRNA expression.

Table 1b *BRCA1*, *TXR1* and *TSP1* tumoural mRNA expression

	All patients	Squamous	Non-squamous	*P*-value[a]
No. of patients (%)	131 (100)	56 (43)	75 (52)	
BRCA1				
Expression value, median (range)	4.28 (0.86–42.45)	8.1 (1.73–42.45)	3.62 (0.72–39.31)	0.001
High expression	65 (50)	28 (50)	37 (50)	
Low expression	66 (50)	28 (50)	38 (50)	
TXR1				
Expression value, median (range)	1.21 (0.02–7.8)	1.19 (0.02–6.7)	1.21 (0.12–7.8)	0.92
High expression	65 (50)	28(50)	36 (50)	
Low expression	66 (50)	28(50)	38 (50)	
TSP1				
Expression value, median (range)	0.24 (0.02–1.87)	0.23 (0.02–1.54)	0.24 (0.02–1.87)	1.0
High expression	65 (50)	28 (50)	36 (50)	
Low expression	66 (50)	28 (50)	38 (50)	

Abbreviations: *BRCA1* = *breast cancer 1 gene*; *TSP1* = *thrombospondin 1*; *TXR1* = *taxol resistance gene 1*. [a]Mann–Whitney *U*-test, *P*-value.

© 2011 Cancer Research UK

Table 2 Tumoural expression of *BRCA1*, *TXR 1* and *TSP1* mRNA and treatment efficacy

		PFS (months)		OS (months)		RR, *N* (%)		
Genes	**No. of patients**	**Median (95% CI)**	***P*-value[a]**	**Median (95% CI)**	***P*-value[a]**	**CR+PR (%)**	**SD+PD(%)**	***P*-value**
BRCA1 low	66 (50)	3.0 (2.3–3.7)	0.021	10.5 (6.2–14.8)	0.4	20	80	0.028
BRCA1 high	65 (50)	6.0 (3.5–8.5)		11.2 (7.2–15.3)		42	58	
TXR1 low	66 (50)	5.5 (2.1–8.9)	0.029	19.1 (10.4–27.9)	0.003	45	55	0.018
TXR1 high	65 (50)	3.0 (1.8–4.0)		10.0 (7.4–12.7)		18	82	
TSP1 low	66 (50)	2.6 (2.0–3.3)	<0.001	8.4 (5.2–11.6)	<0.001	22	78	0.035
TSP1 high	65 (50)	6.1 (4.4–7.7)		25.1 (11.1–39.2)		41	59	

Abbreviations: *BRCA1* = *breast cancer 1 gene*; CR = complete response; RR = response rate; PR = partial response; PFS = progression-free survival; OS = overall survival; CI = confidence interval; SD = stable disease; PD = progressive disease; *TSP1* = *thrombospondin 1*; *TXR1* = *taxol resistance gene 1*. [a]Log-rank *P*-value.

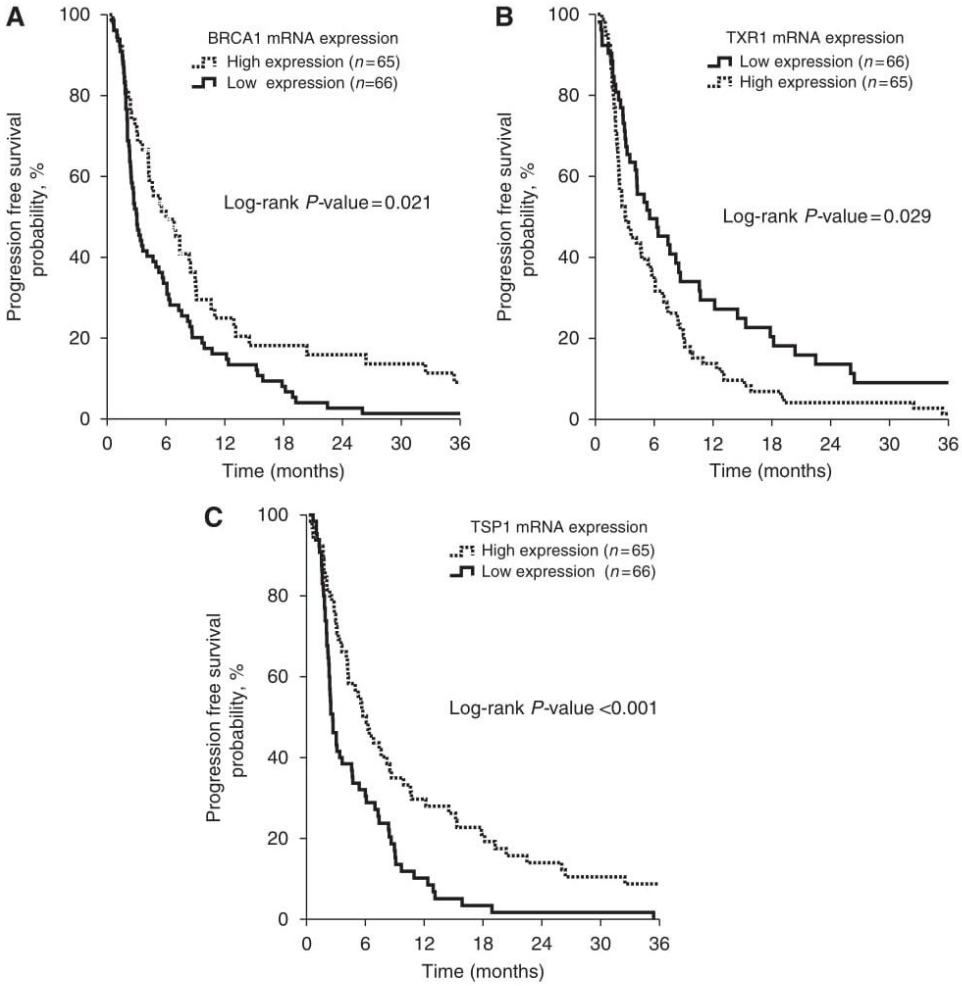


Figure 1 Progression-free survival (PFS) according to *BRCA1* (**A**), *TXR1* (**B**) and *TSP1* (**C**) mRNA expression.

Genes' mRNA expression and treatment outcome according to histological subtype and first-line regimen used

The correlation between high *BRCA1* mRNA expression and increased PFS was significant for both patients with squamous and non-squamous histology (interaction test $P = 0.61$), whereas no significant correlation with mOS was found for either histological subtype (interaction test $P = 0.97$; Table 3A). Similarly, the correlation between high *TXR1* mRNA expression and decreased PFS (interaction test $P = 0.21$) and mOS (interaction test $P = 0.19$) was comparable (Table 3A). Finally, high *TSP1* mRNA expression retained its predictive significance for increased PFS (interaction test $P = 0.34$) and mOS (interaction test $P = 1.0$) among patients with squamous and non-squamous histology (Table 3A).

Likewise, the correlation between high *TXR1* mRNA expression and decreased PFS (interaction test $P = 0.56$) and mOS (interaction test $P = 0.38$) was observed for patients receiving either DG or DC regimens (Table 3B). Moreover, PFS (interaction test $P = 0.48$) and mOS (interaction test $P = 0.93$) were significantly correlated with *TSP1* mRNA expression in either DG or DC treatment regimens (Table 3B). In contrast, high *BRCA1* mRNA expression was

© 2011 Cancer Research UK

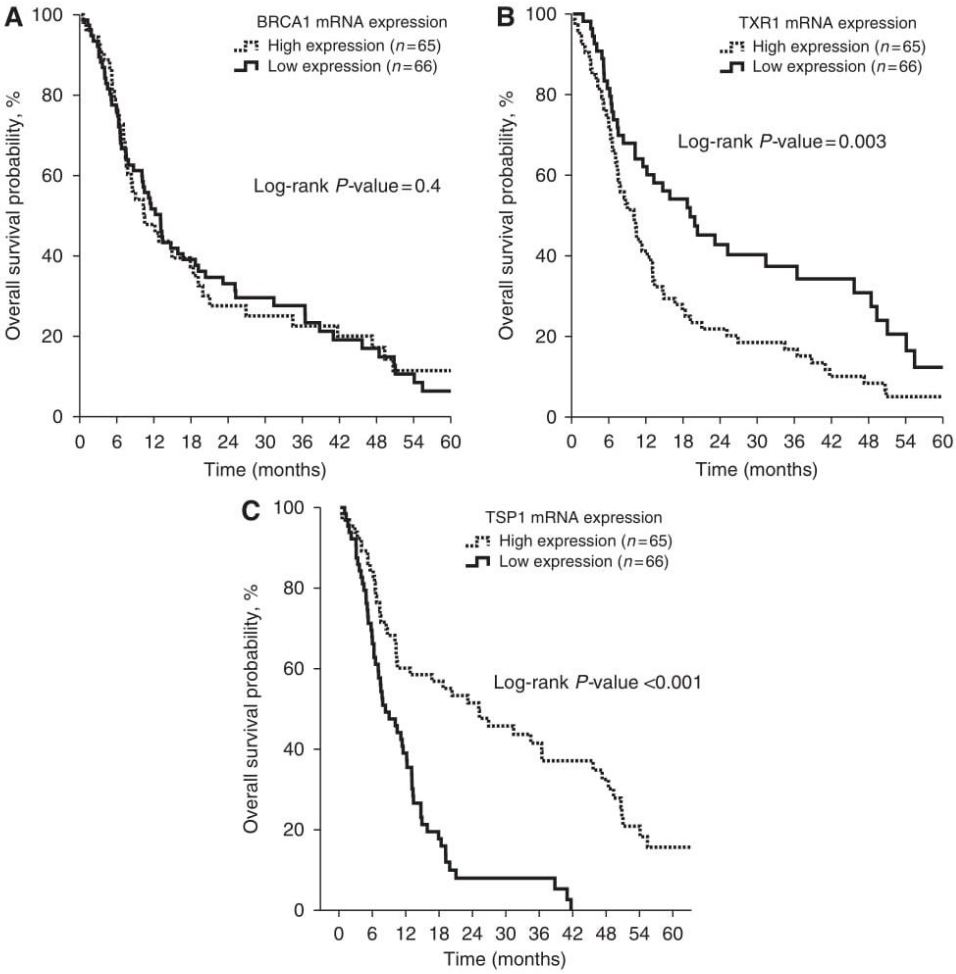


Figure 2 Median OS according to *BRCA1* (**A**), *TXR1* (**B**) and *TSP1* (**C**) mRNA expression.

significantly correlated with increased PFS only in patients treated with DG regimen but not in those treated with DC (interaction test $P=0.006$); on the contrary, no such significant association with mOS was observed in either treatment group (interaction test $P=0.61$; Table 3B). In addition, 42 (63%) patients treated with first-line DG received second-line treatment with a cisplatin-based combination; *BRCA1* mRNA expression was significantly correlated with PFS (5.7 *vs* 2.2 months for patients with low and high mRNA expression; $P=0.01$) in this subgroup of patients.

Univariate and multivariate analyses

Univariate analysis demonstrated that high *TXR1* ($P=0.002$) mRNA expression and stage IV ($P=0.02$) as diagnosis factors were significantly associated with decreased PFS, whereas high *TSP1* ($P<0.001$) and *BRCA1* ($P=0.02$) mRNA expression were associated with increased PFS. In addition, performance status of 2 ($P=0.04$), high *TXR1* ($P=0.003$) and low *TSP1* ($P<0.001$) mRNA expression were significantly associated with decreased OS (Table 4A). Cox proportional hazard analysis revealed that the combined expression of *TXR1* and *TSP1* (low *TXR1*/high *TSP1* expression) (HR 0.49; 95% CI 0.32–0.76; $P<0.001$) and *BRCA1* (HR 0.53; 95% CI 0.37–0.78; $P=0.001$) expression emerged as independent factors associated with increased PFS (Table 4B). Moreover, performance status (2 *vs* 0–1; HR 1.92; 95% CI 1.02–3.60; $P=0.04$) and *TXR1* and *TSP1* (low *TXR1*/high *TSP1* expression; HR 0.37; 95% CI 0.23–0.58; $P<0.001$) were independent prognostic factors for OS (Table 4b).

DISCUSSION

Downregulation of *TSP1* through *TXR1* overexpression has been proposed as a novel mechanism that modulates the cellular cytotoxicity of taxanes *in vitro* (Lih *et al*, 2006); indeed, in a previous report we have confirmed the clinical relevance of this mechanism in a group of patients with lung adenocarcinomas treated with a chemotherapy regimen combining docetaxel and gemcitabine (Papadaki *et al*, 2009). In this we evaluated the predictive significance of TXR1 overexpression/*TSP1* downregulation, together with *BRCA1* mRNA expression, in samples from patients with all histologies of NSCLC treated with either docetaxel/gemcitabine or docetaxel/cisplatin combinations.

We observed that the median expression values of *TXR1* and *TSP1* were almost identical between squamous and non-squamous carcinomas (P-value $=0.92$ and 1.0, respectively) and we confirmed that overexpression of *TXR1* was significantly correlated with downregulation of *TSP1* expression ($P=0.001$). In addition, multivariate analysis revealed that the favourable genotype (low *TXR1*/high *TSP1* expression) was an independent prognostic factor for increased PFS and survival, and was associated with a 51 and 63% reduction of the risk for progression or death, respectively. It is interesting to note that the predictive value of *TXR1* and *TSP1* expression for PFS and median OS was retained irrespectively of the tumour histology. All these results are in agreement with the published *in vitro* and *in vivo* data regarding the role of *TXR1*–*TSP1* expression in taxanes' resistance (Lih *et al*, 2006; Papadaki *et al*, 2009).

 © 2011 Cancer Research UK

Table 3 Correlation of tumoural expression of *BRCA1*, *TXR1* and *TSP1* mRNA and treatment efficacy (a) in different histological subtypes and (b) across taxane-based regimens

	Genes	No. of patients	PFS (months) Median (95% CI)	PFS (months) Log-rank *P*-value	PFS (months) Interaction *P*-value	OS (months) Median (95% CI)	OS (months) Log-rank *P* -value	OS (months) Interaction *P*-value
(A)								
Histology								
Squamous	*BRCA1* low	28 (50)	4.0 (1.5–7.6)	0.047	0.61	11.3 (5.5–17.2)	0.99	0.97
	BRCA1 high	28 (50)	7.4 (4.7–10.1)			9.8 (4.8–17.0)		
Non-squamous	*BRCA1* low	38 (51)	3.8 (2.1–5.5)	0.041		11.2 (8.3–16.1)	0.91	
	BRCA1 high	37 (49)	7.2 (4.3–9.1)			11.1 (8.8–15.6)		
Squamous	*TXR1* low	28 (50)	7.1 (3.4–9.7)	0.038	0.21	16.4 (10.9–19.5)	0.022	0.19
	TXR1 high	28 (50)	4.2 (1.6–7.8)			8.3 (2.6–12.1)		
Non-squamous	*TXR1* low	38 (51)	6.4 (3.8–9.6)	0.027		23.2 (10.2–38.1)	0.007	
	TXR1 high	37 (49)	3.3 (1.9–3.6)			8.7 (5.2–12.3)		
Squamous	*TSP1* low	28 (50)	3.6 (1.4–7.3)	0.019	0.34	9.0 (4.6–13.5)	0.001	1.0
	TSP1 high	28 (50)	6.1 (3.8–10.6)			25.2 (10.2–47.8)		
Non-squamous	*TSP1* low	38 (51)	2.3 (2.1–2.5)	0.001		7.9 (3.0–12.7)	0.001	
	TSP1 high	37 (49)	6.3 (3.2–10.3)			23.2 (10.4–41.8)		
(B)								
Regimen								
Docetaxel–gemcitabine	*BRCA1* low	34 (51)	3.5 (2.1–4.8)	0.013	0.006	11.1 (6.8–15.5)	0.458	0.613
	BRCA1 high	33 (49)	6.2 (4.1–8.5)			10.2 (3.9–17.6)		
Docitaxel–cisplatin	*BRCA1* low	32 (50)	6.8 (3.7–10.0)	0.874		11.2 (8.3–16.1)	0.912	
	BRCA1 high	32 (50)	6.1 (4.5–7.7)			11.1 (8.8–15.6)		
Docetaxel–gemcitabine	*TXR1* low	34 (51)	7.2 (4.9–9.7)	0.024	0.56	15.8 (8.2–25.9)	0.013	0.387
	TXR1 high	33 (49)	3.3 (2.1–4.4)			8.5 (4.1–12.8)		
Docitaxel–cisplatin	*TXR1* low	32 (50)	7.4 (4.2–10.3)	0.032		23.2 (10.2–38.1)	0.007	
	TXR1 high	32 (50)	3.7 (1.4–5.2)			8.7 (3.9–12.3)		
Docetaxel–gemcitabine	*TSP1* low	34 (51)	3.4 (2.1–4.8)	0.007	0.48	7.5 (5.4–11.4)	0.006	0.931
	TSP1 high	33 (49)	6.8(4.6–9.7)			26.7 (10.9–43.6)		
Docitaxel–cisplatin	*TSP1* low	32 (50)	4.4 (1.6–8.1)	0.002		9.1 (5.4–12.7)	0.002	
	TSP1 high	32 (50)	7.6 (4.3–12.8)			36.4 (16.7–50.1)		

Abbreviations: *BRCA1* = *breast cancer 1 gene*; PFS = progression-free survival; OS = overall survival; CI = confidence interval; *TSP1* = *thrombospondin 1*; *TXR1* = *taxol resistance gene 1*.

Table 4A Univariate analysis for PFS and OS

	HR	95% CI	*P*-value
PFS			
BRCA1 expression (high *vs* low)	**0.65**	**0.45–0.94**	**0.02**
TXR1 expression (high *vs* low)	**1.61**	**1.17–2.43**	**0.002**
TSP1 expression (high *vs* low)	**0.49**	**0.34–0.72**	**<0.001**
TXR1–TSP1 expression (*TXR1* low/*TSP1* high *vs* others)	**0.60**	**0.39–0.90**	**0.01**
PS (2 *vs* 0–1)	1.66	0.89–3.10	0.13
Age (>70 years *vs* ⩽70 years)	1.17	0.77–1.84	0.48
Gender (male *vs* female)	1.30	0.72–2.33	0.38
Stage (IV *vs* IIIβ)	**1.90**	**1.15–2.58**	**0.02**
OS			
BRCA1 expression (high *vs* low)	1.02	0.69–1.50	0.93
TXR1 expression (high *vs* low)	**1.83**	**1.23–2.73**	**0.003**
TSP1 expression (high *vs* low)	**0.34**	**0.22–0.53**	**<0.001**
TXR1–TSP1 expression (*TXR1* low/*TSP1* high *vs* others)	**0.38**	**0.24–0.62**	**<0.001**
PS (2 *vs* 0–1)	**1.92**	**1.02–3.58**	**0.04**
Age (>70 years *vs* ⩽70 years)	1.27	0.79–2.04	0.33
Gender (male *vs* female)	1.57	0.77–3.59	0.18
Stage (IV *vs* IIIβ)	**1.73**	**1.03–2.24**	**0.04**

Abbreviations: *BRCA1* = *breast cancer 1 gene*; PFS = progression-free survival; PS = performance status; OS = overall survival; CI = confidence interval; HR = hazard ratio; *TSP1* = *thrombospondin 1*; *TXR1* = *taxol resistance gene 1*. Values shown in bold are statistically significant.

Table 4B Multivariate analysis for time to tumour progression and OS

	HR	95% CI	*P*-value
PFS			
Stage (IV *vs* IIIβ)	1.41	0.94–1.66	0.09
BRCA1 expression (high *vs* low)	**0.53**	**0.37–0.78**	**0.001**
TXR1–TSP1 expression (*TXR1* low/*TSP1* high *vs* others)	**0.49**	**0.32–0.76**	**<0.001**
OS			
Stage (IV *vs* IIIβ)	1.42	0.92–2.74	0.2
TXR1–TSP1 expression (*TXR1* low/*TSP1* high *vs* others)	**0.37**	**0.23–0.58**	**<0.001**
PS (0–1 *vs* 2)	**1.92**	**1.02–3.60**	**0.04**

Abbreviations: *BRCA1* = *breast cancer 1 gene*; PFS = progression-free survival; PS = performance status; OS = overall survival; CI = confidence interval; HR = hazard ratio; *TSP1* = *thrombospondin 1*; *TXR1* = *taxol resistance gene 1*. Values shown in bold are statistically significant.

In contrast, median *BRCA1* expression was significantly different in squamous and non-squamous tumours ($P = 0.001$), as has been previously reported (Rosell *et al*, 2007). Overexpression of *BRCA1* was significantly correlated with higher RR and PFS but not with mOS. The predictive value of *BRCA1* in PFS remained significant in both squamous and non-squamous groups (interaction test $P = 0.61$). On the contrary, overexpression of *BRCA1* was significantly correlated with increased PFS in patients treated with DG but not in those treated with DC regimen (interaction test $P = 0.006$). These results are in agreement with the current evidence for the differential predictive value of *BRCA1*, as low *BRCA1* expression confers increased sensitivity to cisplatin (Husain *et al*, 1998; Lafarge *et al*, 2001; Quinn *et al*, 2003, 2007) and resistance to antimicrotubule drugs such as docetaxel (Quinn

© 2011 Cancer Research UK

et al, 2007), whereas high BRCA1 expression leads to resistance to cisplatin (Husain *et al*, 1998; Lafarge *et al*, 2001; Taron *et al*, 2004; Rosell *et al*, 2009) and sensitivity to docetaxel (Quinn *et al*, 2007; Boukovinas *et al*, 2008; Rosell *et al*, 2009). In addition, *BRCA1* overexpression is significantly correlated with those of *ERCC1* and *RRM1* in several studies (Rosell *et al*, 2007; Boukovinas *et al*, 2008; Wang *et al*, 2008; Bartolucci *et al*, 2009), providing another explanation for the lack of association of BRCA1 with OS.

High *BRCA1* mRNA expression has been associated with increased risk of relapse in patients with early (stage IB–IIB) NSCLC (Bartolucci *et al*, 2009), whereas BRCA1 haplotype could predict the outcome of NSCLC cancer patients treated with platinum-based chemotherapy, especially of those with squamous cell histology (Kim *et al*, 2008); these findings could explain the lack of significant association between BRCA1 expression and efficacy of the DC regimen observed in this study. Similarly, BRCA1 protein expression was not a predictive factor for response to treatment in patient with operable NSCLC treated with DC in the neoadjuvant setting (Kang *et al*, 2010). Finally, the poor correlation of *BRCA1* with OS, especially in patients treated with DG, could be partially explained by the fact that second-line cisplatin chemotherapy is more effective in patients with low BRCA1 expression as has been previously reported (Boukovinas *et al*, 2008), as was the case in the present study.

The effect of *TXR1–TSP1* mRNA expression on taxanes' cytotoxicity is independent of MDR phenotype (the ability of tumour cells to efflux taxanes through the upregulation of the ATP-dependent cell membrane glycoproteins) (Gottesman and Ling, 2006), as the overexpression of *TXR1* did not affect the cellular accumulation of [^{3}H]-labelled-paclitaxel in the resistant cells and did not reduce the sensitivity to other agents that are also expelled from tumour cells by the MDR (Lih *et al*, 2006). Also, it seems to be independent from tubulin formation (the mutations of the *β-tubulin* gene that may interfere with the taxane-binding sites to microtubules) (Giannakakou *et al*, 1997, 2000a, b; Kavallaris *et al*, 1997), as quantitative biochemical analysis of cell lines resistant to taxanes has shown the same tubulin dynamics as that of the parental (sensitive) cells and no increase in microtubules' isoforms that are commonly upregulated in tubulin-related resistance to taxanes (Gottesman and Ling, 2006; Lih *et al*, 2006).

Owing to the lack of a non-taxane-treated control group in our study, we cannot confirm that the effect of *TSP1* expression was taxane specific and not a simple predictive marker for response to chemotherapy. In many human cancers, *TSP1* expression is inversely correlated with progression, and it was also found to be an independent prognostic indicator (Neal *et al*, 2006; Guerrero *et al*, 2008). However, using cDNA microarrays, it has been previously shown that the induction of *TSP1* in docetaxel-treated head and neck squamous cell carcinoma cell lines increased cytotoxicity (Yoo *et al*, 2002). The TSP1 is considered a proapoptotic protein through the activation of CD47 cell surface receptor (Lih *et al*, 2006), which has previously been shown to result in not only caspase-independent (Mateo *et al*, 1999) but also caspase-dependent apoptosis (Manna *et al*, 2005). In addition, TSP1 is a strong inhibitor of angiogenesis and decreased levels of circulating TSP1 in certain inbred mouse strains are correlated with increased circulating endothelial precursors and susceptibility to cancers (Shaked *et al*, 2005). In NSCLC, reduced protein expression of TSP1 has been associated with increased microvessels count and unfavourable prognosis (Yamaguchi *et al*, 2002). On the other hand, overexpression of TSP1 has also been associated with aggressiveness and increased angiogenesis in lung cancer (Ioachim *et al*, 2006).

Despite the fact that the results of this study should be interpreted with caution because of the retrospective nature of the study, it seems that the *TXR1–TSP1* mRNA expression could be used as predictive markers for patients with NSCLC treated with docetaxel-based chemotherapy. The next step should be the evaluation of the significance of *TXR1/TSP1* expression in taxanes' chemosensitivity in other tumour types such as breast and ovarian cancer, where taxanes are commonly used in the daily clinical practice. If this will be the case, the clinical relevance of the *TXR1/TSP1* expression should be further validated in prospective adequately designed clinical trials.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was partially supported by grants from the Cretan Association for Biomedical Research (CABR), Pfizer Hellas and Janssen-Cilag Hellas.

Supplementary Information accompanies the paper on British Journal of Cancer website (http://www.nature.com/bjc)

REFERENCES

Bartolucci R, Wei J, Sanchez JJ, Perez-Roca L, Chaib I, Puma F, Farabi R, Mendez P, Roila F, Okamoto T, Taron M, Rosell R (2009) XPG mRNA expression levels modulate prognosis in resected non-small-cell lung cancer in conjunction with BRCA1 and ERCC1 expression. *Clin Lung Cancer* **10:** 47–52

Boukovinas I, Papadaki C, Mendez P, Taron M, Mavroudis D, Koutsopoulos A, Sanchez-Ronco M, Sanchez JJ, Trypaki M, Staphopoulos E, Georgoulias V, Rosell R, Souglakos J (2008) Tumor BRCA1, RRM1 and RRM2 mRNA expression levels and clinical response to first-line gemcitabine plus docetaxel in non-small-cell lung cancer patients. *PLoS One* **3:** e3695

Georgoulias V, Papadakis E, Alexopoulos A, Tsiafaki X, Rapti A, Veslemes M, Palamidas P, Vlachonikolis I (2001) Platinum-based and non-platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a randomised multicentre trial. *Lancet* **357:** 1478–1484

Giannakakou P, Gussio R, Nogales E, Downing KH, Zaharevitz D, Bollbuck B, Poy G, Sackett D, Nicolaou KC, Fojo T (2000a) A common pharmacophore for epothilone and taxanes: molecular basis for drug resistance conferred by tubulin mutations in human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **97:** 2904–2909

Giannakakou P, Poy G, Zhan Z, Knutsen T, Blagosklonny MV, Fojo T (2000b) Paclitaxel selects for mutant or pseudo-null p53 in drug resistance associated with tubulin mutations in human cancer. *Oncogene* **19:** 3078–3085

Giannakakou P, Sackett DL, Kang YK, Zhan Z, Buters JT, Fojo T, Poruchynsky MS (1997) Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization. *J Biol Chem* **272:** 17118–17125

Gottesman MM, Ling V (2006) The molecular basis of multidrug resistance in cancer: the early years of P-glycoprotein research. *FEBS Lett* **580:** 998–1009

Guerrero D, Guarch R, Ojer A, Casas JM, Ropero S, Mancha A, Pesce C, Lloveras B, Garcia-Bragado F, Puras A (2008) Hypermethylation of the thrombospondin-1 gene is associated with poor prognosis in penile squamous cell carcinoma. *BJU Int* **102:** 747–755

Harsch M, Bendrat K, Hofmeier G, Branscheid D, Niendorf A (2001) A new method for histological microdissection utilizing an ultrasonically oscillating needle: demonstrated by differential mRNA expression in human lung carcinoma tissue. *Am J Pathol* **158:** 1985–1990

Husain A, He G, Venkatraman ES, Spriggs DR (1998) BRCA1 up-regulation is associated with repair-mediated resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res* **58:** 1120–1123

Ioachim E, Michael MC, Salmas M, Damala K, Tsanou E, Michael MM, Malamou-Mitsi V, Stavropoulos NE (2006) Thrombospondin-1 expression in urothelial carcinoma: prognostic significance and association with p53 alterations, tumour angiogenesis and extracellular matrix components. *BMC Cancer* **6:** 140

© 2011 Cancer Research UK

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ (2009) Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* **59:** 225–249

Kang CH, Jang BG, Kim DW, Chung DH, Kim YT, Jheon S, Sung SW, Kim JH (2010) The prognostic significance of ERCC1, BRCA1, XRCC1, and [beta]III-tubulin expression in patients with non-small cell lung cancer treated by platinum- and taxane-based neoadjuvant chemotherapy and surgical resection. *Lung Cancer* **68:** 478–483

Kavallaris M, Kuo DY, Burkhart CA, Regl DL, Norris MD, Haber M, Horwitz SB (1997) Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes. *J Clin Invest* **100:** 1282–1293

Kennedy RD, Quinn JE, Johnston PG, Harkin DP (2002) BRCA1: mechanisms of inactivation and implications for management of patients. *Lancet* **360:** 1007–1014

Kim HT, Lee JE, Shin ES, Yoo YK, Cho JH, Yun MH, Kim YH, Kim SK, Kim HJ, Jang TW, Kwak SM, Kim CS, Ryu JS (2008) Effect of BRCA1 haplotype on survival of non-small-cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *J Clin Oncol* **26:** 5972–5979

Lafarge S, Sylvain V, Ferrara M, Bignon YJ (2001) Inhibition of BRCA1 leads to increased chemoresistance to microtubule-interfering agents, an effect that involves the JNK pathway. *Oncogene* **20:** 6597–6606

Lih CJ, Wei W, Cohen SN (2006) Txr1: a transcriptional regulator of thrombospondin-1 that modulates cellular sensitivity to taxanes. *Genes Dev* **20:** 2082–2095

Lotti LV, Ottini L, D'Amico C, Gradini R, Cama A, Belleudi F, Frati L, Torrisi MR, Mariani-Costantini R (2002) Subcellular localization of the BRCA1 gene product in mitotic cells. *Genes Chromosomes Cancer* **35:** 193–203

Manna PP, Dimitry J, Oldenborg PA, Frazier WA (2005) CD47 augments Fas/CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **280:** 29637–29644

Mateo V, Lagneaux L, Bron D, Biron G, Armant M, Delespesse G, Sarfati M (1999) CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med* **5:** 1277–1284

Mullan PB, McWilliams S, Quinn J, Andrews H, Gilmore P, McCabe N, McKenna S, Harkin DP (2001) Uncovering BRCA1-regulated signalling pathways by microarray-based expression profiling. *Biochem Soc Trans* **29:** 678–683

Neal CP, Garcea G, Doucas H, Manson MM, Sutton CD, Dennison AR, Berry DP (2006) Molecular prognostic markers in resectable colorectal liver metastases: a systematic review. *Eur J Cancer* **42:** 1728–1743

Papadaki C, Mavroudis D, Trypaki M, Koutsopoulos A, Stathopoulos E, Hatzidaki D, Tsakalaki E, Georgoulias V, Souglakos J (2009) Tumoral expression of TXR1 and TSP1 predicts overall survival of patients with lung adenocarcinoma treated with first-line docetaxel-gemcitabine regimen. *Clin Cancer Res* **15:** 3827–3833

Quinn JE, James CR, Stewart GE, Mulligan JM, White P, Chang GK, Mullan PB, Johnston PG, Wilson RH, Harkin DP (2007) BRCA1 mRNA expression levels predict for overall survival in ovarian cancer after chemotherapy. *Clin Cancer Res* **13:** 7413–7420

Quinn JE, Kennedy RD, Mullan PB, Gilmore PM, Carty M, Johnston PG, Harkin DP (2003) BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* **63:** 6221–6228

Rosell R, Perez-Roca L, Sanchez JJ, Cobo M, Moran T, Chaib I, Provencio M, Domine M, Sala MA, Jimenez U, Diz P, Barneto I, Macias JA, de Las PR, Catot S, Isla D, Sanchez JM, Ibeas R, Lopez-Vivanco G, Oramas J, Mendez P, Reguart N, Blanco R, Taron M (2009) Customized treatment in non-small-cell lung cancer based on EGFR mutations and BRCA1 mRNA expression. *PLoS One* **4:** e5133

Rosell R, Scagliotti G, Danenberg KD, Lord RV, Bepler G, Novello S, Cooc J, Crino L, Sanchez JJ, Taron M, Boni C, De MF, Tonato M, Marangolo M, Gozzelino F, Di CF, Rinaldi M, Salonga D, Stephens C (2003) Transcripts in pretreatment biopsies from a three-arm randomized trial in metastatic non-small-cell lung cancer. *Oncogene* **22:** 3548–3553

Rosell R, Skrzypski M, Jassem E, Taron M, Bartolucci R, Sanchez JJ, Mendez P, Chaib I, Perez-Roca L, Szymanowska A, Rzyman W, Puma F, Kobierska-Gulida G, Farabi R, Jassem J (2007) BRCA1: a novel prognostic factor in resected non-small-cell lung cancer. *PLoS One* **2:** e1129

Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, Zhu J, Johnson DH (2002) Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **346:** 92–98

Shaked Y, Bertolini F, Man S, Rogers MS, Cervi D, Foutz T, Rawn K, Voskas D, Dumont DJ, Ben-David Y, Lawler J, Henkin J, Huber J, Hicklin DJ, D'Amato RJ, Kerbel RS (2005) Genetic heterogeneity of the vasculogenic phenotype parallels angiogenesis; Implications for cellular surrogate marker analysis of antiangiogenesis. *Cancer Cell* **7:** 101–111

Taron M, Rosell R, Felip E, Mendez P, Souglakos J, Ronco MS, Queralt C, Majo J, Sanchez JM, Sanchez JJ, Maestre J (2004) BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Hum Mol Genet* **13:** 2443–2449

Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van GM, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG (2000) New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* **92:** 205–216

Wang L, Wei J, Qian X, Yin H, Zhao Y, Yu L, Wang T, Liu B (2008) ERCC1 and BRCA1 mRNA expression levels in metastatic malignant effusions is associated with chemosensitivity to cisplatin and/or docetaxel. *BMC Cancer* **8:** 97

Yamaguchi M, Sugio K, Ondo K, Yano T, Sugimachi K (2002) Reduced expression of thrombospondin-1 correlates with a poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **36:** 143–150

Yoo GH, Piechocki MP, Ensley JF, Nguyen T, Oliver J, Meng H, Kewson D, Shibuya TY, Lonardo F, Tainsky MA (2002) Docetaxel induced gene expression patterns in head and neck squamous cell carcinoma using cDNA microarray and PowerBlot. *Clin Cancer Res* **8:** 3910–3921

© 2011 Cancer Research UK

DE GRUYTER Clin Chem Lab Med 2016; aop

Ioanna Balgkouranidou, Maria Chimonidou, Georgia Milaki, Emily Tsaroucha, Stylianos Kakolyris, Vasilis Georgoulias and Evi Lianidou*

SOX17 promoter methylation in plasma circulating tumor DNA of patients with non-small cell lung cancer

DOI 10.1515/cclm-2015-0776
Received August 10, 2015; accepted November 1, 2015

Abstract

Background: SOX17 belongs to the high-mobility group-box transcription factor superfamily and down-regulates the Wnt pathway. The aim of our study was to evaluate the prognostic significance of *SOX17* promoter methylation in circulating tumor DNA (ctDNA) in plasma of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients.

Methods: We examined the methylation status of *SOX17* promoter in 57 operable NSCLC primary tumors and paired adjacent non-cancerous tissues and in ctDNA isolated from 48 corresponding plasma samples as well as in plasma from 74 patients with advanced NSCLC and 49 healthy individuals. *SOX17* promoter methylation was examined by Methylation Specific PCR (MSP).

Results: In operable NSCLC, *SOX17* promoter was fully methylated in primary tumors (57/57, 100%), and in corresponding ctDNA (27/48, 56.2%) while it was detected in only 1/49 (2.0%) healthy individuals. In advanced NSCLC, *SOX17* promoter was methylated in ctDNA in 27/74 (36.4%) patients and OS was significantly different in favor of patients with non-methylated *SOX17* promoter (p=0.012). Multivariate analysis revealed that *SOX17* promoter methylation in ctDNA was an independent prognostic factor associated with OS in patients with advanced but not operable NSCLC.

Conclusions: Our results show that *SOX17* promoter is highly methylated in primary tumors and in corresponding plasma samples both in operable and advanced NSCLC. In the advanced setting, *SOX17* promoter methylation in plasma ctDNA has a statistical significant influence on NSCLC patient's survival time. Detection of *SOX17* promoter methylation in plasma provides prognostic information and merits to be further evaluated as a circulating tumor biomarker in patients with operable and advanced NSCLC.

Keywords: cell free DNA; circulating tumor DNA; DNA methylation; methylation specific PCR; non-small cell lung cancer; prognostic significance; *SOX17*.

***Corresponding author: Prof. Evi Lianidou,** Analysis of Circulating Tumor Cells Lab, Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Athens, 15771, Greece, Phone: +30 210 7274319, Fax: +30 210 7274750, E-mail: lianidou@chem.uoa.gr
Ioanna Balgkouranidou: Analysis of Circulating Tumor Cells Lab, Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Athens, Greece; and Department of Medical Oncology, Medical School, Democritus University of Thrace, Alexandroupolis, Greece
Maria Chimonidou: Analysis of Circulating Tumor Cells Lab, Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Athens, Greece
Georgia Milaki and Vasilis Georgoulias: Department of Medical Oncology, University Hospital of Heraklion, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece
Emily Tsaroucha: 8th Department of Pulmonary Diseases, "Sotiria" General Hospital for Chest Diseases, Athens, Greece
Stylianos Kakolyris: Department of Medical Oncology, Medical School, Democritus University of Thrace, Alexandroupolis, Greece

Introduction

Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths world-wide and despite advantages in the prevention, detection and treatment, the overall 5-year survival rate remains approximately 15% [1, 2]. The TNM staging system for lung cancer is often unable to accurately determine the prognosis for each patient, so the discovery of novel tumor prognostic biomarkers is of major importance since recurrence is not uncommon even in surgically resected early-stage disease [3, 4].

Genetic and epigenetic changes represent the main pathways resulting to non-small cell lung cancer (NSCLC) tumorigenesis. Deeper understanding of NSCLC biology has led to the development of molecules that target genetic mutations. EGFR and KRAS mutations as well as ALK-EML4 rearrangements are mutually exclusive in patients with NSCLC, and their presence can influence

Brought to you by | Universiteit Maastricht
Authenticated
Download Date | 1/11/16 3:54 PM

Clinical Chemistry 53:1
53–61 (2007)

Cancer Diagnostics

Real-Time RT-PCR Quantification of Human Telomerase Reverse Transcriptase Splice Variants in Tumor Cell Lines and Non–Small Cell Lung Cancer

Eleni Mavrogiannou,[1] Areti Strati,[1] Aliki Stathopoulou,[1] Emily G. Tsaroucha,[2] Loukas Kaklamanis,[3] and Evi S. Lianidou[1*]

Background: **We developed and validated a real-time reverse transcription (RT)–PCR for the quantification of 4 individual human telomerase reverse transcriptase (*TERT*) splice variants ($\alpha+\beta+$, $\alpha-\beta+$, $\alpha+\beta-$, $\alpha-\beta-$) in tumor cell lines and non–small cell lung cancer (NSCLC).**

Methods: **We used in silico designed primers and a common TaqMan probe for highly specific amplification of each *TERT* splice variant, PCR transcript–specific DNA external standards as calibrators, and the MCF-7 cell line for the development and validation of the method. We then quantified *TERT* splice variants in 6 tumor cell lines and telomerase activity and *TERT* splice variant expression in cancerous and paired noncancerous tissue samples from 28 NSCLC patients.**

Results: **In most tumor cell lines, we observed little variation in the proportion of *TERT* splice variants. The $\alpha+\beta-$ splice variant showed the highest expression and $\alpha-\beta+$ and $\alpha-\beta-$ the lowest. Quantification of the 4 *TERT* splice variants in NSCLC and surrounding nonneoplastic tissues showed the highest expression percentage for the $\alpha+\beta-$ variant in both NSCLC and adjacent nonneoplastic tissue samples, followed by $\alpha+\beta+$, with the $\alpha-\beta+$ and $\alpha-\beta-$ splice variants having the lowest expression. In the NSCLC tumors, the $\alpha+\beta+$ variant had higher expression than other splice variants, and its expression correlated with telomerase activity, overall survival, and disease-free survival.**

Conclusions: **Real-time RT-PCR quantification is a specific, sensitive, and rapid method that can elucidate the biological role of *TERT* splice variants in tumor development and progression. Our results suggest that the expression of the *TERT* $\alpha+\beta+$ splice variant may be an independent negative prognostic factor for NSCLC patients.**

© 2007 American Association for Clinical Chemistry

Telomerase is a cellular ribonucleoprotein reverse transcriptase, and telomerase RNA segments act as templates for the synthesis of telomeric DNA onto chromosomal ends *(1, 2)*. Human telomerase reverse transcriptase (*TERT*)[4,5] contains the enzyme's catalytic subunit *(1–3)*, and the expression of the functional hTERT protein is a prerequisite for acquisition of telomerase activity *(4)*. Telomerase has a direct role in early oncogenic transformation *(3, 5–7)*, and through its activation, cancer cells stabilize their telomere size and sustain their unlimited growth *(7–9)*. Moreover, the in vitro malignant transformation of normal human cells was achieved by reconstitution of telomerase activity by induction of *TERT* gene expression in combination with other oncogenes *(5, 10)*. More than 85% of most human tumors express telomerase activity *(11)*, and essentially all major types of cancer have been screened for the presence of *TERT* mRNA in a variety of clinical specimens *(12)*.

[1] Laboratory of Analytical Chemistry, University of Athens, Athens, Greece.
[2] "Sotiria" General Hospital for Chest Diseases, Athens, Greece.
[3] Department of Pathology, Onassis Cardiac Surgery Center, Athens, Greece.
*Address correspondence to this author at: Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, 15771 Athens, Greece. Fax 30-210-7274750; e-mail lianidou@chem.uoa.gr.
Received May 3, 2006; accepted October 24, 2006.
Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2006.073015

[4] Nonstandard abbreviations: TERT, telomerase reverse transcriptase; NSCLC, non–small cell lung cancer; RT, reverse transcription; RTA, relative telomerase activity; DFI, disease-free interval.
[5] Human genes: *TERT*, telomerase reverse transcriptase (*Homo sapiens*); *HPRT*, hypoxanthine phosphoribosyltransferase.

VOLUME 22 · NUMBER 13 · JULY 1 2004

JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

ORIGINAL REPORT

Docetaxel Versus Docetaxel Plus Cisplatin As Front-Line Treatment of Patients With Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer: A Randomized, Multicenter Phase III Trial

Vassilis Georgoulias, Alexandros Ardavanis, Athina Agelidou, Maria Agelidou, Vassilis Chandrinos, Emilia Tsaroucha, Michael Toumbis, Charalambos Kouroussis, Konstantinos Syrigos, Aristidis Polyzos, Nikolaos Samaras, Pavlos Papakotoulas, Charalambos Christofilakis, Nicolaos Ziras, and Athanasios Alegakis

From the Department of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, Crete; 1st Department of Medical Oncology, Agios Savas Anticancer Hospital; 1st, 8th, and 7th Departments of Pulmonary Diseases, Sotiria Hospital; 1st and 2nd Departments of Pulmonary Diseases, Sismanoglion Hospital; Medical Oncology Unit, 3rd Department of Internal Medicine and Oncology Unit, Department of Propedeutic Medicine, School of Medicine, University of Athens; Medical Oncology Unit, 401 Military Hospital; 2nd Department of Medical Oncology, Metaxa Anticancer Hospital of Athens, Athens; 2nd Department of Pulmonary Diseases, Papanikolaou Hospital, Thessaloniki; 2nd Department of Medical Oncology, Theagenion Anticancer Hospital, Thessaloniki; Department of Medical Statistics, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece.

Submitted November 4, 2003; accepted March 30, 2004.

Supported partly by a grant from the Cretan Association for Biomedical Research.

Authors' disclosures of potential conflicts of interest are found at the end of this article.

Address reprint requests to V. Georgoulias, MD, PhD, Department of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, PO Box 1352, 711 10 Heraklion, Crete, Greece; e-mail: georgoul@med.uoc.gr.

© 2004 by American Society of Clinical Oncology

0732-183X/04/2213-2602/$20.00

DOI: 10.1200/JCO.2004.11.004

ABSTRACT

Purpose
To compare the overall survival (OS) of patients with advanced non–small-cell lung cancer (NSCLC) treated with docetaxel plus cisplatin (DC) or docetaxel (D) alone.

Patients and Methods
Chemotherapy-naïve patients with advanced/metastatic NSCLC were randomly assigned to receive either DC (n = 167; docetaxel 100 mg/m^2 on day 1, cisplatin 80 mg/m^2 on day 2, and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) 150 μg/m^2/d on days 3 to 9) or D (n = 152; 100 mg/m^2 on day 1 without rhG-CSF) every 3 weeks.

Results
The overall response rates were 36.5% for DC (three complete responses and 58 partial responses) and 21.7% for D (one complete response and 32 partial responses; P = .004). The median OS was 10.5 months (range, 0.5 to 41 months) and 8.0 months (range, 0.5 to 41 months) for DC and D, respectively (P = .200). The 1- and 2-year survival rates were 44% and 19% for DC and 43% and 15% for D, respectively. Median times to tumor progression were 4.0 and 2.5 months for DC and D, respectively (P = .580). Grade 2/3 anemia was significantly higher with DC than with D (33% *v* 16%; P = .0001). Fifteen (9%) DC and 12 (8%) D patients developed febrile neutropenia. Grade 3/4 nausea/vomiting (P = .0001), diarrhea (P = .007), neurotoxicity (P = .017), and nephroroxicity (P = .006) were significantly more common with DC than with D. There were five treatment-related deaths in the DC group and one in the D (P = .098).

Conclusion
DC regimen resulted in a higher response rate but without improvement in median time to tumor progession or OS compared with D. D could be a reasonable front-line chemotherapy for patients who cannot tolerate cisplatin.

J Clin Oncol 22:2602-2609. © 2004 by American Society of Clinical Oncology

INTRODUCTION

Non–small-cell lung cancer (NSCLC) accounts for approximately 80% of cases of lung cancer.[1-4] Most patients are diagnosed with metastatic disease and without systemic chemotherapy, their median survival is 5 to 6 months and less than 10% are alive at 1 year.[5] Platinum-based regimens confer a small but statistically significant survival benefit in patients with metastatic NSCLC,[6,7] and cisplatin use is considered to be an independent predictor of survival.[8]

Docetaxel, a semi-synthetic taxoid,[9] promotes the assembly of stable microtubules in vitro and blocks mitosis in proliferating cells. Objective response rates ranging from 26% to 54% and from 7% to 10% have been achieved with docetaxel in chemotherapy-naïve[10-15] and refractory or resistant[16,17] patients with advanced NSCLC, respectively. The combination of docetaxel and cisplatin has resulted in objec-

Downloaded from ascopubs.org by 79.166.8.79 on December 26, 2018 from 079.166.008.079
Copyright © 2018 American Society of Clinical Oncology. All rights reserved.

Original Study

Carboplatin Plus Pemetrexed as First-line Treatment of Patients With Malignant Pleural Mesothelioma: A Phase II Study

Nikolaos Katirtzoglou,[1] Ioannis Gkiozos,[1] Nektaria Makrilia,[1] Emilia Tsaroucha,[1] Aggeliki Rapti,[1] Grigorios Stratakos,[1] Georgios Fountzilas,[2] Konstantinos N. Syrigos[1]

Abstract

Introduction: Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a rapidly progressive tumor that is increasing in frequency worldwide. Treatment options are limited, and response to chemotherapy is poor. The aim of this phase II study was to evaluate the activity of the carboplatin/pemetrexed combination as first-line chemotherapy in patients with unresectable MPM. **Patients and Methods:** Chemotherapy-naive patients with histologically confirmed MPM and an Eastern Cooperative Oncology Group performance status of 0-2 were enrolled. Treatment consisted of pemetrexed 500 mg/m^2 and carboplatin area under the concentration-time curve of 5 mg/mL/min, both administered on day 1 of a 21-day cycle. The treatment continued until 6 cycles were completed or until unacceptable toxicity or disease progression were observed. **Results:** A total of 62 patients were enrolled. Of these patients, 18 (29%) had a confirmed partial response, whereas the disease remained stable in 34 patients (54.9%) and progressed in 10 patients (16.1%). The median overall survival (OS) was estimated at 14 months (95% CI, 11.8-16.2 months), and the median time to progression was 7 months (95% CI, 5.8-8.2 months). The difference in median OS between the epithelial histologic subtype (16 months) and the sarcomatoid subtype (11 months) was statistically significant. **Conclusion:** This study confirmed the activity of the carboplatin/pemetrexed combination in the first-line treatment of patients with MPM. It is a viable option, especially in cases in which side effects are generally anticipated.

Clinical Lung Cancer, Vol. 11, No. 1, 30-35, 2010; DOI: 10.3816/CLC.2010.n.005
Keywords: Asbestos, Epithelioid, Expanded-access program, Sarcomatoid

Introduction

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is an aggressive malignancy with a median survival of less than a year.[1,2] MPM is causally associated with asbestos exposure, but the latency period after exposure can last for several decades. It arises from the mesothelial surfaces of the pleural cavity, and it is locally invasive. The incidence of MPM has been increasing in industrialized countries, and it is thought that it will continue to increase in the future.[3] Very few patients are eligible for curative surgical resection, and no randomized evidence exists to support its efficacy.[4] Radiation therapy has also demonstrated poor results, rendering chemotherapy the treatment of choice. Nevertheless, MPM is often refractory to chemotherapeutic agents, and treatment intent is mostly palliative.[5]

A study by Ellis et al demonstrated overall response rates (ORRs) of < 10% and < 12% for single-agent therapy and nonplatinum combinations, respectively, whereas this rate for platinum-based chemotherapy was 25%.[6] Standard chemotherapeutic regimens in MPM are therefore platinum based.[6,7] A meta-analysis by Berghmans et al proved cisplatin to be the most active monotherapy agent in mesothelioma.[8] Pemetrexed monotherapy in previously untreated patients has exhibited a 14.5% RR,[9] which can reach 16% when vitamin supplementation is added.[10] Survival has been shown to improve when pemetrexed is combined with platinum agents.[11,12]

Two phase III studies have demonstrated benefit from the combination of cisplatin and an antifolate. The landmark trial of Vogelzang et al, which was the largest randomized trial, showed significant advantage in terms of survival and RRs with pemetrexed

[1]Oncology Unit, 3rd Department of Medicine, Sotiria General Hospital, Athens School of Medicine, Greece
[2]Department of Medical Oncology, Papageorgiou Hospital, Aristotle University of Thessaloniki School of Medicine, Greece

Submitted: Aug 9, 2009; Revised: Sep 13, 2009; Accepted: Sep 22, 2009

Address for correspondence: Konstantinos N. Syrigos, MD, PhD, Oncology Unit, 3rd Dept of Medicine, Athens University School of Medicine, Building Z, Sotiria General Hospital, Mesogion 152, 115 27 Athens, Greece
Fax: 30-210-7781-035; e-mail: knsyrigos@usa.net, ksyrigos@med.uoa.gr

CIG media group, lp
This article might include the discussion of investigational and/or unlabeled uses of drugs and/or devices that might not be approved by the FDA.
Electronic forwarding or copying is a violation of US and international copyright laws.
Authorization to photocopy items for internal or personal use, or the internal or personal use of specific clients, is granted by CIG Media Group, LP, ISSN #1525-7304, provided the appropriate fee is paid directly to Copyright Clearance Center, 222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA. www.copyright.com 978-750-8400.

Lung Cancer (2006) **53**, 59—65

available at www.sciencedirect.com

SCIENCE DIRECT®

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lungcan

Cisplatin plus etoposide chemotherapy followed by thoracic irradiation and paclitaxel plus cisplatin consolidation therapy for patients with limited stage small cell lung carcinoma

S. Kakolyris[a,b], A. Agelidou[b], N. Androulakis[b], E. Tsaroucha[b], Ch. Kouroussis[b], M. Agelidou[b], N. Karvounis[b], M. Veslemes[b], Ch. Christophylakis[b], A. Argyraki[b], A. Geroyianni[b], V. Georgoulias[b,*]

[a] *Department of Medical Oncology, University General Hospital of Alexandroupolis, Alexandroupolis, Greece*
[b] *Lung Cancer Committee of the Hellenic Oncology Research Group (HORG), 51 rue Lombardou, Athens, Greece*

Received 1 November 2005; received in revised form 13 March 2006; accepted 21 March 2006

KEYWORDS
SCLC;
Limited disease;
Radiotherapy;
Cisplatin;
Etoposide;
Paclitaxel

Summary
Purpose: To evaluate the efficacy and tolerance of a cisplatin plus etoposide regimen followed by thoracic radiotherapy (TRT) and paclitaxel plus cisplatin consolidation chemotherapy in patients with limited stage small cell lung cancer (SCLC).
Patients and methods: Thirty-nine patients with limited SCLC were enrolled onto this study. Patients received three courses of cisplatin 75 mg/m^2 IV, day 1 and etoposide 100 mg/m^2 IV, days 1—3 (EP regimen), followed by TRT (45—56 Gy administered in 15 fractions), and three courses of paclitaxel 175 mg/m^2 IV, day 1 and cisplatin, as previously, on day 2 (PP regimen); cycles were repeated every 21 days.
Results: All patients were evaluable for toxicity and 34 for response. The overall response rate was 67% (CR: 26%; PR: 41%; intention-to-treat analysis) (95% CI: 53.0—84.2%). After a median follow-up period of 15 months, the median survival time was 15 months, the median time to tumor progression 8.3 months and the 1-year survival rate 53.8%. Grade 3/4 neutropenia occurred in 39% and 36% of patients receiving EP and PP regimens, respectively. The incidence of febrile neutropenia was 5% and 3% for EP and PP regimens, respectively. Other hematologic and non-hematologic toxicities were mild, with the exception of esophagitis occuring in 36% of patients during and/or immediately after radiotherapy.

* Corresponding author at: University General Hospital of Heraklion, Department of Medical Oncology, P.O. Box 1352, 71110 Heraklion, Crete, Greece. Tel.: +30 2810 392747; fax: +30 2810 392802.
E-mail address: georgoul@med.uoc.gr (V. Georgoulias).

0169-5002/$ — see front matter © 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.lungcan.2006.03.011

Clinical Chemistry 53:8
1433–1439 (2007)

Cancer Diagnostics

Quantitative Real-Time Reverse Transcription–PCR Study of the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Splice Variants and VEGF Receptors (VEGFR-1 and VEGFR-2) in Non–Small Cell Lung Cancer

Eleni Zygalaki,[1] Emily G. Tsaroucha,[2] Loukas Kaklamanis,[3] and Evi S. Lianidou[1*]

Background: **Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a major regulator of angiogenesis and its expression is increased in non–small cell lung cancer (NSCLC). We aimed to determine the expression pattern of VEGF splice variants in NSCLC and its correlation with the clinicopathological characteristics of tumors.**
Methods: **We used real-time reverse transcription PCR to quantify the mRNA expression of total VEGF, 4 VEGF splice variants ($VEGF_{121}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{183}$, and $VEGF_{189}$), and 2 VEGF receptors (VEGFR-1 and VEGFR-2) in 27 pairs of cancerous and adjacent noncancerous tissues originating from patients with NSCLC.**
Results: **Total VEGF, $VEGF_{121}$, and $VEGF_{165}$ were expressed in all specimens, whereas $VEGF_{183}$ and $VEGF_{189}$ were present in small amounts in certain samples. Total VEGF, $VEGF_{121}$, and $VEGF_{165}$ mRNA was upregulated in cancerous compared with healthy tissues, whereas $VEGF_{183}$ and $VEGF_{189}$ expression tended to be higher in healthy tissues. The expression of VEGFRs was similar between matched specimens. No correlation was found between the expression of total VEGF or VEGF splice variants and the clinicopathological characteristics of tumors. The expression patterns of VEGF splice variants differed between tissue pairs. $VEGF_{121}$ was the major variant expressed in all samples; however, its relative expression was higher in cancerous tissues. The relative expression of $VEGF_{183}$ and $VEGF_{189}$ was upregulated in healthy lung tissues, whereas the ratio of $VEGF_{165}$ to total VEGF was similar between matched specimens.**
Conclusions: **The expression pattern of certain VEGF splice variants is altered during tumorigenesis. Our data support the hypothesis that during malignant progression an angiogenic switch favoring the shorter diffusible isoforms occurs.**
© 2007 American Association for Clinical Chemistry

Angiogenesis is the complex process by which new blood vessels arise from preexisting vasculature. The development of a vascular supply is essential not only for organ development and differentiation during embryogenesis but also for wound healing and reproductive functions in the adult. Dysregulation of angiogenesis, however, contributes to several pathological conditions, such as diabetic retinopathy, rheumatoid arthritis, and solid tumor development *(1)*. Although recent evidence indicates that new vessel growth and maturation are highly complex and coordinated processes, vascular endothelial growth factor (VEGF)[4] signaling is generally agreed to be a crucial step for the regulation of angiogenesis *(2)*.

VEGF is a highly specific mitogen for endothelial cells, inducing angiogenesis as well as the permeabilization of blood vessels and playing a central role in the regulation of vasculogenesis *(2)*. Through alternative splicing of a single VEGF gene, various isoforms are produced. To date 7 VEGF splice variants have been reported, ranging in length from 121 to 206 amino acids *(3–7)*. All splice variants contain exons 1–5 and 8 and differ only by

[1] Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Athens 15771, Greece.
[2] Sotiria General Hospital, Athens 11526, Greece.
[3] Department of Pathology, Onassis Cardiac Surgery Center, Athens 17674, Greece.
* Address correspondence to this author at: Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Athens 15771, Greece. Fax 30-210-7274750; e-mail lianidou@chem.uoa.gr.
Received May 10, 2007; accepted June 4, 2007.
Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2007.086819

[4] Nonstandard abbreviations: VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR, VEGF receptor; NSCLC, non–small cell lung cancer; RT-PCR, reverse transcription PCR.

ANTICANCER RESEARCH *30*: 3031-3038 (2010)

Phase III Study Comparing Sequential *Versus* Alternate Administration of Cisplatin-Etoposide and Topotecan as First-line Treatment in Small Cell Lung Cancer

SOPHIA BAKA, SOPHIA AGELAKI, ATHANASIOS KOTSAKIS, MARINOS VESLEMES, PAVLOS PAPAKOTOULAS, MARIA AGELIDOU, ATHINA AGELIDOU, EMILY TSAROUCHA, GEORGIA PAVLAKOU, ALEKA GEROGIANNI, NIKOLAOS ANDROULAKIS, LAMBROS VAMVAKAS, KOSTAS KALBAKIS, DIMITRIS MAVROUDIS and VASSILIS GEORGOULIAS

Hellenic Oncology Research Group (HORG), 55 Lomvardou Str, 11470, Athens, Greece

Abstract. *Aim: To compare the efficacy and tolerance of sequential versus alternate front-line administration of cisplatin-etoposide (PE) and topotecan (T) in patients with extensive stage small cell lung cancer (SCLC). Patients and Methods: Patients were randomized to receive either 4 cycles PE (cisplatin 80 mg/m^2 i.v. day 1 and etoposide100 mg/m^2/d i.v. days 1-3 every 21 days) followed by 4 cycles T (1.5 mg/m^2/d i.v. days 1-5 every 21 days) (arm A, 183 patients) or the same regimens using an alternate sequence (arm B, 181 patients). Results: There was no significant difference in terms of compliance with treatment, overall response rates (51.4% vs. 55.2%; p=0.458), median response duration (4.3 vs. 5.2 months; p=0.780), median time to tumour progression (5.7 vs. 6.4 months; p=0.494), median overall survival (10.9 vs. 9.8 months; p=0.186) and 1-year survival (43.8% vs. 36.5%) between the two arms. The incidence of severe grade 3-4 haematological and grade 2-4 non-haematological (asthenia, mucositis, diarrhoea and neurotoxicity) toxicity was comparable between the two arms. Conclusion: The comparison of sequential versus alternate administration of cisplatin-etoposide and topotecan as front-line treatment of patients with extensive stage SCLC revealed no clinically meaningful differences in terms of efficacy and tolerance.*

Small cell lung cancer (SCLC) is highly sensitive to chemotherapy and combination regimens have become established as the cornerstone of treatment (1). More frequently used combinations include etoposide with a platinum agent, either cisplatin (PE) or carboplatin; other commonly used regimens are the combination of cyclophosphamide/adriamycin/vincristine, adriamycin/cyclophosphamide/etoposide and ifosphamide/ carboplatin/ etoposide with or without vincristine. The most commonly used first-line therapy is the PE regimen, which is associated with response rates exceeding 65% in patients with limited stage SCLC. However, despite the high response rate which can be obtained with this regimen, relapses are frequent because of the development of resistance to chemotherapy. Therefore, the median survival remains low, at 12-15 months for patients with limited disease and 8-9 months for those with extensive disease (2-4).

Topotecan, a topoisomerase I inhibitor, is a water-soluble camptothecin analogue with a promising activity against SCLC (5). Topotecan delivered at a dose of 1.5 mg/m^2/day for 5 consecutive days in a 21-day cycle is currently approved by FDA, for the second-line treatment of patients with SCLC. Neutropenia has been found to be the dose-limiting toxicity of topotecan, whereas non-hematological toxicity (gastrointestinal, alopecia, skin rash) is generally mild (6-8).

Topotecan given as single-agent treatment in the first-line setting has shown a 39% response rate in patients with extensive stage SCLC (6). Moreover, when topotecan is administered in the second-line setting, objective response rates of 38% and 6-11% have been achieved in patients with chemosensitive- and chemoresistant-disease, respectively (7, 8). The safety profile of topotecan makes it an interesting option for combination therapy. In the first-line setting of SCLC, topotecan has been investigated in doublet regimens with cisplatin, carboplatin, paclitaxel and etoposide (9-18).

In an attempt to increase the clinical efficacy of chemotherapy, new therapeutic strategies have been tested using either alternating or sequential regimens. Alternating chemotherapy cycles can provide treatment breaks, leading to sufficient recovery from toxicity while still maintaining

Correspondence to: Vassilis Georgoulias, MD, Ph.D., Department of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, PO BOX 1352, 711 10 Heraklion, Crete, Greece. Tel: +30 2810392783, Fax: +30 2810392857, e-mail: georgsec@med.uoc.gr

Key Words: Cisplatin, etoposide, topotecan, sequential, alternate, SCLC.

FULL PAPER

BJC

British Journal of Cancer (2014) 110, 2054–2062 | doi: 10.1038/bjc.2014.104

Keywords: breast cancer metastasis suppressor gene-1; BRMS1; cell-free DNA; DNA methylation; non-small cell lung cancer; prognostic biomarker; methylation-specific PCR

Breast cancer metastasis suppressor-1 promoter methylation in cell-free DNA provides prognostic information in non-small cell lung cancer

I Balgkouranidou[1,2], M Chimonidou[1], G Milaki[3], E G Tsarouxa[4], S Kakolyris[2], D R Welch[5], V Georgoulias[3] and E S Lianidou*[,1]

[1]*Analysis of Circulating Tumor Cells Lab, Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, 15771 Athens, Greece;* [2]*Department of Medical Oncology, Medical School, Democritus University of Thrace, Alexandroupolis, Greece;* [3]*Department of Medical Oncology, University Hospital of Heraklion, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece;* [4]*7th Pulmonology Clinic, 'Sotiria' General Hospital for Chest Diseases, 11526 Athens, Greece and* [5]*Department of Cancer Biology, University of Kansas Medical Center, University of Kansas Cancer Center, 3901 Rainbow Boulevard, MS-1071, Kansas City, KS 66160, USA*

Background: Breast-cancer metastasis suppressor 1 (*BRMS1*) gene encodes for a predominantly nuclear protein that differentially regulates the expression of multiple genes, leading to suppression of metastasis without blocking orthotropic tumour growth. The aim of the present study was to evaluate for the first time the prognostic significance of *BRMS1* promoter methylation in cell-free DNA (cfDNA) circulating in plasma of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. Towards this goal, we examined the methylation status of *BRMS1* promoter in NSCLC tissues, matched adjacent non-cancerous tissues and corresponding cfDNA as well as in an independent cohort of patients with advanced NSCLC and healthy individuals.

Methods: Methylation of *BRMS1* promoter was examined in 57 NSCLC tumours and adjacent non-cancerous tissues, in cfDNA isolated from 48 corresponding plasma samples, in cfDNA isolated from plasma of 74 patients with advanced NSCLC and 24 healthy individuals.

Results: The *BRMS1* promoter was highly methylated both in operable NSCLC primary tissues (59.6%) and in corresponding cfDNA (47.9%) but not in cfDNA from healthy individuals (0%), while it was also highly methylated in cfDNA from advanced NSCLC patients (63.5%). In operable NSCLC, Kaplan–Meier estimates were significantly different in favour of patients with non-methylated *BRMS1* promoter in cfDNA, concerning both disease-free interval (DFI) ($P=0.048$) and overall survival (OS) ($P=0.007$). In advanced NSCLC, OS was significantly different in favour of patients with non-methylated *BRMS1* promoter in their cfDNA ($P=0.003$). Multivariate analysis confirmed that *BRMS1* promoter methylation has a statistical significant influence both on operable NSCLC patients' DFI time and OS and on advanced NSCLC patients' PFS and OS.

Conclusions: Methylation of *BRMS1* promoter in cfDNA isolated from plasma of NSCLC patients provides important prognostic information and merits to be further evaluated as a circulating tumour biomarker.

*Correspondence: Professor ES Lianidou; E-mail: lianidou@chem.uoa.gr

Received 27 November 2013; revised 19 January 2014; accepted 23 January 2014; published online 18 March 2014

© 2014 Cancer Research UK. All rights reserved 0007 – 0920/14

Clinical Chemistry 54:10
1696–1704 (2008)

Prognostic Value of Mature MicroRNA-21 and MicroRNA-205 Overexpression in Non–Small Cell Lung Cancer by Quantitative Real-Time RT-PCR

Athina Markou,[1] Emily G. Tsaroucha,[2] Loukas Kaklamanis,[3] Marianthi Fotinou,[2] Vassilis Georgoulias,[4] and Evi S. Lianidou[1*]

BACKGROUND: microRNA (miRNA) expression profiles are being intensively investigated for their involvement in carcinogenesis. We evaluated the prognostic value of mature microRNA-21 (miR-21) and mature microRNA-205 (miR-205) overexpression in non–small cell lung cancer (NSCLC).

PATIENTS AND METHODS: We studied 48 pairs of NSCLC fresh frozen tissue specimens collected at time of surgery and before chemotherapy. Highly specific amplification and quantification of mature miR-21 and mature miR-205 was achieved using looped real time RT-PCR.

RESULTS: miRNA expression, determined by real time RT-PCR, was defined by ΔΔCt measurements. We detected overexpression of mature miR-21 in 25 (52.0%) of the 48 NSCLC paired specimens and overexpression of miR-205 in 31 (64.6%). Overexpression was assessed after comparison of miRNA expression in NSCLC tissues and in their corresponding noncancerous tissues with respect to U6 expression. During the follow-up period, 29 of 48 (60.4%) patients relapsed, and 23 of 48 died (47.9%). Mature miR-21 was upregulated in 16 of 29 (55.2%) patients who relapsed and 15 of 23 (65.2%) patients who died. Mature miR-205 was overexpressed in 19 of 29 patients who relapsed (65.5%) and 15 of 23 patients who died (65.2%). Mature miR-21 overexpression correlated with overall survival (OS) of the patients ($P = 0.027$), whereas overexpression of mature miR-205 did not.

CONCLUSIONS: Our results suggest that overexpression of mature miR-21 is an independent negative prognostic factor for OS in NSCLC patients.

© 2008 American Association for Clinical Chemistry

Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths worldwide, and non–small cell lung cancer (NSCLC)[5] accounts for approximately 80% of all cases *(1)*. Emerging evidence suggests that microRNAs (miRNAs) may control lung cancer development and play a critical role in its pathogenesis *(2)*.

miRNAs are endogenous, small [approximately 22 nucleotides (nt) long], noncoding RNA molecules that silence gene expression by either cleaving target mRNAs or inhibiting their translation *(3)*. Bioinformatic data indicate that each miRNA can control hundreds of gene targets, underscoring the potential influence of miRNAs on almost every genetic pathway *(3, 4)*. Mature miRNAs are generated from precursor molecules that are 80 nt–long hairpin structures (pre-miRNAs). The human genome is predicted to encode as many as 1000 miRNAs, which comprise approximately 3% of the total number of human genes *(3, 5)*.

Abnormal cell proliferation is a hallmark of human cancers, and miRNAs seem to be important factors for the development or maintenance of the neoplastic state *(3, 6)*. Studies in model systems have demonstrated that specific miRNAs contribute to the regulation of cellular differentiation, proliferation, and apoptosis *(4)*. Recent studies have shown an altered expression of miRNAs in cancer relative to corresponding normal tissues, and specific expression signa-

[1] Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Athens, Greece; [2] "Sotiria" General Hospital for Chest Diseases, Athens, Greece; [3] Department of Pathology, Onassis Cardiac Surgery Center, Athens, Greece; [4] Department of Medical Oncology and Laboratory of Tumor Cell Biology, University Hospital of Heraklion, School of Medicine, University of Crete, Greece.
*Address correspondence to this author at: Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, 15771, Greece. Fax + 30 210 7274750; e-mail lianidou@chem.uoa.gr.
Received December 10, 2007; accepted July 23, 2008.
Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2007.101741
[5] Nonstandard abbreviations: NSCLC, non–small cell lung cancer; miRNA, microRNA; nt, nucleotide; miR-21, microRNA 21; miR-205, microRNA 205; VEGF, vascular endothelial growth factor; DFI, disease-free interval; OS, overall survival.