



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη συσχέτισης της
έκφρασης του γονιδίου ERCC1
σε επίπεδο mRNA
και πρωτεΐνης, και των
ρυθμιστικών παραγόντων του,
με την επιβίωση σε ασθενείς με
μη μικροκυτταρικό καρκίνο
του πνεύμονα

ΕΛΕΝΗ ΒΑΣΑΛΟΥ
ΙΑΤΡΟΣ

2016

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μελέτη συσχέτισης της
έκφρασης του γονιδίου ERCC1
σε επίπεδο mRNA
και πρωτεΐνης, και των
ρυθμιστικών παραγόντων του,
με την επιβίωση σε ασθενείς με
μη μικροκυτταρικό καρκίνο
πνεύμονα**

ΕΛΕΝΗ ΒΑΣΑΛΟΥ
ΙΑΤΡΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2016

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Δημήτριος Μαυρουδής

Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Μαυρουδής

Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Βασίλειος Γεωργούλιας

Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Ευστάθιος Σταθόπουλος

Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Μαυρουδής

Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Βασίλειος Γεωργούλιας

Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Ευστάθιος Σταθόπουλος

Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Γεώργιος Σαμώνης

Ογκολόγος - Λοιμωξιολόγος, Καθηγητής Παθολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Παναγιώτης Θεωδωρόπουλος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Αναστάσιος Κουτσόπουλος

Επίκουρος Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Σοφία Σχίζα

Επίκουρη Καθηγήτρια Πνευμονολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

στον πατέρα μου...

«ἀσκέειν, περι τὰ νοσήματα, δύο, ὠφελείν, ἢ μὴ βλάπτειν»

Ἱπποκράτης, 460-377 π.Χ.

Κατά τη διάρκεια της τελευταίας 50ετίας, ο καρκίνος του πνεύμονα μεταμορφώθηκε από μια άγνωστη ασθένεια σε μια πραγματική επιδημία, ιδιαίτερα στον δυτικό κόσμο. Με την εκρηκτική εξέλιξη των θετικών επιστημών και ιδιαίτερα της βιολογίας, οι θεραπευτικές πρακτικές κατά του καρκίνου πολλαπλασιάστηκαν, αναπτύχθηκαν νέα φάρμακα και νέες τεχνολογίες διάγνωσης και εντόπισης καρκινικών κυττάρων. Παρ' όλη αυτά η επιβίωση των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα δεν ακολούθησε την ίδια εξελικτική πορεία.

Κάτω από αυτές τις συνθήκες και από την έμφυτη θέλησή μου να συμμετάσχω ενεργά στη μάχη κατά αυτής της μάστιγας που έχει πλήξει εκατομμύρια οικογένειες ανά τον κόσμο, γεννήθηκε η ιδέα αυτής της διδακτορικής διατριβής, για την ολοκλήρωση της οποίας ήταν καθοριστική η συμβολή, η υποστήριξη, και η βοήθεια του επιβλέποντα Καθηγητή μου, Καθηγητή Παθολογικής Ογκολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης, και επιστημονικού υπεύθυνου της διατριβής αυτής, κ. Δημητρίου Μαυρουδή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον κ. Ευστάθιο Σταθόπουλο, Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής και Διευθυντή του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου Πανεπιστημίου Κρήτης, για το ενδιαφέρον του, τη διάθεση δειγμάτων ασθενών και τη συνεργασία του στο κομμάτι που αφορούσε την ανοσοϊστοχημεία, καθώς και τον κ. Βασίλη Γεωργούλια, Καθηγητή Παθολογίας-Ογκολογίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διατριβή μου στο Εργαστήριο Βιολογίας του Καρκίνου, του οποίου διετέλεσε Διευθυντής. Ευχαριστώ ακόμα θερμά τους ανθρώπους με τους οποίους τόσα χρόνια μοιραζόμασταν τον ίδιο χώρο και παρόμοιες αναζητήσεις στο Εργαστήριο Βιολογίας του Καρκίνου, αλλά και στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο, για τα κίνητρα που ο κάθε ένας ξεχωριστά μου έδινε με τον τρόπο του, τη συνεργασία, τις συμβουλές και την τροφή για σκέψη.

Η διατριβή αυτή είναι το αποτέλεσμα μιας πορείας μοιραία προδιαγεγραμμένης ήδη από τα πρώιμα σχολικά μου χρόνια, που ρίζωσε και θράφηκε γερά από τη ζωή και τον θάνατο. Δεν πρόκειται απλά για την ολοκλήρωση μιας πανεπιστημιακής διατριβής, αλλά για την ολοκλήρωση ενός κύκλου ζωής που περιέλαβε δεκαετίες ερωτηματικών, αναζητήσεων, ονείρων, στόχων, προσωπικών θυσιών και προσπαθειών, όλα με την ίδια αρχή και το ίδιο τέλος, τον πατέρα μου.

Τις τελευταίες λέξεις του προλόγου θα ήθελα να τις αφιερώσω σε όλους εκείνους τους δασκάλους-παιδαγωγούς, καθηγητές, φίλους και συγγενείς, που συνέπασχαν μαζί μου όλα αυτά τα χρόνια, με συμβούλευαν ουσιαστικά, με συντρόφευαν και με στήριζαν εμπράκτως -ακόμα κι όταν δεν συμφωνούσαν- στις όποιες αποφάσεις μου.



«Ὁ μὲν βίος βραχύς, ἡ δὲ τέχνη μακρὴ, ὁ δὲ καιρὸς ὀξύς, ἡ δὲ πείρα σφαλερὴ, ἡ δὲ κρίσις χαλεπὴ»
Ἱπποκράτης, 460-377 π.Χ.

<i>Πρόλογος</i>	ix
<i>Περιεχόμενα</i>	xi
<i>Περίληψη</i>	xiii
<i>Summary</i>	xiv

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Καρκίνος του πνεύμονα

1.1 Ορισμός.....	3
1.2 Επιδημιολογικά δεδομένα	3
1.3 Παράγοντες κινδύνου.....	4
1.4 Παθολογοανατομική ταξινόμηση.....	8
1.5 Σταδιοποίηση.....	12
1.6 Θεραπευτική αντιμετώπιση ΜΜΚΠ	16
1.7 Τα σύμπλοκα της πλατίνης στον ΜΜΚΠ.....	19
1.8 Κριτήρια ανταπόκρισης στη θεραπεία του ΜΜΚΠ	23
1.9 Προγνωστικοί/προβλεπτικοί παράγοντες	27

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Τα γονίδια ERCC1, XPF, XPA, MZF1

2.1 Μονοπάτι επιδιόρθωσης νουκλεοτιδικών βλαβών	29
2.2 Δομή και λειτουργία των γονιδίων ERCC1 και XPF	32
2.3 Δομή και λειτουργία του γονιδίου XPA.....	35
2.4 Δομή και λειτουργία του γονιδίου MZF1	37

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Φαρμακογενωμική

3.1 Ορισμός	40
3.2 Συντονισμένη έκφραση των παραγόντων του μηχανισμού NER	40
3.3 Ο ρυθμιστικός ρόλος της πρωτεΐνης MZF1 στο γονίδιο ERCC1	41
3.4 Η επίδραση της έκφρασης των ERCC1, XPA, XPF στην αντοχή στην πλατίνη σε κυτταρικές σειρές.....	41
3.5 Η επίδραση της έκφρασης των ERCC1, XPA, XPF στην ανταπόκριση ασθενών υπό πλατινούχα χημειοθεραπεία	43
3.6 Μελέτες έκφρασης του γονιδίου ERCC1 σε ασθενείς με ΜΜΚΠ	45

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Σκοπός διδακτορικής διατριβής

4.1 Η σημασία της έρευνας του μονοπατιού NER στον ΜΜΚΠ	48
4.2 Επιμέρους στόχοι διδακτορικής διατριβής	49

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Ασθενείς & Μέθοδοι

5.1	Κριτήρια ένταξης ασθενών	53
5.2	Συλλογή δειγμάτων	53
5.3	Μελέτη έκφρασης ERCC1 πρωτεΐνης	53
5.4	Μελέτη γονιδιακής έκφρασης ERCC1, MZF1, XPA, XPF	56
5.4.1	Απομόνωση και καθαρισμός καρκινικών κυττάρων	57
5.4.2	Εκχύλιση ολικού RNA	57
5.4.3	Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος ολικού RNA	58
5.4.4	Σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA)	58
5.4.5	Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RTqPCR).....	59
5.4.6	Γονίδια αναφοράς	64
5.4.7	Σχεδιασμός εκκινητών και ανιχνευτή.....	65
5.4.8	Αξιολόγηση εκκινητών και ανιχνευτή.....	79
5.5	Στατιστική ανάλυση.....	86

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Αποτελέσματα

6.1	Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών.....	87
6.2	Εργαστηριακά χαρακτηριστικά ασθενών	91
6.3	Συσχέτιση των κλινικών & δημογραφικών χαρακτηριστικών των ασθενών με τα εργαστηριακά τους χαρακτηριστικά	92
6.4	Αλληλοσυσχετίσεις των 5 υπό μελέτη παραγόντων	98
6.5	Συσχέτιση των κλινικών & δημογραφικών χαρακτηριστικών με την ανταπόκριση στη θεραπεία	99
6.6	Συσχέτιση των κλινικών & δημογραφικών χαρακτηριστικών με την επιβίωση	101
6.7	Συσχέτιση των εργαστηριακών χαρακτηριστικών με την ανταπόκριση στη θεραπεία	102
6.8	Συσχέτιση των εργαστηριακών χαρακτηριστικών με την επιβίωση	106

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Συζήτηση.....	114
----------------------------------	------------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Συμπεράσματα.....	122
--------------------------------------	------------

<i>Συντομογραφίες</i>	<i>123</i>
<i>Βιβλιογραφικές αναφορές</i>	<i>125</i>
<i>Δημοσίευση ερευνητικού έργου</i>	<i>137</i>

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η κύρια αιτία θανάτου από κακοήγη νόσο στον δυτικό κόσμο. Η χημειοθεραπεία με βάση τα πηλατινούχα φάρμακα, παρά τη σχετική τοξικότητα, έχει γίνει ευρέως αποδεκτή ως η κύρια θεραπευτική αντιμετώπιση στον ΜΜΚΠ. Το γονίδιο ERCC1 έχει ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη θεραπευτικής αντοχής στην πηλατινούχα χημειοθεραπεία, μέσω του μηχανισμού επιδιόρθωσης νουκλεοτιδικών βλαβών (NER). Στον μηχανισμό αυτόν, η πρωτεΐνη ERCC1 σχηματίζει σύμπλοκο με την πρωτεΐνη XPF. Το σύμπλοκο αυτό οδηγείται στο σημείο της βλάβης μέσω της σύνδεσής του με την πρωτεΐνη XPA. Παράλληλα, η πρωτεΐνη MZF1 φαίνεται να ρυθμίζει την έκφραση του ERCC1 ως μεταγραφικός καταστολέας.

Σκοπός του προτεινόμενου ερευνητικού έργου ήταν η διερεύνηση της πιθανής συσχέτισης της έκφρασης των μοριακών παραγόντων ERCC1, XPF, XPA και MZF1 με την ανταπόκριση στην πηλατινούχα χημειοθεραπεία και την επιβίωση σε ασθενείς με ΜΜΚΠ.

Συνολικά, 94 ασθενείς με προχωρημένου σταδίου ΜΜΚΠ συμπεριλήφθηκαν αναδρομικά στη μελέτη. Στο σύνολο των ασθενών μελετήθηκε ανοσοϊστοχημικά η έκφραση της ERCC1 πρωτεΐνης, ενώ 31 ασθενείς εξαιρέθηκαν από τη μελέτη γονιδιακής έκφρασης λόγω ανεπαρκούς υλικού. Από τους εναπομείναντες, σε 63 ασθενείς ενισχύθηκαν επιτυχώς τα γονίδια ERCC1 & XPA, σε 62 ασθενείς το γονίδιο MZF1, και σε 32 ασθενείς το γονίδιο XPF. Η έκφραση όλων των μοριακών αυτών δεικτών συσχετίστηκε με τα κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών, την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και την επιβίωση.

Από τα αποτελέσματα της έρευνας βρήκαμε ότι τα αντικειμενικά ποσοστά ανταπόκρισης στη θεραπεία (RR) των ασθενών δεν επηρεάστηκαν από την έκφραση των υπό μελέτη μοριακών δεικτών. Ωστόσο, η χαμηλή πρωτεϊνική έκφραση ERCC1 φάνηκε να σχετίζεται με καλύτερο ποσοστό ελέγχου της νόσου (DCR, $p=0.042$) και μεγαλύτερη επιβίωση (OS, $p=0.045$). Επίσης, ο συνδυασμός χαμηλής γονιδιακής έκφρασης ERCC1 με παράλληλα υψηλή γονιδιακή έκφραση MZF1 φάνηκε να σχετίζεται με ευμενέστερη επιβίωση (OS, $p=0.037$).

Συμπερασματικά φαίνεται ότι η φαρμακογενωμική προσέγγιση θα μπορούσε υπό προϋποθέσεις να παρέχει μια νέα θεραπευτική στρατηγική στον ΜΜΚΠ. Η πρωτεΐνη ERCC1 θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντικό προγνωστικό παράγοντα και να φανεί χρήσιμη στην εξατομίκευση της χημειοθεραπείας στον προχωρημένου σταδίου ΜΜΚΠ.

SUMMARY

Lung cancer is the leading cause of death from malignant disease in the western world. Despite its toxicity, platinum-based chemotherapy, has been widely accepted as the primary treatment of choice in NSCLC. The ERCC1 gene has been implicated in the development of therapeutic resistance to platinum-based chemotherapy through the nucleotide excision repair mechanism (NER). In this pathway, ERCC1 binds with the XPF protein to form an endonuclease complex. This complex is driven to the point of DNA damage through its connection with the XPA protein. Nonetheless, MZF1 protein has been shown to regulate the expression of ERCC1 as a transcriptional repressor.

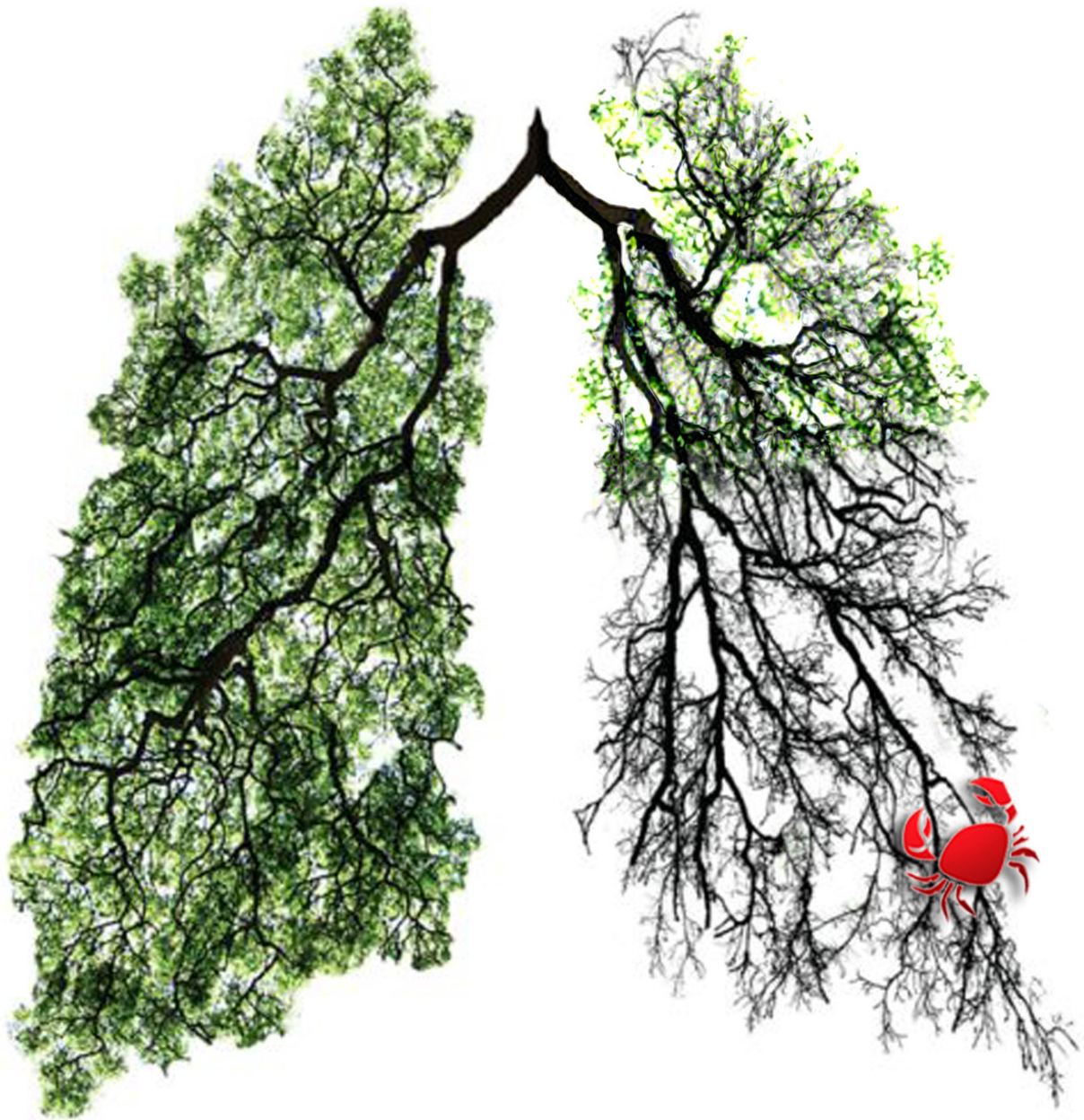
The purpose of this study was to investigate the association of ERCC1, XPF, XPA and MZF1 expression levels with clinical factors such as response to treatment and survival in patients with NSCLC.

Overall, 94 patients with advanced stage NSCLC were retrospectively included in the study. All patients were assessed for the expression of ERCC1 protein by immunohistochemistry, whereas 31 patients were excluded from the study of gene expression due to insufficient biological material. Of the remaining patients, 63 were successfully amplified for the ERCC1 & XPA genes, 62 for the MZF1 gene, and only 32 for the XPF gene. The expression of all molecular markers was correlated with clinical and demographic characteristics of patients, response to chemotherapy and survival.

The results showed that the objective response rate to treatment (RR) was not affected by the expression of the studied molecular markers. However, low ERCC1 protein expression correlated with better disease control rate (DCR, $p = 0.042$) and longer survival (OS, $p = 0.045$). Also, the combination of low ERCC1 and high MZF1 gene expression appeared to correlate with better survival (OS, $p = 0.037$).

In conclusion, the pharmacogenomic approach could under certain conditions provide a novel treatment strategy for NSCLC. The ERCC1 protein may have a role in refining prognosis and thus individualizing chemotherapy in advanced stage NSCLC

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



«Όταν πολλές θεραπείες συνιστώνται για μια αρρώστια, αυτό σημαίνει ότι δεν μπορεί να θεραπευτεί.»

Αντον Τσέχωφ, 1860-1905

Καρκίνος του πνεύμονα

1.1 Ορισμός

Με τον όρο *καρκίνο* ονομάζουμε το κακόηθες νεόπλασμα που αναπτύσσεται από επιθηλιακό ιστό. Ως *νεόπλασμα* ορίζεται κάθε «ανώμαλη μάζα ιστού, η ανάπτυξη της οποίας ξεπερνά τα όρια αυτής των φυσιολογικών ιστών, δεν υπόκειται στους ρυθμιστικούς μηχανισμούς των τελευταίων και επιμένει στον ρυθμό ανάπτυξης όταν ανασταθούν τα ερεθίσματα που προκάλεσαν αυτήν τη μεταβολή»¹.

Η καρκινογένεση προκύπτει από σύνθετες γενετικές και επιγενετικές αλληλαγές με αποτέλεσμα τη σταδιακή κακοήθη εξαίτηση των κυττάρων. Πρόκειται για μια πολυπαραγοντική και πολυσταδιακή διαδικασία².

Ο καρκίνος του πνεύμονα (ΚΠ) αναπτύσσεται από το αναπνευστικό επιθήλιο των βρόγχων³.

1.2 Επιδημιολογικά δεδομένα

Παγκοσμίως, ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο στους άνδρες και η δεύτερη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες, με κατ' εκτίμηση 951.000 θανάτους στους άνδρες και 527.500 θανάτους στις γυναίκες το 2008⁴.

Υπολογίζεται ότι 1,6 εκατομμύρια νέα κρούσματα ΚΠ εμφανίστηκαν το 2008 διεθνώς, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 13% των συνολικών διαγνώσεων καρκίνου. Στους άνδρες, τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης ΚΠ ήταν στη Βόρεια Αμερική, την Ευρώπη, την Ανατολική Ασία, την Αργεντινή και την Ουρουγουάη και τα χαμηλότερα ποσοστά ήταν στην υποσαχάρια Αφρική. Στις γυναίκες, τα υψηλότερα ποσοστά ΚΠ ήταν στη Βόρεια Αμερική, τη Βόρεια Ευρώπη, την Αυστραλία, τη Νέα Ζηλανδία και την Κίνα. Παρά τον χαμηλό επιπολασμό του καπνίσματος, τα ποσοστά ΚΠ σε γυναίκες στην Κίνα (21,3 περιπτώσεις ανά 100.000 γυναίκες) ήταν υψηλότερα από τα αντίστοιχα ποσοστά σε γυναίκες κάποιας ευρωπαϊκής χώρας. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στη ρύπανση του αέρα εσωτερικών χώρων από αναθυμιάσεις άνθρακα, που συνήθίζεται να χρησιμοποιείται ως καύσιμο για σόμπες και για το μαγείρεμα στην Κίνα⁴.

Παρά τις κάποιες βελτιώσεις στις χειρουργικές τεχνικές και στις συνδυασμένες θεραπείες κατά τις τελευταίες αρκετές δεκαετίες, ο καρκίνος του πνεύμονα παραμένει μία από τις πιο θανατηφόρες μορφές καρκίνου⁵. Το σχετικό ποσοστό πενταετούς επιβίωσης για όλα τα στάδια συνολικά είναι περίπου 17% στις Ηνωμένες Πολιτείες για τα έτη 2002-2008 από 12% που ήταν τα έτη 1975-1977⁶. Το ποσοστό 5ετούς επιβίωσης αγγίζει το 53% για τις περιπτώσεις που ανιχνεύονται όταν η νόσος παραμένει εντοπισμένη, αλλιώς μόνο το 15% των ΚΠ διαγιγνώσκονται σε αυτό το πρώιμο στάδιο.

Πίνακας 1: Σχετικά ποσοστά 5ετούς επιβίωσης (%) για τον καρκίνο του πνεύμονα, των βρόγχων και της τραχείας σε ασθενείς >15 ετών⁴

Ηνωμένες Πολιτείες (1999-2006)	15,8
Αγγλία (1995-1999)	8,5
Δανία (1995-1999)	7,9
Αυστρία (1995-1999)	15,5
Πολωνία (1995-1999)	9,2
Βέλγιο (1995-1999)	16,5
Γερμανία (1995-1999)	13,2
Ισπανία (1995-1999)	10,7
Ελβετία (1995-1999)	13,9
Σλοβενία (1995-1999)	8,8
Κίνα (1990-2001)	21,0
Ινδία (1990-2001)	7,0
Νότια Κορέα (1990-2001)	20,0
Ταϊλάνδη (1990-2001)	9,0
Ουγκάντα (1990-2001)	0,0

Στην Ευρώπη, τα ποσοστά 5ετούς επιβίωσης είναι κατά βάση παρόμοια με των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής, και κυμαίνονται από 7,9% (Δανία) σε 16,5% (Βέλγιο) (Πίνακας 1)⁴. Οι προβλήψεις θνησιμότητας από ΚΠ για το έτος 2013 στην Ευρώπη αναφέρουν μια συνεχή μείωση στους άνδρες, και μια συνεχή αύξηση στις γυναίκες, γεγονός που αποδίδεται μάλλον στην αλλαγή των καπνιστικών συνηθειών των δύο φύλων. Επίσης, για πρώτη φορά στις γυναίκες, οι θνησιμότητες από ΚΠ και καρκίνο του μαστού φαίνεται να ισοδυναμούν⁷.

4

1.3 Παράγοντες κινδύνου

Το κάπνισμα παραμένει ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου για τον ΚΠ⁸ αντιπροσωπεύοντας περίπου το 80% των περιπτώσεων ΚΠ στους άνδρες και το 50% στις γυναίκες παγκοσμίως⁹. Σε πολλές δυτικές χώρες, όπου η επιδημία του καπνίσματος κορυφώθηκε στα μέσα του περασμένου αιώνα, όπως οι Ηνωμένες Πολιτείες, το Ηνωμένο Βασίλειο και η Φινλανδία, τα ποσοστά καρκίνου του πνεύμονα έχουν πλέον μείωση στους άνδρες και στις γυναίκες έχουν φτάσει σε πηλινό¹⁰. Αντίθετα, σε χώρες όπου το κάπνισμα μόλις κορυφώθηκε ή συνεχίζει να αυξάνεται, όπως η Κίνα, η Κορέα, και πολλές χώρες στην Αφρική, τα ποσοστά ΚΠ αυξάνονται και είναι πιθανό να συνεχίσουν να αυξάνονται τουλάχιστον για τις επόμενες δεκαετίες, εάν δεν υπάρξουν παρεμβάσεις που να επιταχύνουν τη διακοπή του



Εικόνα 1: Το ενεργητικό και το παθητικό κάπνισμα είναι ο Νο 1 παράγοντας κινδύνου για καρκίνο του πνεύμονα.

καπνίσματος και τη μείωση της έναρξης⁴. Ο κίνδυνος αυξάνεται με την ποσότητα και τη διάρκεια της κατανάλωσης τσιγάρων. Το κάπνισμα πούρων και πίπας αυξάνουν επίσης τον κίνδυνο για ΚΠ, αλλά λιγότερο από το κάπνισμα απλών τσιγάρων, λόγω των διαφορών στη συχνότητα του καπνίσματος και το βάθος της εισπνοής⁸.

Η έκθεση στον καπνό αποτελεί αιτία για ΚΠ και στους μη καπνιστές. Μη καπνιστές που συζούν με καπνιστή, παρουσιάζουν 20-30% αυξημένο κίνδυνο ΚΠ. Το παθητικό κάπνισμα εκτιμάται ότι προκαλεί 3.000 θανάτους από ΚΠ κάθε χρόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες και 21.500 θανάτους ετησίως σε παγκόσμιο επίπεδο⁸. Η έκθεση σε διάφορες περιβαλλοντικές και επαγγελματικές ουσίες, πολλή από τις οποίες έχουν συνεργική δράση με τον καπνό του τσιγάρου αυξάνει επίσης τον κίνδυνο για ΚΠ.

Το κατά πόσον η σκόνη πυριτίου είναι ένας παράγοντας κινδύνου για ΚΠ είναι αμφιλεγόμενο. Ο αμίαντος όμως είναι ένα καθιερωμένο επαγγελματικό καρκινογόνο, και αφορά μια ομάδα διαφορετικών πυριτικών ορυκτών με κοινό χαρακτηριστικό την ινώδη μορφή τους. Η συσχέτιση της επαγγελματικής έκθεσης σε αμίαντο με τον κίνδυνο εμφάνισης ΚΠ είναι πολύ ισχυρή. Παραμένει αβέβαιο αν ο αμίαντος δρα ως άμεσο καρκινογόνο ή έμμεσα με την προαγωγή χρόνιας φλεγμονής που προωθεί την ανάπτυξη του καρκίνου. Τόσο η έκθεση σε αμίαντο, όσο και το κάπνισμα τσιγάρων είναι και οι δύο ανεξάρτητες αιτίες για ΚΠ, αλλά σε συνδυασμό, δρουν συνεργικά και αυξάνουν σημαντικά τον κίνδυνο καρκίνου του πνεύμονα^{8,11}.

Οι εργαζόμενοι που εκτίθενται σε πίσσα και αιθάλη (που περιέχει βενζο[α]πυρένιο), σε συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν εκείνες που υπάρχουν στα επιτρεπόμενα αστικά όρια αέρα διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του πνεύμονα⁸. Το ίδιο και οι εργάτες χυτηρίων και γυαλιού λόγω έκθεσης σε αρσενικό, οι εργάτες οδοποιίας, κλιβάνων και μονώσεων λόγω έκθεσης σε σκόνη άνθρακα, οι εργάτες δέρματος, κεραμικών, μετάλλου και βυρσοδεψίας λόγω έκθεσης σε χρώμιο και νικέλιο, οι εργάτες πλαστικών λόγω έκθεσης σε χλωριούχο βινύλιο, οι εργάτες στην παραγωγή πλαστικών, βαφών και μπαταριών καθώς και στην εξόρυξη ψευδαργύρου λόγω έκθεσης σε κάδμιο, καθώς και οι εργάτες αλουμινίου^{12,13}.

Ο ατμοσφαιρικός αέρας μπορεί να περιέχει τους προαναφερόμενους παράγοντες κινδύνου, πολλοί από τους οποίους παράγονται από την καύση των ορυκτών καυσίμων. Συγκεκριμένα,

πρόκειται για πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες και μέταλλα, όπως το αρσενικό, το νικέλιο και το χρώμιο. Αυτές οι καρκινογόνες ουσίες μπορεί να αυξήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης ΚΠ ακόμη κι όταν η οδός έκθεσης είναι η κατάποση και όχι η εισπνοή. Για παράδειγμα, οι αυξημένες συγκεντρώσεις αρσενικού στο πόσιμο νερό σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο ΚΠ^{8,14}.

Η σωματιδιακή ύλη στον ατμοσφαιρικό αέρα των αστικών κέντρων έχει μελετηθεί ως πιθανός παράγοντας κινδύνου για ΚΠ. Δεδομένα από την Αμερικανική Αντικαρκινική Εταιρεία έδειξαν ότι κάθε αύξηση κατά $10\text{g}/\text{m}^3$ στη συγκέντρωση των μικρών σωματιδίων προκαλούσε αύξηση του κινδύνου για ΚΠ κατά 15%¹⁵. Αύξηση της οδικής κυκλοφορίας από 4000 οχήματα ανά χλμ, ανά ημέρα, σε απόσταση 100 μέτρων από τη μόνιμη κατοικία, συνδέθηκε με κίνδυνο ανάπτυξης ΚΠ κατά 1.09 (95% CI, HR: 0.99–1.21). Τον Οκτώβριο του 2013, η Διεθνής Υπηρεσία Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC, International Agency for Research on Cancer) ταξινόμησε την εξωτερική ατμοσφαιρική ρύπανση ως καρκινογόνο παράγοντα της ομάδας 1 για τον άνθρωπο¹⁶.

Η ρύπανση του αέρα των εσωτερικών χώρων μπορεί να προέρχεται επίσης από τα προϊόντα καύσης από τη θέρμανση και το μαγείρεμα. Πολύ ανησυχητική για τις αναπτυσσόμενες χώρες είναι η μόλυνση που προκύπτει από τη χρήση των μη επεξεργασμένων στερεών καυσίμων, ιδίως του μαλακού άνθρακα (ένα ορυκτό καύσιμο), αλλιά και από τα καύσιμα βιομάζας που χρησιμοποιούνται για το μαγείρεμα και τη θέρμανση του χώρου¹⁷. Η καύση βιομάζας, όπως το ξύλο, σχετίζεται με τον κίνδυνο ΚΠ, αλλιά η συσχέτιση είναι ασθενέστερη από ότι με την καύση ορυκτών καυσίμων¹⁸.

Η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία αποτελεί άλλοιον έναν αιτιολογικό παράγοντα για ΚΠ¹⁹. Υπάρχουν τα ακόλουθα δύο είδη ακτινοβολίας που κατατάσσονται ανάλογα με τον ρυθμό μεταφοράς ενέργειας στον ιστό, και σχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα:

- (1) η ακτινοβολία χαμηλής γραμμικής μεταφοράς ενέργειας (LET - Linear Energy Transfer), όπως είναι η ακτινοβολία που χρησιμοποιείται στις ακτινογραφίες ή στις ακτίνες γ, και
- (2) η ακτινοβολία υψηλής LET όπως π.χ. τα νετρόνια, το ραδόνιο.

Η υψηλή LET ακτινοβολία προκαλεί ιονισμό σχετικά υψηλότερης πυκνότητας σε ιστούς από ότι η χαμηλή LET ακτινοβολία, και επομένως σε ισοδύναμες δόσεις, περισσότερες βιολογικές βλάβες παράγονται από υψηλής LET παρά από χαμηλής LET ακτινοβολία⁸.

Το ραδόνιο είναι ένα αδρανές αέριο που παράγεται φυσιολογικά από το ράδιο κατά την αποσύνθεση του ουρανίου²⁰. Δύο από τα προϊόντα διάσπασης του ραδονίου εκπέμπουν σωματίδια α, που λόγω της υψηλής ενέργειας και μάζας τους, μπορεί να προκαλέσουν



Εικόνα 2: Το ραδιενεργό χημικό στοιχείο Ραδόνιο (σύμβολο: Rn) είναι ένα ευγενές αέριο με ατομικό αριθμό 86, ατομικό βάρος 222 και χρόνο ημίσειας ζωής 3.8 ημέρες²³.

βλάβες στο DNA των κυττάρων του αναπνευστικού επιθηλίου²¹. Μελέτες σε ανθρακωρύχους ουρανίου και άλλων μεταλλευμάτων έχουν επιβεβαιώσει την έκθεση στα προϊόντα διάσπασης του ραδονίου ως αιτία για ΚΠ²². Επίσης ο συνδυασμός προϊόντων διάσπασης του ραδονίου και το κάπνισμα επηρεάζουν συνεργικά τον κίνδυνο εμφάνισης ΚΠ²¹.

Το ραδόνιο έχει ευρύτερο κοινωνικό ενδιαφέρον, διότι είναι ένας πανταχού παρών ατμοσφαιρικός ρύπος, που δύναται να εισέρχεται μέσα στα κτίρια²³. Η μέση έκθεση σε ραδόνιο μέσα στα κτίρια για τον γενικό πληθυσμό είναι πολύ μικρότερη από ότι η επαγγελματική έκθεση, αλλά άμεσες αποδείξεις από μελέτες ασθενών-μαρτύρων τόσο στην Ευρώπη, όσο και στις ΗΠΑ, έχουν τεκμηριώσει ότι η έκθεση σε ραδόνιο στον αέρα των εσωτερικών χώρων σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για ΚΠ^{24,25}.

Διάφοροι κοινωνικοοικονομικοί παράγοντες κινδύνου εμφάνισης ΚΠ έχουν επίσης ερευνηθεί. Ειδικότερα, η υιοθέτηση ενός υγιεινού τρόπου ζωής προφυλάσσει από την εμφάνιση καρκίνου. Η εμπλουτισμένη διατροφή με φρούτα και λαχανικά που είναι μια πλούσια πηγή αντιοξειδωτικών βιταμινών και άλλων μικροθρεπτικών συστατικών, θεωρείται ότι προστατεύει με τη μείωση του κινδύνου καρκίνου των πνευμόνων, αλλά και άλλων καρκίνων²⁶. Επίσης, έχει αναφερθεί μεγαλύτερος κίνδυνος εμφάνισης ΚΠ σε όσους καταναλώνουν τουλάχιστον 30 γρ. αλκοόλ την ημέρα, από εκείνους που απέχουν από το αλκοόλ²⁷. Στοιχεία από μελέτες δείχνουν ότι σωματικά δραστήρια άτομα έχουν μικρότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα²⁸. Συγκεκριμένα, μέτρια έως υψηλά επίπεδα σωματικής δραστηριότητας κατά τον ελεύθερο χρόνο σχετίζονται με τη μείωση κατά 13% έως 30% του κινδύνου για ΚΠ²⁹. Ιδιαίτερα, η φυσική δραστηριότητα θα μπορούσε να μειώσει τον κίνδυνο για ΚΠ και τη θνησιμότητα μεταξύ των βαρέων καπνιστών³⁰. Ο ΚΠ είναι πιο πιθανό να εμφανιστεί σε φτωχότερους και λιγότερο μορφωμένους πληθυσμούς. Πληθυσμοί χαμηλής κοινωνικοοικονομικής κατάστασης συνδέονται γενικότερα με ένα πιο δυσμενές προφίλ παραγόντων κινδύνου για ΚΠ, όπως το κάπνισμα, η διατροφή, και η έκθεση σε εισπνεόμενα καρκινογόνα στον χώρο εργασίας και το ευρύτερο περιβάλλον. Επιπροσθέτως, έχει παρατηρηθεί καθυστερημένη διάγνωση καρκίνου και σε μεταγενέστερο στάδιο, σε τέτοιους πληθυσμούς⁸.

Εκτός από τους κοινωνικοοικονομικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου, γενετικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την ευαισθησία στην ανάπτυξη ΚΠ³¹. Το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του πνεύμονα συνδέεται στενά με αυξημένο κίνδυνο ΚΠ ιδιαίτερα σε εκείνους που αναπτύσσουν τη νόσο σε νεαρότερη ηλικία^{4,32}. Από το ατομικό ιστορικό, η χρόνια φλεγμονή είναι γνωστός επαγωγέας της κυτταρικής διαφοροποίησης και καρκινογένεσης και έχει συσχετιστεί ισχυρά με την εμφάνιση ΚΠ³³. Επίσης, σύμφωνα με το Διεθνές Δίκτυο Συνεργασίας για ΚΠ (International Lung Cancer Consortium), η εμφάνιση ΚΠ συσχετίζεται με προηγθέν ατομικό ιστορικό διαφόρων νόσων των πνευμόνων. Μετά από ανάλυση 17 ερευνών με 24607 περιπτώσεις και 81829 μάρτυρες ελέγχου, που διεξήχθησαν κατά τα έτη 1984-2011, βρέθηκε ότι το ατομικό ιστορικό εμφυσήματος, χρόνιας βρογχίτιδας, φυματίωσης και πνευμονίας, συγκαταλέγεται στους παράγοντες κινδύνου για ΚΠ. Μεταξύ των μη καπνιστών, αυξημένος κίνδυνος εμφανίστηκε στους ασθενείς με ιστορικό εμφυσήματος, πνευμονίας και φυματίωσης, γεγονός που συντελεί στην ανεξάρτητη από το κάπνισμα επίδραση του ατομικού ιστορικού νόσου των πνευμόνων στην εμφάνιση ΚΠ³⁴.

Τα τελευταία χρόνια με την ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας και της γενετικής, μελετήθηκαν

και αναλύθηκαν περαιτέρω διάφοροι βιολογικοί δείκτες που εμπλέκονται σε μονοπάτια και μηχανισμούς που αφορούν την ικανότητα των κυττάρων να επιδιορθώνουν βλάβες που προκαλούνται στο DNA τους από εξωγενείς παράγοντες και οδηγούν στην καρκινογένεση^{35,36}. Η εγγενής δυσλειτουργία ή μειωμένη λειτουργία των μηχανισμών επιδιόρθωσης επιγενετικών γενωμικών βλαβών έχει βρεθεί ότι αυξάνει τον κίνδυνο για ΚΠ^{37,38}. Ανάμεσα σε αυτούς τους μηχανισμούς-παράγοντες κινδύνου για ΚΠ, ανήκει και το μονοπάτι επιδιόρθωσης νουκλεοτιδικών βλαβών (NER)³⁹.

1.4 Παθολογοανατομική ταξινόμηση

Σύμφωνα με το σύστημα ιστολογικής ταξινόμησης από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) το 2004, οι 4 κύριοι ιστολογικοί τύποι ΚΠ, που περιλαμβάνουν το 95% όλων των πρωτοπαθών ΚΠ είναι οι⁴⁰:

- i. καρκίνωμα εκ πηλακωδών κυττάρων (SCC)
- ii. αδενοκαρκίνωμα (ADC)
- iii. καρκίνωμα εκ μικρών κυττάρων (SCLC)
- iv. καρκίνωμα εκ μεγάλων κυττάρων (LCC)

Αν και ο ΚΠ χωρίζεται σε πολλές ακόμα υποκατηγορίες, η πιο σημαντική διάκριση είναι εκείνη μεταξύ του μικροκυτταρικού καρκινώματος του πνεύμονα (SCLC, Small Cell Lung Cancer) και του μη μικροκυτταρικού καρκινώματος του πνεύμονα (NSCLC, Non Small Cell Lung Cancer). Αν και ο ΚΠ χωρίζεται σε πολλές ακόμα υποκατηγορίες, η πιο σημαντική διάκριση είναι εκείνη μεταξύ του μικροκυτταρικού καρκινώματος του πνεύμονα (SCLC, Small Cell Lung Cancer) και του μη μικροκυτταρικού καρκινώματος του πνεύμονα (NSCLC, Non Small Cell Lung Cancer). Ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (ΜΜΚΠ) περιλαμβάνει περισσότερο από το 85% των περιπτώσεων ΚΠ και συγκεκριμένα αφορά τους παρακάτω ιστολογικούς τύπους: αδενοκαρκίνωμα (~50% των ΜΜΚΠ), πηλακώδες καρκίνωμα (~40% των ΜΜΚΠ) και μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα⁴¹. Η σημασία αυτού του ιστολογικού διαχωρισμού έγκειται στις ποικίλες διαφορές στην κλινική εικόνα της νόσου, τη μεταστατική ικανότητα, την ανταπόκριση στη θεραπεία και τον καθορισμό της πρόγνωσης⁵. Η σημασία αυτού του ιστολογικού διαχωρισμού έγκειται στις ποικίλες διαφορές στην κλινική εικόνα της νόσου, τη μεταστατική ικανότητα, την ανταπόκριση στη θεραπεία και τον καθορισμό της πρόγνωσης⁵.

Το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα είναι αδιαφοροποίητο μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα με περιφερική συνήθως εντόπιση στον πνεύμονα⁴⁰. Διαγιγνώσκεται εξ αποκλεισμού μορφολογίας και βιοδεικτών που να κατευθύνουν προς ADC ή SCC, αν και είναι ασαφές κατά πόσον τα LCC είναι γενετικά διαφορετικά από τα ADC ή SCC⁴¹.

Το καρκίνωμα από πηλακώδες επιθήλιο συσχετίζεται έντονα με το κάπνισμα, καθώς η πηλακώδης μετάπλαση οφείλεται σε χρόνια φλεγμονή από το κάπνισμα⁴². Πρόκειται για έναν κακοήθη επιθηλιακό όγκο με κερατινοποίηση ή/και μεσοκυττάρια γέφυρες, προερχόμενο από το βρογχικό επιθήλιο. Παρουσιάζει κυρίως κεντρική εντόπιση στους βρόγχους και σχετική αργή ανάπτυξη⁴⁰.

Το αδενοκαρκίνωμα είναι ο πιο συχνός τύπος ΚΠ στις ΗΠΑ και ο πιο κοινός σε μη καπνιστές και σε γυναίκες¹⁵. Είναι ένας κακοήθης επιθηλιακός όγκος, με αδενική διαφοροποίηση ή παραγωγή βλήννης. Μακροσκοπικά παρουσιάζεται συνήθως ως περιφερικός όγκος και εκφράζει βιοδείκτες, όπως τον θυρεοειδικό μεταγραφικό παράγοντα 1 (TTF1) και την κερατίνη 7 (CK7)⁴⁰.

Πίνακας 2: Ιστολογική Ταξινόμηση των κακοήθων όγκων του πνεύμονα κατά WHO⁴⁰

Πλακώδες καρκίνωμα

Θηλώδες
 Διαυγοκυτταρικό
 Μικροκυτταρικό
 Βασικοειδές

Μικροκυτταρικό καρκίνωμα

Σύνθετο μικροκυτταρικό καρκίνωμα

Αδενοκαρκίνωμα

Αδενοκαρκίνωμα, μικτού υποτύπου
 Κυψελιδικό αδενοκαρκίνωμα
 Θηλώδες αδενοκαρκίνωμα
 Βρογχιολοκυψελιδικό καρκίνωμα
Μη-βλενώδες
Βλενώδες
Μικτό μη-βλενώδες και βλενώδες ή ακαθόριστο
 Συμπαγές αδενοκαρκίνωμα με παραγωγή βλέννης
Εμβρυϊκό αδενοκαρκίνωμα
Βλενώδες (κολλοειδές) καρκίνωμα
Βλενώδες κυσταδενοκαρκίνωμα
Αδενοκαρκίνωμα τύπου “Signet ring”
Διαυγοκυτταρικό αδενοκαρκίνωμα

Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα

Μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα
Σύνθετο μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα
 Βασικοειδές
 Καρκίνωμα τύπου λεμφοεπιθηλιώματος
 Διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα
 Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα με ραβδοειδή φαινότυπο

Αδενοπλακώδες καρκίνωμα

Σαρκωματοειδές καρκίνωμα

Πλειόμορφο καρκίνωμα
 Ατρακτοκυτταρικό καρκίνωμα
 Γιγαντοκυτταρικό καρκίνωμα
 Καρκινοσάρκωμα
 Πνευμονικό βλάστημα

Καρκινοειδείς όγκοι

Τυπικό καρκινοειδές
 Άτυπο καρκινοειδές

Όγκοι τύπου σιελογόνων αδένων

Βλενοεπιδερμοειδές καρκίνωμα
 Αδενοκυστικό καρκίνωμα
 Επιθηλιακό (μυοεπιθηλιακό) καρκίνωμα

Προδιηθητικές αλλοιώσεις

Πλακώδες καρκίνωμα in situ
 Άτυπη αδενωματώδης υπερπλασία
 Διάχυτη ιδιοπαθής πνευμονική νευροενδοκρινική υπερπλασία

Το 70% των περιπτώσεων ΚΠ παρουσιάζεται σε προχωρημένα στάδια, οι περισσότεροι ασθενείς είναι ανεγχείρητοι και η διάγνωση τους βασίζεται σε μικρές βιοψίες ή/και κυτταρολογική εξέταση. Επομένως είναι μείζονος σημασίας η επακριβής και ενδελεχής ιστολογική διάγνωση και ταξινόμηση του ΚΠ, καθώς ο ιστολογικός τύπος των ΚΠ αποτελεί σημαντικό παράγοντα στον καθορισμό του θεραπευτικού αλγορίθμου¹⁵.

Έτσι, το 2011 εισήχθη μια νέα ταξινόμηση όσον αφορά τα αδενοκαρκινώματα, που εστιάζει κυρίως σε μια πιο ορθή ιστολογική κατηγοριοποίηση των αδενοκαρκινωμάτων που διαγιγνώσκονται κυρίως από βιοψίες ή κυτταρολογική εξέταση, καθώς αυτά φαίνεται να αποτελούν την πλειοψηφία (Πίνακας 3)^{43,44}. Μία από τις σημαντικότερες αλλαγές αυτής της νέας ταξινόμησης είναι η ανάκληση του όρου «Βρογχοηλοκυψελιδικό Καρκίνωμα» (BAC), καθώς και του όρου «Αδενοκαρκίνωμα Μικτού Τύπου» από την ταξινόμηση κατά ΠΟΥ-2004⁴⁵. Για τα χειρουργικά δείγματα εισήχθησαν οι νέοι όροι⁴⁶:

- «Αδενοκαρκίνωμα in situ» (AIS, ADC in situ), για μεμονωμένους όγκους με καθαρά «ηλεπιδικό» (lepidic) προφίλ, και
- «ελάχιστα διηθητικό ADC» (MIA, minimally invasive ADC), για μεμονωμένους όγκους με «ηλεπιδικό» κυρίαρχο προφίλ, και <5 χιλ διήθηση.

Οι νεοεισαχθέντες όροι προσδιορίζουν τους ασθενείς που μετά από πλήρη χειρουργική εκτομή του όγκου θα παρουσιάσουν 100% ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS, Disease-free Survival)⁴⁷.

Επίσης, τα διηθητικά αδενοκαρκινώματα κατηγοριοποιούνται εφεξής σύμφωνα με τον κυρίαρχο ιστολογικό υπότυπο που εμφανίζουν όπως: «ηλεπιδικό», αδενικό, θηλώδες, ή συμπαγές, και προστίθεται ο όρος «μικροθηλώδες αδενοκαρκίνωμα» ως νέος υπότυπος με κακή πρόγνωση. Τα πρώην «βλενωδών BAC» ονομάζονται πλέον «διηθητικά βλενωδών ADC» και τα πρώην «μικτά-μη βλενωδών BAC» κατατάσσονται ως διηθητικά ADC με «ηλεπιδικό» κυρίαρχο υπότυπο⁴⁸. Με βάση αυτή την κατάταξη, ένας πιο ακριβής καθορισμός της πρόγνωσης και πρόβλεψης των μοριακών αλλαγών μπορεί να επιτευχθεί⁵⁰.

Τέλος τον Σεπτέμβριο του 2015, δημοσιεύθηκε από τον ΠΟΥ η τελευταία αναθεωρημένη ιστολογική ταξινόμηση που στοχεύει κυρίως σε μια πιο μοριακή προσέγγιση για τον ΚΠ⁵⁰. Οι πιο σημαντικές αλλαγές σε αυτή την έκδοση που αφορούν τον ΜΜΚΠ περιλαμβάνουν: (1) την εκτεταμένη χρήση της ανοσοϊστοχημείας, (2) την έμφαση στα αποτελέσματα γενετικών μελετών και ιδίως την ενσωμάτωση των μοριακών ελέγχων με απώτερο στόχο την εξατομίκευση της θεραπευτικής στρατηγικής σε ασθενείς με ΚΠ προχωρημένου σταδίου, (3) τη διαφορετική ιστολογική κατάταξη για τις μικρές βιοψίες και κυτταρολογική εξέταση, παρόμοια με αυτή που προτείνεται στην αναθεώρηση του 2011, (4) μια διαφορετική προσέγγιση για τα αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα από εκείνη που προτάθηκε το 2011, (5) τον περιορισμό της διάγνωσης των LCCs μόνο σε πλήρως εξαιρεθέντες όγκους που δεν παρουσιάζουν καμία σαφή μορφολογική ή ανοσοϊστοχημική διαφοροποίηση, με αναγκαστική αναταξινόμηση των υπολοίπων πρώην LCCs. Από τα πρώην LCCs, όσα εκφράζουν TTF1+ κατηγοριοποιούνται ως ADCs, ενώ όσα εκφράζουν P40+ κατηγοριοποιούνται ως μη κερατινοποιημένα SCCs, (6) αναταξινόμηση των SCCs σε κερατινοποιημένα, μη κερατινοποιημένα (P40+/TTF1-) και βασικοειδή, με τους μη κερατινοποιημένους όγκους να απαιτούν ανοσοϊστοχημική απόδειξη για την πλάκώδη διαφοροποίηση.

Πίνακας 3: Νέα Ιστολογική Ταξινόμηση των Αδενοκαρκινωμάτων του Πνεύμονα^{44,48}

Σε μικρές βιοψίες και κυτταρολογικές εξετάσεις:

Αδενοκαρκίνωμα

Μικτού υποτύπου
Αδενικού
Θηλώδους
Μικροθηλωματώδους
«Λεπιδικού»* (μη βλεννώδους)
«Λεπιδικού»* (βλεννώδους)

Σε χειρουργικά δείγματα:

Προδιηθητικές βλάβες

Άτυπη αδενωματώδης υπερπλασία
Αδενοκαρκίνωμα in situ (≤ 3 cm, πρώην μεμονωμένο BAC)
Μη βλεννώδες
Βλεννώδες
Μικτό βλεννώδες/μη βλεννώδες

Ελάχιστο διηθητικό Αδενοκαρκίνωμα (≤ 3 cm, «λεπιδικού» κυρίαρχου υποτύπου με ≤ 5 χιλ διήθηση)

Μη βλεννώδες
Βλεννώδες
Μικτό βλεννώδες/μη βλεννώδες

Διηθητικό Αδενοκαρκίνωμα

«Λεπιδικό»* κυρίαρχο (πρώην μη βλεννώδες BAC με > 5 χιλ διήθηση)
Αδενικό κυρίαρχο
Θηλώδες κυρίαρχο
Μικροθηλωματώδες κυρίαρχο
Συμπαγές κυρίαρχο, βλεννοπαραγωγό

Παραλλαγές διηθητικού αδενοκαρκινώματος

Διηθητικό βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα (πρώην βλεννώδες BAC)
Κολλοειδές
Εμβρυϊκό
Εντερικό

* Ο «λεπιδικός» υπότυπος ορίζεται ως νεοπλασματική «φολιδωτή» ανάπτυξη κατά μήκος της επιφανείας των κυψελιδικών τοιχωμάτων, χωρίς διήθηση στρώματος, αγγείων ή υπεζωκότα, χωρίς θηλώδη ή μικροθηλωματώδη μοτίβα, και χωρίς ενδοκυψελιδικά νεοπλασματικά κύτταρα.

1.5 Σταδιοποίηση

Η σταδιοποίηση του ΚΠ παραμένει ο πιο ισχυρός προγνωστικός δείκτης για τον ΚΠ και συμβάλλει στην επιλογή της καταλληλότερης θεραπείας για τον ασθενή, αλλά και στην εκτίμηση των αποτελεσμάτων της⁵¹.

Το καθιερωμένο σύστημα σταδιοποίησης είναι η διεθνής ταξινόμηση TNM (Tumor-Node-Metastasis) της Αμερικανικής μικτής επιτροπής για τον καρκίνο (American Joint Committee on cancer, AJCC) και της διεθνούς ένωσης κατά του καρκίνου (Union Internationale Centre le Cancer, UICC)⁵². Η TNM σταδιοποίηση κατευθύνει τους θεραπευτικούς αλγόριθμους αντιμετώπισης των ασθενών, παρέχει πληροφορίες σχετικά με την πρόγνυσή τους, με την καταλληλότητα της ένταξής τους σε κλινικές δοκιμές, και επιτρέπει συγκρίσεις και μετα-αναλύσεις σε διεθνές επίπεδο. Ο δείκτης T αντιστοιχεί στην έκταση του πρωτοπαθούς όγκου, ο δείκτης N στην απουσία ή παρουσία, αριθμό και έκταση μεταστάσεων σε επιχώριους λεμφαδένες, και ο δείκτης M στην ύπαρξη ή όχι απομακρυσμένων μεταστάσεων σε άλλα μέρη του σώματος⁵³. Ο συνδυασμός των δεικτών T, N και M συνδυάζονται στη συνέχεια για να δώσουν ένα ολοκληρωμένο στάδιο (I-IV) της νόσου, με τελικό στόχο την ομαδοποίηση των ασθενών σε στάδιο παρόμοιας πρόγνωσης⁵⁴. Υπάρχουν δύο κύρια είδη σταδιοποίησης για τον ΜΜΚΠ: η κλινική σταδιοποίηση TNM (cTNM) και η παθολογοανατομική σταδιοποίηση TNM (pTNM). Η κλινική σταδιοποίηση βασίζεται στην προσεκτική λήψη του ιστορικού και την κλινική εξέταση, σε συνδυασμό με εργαστηριακές εξετάσεις, ακτινολογικά και βρογχοσκοπικά ευρήματα πριν από τη λήψη θεραπείας. Η παθολογοανατομική σταδιοποίηση βασίζεται στα ιστοπαθολογικά ευρήματα μετά από δειγματοληψία ιστού του όγκου, και χρησιμεύει στην επιβεβαίωση της διάγνωσης και της κλινικής σταδιοποίησης⁵⁵.

Ιστορικά, το σύστημα σταδιοποίησης TNM για συμπαγείς όγκους επινοήθηκε, αναπτύχθηκε και βελτιώθηκε στη Γαλλία από τον Dr. Pierre Denoix στη δεκατία του 1940 και του 1950. Τέθηκε σε ισχύ για τον ΚΠ το 1966⁵⁶. Η έκδοση του Dr. Denoix αναθεωρήθηκε για πρώτη φορά από τον Dr. Clifton Mountain το 1973⁵⁷. Ακολούθησαν πολλές αναθεωρήσεις⁵⁸, όλες βασισμένες στη συνεχώς αυξανόμενη κλινική εμπειρία του Dr. Mountain. Η 5^η αναθεώρηση θεμελιώθηκε από μια βάση δεδομένων που έφτασε τους 5319 ασθενείς το 1997⁵². Το 1998, η Διεθνής Ένωση για τη Μελέτη του Καρκίνου του Πνεύμονα (International Association for the Study of Lung Cancer, IASLC) ξεκίνησε το Πρόγραμμα σταδιοποίησης ΚΠ (The Lung Cancer Staging Project), με τη συλλογή δεδομένων από πάνω από 100.000 ασθενείς, από 46 διαφορετικά ιατρικά κέντρα, από πάνω από 19 χώρες, που είχαν διαγνωσθεί με ΚΠ το διάστημα 1990-2000, σε παγκόσμιο επίπεδο⁵⁶, προκειμένου να αναθεωρήσει την 5^η έκδοση. Ωστόσο, η 6^η αναθεώρηση (Πίνακας 4) του συστήματος σταδιοποίησης TNM για συμπαγείς όγκους δεν περιείχε ιδιαίτερες αλλαγές όσον αφορά τη σταδιοποίηση του ΚΠ⁵⁹. Στα τέλη του 2009 δημοσιεύτηκε η 7^η έκδοση (Εικόνα 3, Πίνακας 5) και τέθηκε σε ισχύ από τον Ιανουάριο του 2010⁶⁰. Σκοπός της αναθεωρημένης ταξινόμησης είναι να παράσχει ένα βελτιωμένο πλαίσιο για την καλύτερη επιλογή της θεραπείας, και εκτίμηση της πρόγνωσης.

Στην παρούσα μελέτη η TNM σταδιοποίηση των ασθενών, βάσει της οποίας επιλέχθηκε και η αντίστοιχη θεραπευτική τους διαχείριση και πορεία, είχε γίνει σύμφωνα με την 6^η έκδοση.

Πίνακας 4: Σταδιοποίηση ΚΠ σύμφωνα με την 6^η έκδοση του συστήματος TNM⁵²

T (Πρωτοπαθής Όγκος)

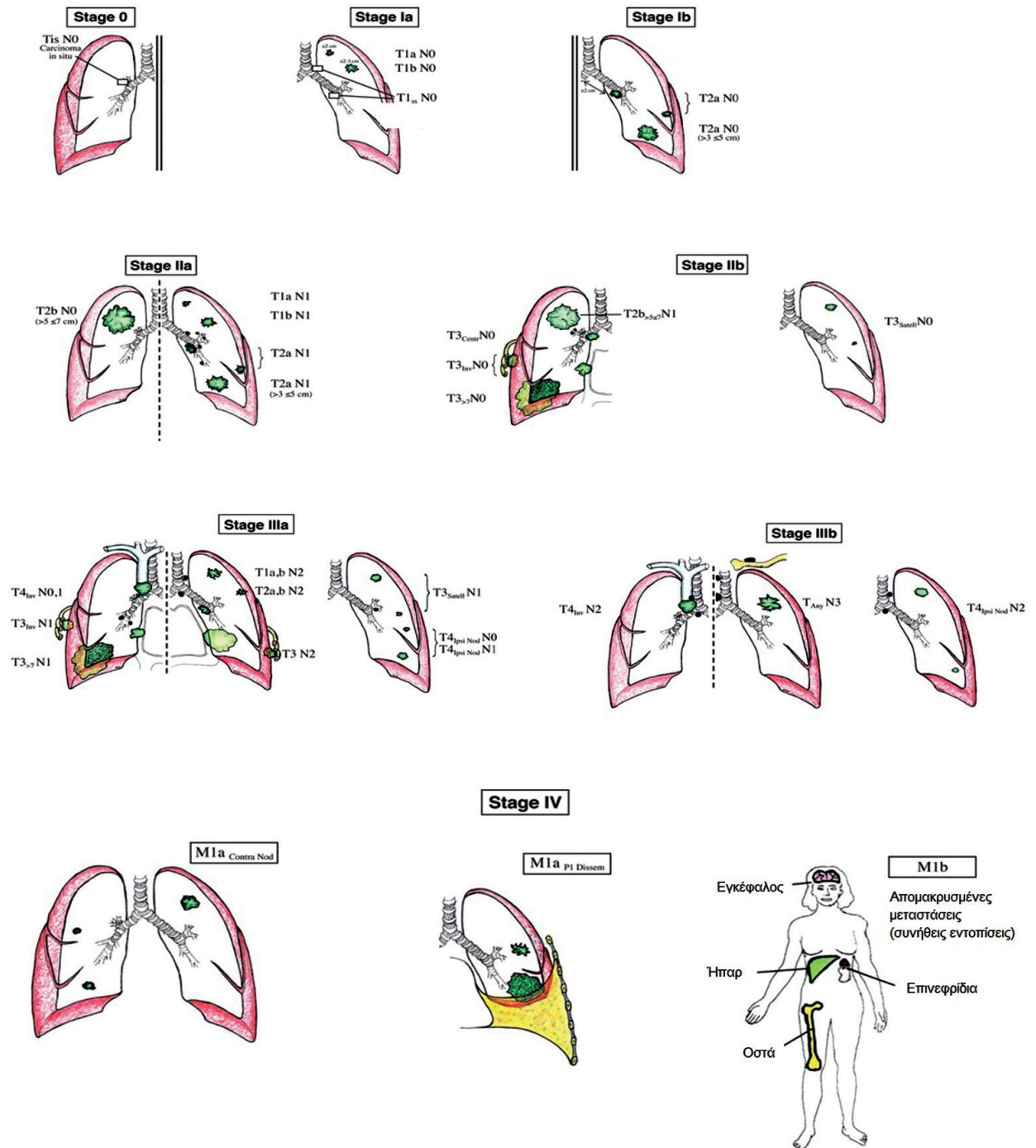
- Tx** Η παρουσία πρωτοπαθούς όγκου είναι άγνωστη, ή τα καρκινικά κύτταρα ανευρίσκονται μόνο στα πύελα ή το βρογχικό έκπλυμα, χωρίς συνυπάρχοντα ακτινολογικά ή βρογχοσκοπικά ευρήματα.
- T0** Δεν υπάρχουν ενδείξεις πρωτοπαθούς όγκου
- Tis** Καρκίνωμα in situ
- T1** Όγκος μεγαλύτερης διαμέτρου ≤ 3 cm, περιοριζόμενος εντός του πνευμονικού παρεγχύματος ή των ορίων του σπλαχνικού υπεζωκότα, χωρίς βρογχοσκοπικές ενδείξεις διήθησης εγγύτερα του λοβαίου βρόγχου.
- T2** Όγκοι μεγαλύτερης διαμέτρου > 3 cm, ή με εντόπιση στον κύριο βρόγχο, αλλά όχι εγγύτερα των 2 cm από την τρόπιδα, ή διήθηση σπλαχνικού υπεζωκότα, ή παρουσία ατελεκτασίας ή αποφρακτικής πνευμονίτιδας που επεκτείνεται στην περιοχή της πύλης αλλά δεν καταλαμβάνει όλο τον πνεύμονα.
- T3** Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους που διηθεί κατά συνέχεια ιστού οποιοδήποτε από τα παρακάτω: το θωρακικό τοίχωμα (συμπεριλαμβανομένων των όγκων Pancoast), το διάφραγμα, τον υπεζωκότα του μεσοθωρακίου ή το τοιχωματικό περικάρδιο. Όγκος στον κύριο βρόγχο εγγύτερα των 2 cm από την τρόπιδα (χωρίς διήθηση αυτής). Όγκος που συνοδεύεται από ατελεκτασία ή αποφρακτική πνευμονίτιδα ολόκληρου του πνεύμονα.
- T4** Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους που διηθεί ένα από τα παρακάτω: μεσοθωράκιο, καρδιά, μεγάλα αγγεία, τραχεία, οισοφάγος, σώματα σπονδύλων, τρόπιδα. Όγκοι με κακοήθη πλευριτική συλλογή ή περικαρδιακή συλλογή, ή οποιοσδήποτε όγκος με δορυφορικά οζίδια στον ίδιο λοβό με τον πρωτοπαθή όγκο.

N (Επιχώριοι Λεμφαδένες)

- Nx** Δεν μπορεί να αξιολογηθεί η προσβολή των επιχώριων λεμφαδένων (ενδοθωρακικών, σκαλπνών και υπερκλείδιων)
- N0** Δεν υπάρχει διήθηση επιχώριων λεμφαδένων
- N1** Διήθηση κατά συνέχεια ιστού του πρωτοπαθούς όγκου σε σύστοιχους περιβρογχικούς ή πυλαίους λεμφαδένες, ή ενδοπνευμονικούς λεμφαδένες. Οι N1 λεμφαδένες βρίσκονται περιφερικά του μεσοθωρακικού υπεζωκότα.
- N2** Διήθηση σύστοιχων μεσοθωρακικών ή υποτροπιδικών λεμφαδένων.
- N3** Διήθηση ετερόπλευρων μεσοθωρακικών ή ετερόπλευρων πυλαίων λεμφαδένων, διήθηση ετερόπλευρων ή σύστοιχων σκαλπνών ή υπερκλείδιων λεμφαδένων. Οι υπόλοιποι παρατραχηλικοί λεμφαδένες ταξινομούνται ως M1.

M (Μεταστάσεις)

- Mx** Δεν μπορεί να αξιολογηθεί η ύπαρξη ή μη απομακρυσμένων μεταστάσεων
- M0** Δεν υπάρχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις
- M1** Παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων, ή δορυφορικά οζίδια ομόπλευρα αλλά όχι στον ίδιο λοβό με τον πρωτοπαθή όγκο. Η παρουσία όζων στον ετερόπλευρο πνεύμονα θεωρείται M1 μόνον όταν παρουσιάζει ίδια ιστολογία με τον πρωτοπαθή όγκο. Διαφορετικά ταξινομείται ως σύγχρονος διαφορετικός πρωτοπαθής όγκος και θα πρέπει να σταδιοποιείται ξεχωριστά.



Εικόνα 3: Γραφική αναπαράσταση των σταδίων I-IV, κατά την 7^η TNM έκδοση⁶¹. Τα στάδια I-III είναι M0. Στο στάδιο IV συμπεριλαμβάνονται όλα τα T & N. Οι ενδείξεις Tx, Nx ή Mx χρησιμοποιούνται μόνο όταν δεν υπάρχει καμία διαθέσιμη πληροφορία σχετικά με τους δείκτες T, N, M.

Οι κύριες αλλαγές της 7ης έκδοσης που αφορούν τον δείκτη T περιλαμβάνουν⁶²:

- Διαχωρισμό του σταδίου T1 σε T1a (≤ 2 εκ) & T1b (2-3 εκ).
- Διαχωρισμό του σταδίου T2 σε T2a (3-5 εκ) & T2b (5-7 εκ).
- Όγκοι διαμέτρου > 7 εκ βρέθηκαν να έχουν παρόμοια 5ετή επιβίωση με ασθενείς με προσβολή θωρακικού τοιχώματος ή ασθενείς με όγκο στο μεσοθωράκιο και χαρακτηρίστηκαν σταδίου T3.
- Ασθενείς με ποληλαπλούς δορυφορικούς όγκους στον ίδιο λοβό με τον πρωτοπαθή όγκο, χαρακτηρίστηκαν σταδίου T3 (από T4), λόγω παρόμοιων ποσοστών επιβίωσης με όγκους T3 (28% 5ετής επιβίωση).
- Ασθενείς με μεταστατικούς όγκους σε διαφορετικό λοβό σύστοιχα με τον πρωτοπαθή όγκο χαρακτηρίστηκαν σταδίου T4 (από M1), δεδομένης της σχετικά καλύτερης 5ετούς επιβίωσης από τους M1 όγκους, αλλά χειρότερης επιβίωσης από ασθενείς σταδίου T3.

Στον δείκτη N δεν έγιναν αλλαγές στην 7^η έκδοση παρότι υπήρχαν προτάσεις που αφορούν κυρίως την εισαγωγή του όρου «λημφαδενικές ζώνες» για την ξέχωρη τοπογραφική ομαδοποίηση των προσβεβλημένων λεμφαδένων, κυρίως για προγνωστικούς λόγους⁶³. Οι προτάσεις αυτές ενδέχεται να προσαρτηθούν σε μεταγενέστερη έκδοση⁶⁴.

Πίνακας 5: Σύγκριση σταδιοποίησης ΚΠ κατά την 6^η και 7^η έκδοση TNM⁶⁷.

T & M (6 ^η έκδοση)	T & M (7 ^η έκδοση)	Στάδιο			
		N0	N1	N2	N3
T1 (≤ 2 εκ)	T1a	IA	IIA	IIIA	IIIB
T1 ($> 2-3$ εκ)	T1b	IA	IIA	IIIA	IIIB
T2 ($> 3-5$ εκ)	T2a	IB	IIA (IIB)	IIIA	IIIB
T2 ($> 5-7$ εκ)	T2b	IIA (IB)*	IIB	IIIA	IIIB
T2 (> 7 εκ)	T3	IIB (IB)	IIIA (IIB)	IIIA	IIIB
T3 (διήθηση)	T3	IIB	IIIA	IIIA	IIIB
T5 (ίδιου λοβού βλάβες)	T3	IIB (IIB)	IIIA (IIB)	IIIA (IIB)	IIIB
T5 (επέκταση)	T5	IIIA (IIB)	IIIA (IIB)	IIB	IIIB
M1 (ομόπλευρο πνεύμονα)	T5	IIIA (IV)	IIIA (IV)	IIB (IV)	IIIB (IV)
T5 (υπεζωκοτική συλλογή)	M1a	IV (IIB)	IV (IIB)	IV (IIB)	IV (IIB)
M1 (ετερόπλευρο πνεύμονα)	M1a	IV	IV	IV	IV
M1 (απομακρυσμένες μεταστάσεις)	M1b	IV	IV	IV	IV

*Η έντονη γραμματοσειρά υποδεικνύει την αλλαγή σταδίου όπως διαμορφώνεται στην 7^η έκδοση, το στάδιο της 6^{ης} έκδοσης δίνεται στην παρένθεση.

Οι κύριες αλλαγές που αφορούν τον δείκτη M στην 7^η έκδοση περιγράφονται ως εξής⁶⁵:

- Ασθενείς με κακοήθη πνευμονική και περικαρδιακή συλλογή χαρακτηρίστηκαν σταδίου M1 (από T4), μετά από ευρήματα που έδειχναν συγκριτικά χειρότερο διάμεσο χρόνο επιβίωσης για τους ασθενείς με κακοήθη πνευμονική συλλογή (8 μήνες) σε σύγκριση με άλλους ασθενείς νόσου T4 (13 μήνες).
- Διαίρεση του δείκτη M σε M1a και M1b για ενδοθωρακικές και εξωθωρακικές μεταστάσεις αντίστοιχα, μετά από ευρήματα που κατέληξαν σε σημαντικές διαφορές στα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών με μακρινές μεταστάσεις σε σύγκριση με ασθενείς με υπεζωκοτική συμμετοχή ή μετάσταση στον ετερόπλευρο πνεύμονα (1%, 6% και 3% 5ετή επιβίωση αντίστοιχα).

Επιπλέον, οι περιπτώσεις T2b N0 M0 μετακινήθηκαν από το στάδιο IB στο στάδιο IIA, οι περιπτώσεις T2a N1 M0 από το στάδιο IIB στο στάδιο IIA, καθώς και οι περιπτώσεις T4 N0-1 M0 από το στάδιο IIIB στο στάδιο IIIA⁶⁶.

1.6 Θεραπευτική αντιμετώπιση ΜΜΚΠ

Η θεραπευτική στρατηγική αντιμετώπισης του ΜΜΚΠ καθορίζεται τόσο από την ιστολογική διάγνωση όσο και από την κλινική και εργαστηριακή σταδιοποίηση της νόσου. Η ακριβής σταδιοποίηση της νόσου οδηγεί στη σωστή θεραπευτική επιλογή. Στις περιπτώσεις που

Πίνακας 6: 5ετής πρόγνωση του ΜΜΚΠ σύμφωνα με την cTNM σταδιοποίηση (7^η έκδοση)⁵⁵.

Στάδιο	cTNM	5ετής επιβίωση
0	Καρκίνωμα in situ	
IA	T1a/T1b, N0M0	50–80%
IB	T2aN0M0	47%
IIA	T1a/T1b, N1M0 T2aN1M0 T2bN0M0	36%
IIB	T2bN1M0 T3N0M0	26%
IIIA	T1/T2, N2M0 T3, N1/N2, M0 T4, N0/N1, M0	19%
IIIB	T4N2M0 Any T, N3, M0	7%
IV	Any T, Any N, M1a/M1b	2%

οι απομακρυσμένες μεταστάσεις έχουν αποκλειστεί (στάδιο IV), μια πιο λεπτομερής τοπική σταδιοποίηση θα διακρίνει τα πρώιμα στάδια (I/II) από τα δυσνηκτικά χειρουργήσιμα στάδια (III A) ή από τα ανεγχείρητα στάδια (III B), σύμφωνα με το σύστημα TNM. Λάθος σταδιοποίηση οδηγεί σε εσφαλμένες θεραπευτικές επιλογές και ανακριβή πρόγνωση (Πίνακας 6)⁶⁸. Στη φαρέτρα των θεραπειών περιλαμβάνονται η χειρουργική επέμβαση, η ακτινοθεραπεία, η χημειοθεραπεία, και οι στοχεύουσες θεραπείες⁶⁹.

Στα πρώιμα στάδια η χειρουργική αφαίρεση του όγκου είναι καθοριστικής σημασίας, καθώς ο ΜΜΚΠ θα μπορούσε να θεωρηθεί πιθανόν ίσκιμος μετά από μια επιτυχημένη πλήρη εκτομή του όγκου⁷⁰. Ωστόσο, μόνο το 25-30% των ασθενών με ΜΜΚΠ διαγιγνώσκονται σε αρχικά στάδια, καθώς η πλειονότητα των ΜΜΚΠ εμφανίζει συμπτώματα όταν η νόσος έχει ήδη επεκταθεί²⁵. Ειδικότερα, σε ασθενείς σταδίου IA (T1N0) η συνήθης πρακτική είναι η λοβεκτομή ή τμηματεκτομή. Απλή σφηνοειδής εκτομή δεν συστήνεται παρά μόνο σε βλάβες θολής υάλου ή αδενοκαρκινώματα *in situ*⁷².

Παρά ταύτα αρκετοί από αυτούς τους ασθενείς θα αναπτύξουν συστηματικές υποτροπές με ή χωρίς τοπική υποτροπή και τελικά θα πεθάνουν από τη νόσο⁷³. Για τη βελτίωση λοιπόν της πρόγνωσης του ΜΜΚΠ πρώιμου σταδίου, μετά τη χειρουργική αφαίρεση του όγκου ακολουθεί επικουρική (adjuvant) χημειοθεραπεία (ΧΜΘ), η οποία θεωρείται πλέον απαραίτητη για τη θεραπευτική αντιμετώπιση ασθενών σταδίου II και IIIA^{73,74}. Η χορήγηση επικουρικής ΧΜΘ στο στάδιο IB είναι ακόμα υπό έρευνα, καθώς υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Στο στάδιο IA δεν συνιστάται, αν και ο αριθμός των ασθενών που διαγιγνώσκονται σε αυτό το στάδιο είναι εξαιρετικά μικρός^{72,75}.

Η επικουρική ΧΜΘ που έχει ως βάση τα πλατινούχα φάρμακα έχει δείξει ότι αυξάνει την 5ετή επιβίωση των ασθενών σταδίου II/IIIA⁷⁶ και μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης απομακρυσμένων μεταστάσεων⁷⁴. Έτσι, σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένη νόσο (II B-III A), η συνδυασμένη επικουρική πλατινούχα ΧΜΘ έχει καθιερωθεί ως αναπόσπαστο μέρος της θεραπευτικής στρατηγικής, είτε συνδυάζεται με ταυτόχρονη ακτινοθεραπεία, είτε όχι⁷⁷. Η χορήγηση προεγχειρητικής (neo-adjuvant) ΧΜΘ για την αύξηση της συνολικής επιβίωσης ή για τη μείωση του χειρουργήσιμου όγκου του ΚΠ σε ασθενείς πρώιμου σταδίου I-III A, πιθανόν να έχει κάποια θετικά αποτελέσματα⁷⁸, αλλά δεν προτιμάται σαν τακτική ρουτίνας καθώς δεν έδειξε να υπερέχει της μετεγχειρητικής επικουρικής ΧΜΘ που αποτελεί την έως τώρα θεραπεία εκλογής^{79,80}.

Στα προχωρημένα στάδια ΜΜΚΠ (III B/IV), η νόσος είναι συνήθως ανίατη και η θεραπεία κυρίως παρηγορητική. Η χειρουργική θεραπεία δεν συνιστάται, παρά μόνο στις περιπτώσεις που μπορεί να επιτευχθεί πλήρης εκτομή (συμπεριλαμβανομένων των προσβεβλημένων λεμφαδένων) και η μετεγχειρητική θνησιμότητα και νοσηρότητα να είναι μικρή⁸¹. Επομένως, η αντιμετώπιση επικεντρώνεται ως επί το πλείστον στην πολυπαραγοντική προσέγγιση, που μπορεί να περιλαμβάνει ακτινοθεραπεία που προσδίδει καλύτερο τοπικό έλεγχο της νόσου ή/και χημειοθεραπεία που αυξάνει τη συνολική επιβίωση^{5,82}. Ειδικότερα, σε μη χειρουργήσιμους ασθενείς σταδίου III, η σύγχρονη χημειο-ακτινοθεραπεία έχει δείξει καλά αποτελέσματα σε ασθενείς που δεν παρουσιάζουν απώλεια βάρους και εμφανίζουν καλό δείκτη λειτουργικής δραστηριότητας (Performance Status, PS)⁸², αλλά και σε ηλικιωμένους ασθενείς άνω των 70 ετών⁸³. Σε ασθενείς με αυξημένη συννοσηρότητα, η διαδοχική χημειοθεραπεία και

ακτινοθεραπεία εφαρμόζεται με καλύτερα αποτελέσματα⁸⁴.

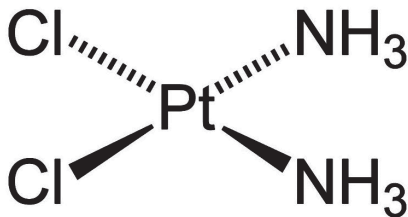
Στους ασθενείς σταδίου IV, η επικρατούσα τάση είναι να χορηγείται συνδυασμένη ΧΜΘ πρώτης γραμμής (first line chemotherapy) με βάση την πλιατίνα και κάποιον άλλον κυτταροτοξικό παράγοντα (vinorelbine, gemcitabine, ταξάνες, ή πεμετρεξίδη σε ασθενείς μη-πληκώδους ιστολογίας), δεδομένου ότι έχει βρεθεί να βελτιώνει την επιβίωση, τον έλεγχο των συμπτωμάτων και την ποιότητα ζωής⁸⁵. Η προσθήκη και τρίτου κυτταροτοξικού παράγοντα στο σχήμα θεραπείας πρώτης γραμμής δεν έχει αποδείξει να βελτιώνει τη συνολική επιβίωση⁸⁶. Το ίδιο συνέβη και σε μελέτες φάσης III, όταν δοκιμάστηκε η προσθήκη στοχευμένων βιολογικών παραγόντων κατά του EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), και συγκεκριμένα των gefitinib και erlotinib, σε συνδυασμένη πλιατινούχα ΧΜΘ πρώτης γραμμής, χωρίς κανένα πρόσθετο όφελος στη συνολική επιβίωση^{87,88}, με μόνη εξαίρεση τον υποπληθυσμό των μη καπνιστών ασθενών⁸⁹. Αντιθέτως, η προσθήκη του bevacizumab, ενός μονοκλωνικού αντισώματος κατά του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), ως τρίτο φάρμακο στο πλιατινούχο χημειοθεραπευτικό σχήμα πρώτης γραμμής οδήγησε σε βελτίωση της επιβίωσης⁹⁰ και της ανταπόκρισης στη θεραπεία⁹¹, με κόστος όμως τον αυξημένο κίνδυνο θανάτου σχετιζόμενου με τη θεραπεία⁹². Ωστόσο, οι ασθενείς για θεραπεία με bevacizumab θα πρέπει να επιλέγονται βάσει της ιστολογίας (μη πηκώδους), της απουσίας εγκεφαλικών μεταστάσεων, αιμόπτυσης και ένδειξης για αντιπηκτική αγωγή, και επίσης να έχουν καλό PS⁹³. Σε αδύναμους (PS \geq 2) ή πολύ ηλικιωμένους ασθενείς σταδίου IV συνήθως συστήνεται μονοθεραπεία³⁵. Για τους ασθενείς που υποτροπιάζουν μετά την πρώτη γραμμής ΧΜΘ, αλλήλα εξακολουθούν να έχουν καλό PS, έχει εγκριθεί η χορήγηση δεύτερης γραμμής ΧΜΘ, καθώς θεωρείται ότι βελτιώνει τη μονοετή επιβίωση έως και 30%⁹⁵. Οι φαρμακευτικοί παράγοντες που έχουν εγκριθεί προς χρήση είναι το docetaxel και το pemetrexed⁹⁶. Και τα δύο φάρμακα είναι παρομοίως δραστικά όσον αφορά τα αντικειμενικά ποσοστά ανταπόκρισης (Objective Response Rates, RR) στη θεραπεία (8.8% και 9.1% αντίστοιχα) και την επιβίωση (7.9 και 8.3 μήνες αντίστοιχα), με το pemetrexed να προσφέρει καλύτερη ανεκτικότητα και ποιότητας ζωής στους ασθενείς⁹⁷. Ως εκ τούτου, το pemetrexed θεωρείται η καλύτερη δεύτερης γραμμής θεραπευτική επιλογή προκειμένου να αποφευχθούν σοβαρές παρενέργειες⁹⁸. Επίσης το erlotinib έχει εγκριθεί για τη θεραπεία δεύτερης και τρίτης γραμμής, και είναι δραστικό με RR: 8%–12% και μέσο χρόνο επιβίωσης 6.7-8.4 μήνες⁹⁹, ωστόσο μένει να διευκρινιστεί το εάν είναι εξίσου δραστικό σε όλους τους ασθενείς με ΜΜΚΠ ή σε συγκεκριμένους υποπληθυσμούς όπως π.χ. σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα, στις γυναίκες, στους ασθενείς Ασιατικής καταγωγής και σε ασθενείς με μεταλλάξεις του EGFR⁹⁸, και επομένως εάν θα πρέπει να γίνεται επιλογή υποομάδων ασθενών στους οποίους θα χορηγείται ή όχι¹⁰⁰. Κάποιες φορές χρησιμοποιούνται συμπληρωματικά και οι παράγοντες gemcitabine και irinotecan στη δεύτερης γραμμής θεραπεία⁹⁵.

Εντούτοις, ο ΜΜΚΠ έχει αυξημένη μεταστατική ικανότητα, και συχνά παρουσιάζεται ανθεκτικός στα φάρμακα, ώστε ακόμα και μετά από έγκαιρη διάγνωση και κατάλληλη θεραπευτική αντιμετώπιση, η πρόγνωση των ασθενών να παραμένει φτωχή. Η βελτίωση στα ποσοστά 5ετούς επιβίωσης για τα στάδια I-III είναι μόνο 5-10%¹⁰¹, ενώ στο στάδιο IV παρατηρείται μόνο μια ολιγόμηννη παράταση ζωής^{35,102}.

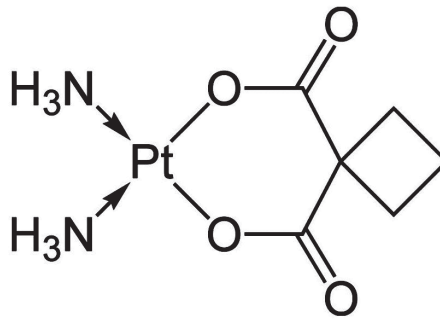
1.7 Τα σύμπλοκα της πλάτινας στον ΜΜΚΠ

Τα φάρμακα με βάση την πλάτινα χρησιμοποιούνται ευρέως σε αρκετούς κακοήθεις όγκους, καθώς και στη θεραπεία του ΜΜΚΠ, και ιδιαίτερα στα προχωρημένα στάδια της νόσου, όπου η ΧΜΘ είναι η αντιμετώπιση πρώτης γραμμής.

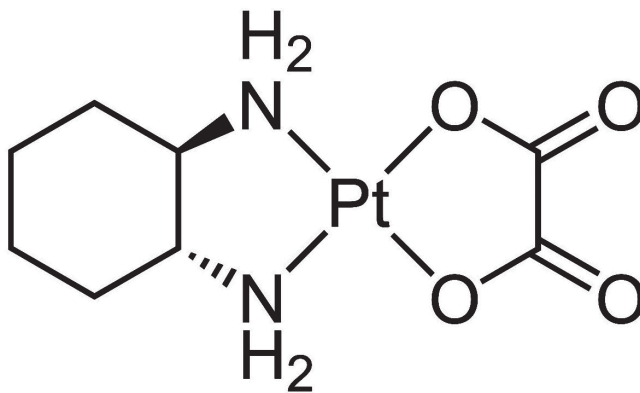
Η κυτταρική πρόσληψη της πλάτινας θεωρείται ότι γίνεται μέσω απλής παθητικής διάχυσης, ωστόσο έχει υποστηριχθεί ότι μπορεί να γίνεται και μέσω διαμεμβρανικών καναλιών, αλλά δεν έχει βρεθεί μέχρι στιγμής κάποιο συγκεκριμένο σύστημα μεταφοράς¹⁰³. Μόλις η πλάτινα εισέρθει μέσα στο κύτταρο, ενυδατώνεται και φορτίζεται θετικά ώστε να μπορεί ακολούθως να



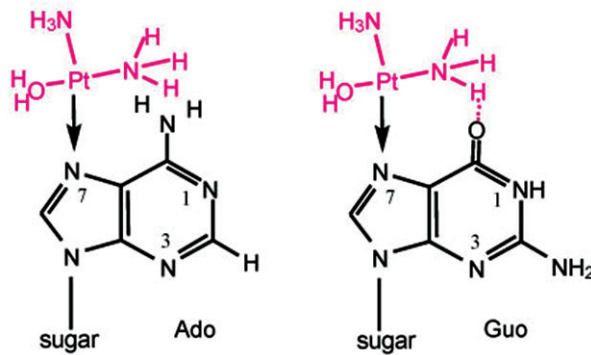
Cisplatin (1978)



Carboplatin (1989)



Εικόνα 4: Σισπλητίνη, Καρβοπλητίνη και Οξαλοπλητίνη.

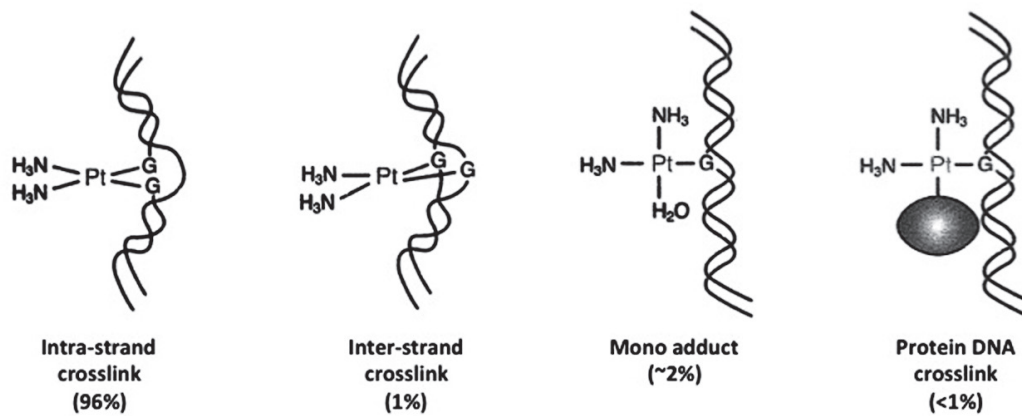


Εικόνα 5: Σύνδεση της Σισπλητίνης με τη Γουανίνη (G) και την Αδενίνη (A). Φαίνεται ότι η κινητική προσέγγιση προς τη G ευνοείται λόγω των δεσμών υδρογόνου στη θέση O₆¹⁰⁵.

αλληλεπιδράσει με κυτταρικά πυρηνόφιλα¹⁰⁴. Πυρηνόφιλες θέσεις πρόσδεσης έχουν διάφορα κυτταρικά συστατικά, όπως το DNA, το RNA, οι πρωτεΐνες, τα φωσφολιπίδια της μεμβράνης, κυτταροσκελετικά μικροϊνίδια, καθώς και διάφορες άλλες ενώσεις που περιέχουν ομάδες SH, και μπορούν να αντιδράσουν με την πηλατίνη. Ωστόσο μόνο το 1% της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης της πηλατίνης αντιδρά με το DNA¹⁰⁵.

Στα σύμπλοκα της πηλατίνης συμπεριλαμβάνονται η Σισπλητίνη (Cisplatin, C₁₂N₂H₆Pt), η Καρβοπλητίνη (Carboplatin, C₆H₁₄N₂O₄Pt) και η Οξαλοπλητίνη (Oxaliplatin, C₈H₁₄N₂O₄Pt) (Εικόνα 4)¹⁰⁶. Ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των ρυθμιστικών συμπλόκων του λευκόχρυσου και εμφανίζουν παρόμοια κυτταροτοξική δράση με αυτή των αηκυλιούντων παραγόντων που διαταράσσουν την κυτταρική λειτουργία σχηματίζοντας γέφυρες εντός και μεταξύ των ελίκων του ανθρώπινου γονιδιώματος (DNA), παρεμβαίνοντας έτσι στον αναδιπλασιασμό του, καθώς και στη μετέπειτα φάση της μεταγραφής του RNA, με απώτερο στόχο την επαγωγή της απόπτωσης¹⁰⁷. Συγκεκριμένα το στοιχείο N στη θέση 7 της γουανίνης (G) στο DNA είναι ιδιαίτερα πρόσφορο για αηκυλίωση (Εικόνα 5)¹⁰⁵.

Οι ενώσεις της πηλατίνης δημιουργούν τις DNA βλάβες σχηματίζοντας διαφόρων ειδών διασταυρούμενες/χιαστές συνδέσεις (cross-links, CLs) με τις οποίες προκύπτουν τα σύμπλοκα DNA-πηλατίνης¹⁰⁸. Από αυτά τα σύμπλοκα περίπου το 90% είναι CLs γειτονικών πουρινικών βάσεων στην ίδια έλικα DNA (intra-strand)¹⁰⁹, και συγκεκριμένα το 60-65% είναι CLs γειτονικών βάσεων γουανίνης [1,2-d(GpG)], και το 25-30% αφορούν CLs γουανίνης-αδενίνης [1,2-d(ApG)]¹¹⁰. Το υπόλοιπο σχεδόν 10% είναι μονομερή (monoadducts), CLs στην ίδια έλικα DNA μεταξύ πουρινικών βάσεων που χωρίζονται από μια τρίτη βάση [1,3-d(GpTpG)]¹¹¹, και CLs μεταξύ DNA και χρωμοσωμικών πρωτεϊνών^{112,113}, όπως ιστόνες και κυτταροκερατίνες¹¹⁴. Μόνον το 1% είναι συνδέσεις και με τις δύο DNA έλικες (inter-strand)¹¹⁵. (Εικόνα 6). Ο σχηματισμός των συμπλόκων αυτών αηλλάζει την τρισδιάστατη δομή του DNA λόγω των προσκολλημένων πηλατινούχων μετάλλων, και επίσης αηλλάζει τη θέση του και το τοποθετεί σε ασύμμετρη διάταξη γύρω από το οκταμερές των ιστονών, με απώτερο αποτέλεσμα τη διακοπή της αντιγραφής του DNA, της μεταγραφής του RNA και κατά συνέπεια του πολλαπλασιασμού του κυττάρου¹¹⁰.

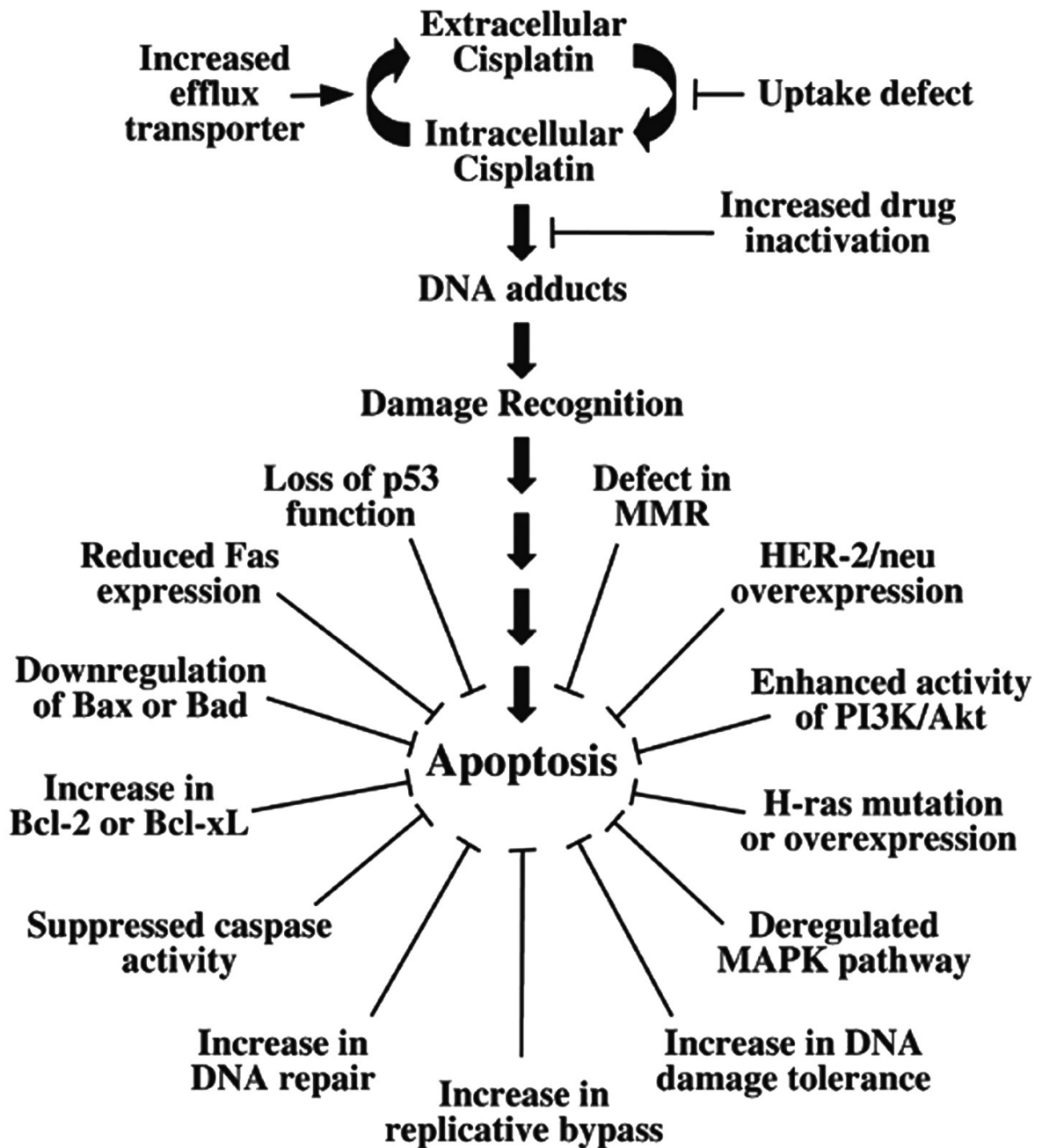


Εικόνα 6: Χιαστές συνδέσεις της σισπλατίνης εντός και μεταξύ των ελίκων του DNA.

Αν και το γενωμικό DNA θεωρείται ο κύριος φαρμακευτικός στόχος της κυτταροτοξικής δράσης της πλτατίνης, υπάρχουν ενδείξεις και για άλλους κυτταρικούς στόχους που εμπλέκονται ενεργά στην κυτταροτοξικότητά της, όπως η σύνδεσή της με το μιτοχονδριακό DNA, η διατάραξη του κυτταροσκελετού, ο πολυμερισμός της ακτίνης κ.α.¹¹⁶

Η ΧΜΘ με πλτατινούχα φάρμακα και ειδικά με τη σισπλατίνη, παρά τον ζωτικό της ρόλο στην αντιμετώπιση του προχωρημένου σταδίου ΜΜΚΠ και άλλων συμπαγών όγκων¹¹⁷, εμφανίζει διάφορες τοξικότητες όπως νεφροτοξικότητα, ωτοτοξικότητα, ναυτία/έμετος, περιφερική νευροπάθεια, μυελοκαταστολή, ηλεκτρολυτικές διαταραχές, ηπατοτοξικότητα, διάρροιες, παραισθησίες, απώλεια της ιδιοδεκτικής αισθητικότητας και αντιδράσεις υπερευαισθησίας, ανάλογα με τη δόση χορήγησης και την ανθεκτικότητα του ασθενούς¹¹⁸. Επίσης συχνά παρατηρείται η ανάπτυξη χημειοανθεκτικότητας σε ορισμένους ασθενείς, μετά από αρχική καλή απόκριση στο φάρμακο. Για να υπερνικηθούν αυτοί οι περιορισμοί, κυρίως όσον αφορά την τοξικότητα, χρησιμοποιείται συχνά ένα δεύτερης γενιάς πλτατινούχο ανάλογο, η καρβοπλτατίνη, που παρουσιάζει παρόμοιο μηχανισμό δράσης¹¹⁹. Ωστόσο, δεδομένα έδειξαν ότι η ΧΜΘ με σισπλατίνη, σε σχέση με την καρβοπλτατίνη, προσφέρει ελαφρώς καλύτερα ποσοστά ανταπόκρισης (Response Rates RR) και σε ορισμένες υποκατηγορίες ασθενών προσφέρει και μεγαλύτερη επιβίωση, χωρίς σημαντική αύξηση της τοξικότητας^{120,121}.

Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί που ενέχονται στην εμφάνιση αντοχής της πλτατίνης¹²². Άλλοι ενδογενείς (βιολογικής αιτιολογίας) και άλλοι επίκτητοι (κατά τη διάρκεια της θεραπείας)¹²³. Το αποτέλεσμα όλων αυτών είναι η αναστολή του τελικού αποπτωτικού σήματος¹²⁴. Σε ανθεκτικά στην πλτατίνη κύτταρα, συνήθως παρατηρείται πολλαπλή φαρμακευτική αντίσταση, στην οποία εμπλέκονται περισσότεροι από ένας μηχανισμός¹²⁵. Διάφοροι τέτοιοι μηχανισμοί που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία για την αντίσταση στην πλτατίνη είναι: η ανεπαρκής πρόσληψη και διάχυση του φαρμάκου, η ανεπαρκής ενεργοποίηση ή αυξημένη αδρανοποίησή του, η αυξημένη κυτταρική συγκέντρωση γλυουταθειόνης, κ.α (Εικόνα 7)¹²⁶. Ο κυριότερος ωστόσο μηχανισμός αντοχής στην πλτατίνη είναι η αυξημένη δραστηριότητα του συστήματος επιδιόρθωσης DNA βλαβών του οργανισμού (Nucleotide Excision Repair, NER)^{127,128}.



Εικόνα 7: Μηχανισμοί που εμπλέκονται στην εμφάνιση αντοχής στην πλατίνα, μέσω αναστολής του αποπτωτικού σήματος¹²⁵.

1.8 Κριτήρια ανταπόκρισης στη θεραπεία του ΜΜΚΠ

Στην ογκολογική πρακτική, είναι μείζονος σημασίας η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας που έχει επιλεχθεί, για τη διαμόρφωση της περαιτέρω θεραπευτικής στρατηγικής. Οσον αφορά τη χημειοθεραπεία, η αποτελεσματικότητα ουσιαστικά συνδέεται και με τον όρο «ανταπόκριση»¹²⁹. Υπάρχουν διάφορα συστήματα εκτίμησης της ανταπόκρισης στη ΧΜΘ¹³⁰. Τα πιο διαδεδομένα και ευρείας αποδοχής συστήματα μέτρησης της ανταπόκρισης στη θεραπεία βασίζονται σε κάποιες παραμέτρους, που μπορούν να υπολογιστούν με ακρίβεια και αξιοπιστία μέσω της κατάλληλης απεικονιστικής μεθόδου¹³¹. Οι μεταβολές της παραμέτρου αυτής μετά τη θεραπεία, έχει βρεθεί πως συσχετίζονται άμεσα με κλινικά δεδομένα όπως η συνολική επιβίωση (OS: overall survival) των ασθενών, ή ο χρόνος που μεσολαμβάνει για την εξέλιξη της νόσου (TTP: time to progression, DFS: disease-free survival)¹³². Συγκεκριμένα, τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, μέσω της κυτταροτοξικής τους δράσης προκαλούν μείωση του αριθμού των νεοπλασματικών κυττάρων, η οποία μεταφράζεται σε μείωση του μεγέθους του όγκου¹³³. Έτσι, η αντικειμενική απεικόνιση της σμίκρυνσης ή εξαφάνισης του όγκου σαν συνέπεια της θεραπείας αποτελεί την «κοινή πρακτική» για την εκτίμηση της ανταπόκρισης στη ΧΜΘ, που χρησιμοποιείται ήδη από τα τέλη της δεκαετίας του '70¹³⁴.

Το 1979 δημοσιεύτηκαν τα πρώτα τυποποιημένα κριτήρια ανταπόκρισης από τον ΠΟΥ και εφαρμόστηκαν διεθνώς¹³⁵. Για τις μετρήσιμες βλάβες, το μέγεθος του όγκου βασιζόταν στο γινόμενο δύο διαστάσεων: της μέγιστης διαμέτρου του όγκου (σε τομές εγκάρσιας απεικόνισης) επί τη μέγιστη κάθετη σε αυτή διάμετρο¹³⁶. Για μη μετρήσιμες βλάβες, η εκτίμηση ήταν υποκειμενική. Τα κριτήρια ανταπόκρισης τέθηκαν αναγκαστικά αυθαίρετα και ουσιαστικά χωρίστηκαν σε 4 μεγάλες κατηγορίες¹³⁵, κατά τις οποίες η ανταπόκριση ταξινομείται σύμφωνα με τη μεταβολή επί τοις εκατό (Δ) του μεγέθους του όγκου πριν και μετά τη θεραπεία σύμφωνα με την εξίσωση¹³³:

$$\Delta = \frac{[(\text{μέγεθος μετά τη θεραπεία}) - (\text{μέγεθος πριν τη θεραπεία})]}{(\text{μέγεθος πριν τη θεραπεία})} \times 100$$

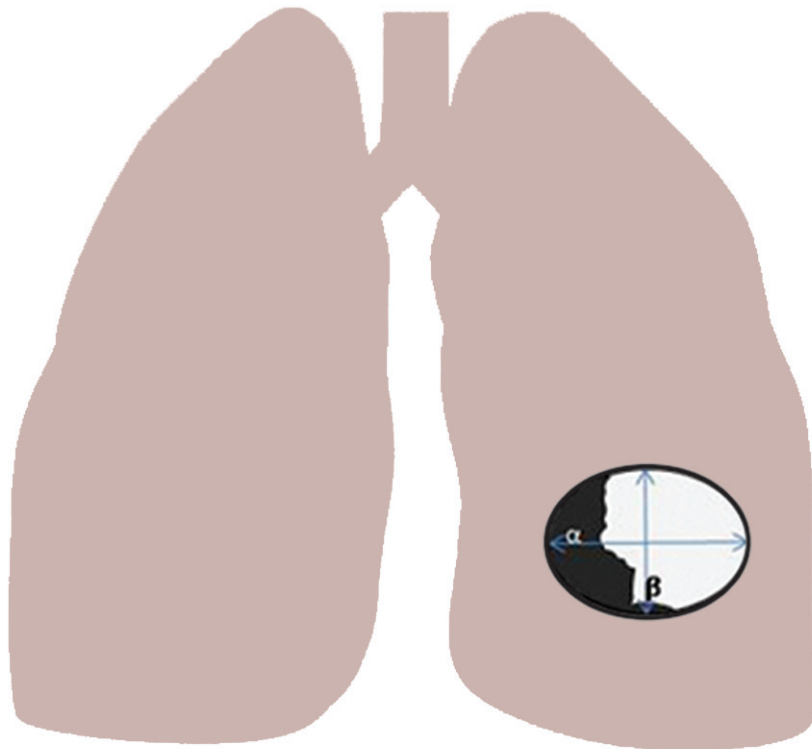
Στην περίπτωση πολλαπλών όγκων, τα αποτελέσματα των διαφόρων μεταβολιών προστίθενται. Συγκεκριμένα οι 4 κατηγορίες ανταπόκρισης προσδιορίζονται ως εξής:

- Πλήρης ανταπόκριση (Complete Response-CR): ορίζεται η πλήρης εξαφάνιση της συνολικής νόσου.
- Μερική ανταπόκριση (Partial Response-PR): ορίζεται η μείωση $\geq 50\%$ της συνολικής νόσου, είτε αντικειμενικά για τις μετρήσιμες βλάβες, είτε υποκειμενικά για τις μη μετρήσιμες βλάβες.
- Επιδείνωση ή πρόοδος της νόσου (Progressive Disease-PD): ορίζεται η αύξηση $\geq 25\%$ είτε της συνολικής νόσου, είτε μιας μεμονωμένης βλάβης (που αντιστοιχεί σε $\geq 40\%$ αύξηση του τρισδιάστατου όγκου της νόσου), ή η εμφάνιση νέας βλάβης.
- Σταθερή νόσος (Stable Disease-SD): ορίζονται οι περιπτώσεις που δεν εμπίπτουν στις ανωτέρω κατηγορίες.

Με τον όρο «αντικειμενικά ποσοστά ανταπόκρισης» (Objective Response Rates, ORR), σύμφωνα με τον ΠΟΥ ορίζεται το ποσοστό των ασθενών που ανήκουν στις ομάδες CR και PR, με ελάχιστο χρόνο παρακολούθησης (Follow up, FU) τις τέσσερις εβδομάδες μετά το τέλος της θεραπείας¹³⁷.

Ωστόσο, υπήρξαν αρκετά σημεία στα οποία το σύστημα του ΠΟΥ δέχθηκε κριτική και πολλές προσπάθειες έγιναν για την εξομάλυνση αυτών των προβλημάτων¹³⁴, τα οποία πολλές φορές οδήγησαν σε ασυμφωνία πολλών ερευνητικών ομάδων¹³⁶. Κάποια από αυτά τα προβλήματα αφορούσαν το γεγονός ότι δεν διευκρινίζεται σαφώς ποια απεικονιστική μέθοδος πρέπει να χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της ανταπόκρισης, ούτε ορίζεται ο αριθμός και το ελάχιστο μέγεθος των βλαβών-στόχων^{133,136}. Επίσης ο αυθαίρετος ορισμός του 25% για την επιδείνωση της νόσου, δεν εφαρμόστηκε από όλους για το σύνολο της νόσου, αλλά για μεμονωμένες βλάβες, καθώς επίσης από κάποιους θεωρήθηκε ιδιαίτερα χαμηλός, με αποτέλεσμα μερικές φορές να υπερεκτιμάται το ποσοστό των ασθενών που παρουσιάζουν επιδείνωση^{133,138}. Ένα ακόμα βασικό σημείο κριτικής ήταν το γεγονός ότι τα κριτήρια του ΠΟΥ βασίζονταν σε μετρήσεις δύο διαστάσεων επειδή με την τεχνολογία απεικόνισης εκείνης της εποχής δεν ήταν δυνατόν να μετρηθεί αλληλώς ο όγκος των νεοπλασματικών βλαβών¹³⁹. Αυτό όμως είχε σαν συνέπεια οι μετρήσεις να βασίζονται στην παραδοχή ότι οι βλάβες ήταν σφαιρικές, κάτι που με την εισαγωγή νέας τεχνολογίας τρισδιάστατης απεικόνισης φάνηκε ότι δεν ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα¹³⁷. Όλα αυτά τα προβλήματα συντέλεσαν τελικά στη μη δυνατότητα σύγκρισης των αποτελεσμάτων από διαφορετικές μελέτες και κλινικές δοκιμές, αυτό δηλαδή που εξαρχής η υιοθέτηση των κριτηρίων του ΠΟΥ στόχευε να διορθώσει¹³⁶.

Με στόχο να διορθωθούν οι ανωτέρω αδυναμίες, και να μπορούν να πραγματοποιηθούν ουσιαστικές συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων μελετών, προτάθηκαν το 2000 τα κριτήρια αξιολόγησης της ανταπόκρισης σε συμπαγείς όγκους (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors-RECIST)¹³⁶ από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό για την Έρευνα και Θεραπεία του Καρκίνου (European Organisation for Research and Treatment of Cancer, EORTC) και από τα Εθνικά Αντικαρκινικά Ινστιτούτα των Ηνωμένων Πολιτειών και του Καναδά (National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada). Στα RECIST κριτήρια αναγνωρίζεται ο καίριος ρόλος της απεικόνισης στην αξιολόγηση της απόκρισης, και ορίζονται ειδικές και αναλυτικές κατευθυντήριες γραμμές απεικόνισης και αξιολόγησης¹³⁶. Επίσης, για τη μέτρηση του μεγέθους των βλαβών χρησιμοποιείται μία μόνο διάσταση και όχι το γινόμενο δύο διαστάσεων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται η μέγιστη εγκάρσια διάμετρος, γεγονός που απλουστεύει και διευκολύνει τις μετρήσεις πολλαπλών βλαβών σε σχέση με το σύστημα WHO (Εικόνα 8)¹³⁷. Ακόμη, καθορίζεται πλήρως το είδος και ο αριθμός των βλαβών που επιλέγονται για την εκτίμηση της ανταπόκρισης¹⁴⁰. Συγκεκριμένα, ο αριθμός των μετρήσιμων βλαβών-στόχων δεν πρέπει να υπερβαίνει τις 10 συνολικά και τις 5 ανά συγκεκριμένο όργανο. Μετρήσιμες θεωρούνται οι βλάβες που μπορούν να μετρηθούν με ακρίβεια σε τουλάχιστον μία διάσταση με μεγαλύτερη διάμετρο ≥ 10 χιλ. με ελικοειδή αξονική τομογραφία (Computed Tomography, CT), και ≥ 20 χιλ. με συμβατικές απεικονιστικές μεθόδους (απλή CT, ή ακτινογραφία θώρακος). Μη μετρήσιμες θεωρούνται οι βλάβες με μεγαλύτερη διάμετρο < 20 χιλ. με τις συμβατικές μεθόδους, και < 10 mm με την ελικοειδή CT, καθώς και αρκετές άλλες μη μετρήσιμες νεοπλασματικές εκδηλώσεις όπως οστικές βλάβες, ηπατομυογική

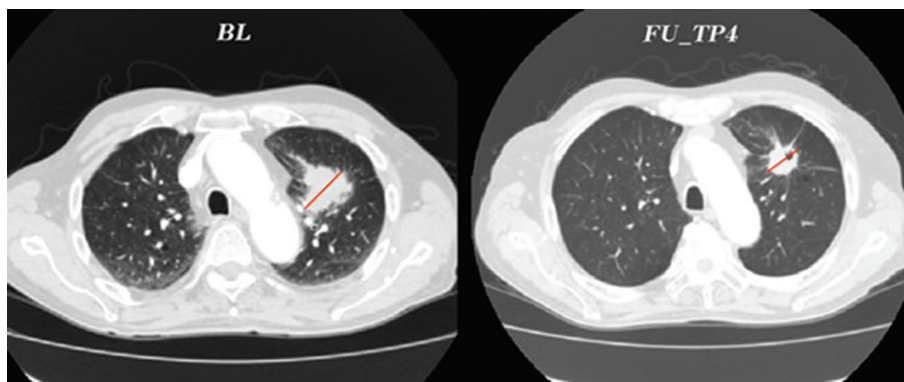


Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση των μετρήσεων στις οποίες βασίζονται τα δύο βασικότερα κριτήρια ανταπόκρισης. Τα κριτήρια του ΠΟΥ βασίζονται στο γινόμενο $a \times b$, δηλαδή στο γινόμενο της μέγιστης εγκάρσιας διαμέτρου του όγκου (a), επί τη μέγιστη κάθετη σε αυτή διάμετρο (b). Τα κριτήρια RECIST βασίζονται μόνο στη μέγιστη εγκάρσια διάμετρο του όγκου (a).

νόσος, ασκίτης, υπεζωκοτική και περικαρδιακή συλλογή, φλεγμονώδης νόσος του μαστού, λεμφαγγειακή διασπορά των πνευμόνων, κυστικές ή νεκρωτικές βλάβες, κα¹³⁶.

Η αντικειμενική ανταπόκριση (Objective Response-OR) στα κριτήρια RECIST παραμένει η ίδια με τα κριτήρια του ΠΟΥ και προκύπτει από το άθροισμα των περιπτώσεων CR και PR το νωρίτερο στις 4 εβδομάδες παρακολούθησης από την έναρξη της θεραπείας. Για τις περιπτώσεις SD, η επαναξιολόγηση θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της κάθε μελέτης (συνήθως στις 6-8 εβδομάδες). Επίσης παραμένουν οι 4 κατηγορίες ανταπόκρισης και ορίζονται ως εξής:

- Πλήρης ανταπόκριση εξακολουθεί να ορίζεται η πλήρης εξαφάνιση όλων των βλαβών στόχων.
- Μερική ανταπόκριση ορίζεται η μείωση κατά $\geq 30\%$ του αθροίσματος των μεγαλύτερων διαστάσεων όλων των βλαβών στόχων.
- Πρόοδος νόσου ορίζεται η αύξηση κατά $\geq 20\%$ του αθροίσματος των μεγαλύτερων διαστάσεων των βλαβών στόχων (που αντιστοιχεί σε $\geq 73\%$ αύξηση του τρισδιάστατου όγκου της νόσου) ή η εμφάνιση μιας ή περισσότερων νέων βλαβών.



Εικόνα 9: Μέτρηση βλάβης-στόχου στον πνεύμονα, στη μεγαλύτερή της διάμετρο, βάσει των κριτηρίων RECIST 1.1. Η μέτρηση πρέπει να συνεχίζεται ακόμα κι όταν εντός της βλάβης έχει αναπτυχθεί νέκρωση¹⁴⁴.

- Σταθερή νόσος ορίζεται είτε η μη επαρκής μείωση (<30%) για να υπάρχει μερική ανταπόκριση ή η μη επαρκής αύξηση (<20%) για να υπάρχει επιδείνωση της νόσου. Η συνολική ανταπόκριση προσδιορίζεται από τον συνδυασμό των ανταποκρίσεων στις μετρητές και μη μετρητές βλάβες.

Το σύστημα RECIST έκδοσης 1.0 υιοθετήθηκε από πολλές κλινικές δοκιμές και είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος αξιολόγησης της ανταπόκρισης στη θεραπεία¹⁴¹. Το 2009 έγιναν περαιτέρω τροποποιήσεις και προέκυψε το αναθεωρημένο σύστημα RECIST έκδοσης 1.1 (Εικόνα 9), για την επιπρόσθετη βελτίωση, απλοποίηση και τυποποίηση της αξιολόγησης της ανταπόκρισης στη θεραπεία¹⁴². Η έκδοση αυτή των αναθεωρημένων RECIST προβλέπει τις εξής αλλαγές/διευκρινήσεις¹⁴³:

- Μείωση του αριθμού των βλαβών στόχων σε έως 5 (αντί για 10) συνολικά και έως 2 (αντί για 5) ανά όργανο, συντομεύοντας έτσι κατά 70% τις διαδικασίες μέτρησης¹³³.
- Ως παθολογικοί λεμφαδένες θεωρούνται εκείνοι με μικρότερη διάμετρο ≥ 10 χιλ., αλλά ως βλάβη-στόχος θεωρείται ένας λεμφαδένας αν η μικρότερη διάμετρος του είναι ≥ 15 χιλ. Οι μετρήσεις που καταγράφονται αφορούν τον μικρό άξονα της βλάβης. Οι λεμφαδένες θεωρούνται ξεχωριστό όργανο.
- Για την πρόοδο νόσου, επιπλέον της αύξησης κατά $\geq 20\%$ του αθροίσματος των μεγαλύτερων διαστάσεων των βλαβών-στόχων, θα πρέπει να υπάρχει και αύξηση στο απόλυτο μέγεθος των βλαβών-στόχων κατά 5 χιλ. τουλάχιστον.
- Επίσης, λαμβάνονται υπόψη (αν υπάρχουν) και τα ευρήματα του FDG-PET (Fludeoxyglucose Positron Emission Tomography), αλλά μόνο σαν συμπληρωματικά των ευρημάτων της αξονικής τομογραφίας ή της μαγνητικής τομογραφίας (Magnetic Resonance, MR).

Όλα τα προαναφερθέντα συστήματα αξιολόγησης της ανταπόκρισης βασίζονται σε γραμμικές μετρήσεις των βλαβών-στόχων, θεωρώντας, χάριν απλότητας, ότι οι βλάβες αυτές έχουν σφαιρικό σχήμα. Αυτό όμως συχνά είναι υπεραπλοΐστευση, καθώς αρκετοί όγκοι (κυρίως οι μεγάλοι) έχουν ακανόνιστο σχήμα, ή μπορεί να αποκτήσουν τέτοιο στην πορεία της θεραπείας¹³³. Στις περιπτώσεις αυτές, η ογκομετρική μελέτη των βλαβών-στόχων πριν και μετά τη θεραπεία φαίνεται ότι προσφέρει πιο αντικειμενική εκτίμηση της ανταπόκρισης¹⁴⁵. Η ογκομετρική μελέτη είναι σαφώς πιο περίπλοκη από τις γραμμικές μετρήσεις, μπορεί όμως να γίνει σε εξετάσεις CT ή MR, με κατάλληλο λογισμικό και με αυτόματο ή ημιαυτόματο τρόπο, μειώνοντας σημαντικά τον απαιτούμενο χρόνο και φόρτο εργασίας. Επίσης, η ογκομέτρηση επιτυγχάνει την ανίχνευση μικρών αλλαγών του μεγέθους του όγκου ως απόκριση στη θεραπεία, προβλέπει σε μικρότερο χρονικό διάστημα τέτοιες αλλαγές και παράγει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα¹³³. Μέχρι σήμερα πάντως η ογκομετρική μελέτη τρισδιάστατης τεχνικής δεν έχει ενσωματωθεί σε κάποιο ευρέως αποδεκτό σύστημα ελέγχου της θεραπευτικής ανταπόκρισης¹⁴⁶.

1.9 Προγνωστικοί/προβλεπτικοί παράγοντες ΜΜΚΠ

Η διεθνής βιβλιογραφία βρίθει από προγνωστικούς και προβλεπτικούς δείκτες επιβίωσης για τον ΜΜΚΠ. Άλλοι παράγοντες σχετίζονται με τον όγκο και άλλοι με τον ασθενή¹⁴⁷.

Οι κυριότεροι παράγοντες που σχετίζονται άμεσα με τα χαρακτηριστικά και τις συνήθειες του ασθενούς συνοψίζονται ως εξής:

- 1) Οι ηλικίες < 70 χρόνων παρουσιάζουν ευνοϊκότερα ποσοστά επιβίωσης^{148,149}.
- 2) Η απώλεια σωματικού βάρους σχετίζεται με χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης^{148,150}.
- 3) Ο δείκτης λειτουργικής κατάστασης του ασθενούς (PS)¹⁴⁸ της πεντάβαθμης κλίμακας που εισήχθη από τον C.G. Zubrod και υιοθετήθηκε από την Ανατολική Συνεργατική Ογκολογική Ομάδα (Eastern Cooperative Oncologic Group, ECOG) και από τον ΠΟΥ¹⁵¹.
- 4) Η σχετιζόμενη με την υγεία ποιότητα ζωής (Health Related Quality of Life, HRQoL)^{152,153}.
- 5) Το άγχος και η κατάθλιψη έχουν δείξει επίσης να επηρεάζουν την πρόγνωση της νόσου¹⁵².
- 6) Το γυναικείο φύλο παρουσιάζει καλύτερη πρόγνωση, ακόμα και μετά από στατιστική προσαρμογή των άλλων παραγόντων κινδύνου που διαφοροποιούνται ανάμεσα στα δύο φύλα, όπως μέσο προσδόκιμο επιβίωσης, συνήθειες καπνίσματος, κλπ¹⁵⁴.
- 7) Ο ρόλος του καπνίσματος στον ΜΜΚΠ ως θετικός προγνωστικός παράγοντας ή παράγοντας πρόβλεψης μιας καλύτερης χημειοευαισθησίας σε συστηματικές θεραπείες είναι ακόμα υπό έρευνα¹⁵⁵.

Οι σημαντικότεροι παράγοντες που αφορούν τα χαρακτηριστικά του όγκου συνοψίζονται ως εξής:

- 1) Η έκταση της νόσου, και το στάδιο κατά τη διάγνωση αναφέρονται ως οι πιο ισχυροί προγνωστικοί δείκτες του μέσου χρόνου επιβίωσης των ασθενών που υποβάλλονται σε συστηματική χημειοθεραπεία^{147,156}.
- 2) Η πιθανότητα ατελούς εκτομής του όγκου στα χειρουργήσιμα στάδια αποτελεί ισχυρό αρνητικό παράγοντα πρόγνωσης¹⁵⁶.

- 3) Ο ιστολογικός τύπος του όγκου και δη το αδενοκαρκίνωμα εμφανίζεται ως ανεξάρτητος αρνητικός προγνωστικός δείκτης επιβίωσης¹⁵⁶.
- 4) Ο βαθμός διαφοροποίησης των κυττάρων του όγκου έχει αναφερθεί ως ισχυρός και ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας, καθώς τα χαμηλής διαφοροποίησης ή αδιαφοροποίητα καρκινώματα έχουν έως 70% υψηλότερο κίνδυνο θανάτου¹⁵⁷.

Ωστόσο, επειδή ασθενείς ίδιου σταδίου και ιστοπαθολογίας μπορεί να παρουσιάσουν σημαντικά διαφορετική επιβίωση, είναι αναγκαίες περισσότερες προγνωστικές πληροφορίες για την καλύτερη κλινική αντιμετώπιση. Η πρόοδος στη μοριακή βιολογία επέτρεψε την ανάλυση πρωτεϊνών και γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου. Καθώς υπάρχουν πολλές μοριακές/γενετικές αλληλαγές που συνοδεύουν την παθογένεση αυτής της κακοήθειας, υπάρχει και μια ποικιλία παραγόντων που επηρεάζουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, και την ανθεκτικότητα στα φάρμακα. Οι παράγοντες αυτοί φαίνεται πως αποκτούν προγνωστικό ή/και προβλεπτικό ρόλο στην εξέλιξη της νόσου, αλλά και στην εφαρμογή νέων θεραπειών¹⁵⁸.

Ο προγνωστικός ρόλος της αγγειογένεσης έχει εξεταστεί διεξοδικά με τη χρήση ειδικών μονοκλωνικών αντισωμάτων, τα οποία αναγνωρίζουν το ενδοθήλιο και βοηθούν στη μέτρηση της πυκνότητας των μικροαγγείων (microvessel density - MVD). Στον ΜΜΚΠ, η υψηλή MVD έχει ενοχοποιηθεί ως ένας από τους πιο σημαντικούς και ανεξάρτητους δείκτες που καθορίζουν κακή μεταχειρητική πορεία της νόσου, καθώς αυξάνει την ανάπτυξη του όγκου και τη μεταστατική του δυνατότητα¹⁵⁹. Συγκεκριμένα, η έκφραση του VEGF και της φωσφορυλίσης της θυμιδίνης θεωρούνται σημαντικοί προβλεπτικοί παράγοντες στον ΜΜΚΠ¹⁶⁰. Επίσης, η παρουσία μοριακών δεικτών στον όγκο, και ειδικότερα η θυμιδυλική συνθάση (TS), καθώς και οι μεταλλάξεις των EGFR¹⁶¹ (Epidermal Growth Factor) και K-ras, αποτελούν έως σήμερα τους πιο διαδεδομένους βιολογικούς προγνωστικούς ή/και προβλεπτικούς παράγοντες που σχετίζονται με τις θεραπείες με pemetrexed, gefitinib, erlotinib και cetuximab στην αντιμετώπιση των ασθενών με προχωρημένο ΜΜΚΠ¹⁶².

Κάπως έτσι ξεκίνησε η στροφή προς τη μοριακή ταξινόμηση των όγκων για την προώθηση εξατομικευμένων θεραπειών ανάλογα με το μοριακό προφίλ του όγκου με στόχο πάντα την καλύτερη ανταπόκριση στη χορηγούμενη θεραπεία και τη βελτίωση της επιβίωσης¹⁶³. Παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε προβλεπτικούς γονιδιακούς/βιολογικούς δείκτες, δεν υπάρχει ακόμη κάποιος τέτοιος δείκτης που να επικυρώνεται από μεγάλες προοπτικές μελέτες και που να έχει σημαντική ανεξάρτητη προβλεπτική αξία όσον αφορά το συχνότερα χορηγούμενο χημειοθεραπευτικό φάρμακο στον προχωρημένου σταδίου ΜΜΚΠ, την πλατίνη. Πολλοί δυνητικοί προβλεπτικοί παράγοντες είναι ήδη υπό διερεύνηση για την πιθανή κλινική χρησιμότητά τους, και λόγω της ετερογένειας όσον αφορά την ευαισθησία των ασθενών με ΜΜΚΠ στην πλατίνη, είναι σε εξέλιξη πολλές έρευνες προκειμένου να εντοπισουν μοριακούς προβλεπτικούς δείκτες αντίστασης. Σύμφωνα με τον μηχανισμό δράσης της πλατίνης, ως πιθανοί δείκτες πρόβλεψης έχουν μελετηθεί διάφοροι παράγοντες που εμπλέκονται στα μονοπάτια επιδιόρθωσης DNA βλαβών¹⁶⁴. Η κύρια οδός επιδιόρθωσης DNA βλαβών από πλατίνη είναι το μονοπάτι επιδιόρθωσης νουκλεοτιδικών βλαβών του DNA (Nucleotide Excision Repair, NER)¹⁶⁵, και ο πιο δημοφιλής προς έρευνα παράγοντας αυτού του μονοπατιού είναι το γονίδιο ERCC1 (Excision Repair Cross Complementing-1).

Τα γονίδια ERCC1, XPA, XPF, MZF1

2.1 Μονοπάτι επιδιόρθωσης νουκλεοτιδικών βλαβών

Όλα τα κύτταρα διαθέτουν μηχανισμούς για την επιδιόρθωση του αλκυλιωμένου DNA που προκαλείται από την κυτταροτοξική δράση των αναλόγων της πλάτινας, με σκοπό τη διατήρηση της λειτουργικής του ακεραιότητας^{166,167}. Δομικά, παρόμοιες βλάβες στο DNA παρατηρούνται και μετά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία¹⁶⁸, την έκθεση σε περιβαλλοντικά μεταλλαξιογόνα¹⁶⁹ όπως, βενζο[α]πυρένιο, αρυλαμινικά καρκινογόνα ή αρωματικούς πολυκυκλικούς υδρογονάνθρακες, καρκινογόνα του καπνού, αλλά και από ενδογενείς οξειδωτικές διεργασίες¹⁷⁰. Αν αυτές οι γενωμικές αλλοιώσεις δεν διορθωθούν, οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο ή σε μεταλλάξεις¹⁷¹. Η προσπάθεια να γίνει κατανοητός ο ρόλος των πρωτεϊνών και των γονιδίων που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA έχει γίνει ένας από τους κύριους στόχους της έρευνας για την εξατομικευμένη θεραπεία¹⁷².

Το μονοπάτι επιδιόρθωσης (εκτομής) νουκλεοτιδικών βλαβών (Nucleotide Excision Repair, NER), που είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της ακεραιότητας της γονιδιωματικής πληροφορίας, έχει ενοχοποιηθεί την τελευταία δεκαετία για την εμπλοκή του στην εμφάνιση αντοχής στη θεραπεία με βάση την πλάτινα σε διάφορους τύπους καρκίνου¹⁷³. Εκ γενετής μειωμένη λειτουργία του μονοπατιού NER προκαλεί τη Μελαγχρωματική Ξηροδερμία (Xeroderma Pigmentosum-XP), μια αυτοσωμική υπολειπόμενη ασθένεια με έντονη φωτοευαισθησία και εξαιρετικά υψηλή προδιάθεση για καρκίνο του δέρματος¹⁷⁴. Χαρακτηρίζεται από μειωμένη ικανότητα επιδιόρθωσης DNA βλαβών που προκαλούνται από την υπεριώδη ακτινοβολία¹⁷⁵. Τουλάχιστον 8 κληρονομούμενες μορφές Μελαγχρωματικής Ξηροδερμίας έχουν εντοπιστεί έως τώρα (Τύπος A έως G) που οφείλονται σε μεταλλάξεις σε οποιοδήποτε από τα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες XP A-G, οι οποίες είναι ζωτικής σημασίας για την επαρκή λειτουργία του NER¹⁷⁶. Η δυσλειτουργία του NER προκαλεί επίσης την εμφάνιση νευρο-αναπτυξιακών διαταραχών¹⁷⁷. Τέτοιες είναι το νευροεκφυλιστικό Σύνδρομο Cockayne (Cockayne's syndrome, CS) που χαρακτηρίζεται από καχεκτικό νανισμό, ανωμαλίες του κεντρικού νευρικού συστήματος, όπως προοδευτική νευροαισθητήρια κώφωση, και πρόωρη γήρανση¹⁷⁸, καθώς και η εκφυλιστική Τριχοθειοδυστροφία (Trichothiodystrophy, TTD)¹⁷⁹, που χαρακτηρίζεται από υπερβολικά εύθραυστα μαλλιά, μειωμένη μυελίνωση του εγκεφάλου, συγγενή καταρράκτη ματιών και άλλες νευρολογικές διαταραχές¹⁸⁰. Πρόκειται για πλήρως διακριτές γενετικές ανωμαλίες, όλες κληρονομούμενες με τον αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα¹⁸¹. Οι διαταραχές αυτές απέδειξαν κλινικά και εργαστηριακά ότι βλάβες που διαταράσσουν τη λειτουργία του μονοπατιού NER προκαλούν πρόωμη γήρανση ή καρκίνο¹⁸².

Ο μηχανισμός NER χωρίζεται σε δύο μονοπάτια με παρόμοια ουσιαστικά λειτουργία, το

Global Genome NER (GG-NER) και το Transcription Coupled NER (TC-NER)¹⁸³. Το μονοπάτι GG-NER αφορά την αναγνώριση και επιδιόρθωση βλαβών, όταν χρειαστεί, σε οποιοδήποτε τμήμα του DNA, μέσω της σχολιαστικής ανίχνευσης του γονιδιώματος για βλάβες που στρεβλώνουν την έλικα του DNA, αποτρέποντας έτσι τη μεταλητασιογένεση. Κατά συνέπεια, δυσλειτουργία του GG-NER οδηγεί σε προδιάθεση για καρκίνο¹⁸⁴. Το μονοπάτι TC-NER μπορεί να ενεργοποιηθεί και να λειτουργήσει για την επιδιόρθωση βλαβών που εντοπίζονται στον υπό μεταγραφή κλώνο ενεργών γονιδίων¹⁸⁵. Πρόκειται για βλάβες που ουσιαστικά εμποδίζουν τη μεταγραφή και επομένως διαταράσσουν τη γονιδιακή έκφραση, οδηγώντας πολλές φορές σε κυτταρικό θάνατο^{184,186}. Δυσλειτουργία στο TC-NER οδηγεί σε μια ποικιλία ασθενειών, όπως το σύνδρομο Cockayne¹⁸⁶.

Η επιδιόρθωση που συντελείται από το NER είναι μια πολυσταδιακή διαδικασία¹⁸⁷. Απαρτίζεται από 5 ευδιάκριτα στάδια στα οποία λαμβάνει μέρος διαδοχικά και συνεργατικά μια πλειάδα παραγόντων, αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους μέσω ειδικά δομημένων ρυθμιστικών περιοχών (Εικόνα 10)¹⁸⁸:

Στάδιο 1: Αναγνώριση της βλάβης

Το πρώτο αυτό βήμα αποτελεί και τον παράγοντα διαφοροποίησης μεταξύ GG & TC NER. Το TC-NER ενεργοποιείται όταν μια βλάβη παρεμποδίζει τη μετατόπιση της RNA II πολυμεράσης¹⁸⁹, ενώ το GG-NER ενεργοποιείται από εξειδικευμένους παράγοντες αναγνώρισης βλαβών που αποσταθεροποιούν θερμοδυναμικά το DNA, όπως το σύμπλοκο XPA-RPA (Xeroderma Pigmentosum A - Replication Protein A), το ετεροδιμερές XPC-RAD23B και οι πρωτεΐνες UV-DDB¹⁹⁰.

Στάδιο 2: Εκτύλιξη της DNA έλικας και επιβεβαίωση της βλάβης

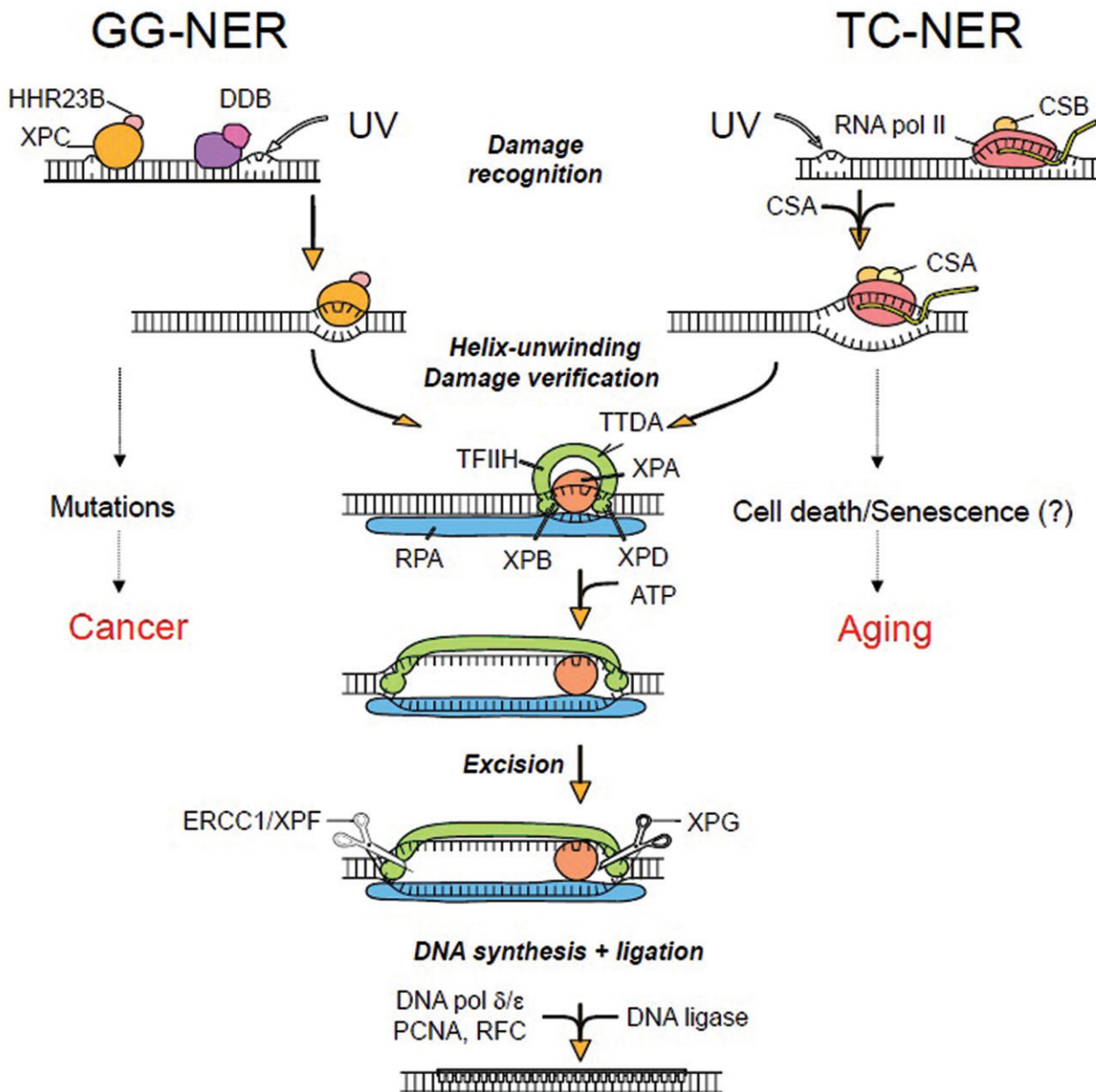
Το ετεροδιμερές XPC-RAD23B στρατολογεί τον μεταγραφικό παράγοντα IIIH (Transcriptor Factor IIIH – TFIIH), ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που είναι υπεύθυνο για την εκτύλιξη του DNA γύρω από τη θέση της βλάβης, και που περιλαμβάνει τις ελικάσες XPB (ονομάζεται και ERCC3 σε μελέτες με ποντίκια)¹⁹¹ και XPD (ERCC2)¹⁹². Η XPB εκτυλίσσει την DNA έλικα σε κατεύθυνση 3' προς 5', ενώ η XPD σε κατεύθυνση 5' προς 3'¹⁹³. Στη συνέχεια η XPA επιβεβαιώνει τη βλάβη στην ανοιγμένη έλικα. Η RPA προσδένεται στην έλικα που δεν φέρει βλάβη, σταθεροποιεί την ανοιγμένη διάταξη του DNA και βοηθάει στη σωστή τοποθέτηση των ενδονουκλεασών που εμπλέκονται στο επόμενο βήμα της διαδικασίας¹⁹⁴.

Στάδιο 3: Εκτομή της βλάβης

Διπλή τομή της πολυνουκλεοτιδικής αλυσού περιφερικά της βλάβης γίνεται από δύο ειδικής δομής εγκοπτικές ενδονουκλεάσες, το σύμπλοκο ERCC1-XPF και την XPG¹⁹⁵. Η XPG τοποθετείται στο σημείο της βλάβης από την RPA και το σύμπλοκο TFIIH, και πραγματοποιεί την τομή της DNA αλυσού στο 3' άκρο της. Το σύμπλοκο ERCC1-XPF τοποθετείται στο σημείο της βλάβης από την RPA και την XPA και τέμνει την DNA αλυσίδα στο 5' άκρο της βλάβης της, οδηγώντας έτσι στην απελευθέρωση του ολιγονουκλεοτιδίου (συνήθως μήκους 25-32 νουκλεοτιδίων) που περιέχει τη βλάβη¹⁹⁶.

Ο ακριβής χρονικός συντονισμός των δύο τομών δεν έχει διευκρινιστεί επαρκώς.

Πειράματα έχουν δείξει ότι οι τομές στα 2 άκρα τις βλάβης μπορούν να γίνουν και χρονικά ανεξάρτητα σε ορισμένες περιπτώσεις¹⁹⁷ και συγκεκριμένα ότι η τομή στο 3' άκρο από την XPG προηγείται αυτής στο 5' άκρο που πραγματοποιείται από το σύμπλοκο ERCC1-XPF¹⁹⁸. Ωστόσο, μια πιο πρόσφατη μελέτη υποστηρίζει το αντίστροφο, ότι δηλαδή η τομή από το σύμπλοκο ERCC1-XPF προηγείται εκείνης από την XPG¹⁹⁹. Υπό έρευνα βρίσκεται επίσης η τύχη του ολιγονουκλεοτιδίου που φέρει τη βλάβη μετά την εκτομή του. Μελέτες υποστηρίζουν ότι απομακρύνεται από την χρωματίνη από τον TFIIH και την RPA²⁰⁰ ή από τον TFIIH και την XPG²⁰¹.



Εικόνα 10: Μοριακό μοντέλο NER.

Στάδιο 4: Σύνθεση νέου τμήματος DNA

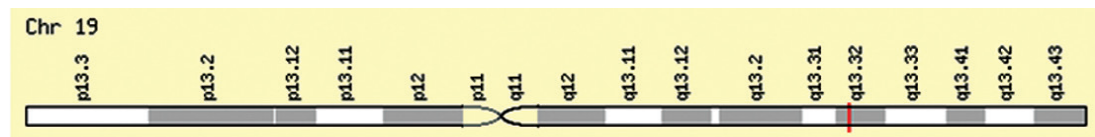
Το κενό που δημιουργείται μετά την εκτομή της βλάβης καλύπτεται με τη σύνθεση του νέου «υγιούς» πολυνουκλεοτιδίου, που επιτυγχάνεται με τη συνδυασμένη δράση της DNA πολυμεράσης δέλτα ή έψιλον, και την παρουσία του πυρηνικού αντιγόνου πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA), καθώς και του παράγοντα αναπαραγωγής C (Replication Factor C, RFC). Εν συντομία, ο RFC προσδένεται στο 3' άκρο των εκκινητών του νέου τμήματος DNA και διευκολύνει την πρόσδεση του PCNA, ο οποίος στη συνέχεια λειτουργεί ως πλατφόρμα σύνδεσης για τις DNA πολυμεράσες²⁰².

Στάδιο 5: Τελική αποκατάσταση της τομής

Τέλος, η σύνδεση του 5' άκρου του νέου «υγιούς» ολιγονουκλεοτιδίου πάνω στην πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα εκτελείται από την DNA λιγάση I²⁰³.

2.2 Δομή και λειτουργία των γονιδίων ERCC1 και XPF

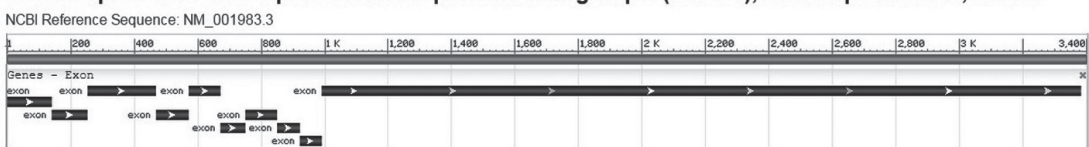
Το γονίδιο Excision Repair Cross-Complementation 1 (ERCC1) (Εικόνα 11) κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1984 και βρέθηκε να προσδίδει κυτταρική αντοχή στην υπερίωδη ακτινοβολία και στη μιτομυκίνη-C²⁰⁴. Το ανθρώπινο ERCC1 έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 19, στη θέση 19q13.2-13.32, αποτελείται από 10 εξώνια²⁰⁵ και εκτείνεται σε 78496 ζεύγη βάσεων (base pairs, bp)²⁰⁶. Είναι αξιοσημείωτο ότι στην ίδια περιοχή του χρωμοσώματος 19 βρίσκονται 3 γονίδια επιδιόρθωσης γενετικών βλαβών, τα ERCC1, ERCC2 και XRCC1²⁰⁷.



Εικόνα 11: Γονιδιωματική θέση του ERCC1²⁰⁸.

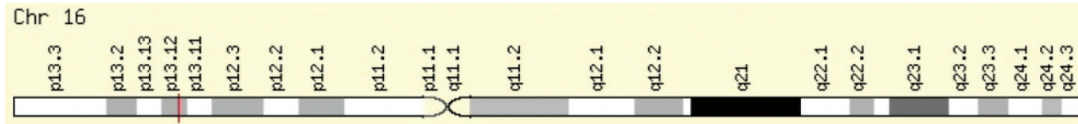
Το ERCC1 πρόδρομο RNA υπόκειται σε εναλλακτικό μάτισμα οδηγώντας στην κωδικοποίηση διάφορων ισομορφών, οι οποίες στο μεγαλύτερο μέρος τους δεν έχουν ακόμα χαρακτηριστεί εκτενώς²⁰⁵. Η ισομορφή 2 αντιστοιχεί στο μεγαλύτερο μετάγραφο του γονιδίου (transcript variant 2) που εκτείνεται σε 3400 ζεύγη βάσεων (bp) (Εικόνα 12)²⁰⁹ και κωδικοποιεί μια λειτουργική πρωτεΐνη 297 αμινοξέων²¹⁰ μεγέθους 33 kDa²⁰⁴.

Homo sapiens excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1), transcript variant 2, mRNA



Εικόνα 12: ERCC1 mRNA²⁰⁹.

Το γονίδιο ERCC4 ή αλλιώς Xeroderma Pigmentosum F (XPF), βρίσκεται στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 16 στη θέση 16p13.12 (Εικόνα 13) και εμπλέκεται στη διαταραχή της Μελαγχρωματικής Ξηροδερμίας της ομάδας F, στο σύνδρομο Cockayne τύπου F και στο XFE σύνδρομο προγηρίας²¹¹.

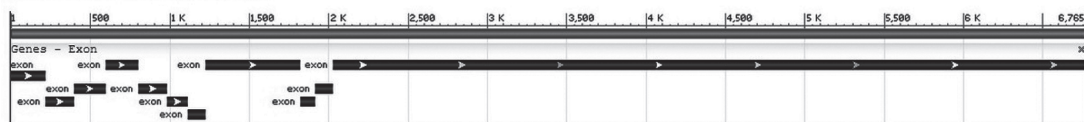


Εικόνα 13: Γονιδιωματική θέση του ERCC4 (XPF)²¹².

Το γονίδιο XPF αποτελείται από 12 εξώνια και εκτείνεται σε 32192 bp²¹³. Κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 916 αμινοξέων²¹⁴ (105 kDa)²¹¹. Το mRNA της ανθρώπινης XPF εκτείνεται σε 6765 bp (Εικόνα 14)²¹⁵.

Homo sapiens excision repair cross-complementation group 4 (ERCC4), mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_005236.2

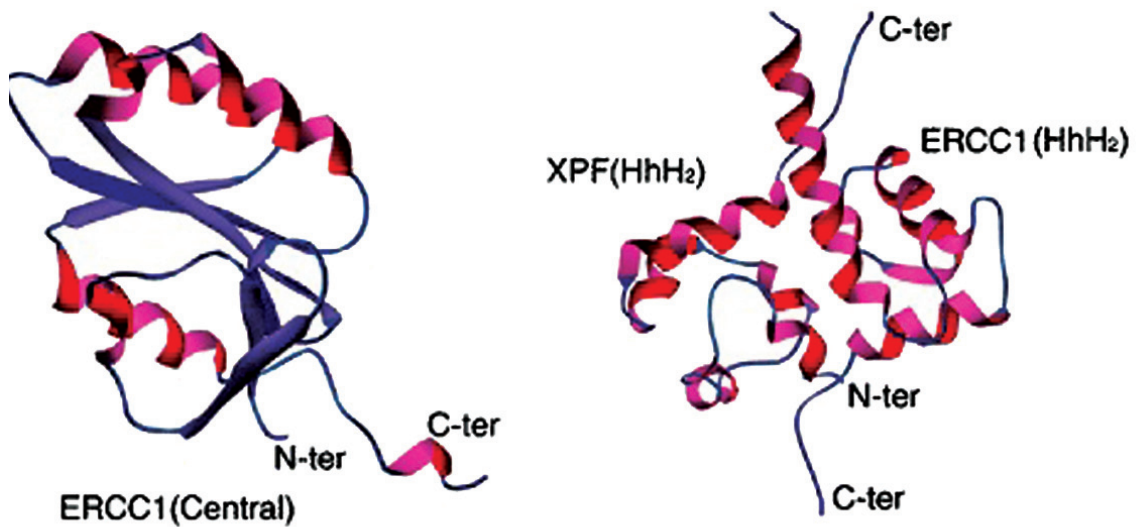
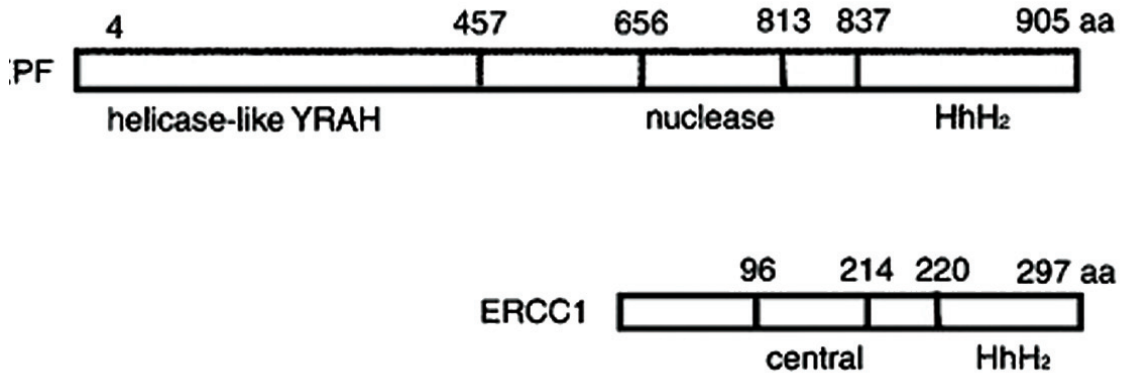


Εικόνα 14: XPF mRNA²¹⁵.

Η κατάλληλη αναδίπλωση της ERCC1 πρωτεΐνης επιτυγχάνεται μόνο με την παρουσία της XPF ενδονουκλεάσης, με την οποία σχηματίζει σύμπλοκο στο μονοπάτι NER²¹⁶. Σε αυτό το σύμπλοκο, η υπομονάδα XPF αποτελείται από τρεις λειτουργικές περιοχές (Εικόνα 15): μια αμινοτελική (N-τελική) περιοχή που μοιάζει με ελικάση, μια κεντρική περιοχή που λειτουργεί ως νουκλεάση, και μια καρβοξυτελική (C-τελική) περιοχή με δομή έλικας-φουρκέτας-έλικας [(HhH)₂]. Η υπομονάδα ERCC1 αποτελείται μόνο από δύο λειτουργικές περιοχές (Εικόνα 15): μια κεντρική περιοχή παρόμοιας δομής με την κεντρική περιοχή της XPF νουκλεάσης, η οποία όμως στερείται κάποιων αμινοξέων χαρακτηριστικών των πρωτεϊνών με δραστηριότητα νουκλεάσης, και μια C-τελική περιοχή με δομή έλικας-φουρκέτας-έλικας [(HhH)₂].

Οι C-τελικές περιοχές των ERCC1 και XPF είναι υπεύθυνες για τη δέσμευση των δύο πρωτεϊνών (Εικόνα 16), η οποία επιτυγχάνεται κυρίως μέσω υδροφοβικών δεσμών²¹⁷. Υποστηρίζεται ότι από αυτό το διμερές σύμπλοκο, η ERCC1 πρωτεΐνη συνδέεται στο DNA στην έλικα που δεν φέρει τη βλάβη και λειτουργεί περισσότερο ως σταθεροποιητικός παράγων του συμπλόκου, τοποθετώντας την XPF στο σημείο της βλάβης, ώστε στη συνέχεια η XPF να καταλύσει την τομή στην έλικα που φέρει τη βλάβη με την ιδιότητά της ως νουκλεάση (Εικόνα 16)²¹⁸.

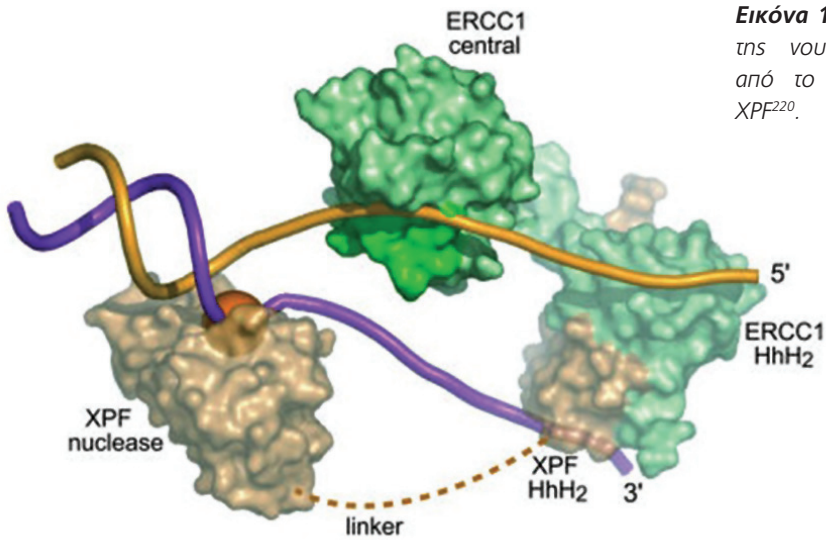
Σε κύτταρα με δυσλειτουργία του γονιδίου ERCC1 παρουσιάζονται χαμηλά επίπεδα XPF. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η δυσλειτουργία του γονιδίου XPF συνεπάγεται μειωμένα κυτταρικά



Εικόνα 15: Λειτουργικές περιοχές των πρωτεϊνών ERCC1 και XPF. Δεξιά: κρυσταλλική δομή του συμπλόκου ERCC1- XPF που περιέχει τις C-τελικές τους περιοχές (PDB entry: 2A1J). Αριστερά: κρυσταλλική δομή της κεντρικής περιοχής του ERCC1 (PDB entry: 2A1I)²¹⁹.

επίπεδα και των δύο πρωτεϊνών XPF και ERCC1, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο σχηματισμός του ετεροδιμερούς συμπλόκου σταθεροποιεί και τις δύο πρωτεΐνες in vivo²²⁰.

Το σύμπλοκο XPF-ERCC1 είναι το τελευταίο πρωτεϊνικό διμερές που εντάσσεται στον μηχανισμό NER κατά τη φάση της εκτομής της βλάβης. Για να ενταχθεί αλληλεπιδρά ειδικά με την XPA και την RPA μαζί²¹⁹. Η XPA στρατολογεί το σύμπλοκο XPF-ERCC1 στον μηχανισμό NER τοποθετώντας την XPF βουκλιάση στο 5' άκρο της βλάβης²²¹.

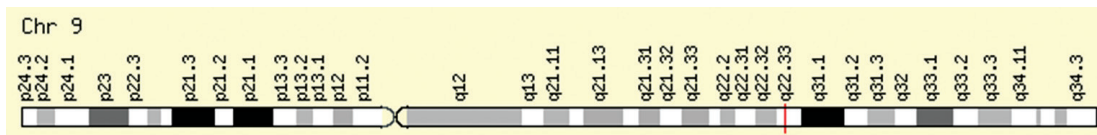


Εικόνα 16: Μοντέλο εκτομής της νουκλεοτιδικής βλάβης από το σύμπλοκο ERCC1/XPF²²⁰.

2.3 Δομή και λειτουργία του γονιδίου XPA

Το γονίδιο Xeroderma Pigmentosum A (XPA) βρίσκεται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 9, στη θέση 9q22.3 (Εικόνα 17), εκτείνεται σε 22501 bp, περιέχει 11 εξώνια²²², και παράγει μια μεταλλοπρωτεΐνη 273 αμινοξέων²²³ (31368Da) που προσδέεται στο DNA στο σημείο της βλάβης²²⁴.

Το ανθρώπινο γονίδιο XPA παρουσιάζει δύο εναλλεκτικά μετάγραφα, τα transcript variant 1²²⁶ και transcript variant 2²²⁷. Ωστόσο μόνο το transcript variant 1 που εκτείνεται σε 1491bp κωδικοποιεί τη λειτουργική πρωτεΐνη XPA (Εικόνα 18)^{226,227}.



Εικόνα 17: Γονιδιωματική θέση του γονιδίου XPA²²⁵.

Homo sapiens xeroderma pigmentosum, complementation group A (XPA), transcript variant 1, mRNA

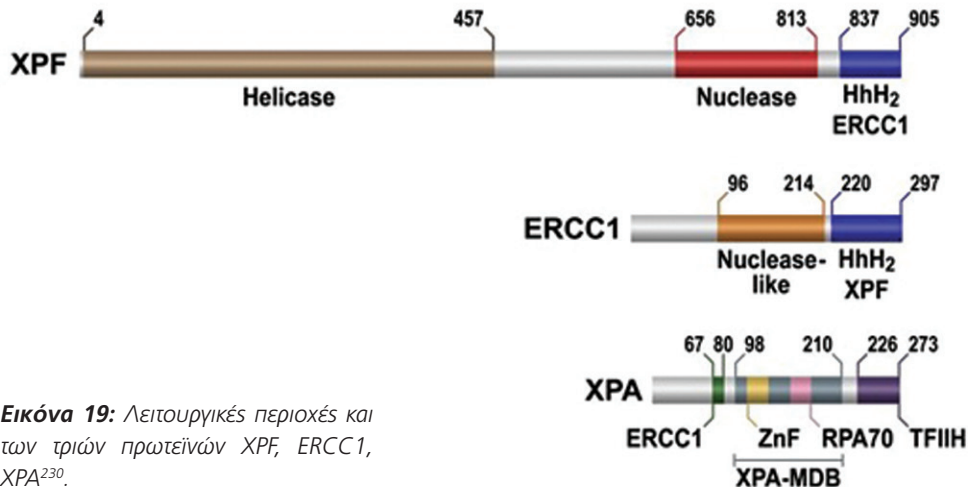
NCBI Reference Sequence: NM_000380.3



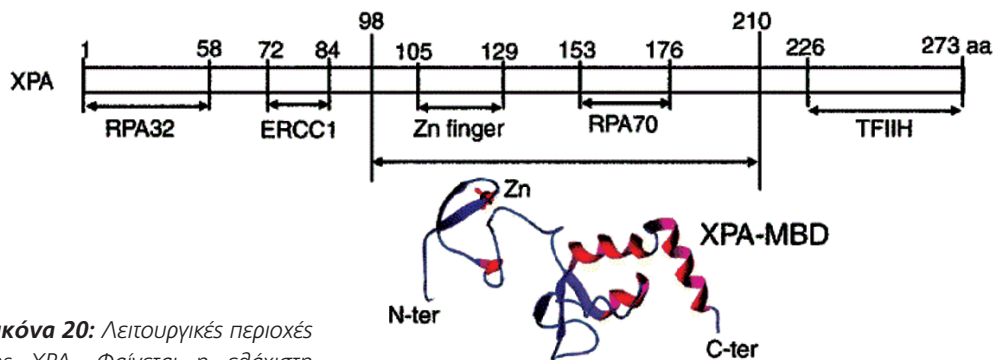
Εικόνα 18: XPA transcript variant 1 mRNA²²⁶.

Η XPA συνδέεται συνεργατικά με τις πρωτεΐνες RPA, TFIIH, XPC και ERCC1/XPF. Το σύμπλοκο XPA-RPA αποτελεί τον ακρογωνιαίο λίθο των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων στον μηχανισμό NER²⁰².

Η κεντρική περιοχή της XPA πρωτεΐνης (98-219 αμινοξέα) περιέχει περιοχές πλούσιες σε θηλιές και περιοχές δακτύλων ψευδαργύρου (zinc finger) που της δίνουν την ικανότητα να συνδέεται με το DNA και με την πρωτεΐνη RPA70. Συγκεκριμένα η πυρηνική μαγνητική φασματοσκοπία έδειξε ότι το DNA συνδέεται στην περιοχή των θηλιών (Εικόνα 19)²¹⁹. Το σύμπλοκο XPA-RPA φαίνεται να έχει μια μεγαλύτερη συγγένεια για το κατεστραμμένο DNA από ότι η XPA μόνη της²²⁸. Ωστόσο, σε αντίθεση με την XPC, η πρωτεΐνη XPA αλληλεπιδρά κατά προτίμηση με την έλικα που φέρει τη βλάβη. Οι περισσότερες επαφές XPA-DNA βρίσκονται κοντά στο 5' άκρο της βλάβης, στο σημείο που ανοίγει η δίκλωνη έλικα για να πραγματοποιηθεί η επιδιόρθωση²²⁹.



Εικόνα 19: Λειτουργικές περιοχές και των τριών πρωτεϊνών XPF, ERCC1, XPA²³⁰.

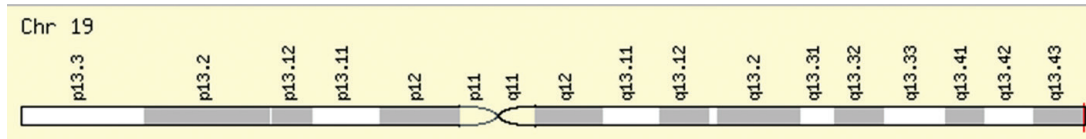


Εικόνα 20: Λειτουργικές περιοχές της XPA. Φαίνεται η ελάχιστη περιοχή σύνδεσης της XPA στο DNA (XPA-MBD)²¹⁹.

Η Ν-τελική περιοχή της XPA (1-97 αμινοξέα) είναι αρμόδια για την αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη ERCC1 και την RPA32 (Εικόνα 20). Μέσω της σύνδεσης της με την ERCC1, η XPA κατευθύνει το σύμπλοκο ERCC1/XPF στο σωστό σημείο πάνω στο DNA για την αποκοπή της βλάβης. Η πυρηνική μαγνητική φασματοσκοπία έδειξε επίσης ότι η Ν-τελική περιοχή της XPA που συνδέεται με το ERCC1 είναι αδόμενη πριν τη σύνδεσή των δύο πρωτεϊνών και σχηματίζει μια πρόσκαιρη ενδομοριακή σύνδεση με την κεντρική περιοχή της XPA που συνδέεται με το DNA. Γεγονός που υποδηλώνει ότι η σύνδεση του ERCC1 με την XPA θα ήταν δυνατή μόνο μετά από μια βλάβη στο DNA, και αφότου η XPA την αναγνωρίσει και συνδεθεί πάνω της με την κεντρική της περιοχή, ώστε να αποσυνδεθεί ενδομοριακά η Ν-τελική της περιοχή από την κεντρική της²¹⁹.

2.4 Δομή και λειτουργία του γονιδίου MZF1

Το γονίδιο Myeloid Zinc Finger 1 (MZF1) βρίσκεται χρωμόσωμα 19, στη θέση 19q13.4 (Εικόνα 21)²³¹, περιέχει 9 εξώνια²³², εκτείνεται σε 11659 bp, και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που περιέχει 13 λειτουργικές περιοχές δακτύλων ψευδαργύρου (zinc finger) που χωρίζονται σε δύο ομάδες, και οι οποίες μπορούν να δεσμεύουν το DNA, ανεξάρτητα η μία από την άλλη²³³.

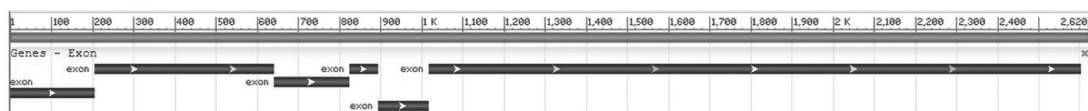


Εικόνα 21: Γονιδιωματική θέση του γονιδίου MZF1²³⁴.

Το γονίδιο της MZF1 έχει τρία εναλλακτικά μετάγραφα²³⁵. Το transcript variant 1 εκτείνεται σε 2620 bp²³⁶ και το transcript variant 2 εκτείνεται σε 2938 bp²³⁷. Το μετάγραφο 1 (Εικόνα 22) αποτελεί το μικρότερο, όμως καθώς το μετάγραφο 2 διαφέρει μόνο στην 5' μη μεταφραζόμενη (untranslated, UTR) περιοχή σε σχέση με το μετάγραφο 1, ουσιαστικά και τα δύο μετάγραφα κωδικοποιούν την ίδια ισομορφή (1) της MZF1 πρωτεΐνης^{238,239}. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη 734 αμινοξέων (82055Da)²³⁴. Το transcript variant 3 εκτείνεται σε 2694 bp²⁴⁰, διαφέρει στην 5' UTR περιοχή, στην οποία έχει 320 λιγότερα νουκλεοτίδια, καθώς επίσης χρησιμοποιεί και μια εναλλακτική θέση ματίσματος, η οποία οδηγεί σε μια μετατόπιση του ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης, σε σύγκριση με το μετάγραφο 1. Η κωδικοποιούμενη ισομορφή (2) της MZF1 πρωτεΐνης είναι μικρότερη (290 αμινοξέα) και έχει μια ένα ξεχωριστό καρβοξυτελικό άκρο, σε

Homo sapiens myeloid zinc finger 1 (MZF1), transcript variant 1, mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_003422.2



Εικόνα 22: MZF1 mRNA²³⁶.

σύγκριση με την ισομορφή 1²⁴¹. Και οι 2 ισομορφές της πρωτεΐνης περιέχουν την ίδια διμερή μονάδα δακτύλων ψευδαργύρου²³⁵.

Η πρωτεΐνη MZF1 ανήκει στους Krüppel-like παράγοντες (KLFs) που αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών-μεταγραφικών παραγόντων τύπου δακτύλων ψευδαργύρου που ρυθμίζουν την απόπτωση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση σε διάφορους ιστούς²⁴². Γενικότερα ο πρωταρχικός ρόλος τέτοιων παραγόντων μεταγραφής, είναι να δεσμεύουν συγκεκριμένα τμήματα DNA μέσω των δακτύλων ψευδαργύρου και να αλληλεπιδρούν με άλλους κυτταρικούς παράγοντες για να ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων στόχων²⁴³.

Η MZF1 εκφράζεται κυρίως στα προγονικά κύτταρα του νωτιαίου μυελού, και στα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα και έχει σημαντικό ρόλο στη μυελική κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση²⁴⁴, καθώς εμπλέκεται και ρυθμίζει την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση των προγονικών κυττάρων του μυελού²⁴³. Η έκφραση της από κύτταρα ανθρώπινου μυελού των οστών είναι απαραίτητη για την κοκκιοποίηση²⁴⁴. Διαταραχές της έκφρασης της MZF1 διαταράσσουν την κοκκιοποίηση, καθώς έχει βρεθεί ότι η MZF1 λειτουργεί ρυθμιστικά στη διαφοροποίηση των κοκκιοκυττάρων²⁴³. Συνολικά, η MZF1 διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην αιμοποίηση ρυθμίζοντας την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία. Λειτουργεί ως δι-λειτουργικός μεταγραφικός παράγοντας, καθώς καταστέλλει τη μεταγραφή σε μη αιμοποιητικά κύτταρα, ενώ ενεργοποιεί τη μεταγραφή σε κύτταρα αιμοποιητικής προέλευσης²⁴⁵. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση της MZF1 ενοχοποιείται για την αναστολή της αιμοποίησης. Επιπλέον η MZF1 έχει ογκοκατασταλτικές ιδιότητες στα προγονικά κύτταρα του μυελού κατά την αιμοποίηση²⁴³. Ωστόσο, δεν είναι ανιχνεύσιμη σε πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα του αίματος²⁴⁶.

Το γονίδιο της MZF1 βρίσκεται λιγότερο από 20 kb από το τελομερές του χρωμοσώματος 19, στο ίδιο δηλαδή χρωμόσωμα στο οποίο βρίσκεται και το γονίδιο ERCC1. Τα τελομερή είναι γνωστό ότι εκφυλίζονται καθώς τα κύτταρα γηράσκουν. Επομένως η διαταραχή της έκφρασης της MZF1 λόγω εκφυλισμού του τελομερούς του χρωμοσώματος 19 μπορεί να έχει κάποιον ρόλο στην αυξημένη συχνότητα της λευχαιμίας στους ηλικιωμένους²⁴⁷, αλλά και στη νόσο Alzheimer's²⁴⁸.

Οι ρυθμιστές της μυελικής ανάπτυξης αποτελούν δυνतिकούς στόχους για νεοπλαστική εξαίληγή. Πειράματα έδειξαν ότι διαταραχή της έκφρασης της MZF1, είναι ογκογόνα σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες. Ως εκ τούτου, η MZF1 κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει ένα ακόμα ογκογονίδιο²⁴⁹. Διάφορες μελέτες υποδεικνύουν πως η ανώμαλη έκφραση της MZF1 οδηγεί σε καρκίνο. Εντούτοις, οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους η MZF1 λειτουργεί στην κυτταρική ανάπτυξη και συμβάλλει στην εξέλιξη του καρκίνου δεν έχουν ακόμα πλήρως αναλυθεί²⁵⁰.

Οι Gaboli και συν αναφέρουν ότι η απενεργοποίηση του γονιδίου MZF1 του ποντικού οδηγεί σε μια εντυπωσιακή αύξηση αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων, με ενδεχόμενη ανάπτυξη θανατηφόρων νεοπλασιών του μυελού. Ως εκ τούτου, η MZF1 προτείνεται να δρα ως καταστολέας όγκων κατά την ανάπτυξη των κυττάρων του αίματος²⁴⁶. Η υπερ-έκφραση του γονιδίου MZF1 αναστέλλει την απόπτωση και προωθεί την ογκογένεση σε μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκε η ιντερλευκίνη-3 εξαρτώμενη κυτταρική σειρά FDCLP.1 που αφορά μη ογκογόνα προγονικά κύτταρα των κοκκιοκυττάρων, μονοκυττάρων, μακροφάγων από μακροχρόνιες καλλιέργειες κυττάρων μυελού των οστών²⁵¹.

Η μείωση της έκφρασης της MZF1 ανέστειλε την έκφραση της πρωτεϊνικής κινάσης C-άλφα (PKCalpha) και κατ' αυτόν τον τρόπο μείωσε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική μετανάστευση και τη διεισδυτικότητα στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC)²⁵². Επίσης έχει βρεθεί ότι η αναστολή της MZF1 ασκεί ανασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό κυτταρικής σειράς HCC. Η καταστολή της MZF1 επίσης αναστέλλει την ανάπτυξη όγκου σε ξеноμοσχεύματα ανθρώπινου HCC σε ποντικούς. Έτσι, η MZF1 μπορεί να ελέγξει την ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων HCC, λειτουργώντας κατά βάση ως ογκογόνος παράγοντας HCC²⁵³.

Σε κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου (RKO, SW480) και τραχήλου της μήτρας (HeLa), η υπερέκφραση της MZF1 επάγει την κυτταρική μετανάστευση και διείσδυση, καθώς και την έκφραση -σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης- του γονιδίου Axl μέσω ενεργοποίησης του υποκινητή του. Επίσης η έκφραση των MZF1 & Axl ήταν σημαντικά υψηλότερη σε χειρουργικά παρασκευάσματα από όγκους του παχέος εντέρου σε σύγκριση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς ($p=0.02, p=0.05$), και η έκφραση της MZF1 συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση του Axl σε ιστούς όγκου ($p<0,01$). Ουσιαστικά, η MZF1 φάνηκε να επάγει τη διείσδυση και μετάσταση in vivo σε ορθοκολικό καρκίνο και καρκίνο τραχήλου της μήτρας, μέσω της εν μέρει ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου Axl²⁵⁴.

Η MZF1, έχει επίσης φανεί απαραίτητη για τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου p55PIK. Σε ιστούς από κολλοειδικό καρκίνο, η mRNA έκφραση των MZF1 και p55PIK ήταν αυξημένη ($p=0.046, p=0.047$, αντίστοιχα.). Παρατηρήθηκε ισχυρή θετική συσχέτιση ($R_s=0.94$) μεταξύ mRNA έκφρασης MZF1 και p55PIK. Οι ερευνητές της μελέτης πρότειναν ότι το γονίδιο p55PIK ενεργοποιείται μεταγραφικά από την MZF1, με αποτέλεσμα την αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων κολλοειδικού καρκίνου²⁵⁵. Επίσης, σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού φάνηκε ότι η αυξημένη έκφραση PKCα που έχει συσχετιστεί με την κυτταρική μετανάστευση και διείσδυση μπορεί να συσχετίζεται με την αυξημένη έκφραση των παραγόντων μεταγραφής Elk-1 και MZF-1²⁵⁶. Ωστόσο παρόμοια πειράματα σε κυτταρικές σειρές καρκινώματος από μεταβατικό επιθήλιο της ουροδόχου κύστης δεν κατάφεραν να δείξουν τα ίδια αποτελέσματα²⁵⁷.

Οι Tsai SJ και συν. διερεύνησαν τον ρόλο της MZF1 στην κυτταρική μετανάστευση και διείσδυση σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινου καρκίνου τραχήλου της μήτρας. Βρήκαν ότι η υπερέκφραση της MZF1 αναστέλλει τις μεταναστευτικές και διεισδυτικές ικανότητες των κυττάρων. Επιπλέον, η υπερέκφραση της MZF1 μειώνει σημαντικά τα επίπεδα πρωτεΐνης και mRNA της μεταλλοπρωτεϊνάσης εξωκυττάρου δικτύου (matrix metalloproteinase-2, MMP-2). Αυτή η μεταγραφική καταστολή μπορεί να συνδέεται με την αναστολή της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων και της μετάστασης²⁵⁸.

Φαρμακογενωμική

3.1 Ορισμός

Φαρμακογενωμική είναι ο συνδυασμένος κλάδος της φαρμακολογίας και της γενωμικής που μελετάει τη σχέση μεταξύ γονιδιακής έκφρασης ή πολυμορφισμών και δραστικότητας ή τοξικότητας ενός φαρμάκου. Με άλλα λόγια αφορά την επίδραση που έχει η γενετική μοναδικότητα και ποικιλομορφία του ατόμου στην ανταπόκριση σε συγκεκριμένη θεραπεία που λαμβάνει. Είναι, εν συντομία, η βάση της εξατομίκευσης της θεραπείας²⁵⁹.

Πολλά φάρμακα, ενώ έχουν στην πλειοψηφία των ασθενών καλό θεραπευτικό αποτέλεσμα, σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να εμφανίζουν μειωμένη επίδραση ή ακόμα και να προκαλέσουν πολύ σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες. Καθόσον αποκαλύπτονται ολοένα και περισσότερες θέσεις του ανθρώπινου γονιδιώματος που ευθύνονται για τις παραπάνω ιδιαιτερότητες, όσον αφορά στην απόκριση του ασθενούς σε ένα φάρμακο, μία φαρμακογενωμική προσέγγιση επιτρέπει τη ρύθμιση της φαρμακευτικής αγωγής με βάση το γενετικό προφίλ του κάθε ασθενούς (όπου υπάρχουν τα απαραίτητα επιστημονικά δεδομένα), επιτυγχάνοντας έτσι τη μέγιστη απόκριση στο φάρμακο με τις λιγότερες δυνατές παρενέργειες, καθώς επίσης συνεισφέρει στη βελτίωση της επιβίωσης των ασθενών που μπορούν να ωφεληθούν από την εφαρμογή μιας τέτοιας προσέγγισης. Επιπλέον, η ανάπτυξη της φαρμακογενωμικής επιταχύνει την πρόοδο στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων, με τον εντοπισμό νέων θεραπευτικών στόχων σε γονιδιωματικό ή πρωτεωμικό επίπεδο.

3.2 Συντονισμένη έκφραση των παραγόντων του μηχανισμού NER

Είναι γεγονός ότι για να λειτουργήσει καλύτερα ο μηχανισμός επιδιόρθωσης NER θα πρέπει όλες οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία να ρυθμίζονται συντονισμένα σε επίπεδο έκφρασης. Δημοσιευμένα δεδομένα υποστηρίζουν ότι υπάρχει μια μοριακή βάση για αυτή τη συντονισμένη έκφραση του mRNA επιλεγμένων γονιδίων του μηχανισμού NER σε δείγματα ανθρώπινων ιστών από ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών, καρκίνο των όρχεων, κακοήθεις όγκους του εγκεφάλου, και άλλων κακοηθειών, και συγκεκριμένα για τα γονίδια ERCC1, XPA, XPB, XPD, XPF, και XPG²⁶⁰.

Σε ιστούς ανθρώπινου εγκεφάλου, οι φυσιολογικοί ιστοί είχαν στενά συντονισμένη mRNA έκφραση των μελετηθέντων γονιδίων επιδιόρθωσης νουκλεοτιδικών βλαβών. Οι υψηλού βαθμού κακοήθειας ιστοί παρουσίαζαν πολύ μειωμένο επίπεδο συντονισμού έκφρασης για τα ίδια γονίδια. Οι χαμηλού βαθμού κακοήθειας ιστοί του εγκεφάλου είχαν ένα μοτίβο

έκφρασης που ήταν ενδιάμεσο. Για τον λόγο αυτόν οι ιστοί του εγκεφάλου με νεοπλασία δείχνουν μεγαλύτερη ευαισθησία σε παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA από ότι οι παρακείμενοι φυσιολογικοί ιστοί όταν εκτεθούν συγχρόνως^{261,262}. Επομένως, συντονισμένη έκφραση των παραγόντων NER θα μπορούσε να συνεπάγεται αυξημένη αντοχή στην πλάτινα ακόμα και σε κακοήθεις ιστούς.

Σε δείγματα ιστών από καρκίνο των ωοθηκών που εμφάνιζαν υψηλή αντοχή στην πλάτινα φάνηκε ότι η αύξηση της έκφρασης του ERCC1 mRNA συνοδευόταν από αύξηση της έκφρασης και άλλων γονιδίων επιδιόρθωσης νουκλεοτιδικών βλαβών όπως της XPA²⁶³. Παρομοίως, σε 28 δείγματα από καρκίνο των ωοθηκών πιθανολογήθηκε να υπάρχει συγκεκριμένη σειρά εμφάνισης των mRNAs των γονιδίων NER και προτάθηκε ότι το ERCC1 mRNA εμφανίζεται υποχρεωτικά πριν από το mRNA οποιουδήποτε από τα άλλα γονίδια, ακολουθείται δε από το mRNA της XPB, και στη συνέχεια εμφανίζεται το mRNA της XPA²⁶⁴.

3.3 Ο ρυθμιστικός ρόλος της MZF1 στο ERCC1

Ρόλο κλειδί στη ρύθμιση της έκφρασης του ERCC1 φαίνεται να διαδραματίζει η πρωτεΐνη MZF1. Αρκετοί μεταγραφικοί καταστολείς και ενεργοποιητές μπορεί να εμπλέκονται στη ρύθμιση του ERCC1 μέσω της 5'-μη μεταγραφόμενης περιοχής του (5'-flanking region). Συγκεκριμένα, η αλληλοουσία των ολιγονουκλεοτιδίων που αντιστοιχούν στις λειτουργικές περιοχές δακτύλων ψευδαργύρου (zinc finger) 1 έως 4 της MZF1, δείχνουν ότι η αμινοτελική περιοχή τους έχει την ικανότητα να συνδέεται σε μια περιοχή του υποκινητή του ERCC1.

Σε κυτταρικές σειρές καρκίνου των ωοθηκών (A2780/CP70) φάνηκε ότι η χορήγηση πλάτινας μειώνει την mRNA έκφραση της MZF1. Παράλληλα η υπερέκφραση της MZF1 άσκησε κατασταλτική δράση στον υποκινητή του ERCC1, μειώνοντας έτσι την έκφραση του. Οι Yan Q-W και συν. συμπέραναν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας MZF1 λειτουργεί ως καταστολέας της μεταγραφής του ERCC1 στα ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου ωοθηκών. Επομένως η καταστολή της MZF1 μέσω έκθεσης σε πλάτινούχα φάρμακα, θα μπορούσε να συμβάλει στην υπερέκφραση του ERCC1 κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπευτικής διαδικασίας, και έτσι να εμπλέκεται στον μηχανισμό αντοχής στην πλάτινα κατά τη θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών²⁶⁵. Ωστόσο, δεν υπάρχουν στη βιβλιογραφία αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα για τη δράση της MZF1 στη ρύθμιση της έκφρασης του ERCC1 σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα.

3.4 Η επίδραση της έκφρασης των ERCC1, XPA, XPF στην αντοχή στην πλάτινα σε κυτταρικές σειρές

Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν μελετήσει τη σχέση των γονιδίων του μηχανισμού NER στην εμφάνιση αντοχής στην πλάτινα σε διάφορες κυτταρικές σειρές και ιστούς. Τα *in vitro* δεδομένα δείχνουν σαφώς ότι ο μηχανισμός NER είναι υπεύθυνος για τη επιδιόρθωση των γενωμικών βλαβών που δημιουργούν τα φάρμακα της πλάτινας²⁶⁶.

Το 1993 πειράματα έδειξαν ότι η ERCC1-γονιδιακή επιμόλυνση ωοθηκικών κυττάρων των ποντικών, τα οποία αρχικά δεν εξέφραζαν ERCC1, αποκατέστησε την ικανότητά τους να

επιδιορθώνουν τις γενωμικές βλάβες που δημιουργούνται από τη χορήγηση πλταίνης²⁶⁷. Το 1998 οι Li και συν μελέτησαν την επίδραση της πλταίνης στην έκφραση του ERCC1 σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινων ωοθηκικών κυττάρων και έδειξαν ότι 1 ώρα έκθεση των κυττάρων αυτών στην πλταίνη είχε ως αποτέλεσμα την 6πλάσια αύξηση του ERCC1 mRNA, λόγω αυξημένης μεταγραφής του, αλλά και αύξησης κατά 60% της ημίσειας ζωής του ERCC1 mRNA²⁶⁸. Το 2000 η ίδια ομάδα αξιολόγησε τη συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του ERCC1 -τόσο σε επίπεδο mRNA όσο σε επίπεδο πρωτεΐνης- και στην επιδιόρθωση πλτατινούχων γενωμικών βλαβών σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινων ωοθηκικών κυττάρων. Από τα πειράματά τους φάνηκε ότι η κυτταρική σειρά που εξέφραζε το ERCC1 σε υψηλότερα (διπλάσια) επίπεδα είχε επίσης υψηλότερα επίπεδα αντοχής στην πλταίνη σε σύγκριση με τη χαμηλότερης ERCC1 έκφρασης κυτταρική σειρά, παρά το γεγονός της ούτως ή άλλως επαγωγής της έκφρασης του ERCC1 από την παρουσία της πλταίνης²⁶⁹. Την ίδια εποχή μια άλλη ομάδα εξέταζε επίσης την έκφραση του ERCC1 -τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης- σε κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών και συμπέρανε ότι η έκφραση του ERCC1 σε επίπεδο mRNA αλλά όχι σε επίπεδο πρωτεΐνης σχετίζεται με την αντίσταση στην πλταίνη²⁷⁰, θέτοντας για πρώτη φορά τη διαφοροποίηση της μέτρησης mRNA vs πρωτεΐνης και το ερώτημα «ποιο από τα δύο θα μπορούσε να μας καθοδηγήσει στην ανάπτυξη της φαρμακογενωμικής του ERCC1 στην πλταίνη;». Το 2003 η διατάραξη του μηχανισμού NER μέσω απενεργοποίησης του ERCC1 ενίσχυσε σημαντικά την κυτταροτοξικότητα της πλταίνης σε κυτταρικές σειρές καρκίνου των ωοθηκών. Όταν αυτές οι σειρές μεταμοσχεύτηκαν σε ανοσοκατεσταλμένους ποντικούς βελτιώθηκε η ικανότητα επιβίωσής τους μετά τη χορήγηση πλταίνης²⁷¹.

Το 1996 οι States JC και Reed E²⁷² παρατήρησαν ότι αυξημένη έκφραση της XPA σχετίζεται με αντίσταση στη θεραπεία cisplatin σε κυτταρικές σειρές καρκίνου των ωοθηκών, χωρίς να μπορέσουν να κατανοήσουν την αιτία αυτής της αυξημένης έκφρασης της XPA, καθώς δεν οφειλόταν σε μεταλλάξεις ή γονιδιακή ενίσχυση.

Οι Wu X και συν²⁷³ κατάφεραν να δείξουν ότι η μείωση της γονιδιακής έκφρασης της XPA, μέσω διαμόλυνσης με mRNA αντίστροφης φοράς (antisense mRNA), μπορεί να μειώσει την επιδιόρθωση του DNA και έτσι να ευαισθητοποιήσει κύτταρα αδενοκαρκινώματος πνεύμονα στην πλταίνη, συμπεραίνοντας ότι η στοχευμένη αναστολή της XPA μπορεί να παρέχει ένα πολύτιμο εργαλείο στην κλινική χημειοθεραπεία του καρκίνου. Αρκετά πρόσφατα, τέλη του 2014 μια νέα μελέτη σε κυτταρικές σειρές ΜΜΚΠ υποστήριξε ότι η γονιδιακή επιμόλυνση των H1299 κυττάρων με ERCC1 είχε σημαντική επίδραση στην απόκριση των κυττάρων στην πλταίνη. Παράλληλα, η στοχευμένη σίγαση του ERCC1 μέσω της τεχνολογίας παρέμβασης μικρών RNAs (RNA interference, RNAi) στα κύτταρα A549 οδήγησε σε αύξηση της ευαισθησίας των κυττάρων αυτών στη σισπλταίνη²⁷⁴.

Το 1999 οι Köberle B και συν. παρατήρησαν ότι οι όγκοι των όρχεων από γεννητικά κύτταρα, που είναι υπερευαίσθητοι στη σισπλταίνη, έχουν χαμηλή ικανότητα αφαίρεσης γενωμικών βλαβών λόγω χαμηλών επιπέδων XPA, ERCC1 και XPF. Η προσθήκη XPA επανέφερε τη λειτουργικότητα του μηχανισμού NER. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι η στοχευμένη αναστολή της XPA θα μπορούσε να ευαισθητοποιήσει κι άλλους τύπους κυττάρων και όγκων στη σισπλταίνη²⁷⁵. Οι ίδιοι συγγραφείς το 2004 μελέτησαν 35 κυτταρικές σειρές από διάφορους καρκινικούς ιστούς, όπως καρκίνου του προστάτη, της ουροδόχου κύστης, του μαστού, του

πνεύμονα, του τραχήλου της μήτρας, των ωοθηκών και των όρχεων για να προσδιορίσουν τις διαφορές τους στα επίπεδα των παραγόντων NER και τη συσχέτισή τους με την αντοχή τους στην πλατίνα. Από τα πειράματά τους βρήκαν ότι μόνο οι 6 κυτταρικές σειρές καρκίνων όρχεων έδειξαν σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης XPA ($p=0,001$), XPF ($p=0,001$) και ERCC1 ($p=0,004$) πρωτεϊνών από τις άλλες σειρές, θεωρώντας έτσι ότι τα χαμηλά επίπεδα αυτών των πρωτεϊνών NER θα μπορούσαν να σχετίζονται με τη θετική ανταπόκριση των όγκων των όρχεων στη χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα²⁷⁶. Παρά ταύτα, σχεδόν 10 χρόνια αργότερα από την πρώτη τους δημοσίευση, το 2008, με περισσότερα πειράματα ανέφεραν ότι τελικά η ευαισθησία αυτών των όγκων των όρχεων στην πλατίνα δεν οφείλεται στον μηχανισμό NER και ότι η αύξηση της έκφρασης της XPA δεν συνεπάγεται αύξηση της αντοχής των κυττάρων στην πλατίνα²⁷⁷. Ωστόσο το 2010 με νέα τους μελέτη κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αυξημένη ευαισθησία στην πλατίνα των όγκων όρχεων από γεννητικά κύτταρα οφείλεται στη χαμηλή έκφραση του συμπλόκου ERCC1-XPF²⁷⁸.

Το 2010 πάλι οι Köberle B και συν.²⁷⁹ μελέτησαν την έκφραση του ERCC1 και της XPF τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης σε 13 κυτταρικές σειρές πλάκώδους καρκινώματος κεφαλής και τραχήλου (HNSCC), καθώς και σε 7 κυτταρικές σειρές καρκίνου των όρχεων και εξέτασαν την κυτταρική τους αντίσταση στην πλατίνα. Δεν παρατήρησαν σημαντική διαφορά στην έκφραση του mRNA των ERCC1 & XPF στις κυτταρικές σειρές HNSCC σε σύγκριση με τις κυτταρικές σειρές καρκίνου των όρχεων, αλλιά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης XPF βρέθηκαν στις σειρές HNSCC σε σύγκριση με εκείνες του καρκίνου όρχεων γεγονός που ερχόταν σε σύμπτωση με την αυξημένη κυτταρική αντίσταση των HNSCC στην πλατίνα.

Οι Arora S και συν. ερεύνησαν το κατά πόσον το σύμπλοκο XPF-ERCC1 είναι ένας έγκυρος στόχος για την αύξηση της κυτταροτοξικότητας και της αποτελεσματικότητας της πλατίνας και σε κυτταρικές σειρές MMKP, ωοθηκών, και καρκίνου του μαστού. Με στοχευμένη σίγαση του συμπλόκου, μέσω της τεχνολογίας παρέμβασης μικρών RNAs, αξιολόγησαν την ικανότητα επιδιόρθωσης των πλατινούχων βλαβών στο DNA. Παρατήρησαν ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης XPF μειώθηκαν μετά από τη μείωση των αντίστοιχων του ERCC1, ενώ το αντίθετο δεν συνέβη. Επίσης η επιδιόρθωση των γενωμικών βλαβών μειώθηκε τόσο μετά τη μείωση της XPF, όσο και μετά τη μείωση του ERCC1 ή αμφοτέρων και των δύο (XPF-ERCC1). Η καταστολή του συμπλόκου XPF-ERCC1 μείωσε σημαντικά την κυτταρική επιβίωση γεγονός που συσχετίστηκε με μείωση στην ικανότητα επιδιόρθωσης του DNA. Διπλή απενεργοποίηση των γονιδίων XPF-ERCC1 συνδέθηκε με μεγαλύτερη κυτταροτοξικότητα όταν συγκρίθηκε με απενεργοποίηση μόνο της XPF ή μόνο του ERCC1²⁸⁰.

3.5 Η επίδραση της έκφρασης των ERCC1, XPA, XPF στην ανταπόκριση ασθενών υπό πλατινούχα χημειοθεραπεία

Η χαμηλή έκφραση των ERCC1, XPA, XPF έχει συνδεθεί με καλή ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία των ασθενών που πάσχουν από μια σειρά διαφορετικών κακοθηγιών όπως καρκίνο των ωοθηκών, της ουροδόχου κύστεως, του οισοφάγου, αδενοκαρκίνωμα στομάχου, μεταστατικό κοίλο-ορθικό καρκίνο, πλάκώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου, και καρκίνο του παγκρέατος.

Ιστοί από 26 ασθενείς με καρκίνο των ωθηκών πριν τη θεραπεία τους με πλατίνα μελετήθηκαν ως προς την mRNA έκφραση του ERCC1 και φάνηκε ότι οι ασθενείς που εμφάνισαν κλινική αντίσταση στη χημειοθεραπεία είχαν 2.6 φορές υψηλότερα επίπεδα ERCC1 από τους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία²⁸¹. Υψηλά επίπεδα mRNA των ERCC1 & XPA από 28 ασθενείς με καρκίνο των ωθηκών συσχετίστηκαν με μη ανταπόκριση των ασθενών σε πλατινούχα χημειοθεραπεία²⁸². Επίσης, σε 33 ασθενείς με καρκίνο των ωθηκών, η ERCC1 έκφραση συσχετίστηκε με τη θνησιμότητα ($p = 0.037$)²⁸³. Το 2009 μια πιο πρόσφατη και μεγαλύτερη μελέτη με 101 ασθενείς με καρκίνο των ωθηκών επιβεβαίωσε ότι η -ανοσοϊστοχημικά μετρημένη- αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση του ERCC1 σχετίζεται με αυξημένη αντίσταση στην πλατίνα ($p=0.0013$) και μειωμένη επιβίωση δίχως εξέλιξη της νόσου (Progression-Free Survival, PFS), ($p=0.006$)²⁸⁴.

Το 2007 σε 57 ασθενείς με προχωρημένου και μεταστατικού σταδίου καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, τα χαμηλά επίπεδα ERCC1 φάνηκαν να είναι ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης καλύτερης συνολικής επιβίωσης, αλλά δεν συσχετίστηκαν με την ανταπόκριση των ασθενών στην πλατινούχα χημειοθεραπεία που έλαβαν²⁸⁵. Το 2010, παρατηρήθηκε παρόμοια συσχέτιση σε 108 ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστεως, όσον αφορά την mRNA έκφραση του ERCC1 και τη συνολική επιβίωση²⁸⁶. Σε 89 ασθενείς με προχωρημένου σταδίου ή υποτροπιάζοντες όγκους του ουροθηλίου παρατηρήθηκε συσχέτιση της πρωτεϊνικής ERCC1 έκφρασης μόνο με την επιβίωση ελεύθερης νόσου (PFS) και όχι με τη συνολική επιβίωση (OS)²⁸⁷. Επίσης, το 2012 σε 93 ασθενείς με τοπικά προχωρημένο μεταβατικό κυτταρικό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης που υποβλήθηκαν σε κυστεκτομή, η υψηλή πρωτεϊνική ERCC1 έκφραση συσχετίστηκε με καλύτερη επιβίωση στους 36 ασθενείς που δεν πήραν μετεπεμβατική ΧΜΘ ($p=0.049$) και με χειρότερη επιβίωση στους 57 ασθενείς που έλαβαν επικουρική ΧΜΘ με πλατίνα ($p=0.047$)²⁸⁸.

Δείγματα βιοψίας από 36 ασθενείς με τοπικά προχωρημένο καρκίνο του οισοφάγου αναλύθηκαν ως προς την ERCC1 mRNA έκφρασή τους και βρέθηκε ότι ασθενείς με χαμηλή έκφραση εμφάνισαν καλύτερη ιστοπαθολογική ανταπόκριση του όγκου στη χημειοακτινοθεραπεία με πλατίνα που έλαβαν²⁸⁹. Παρομοίως, σε μια άλλη μελέτη με 99 ασθενείς, τα αυξημένα επίπεδα ERCC1 mRNA συσχετίστηκαν με σχεδόν διπλάσια αύξηση κινδύνου υποτροπής της νόσου μετά από ακτινο-χημειοθεραπεία με πλατίνα ($p=0.086$)²⁹⁰. Η έκφραση της ERCC1 πρωτεΐνης μελετήθηκε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας σε δείγματα βιοψίας από 108 ασθενείς με τοπικό καρκίνο οισοφάγου και βρέθηκε ότι η χαμηλή ERCC1 έκφραση ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για καλύτερη παθολογοανατομική ανταπόκριση σε συνδυασμένη χημειοακτινοθεραπεία ($p<0.001$), και επίσης οι ασθενείς με χαμηλό ERCC1 είχαν μια τάση για καλύτερη συνολική ($p=0.10$) και ελεύθερη νόσου επιβίωση ($p=0.08$)²⁹¹.

Σε ασθενείς με γαστρο-οισοφαγικό καρκίνο, η υψηλή έκφραση της πυρηνικής πρωτεΐνης ERCC1 -αλλά όχι της XPF- συσχετίστηκε με μειωμένη ιστοπαθολογική ανταπόκριση σε προεγχειρητική ΧΜΘ με πλατίνα ($p=0.006$) και χειρότερη συνολική επιβίωση ($p=0.04$)²⁹². Χαμηλά επίπεδα του ERCC1 mRNA από τα γαστρικά αδενοκαρκινώματα 38 ασθενών συσχετίστηκαν σημαντικά με την ανταπόκριση σε πλατινούχο συνδυασμό χημειοθεραπείας, αλλά και με τη συνολική τους επιβίωση²⁹³. Επίσης μια άλλη ομάδα στο ίδιο ερευνητικό κέντρο μελέτησε την mRNA έκφραση του ERCC1 σε 50 ασθενείς σταδίου IV μεταστατικού κολλοειδούς

καρκίνου και βρήκε ότι η χαμηλή ERCC1 έκφραση είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας καλύτερης επιβίωσης ($p < 0.001$), αλλά δεν κατάφερε να συσχετιστεί σημαντικά και με καλύτερη ανταπόκριση στη ΧΜΘ των ασθενών ($p = 0.29$)²⁹⁴.

Η χαμηλή έκφραση του ERCC1 mRNA σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος 57 ασθενών με πηλακώδες καρκίνωμα κεφαλής & τραχήλου (HNSCC) συσχετίστηκε με σημαντική αύξηση κινδύνου για HNSCC ($p = 0.0001$) όταν συγκρίθηκε με τα αντίστοιχα επίπεδα ERCC1 mRNA από 103 υγιή άτομα που αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου της μελέτης²⁹⁵. Σε 45 ασθενείς με τοπικά προχωρημένη νόσο HNSCC που αντιμετωπίστηκαν με συνδυασμένη χημιο-ακτινοθεραπεία, τα μειωμένα επίπεδα ERCC1 πρωτεΐνης ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας καλύτερης επιβίωσης ($p = 0.043$)²⁹⁶. Σε μια αντίστοιχης μεθοδολογίας μελέτη με 96 ασθενείς, χαμηλή πρωτεϊνική ERCC1 έκφραση συσχετίστηκε με καλύτερη ανταπόκριση στη χημιοθεραπεία και χαμηλότερο κίνδυνο θανάτου από τη νόσο²⁹⁷. Σε μια προοπτική μελέτη 80 ασθενών με HNSCC που αντιμετωπίστηκαν με συνδυασμένη ή όχι ακτινοθεραπεία με πηλατίνα, η υψηλή έκφραση της XPF πρωτεΐνης, που μετρήθηκε ανοσοϊστοχημικά, φάνηκε να σχετίζεται με ταχύτερη υποτροπή της νόσου²⁹⁸. Η έκφραση των XPF & ERCC1 πρωτεϊνών διερευνήθηκε σε 34 ασθενείς με HNSCC και βρέθηκε ότι η XPF στα μεταστατικά δείγματα των ασθενών ήταν αρκετά υψηλότερη από τα αντίστοιχα πρωτοπαθή. Οι συγγραφείς θεωρούν ότι η XPF πρωτεΐνη ίσως να ευθύνεται για τη χημειοαντοχή στην πηλατίνα που εμφανίζουν οι μεταστατικοί HNSCC²⁹⁹.

Στον καρκίνο του ρινοφάρυγγα, σε 77 ασθενείς με προχωρημένη νόσο που αντιμετωπίστηκαν με συνδυασμένη ακτινο-χημιοθεραπεία με πηλατίνα, η χαμηλή πρωτεϊνική έκφραση του ERCC1 συνδέθηκε με αυξημένη συνολική επιβίωση ($p = 0.013$)²⁹⁹.

Στον καρκίνο του παγκρέατος, η πρωτεϊνική έκφραση του ERCC1 μετρήθηκε ανοσοϊστοχημικά σε 95 ασθενείς. Αυξημένη ERCC1 έκφραση συσχετίστηκε με μικρότερη επιβίωση ελεύθερη υποτροπής (Relapse Free Survival, RFS), ($p = 0.03$) και μικρότερη συνολική επιβίωση ($p = 0.019$)³⁰⁰.

Σε 65 ασθενείς με προχωρημένο αδενοκαρκίνωμα της χοληφόρου οδού που αντιμετωπίστηκαν με πηλατινούχα ΧΜΘ, η πρωτεϊνική έκφραση του ERCC1 συσχετίστηκε με την PFS ($p = 0.014$) και με την OS ($p = 0.017$), αλλά και με το ποσοστό ελέγχου της νόσου (DCR) ($p = 0.048$)³⁰¹.

3.6 Μελέτες έκφρασης του ERCC1 σε ασθενείς με ΜΜΚΠ

Οι Lord και συν. σε μια μελέτη με 56 ασθενείς σταδίου IIB-IV ΜΜΚΠ, που έλαβαν θεραπεία Γεμισταμπίνης/Σισπλατίνης (Gem/CDDP) έδειξαν ότι η χαμηλή mRNA έκφραση του ERCC1 συσχετίστηκε με καλύτερη συνολική επιβίωση ($p = 0.046$)³⁰². Η υψηλή έκφραση του ERCC1 mRNA ήταν ανεξάρτητος προβλεπτικός δείκτης μεγαλύτερης επιβίωσης σε 51 ασθενείς με ΜΜΚΠ σταδίου IA-IIIIB, που υποβλήθηκαν σε πλήρη χειρουργική εξαίρεση του όγκου. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι η καλή λειτουργία του μηχανισμού NER μπορεί να μειώσει τη συσσώρευση των γενετικών ανωμαλιών που συμβάλλουν στη δημιουργία κακοθειών και ως εκ τούτου, να μειώσουν τον κίνδυνο της υποτροπής μετά την οριστική θεραπεία σε ασθενείς με πλήρως εξαιρεθέντες όγκους³⁰³.

Οι Olausson KA και συν. το 2006 διεξήγαγαν τη μεγαλύτερη έως τώρα μελέτη έκφρασης

του ERCC1. Σε 761 δείγματα ασθενών με ΜΜΚΠ με πλήρως εξαιρεθέντες όγκους σταδίου I-IIIΑ, που έλαβαν συμπληρωματική ΧΜΘ με βάση την πηλάτινα αξιολόγησαν ανοσοϊστοχημικά την πρωτεϊνική ERCC1 έκφραση και κατέληξαν ότι η χαμηλή ERCC1 έκφραση σχετίζεται με μακρύτερη επιβίωση και μπορεί να λειτουργήσει ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για την αποτελεσματικότητα της επικουρικής χημειοθεραπείας³⁰⁴. Λίγα χρόνια μετά, το 2011, επιβεβαίωσαν -με κάποιες διαφορές ως προς τη σημαντικότητα- τα αποτελέσματά τους σχετικά με την προγνωστική και προβλεπτική αξία της πρωτεϊνικής έκφρασης του ERCC1 χρησιμοποιώντας μια άλλη αυτοματοποιημένη μέθοδο αξιολόγησης πέραν της ανοσοϊστοχημείας³⁰⁵. Τέλη του 2006 πάλι, μια άλλη αναδρομική μελέτη, χρησιμοποιώντας δείγματα βιοψίας από 43 ασθενείς με προχωρημένου σταδίου ΜΜΚΠ που έλαβαν συνδυασμένη χημειοθεραπεία cisplatin/gemcitabine, επιβεβαίωσε ότι η επιβίωση των ασθενών με χαμηλά επίπεδα ERCC1 mRNA είναι σημαντικά μεγαλύτερη ($p=0.0001$) σε σύγκριση με τους ασθενείς που εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα ERCC1³⁰⁶.

Το 2007 ανακοινώθηκαν τα αποτελέσματα της πρώτης προοπτικής μελέτης με 346 ασθενείς σταδίου IV ΜΜΚΠ, όπου ανάλογα με τα επίπεδα ERCC1 mRNA των ασθενών πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας, καθορίστηκε η χορήγηση πηλάτινας ή κάποιου άλλου φαρμάκου. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι η ομάδα των ασθενών, με ΜΜΚΠ προχωρημένου σταδίου, που έλαβε χημειοθεραπεία βασισμένη στα ERCC1 mRNA επίπεδα, παρουσίασε καλύτερη ανταπόκριση στη ΧΜΘ από την ομάδα ελέγχου. Ωστόσο, δεν υπήρξε καμία διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων στη συνολική επιβίωση των ασθενών³⁰⁷. Σε μια αρκετά μικρότερη προοπτική μελέτη φάσης II, 53 ασθενείς με μεταστατικό ΜΜΚΠ ωφελήθηκαν από την προσαρμογή και εξατομίκευση της χημειοθεραπείας, με βάση τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων ERCC1 και RRM1 (Ribonucleotide reductase subunit 1) όσον αφορά την επιβίωση και την ανταπόκριση στην χημειοθεραπεία³⁰⁸.

Η υψηλή έκφραση του ERCC1 φάνηκε να συνεισφέρει θετικά στην επιβίωση 187 ασθενών με πρώιμου σταδίου ΜΜΚΠ που δεν έλαβαν ΧΜΘ μετά την εκτομή του όγκου³⁰⁹. Σε 68 ασθενείς σταδίου IIIΑ με Ν2 θετικούς λεμφαδένες, η χαμηλή πρωτεϊνική ERCC1 έκφραση φάνηκε να βελτιώνει την επιβίωση μετά από προεγχειρητική συνδυασμένη χημειοακτινοθεραπεία με πηλάτινα ακολουθούμενη από χειρουργική επέμβαση ($p=0.014$)³¹⁰. Σε μια τυχαίοποιημένη μελέτη φάσης III με 170 συνολικά ασθενείς προχωρημένου σταδίου ΜΜΚΠ, η χαμηλή πρωτεϊνική ERCC1 έκφραση συσχετίστηκε σημαντικά με την ανταπόκριση στη ΧΜΘ ($p=0.003$), αλλά όχι με τη συνολική επιβίωση ($p=0.19$), ούτε με την επιβίωση ελεύθερης νόσου ($p=0.53$)³¹¹. Ανάμεσα σε 264 ασθενείς με προχωρημένου σταδίου ΜΜΚΠ, όσοι είχαν αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση του ERCC1 εμφάνισαν καλύτερη διάμεση συνολική επιβίωση (OS) ($P=0.028$) σε μια τυχαίοποιημένη πολυκεντρική μελέτη. Η προβλεπτική αξία του ERCC1 ήταν ακόμα ισχυρότερη στους 122 ασθενείς με ιστολογικό τύπο αδενοκαρκινώματος ($P=0.007$)³¹².

Το 2010 και το 2011 δύο ξεχωριστές ανασκοπήσεις και μετα-αναλύσεις της υπάρχουσας βιβλιογραφίας, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ERCC1 έκφραση (πρωτεϊνική ή mRNA) έχει προβλεπτική και προγνωστική σημασία για τον ΜΜΚΠ προχωρημένου σταδίου, με μια στατιστικά σημαντική αύξηση της ανταπόκρισης στη ΧΜΘ, καθώς και στη συνολική επιβίωση

των ασθενών με χαμηλή ERCC1 έκφραση σε σχέση με τους ασθενείς με υψηλή έκφραση ERCC1^{313,314}.

Παρά την ύπαρξη κάποιων εξαιρέσεων³¹⁵ και αντικρουόμενων αποτελεσμάτων, θα μπορούσε κανείς να υποστηρίξει ότι γενικότερα τα δημοσιευμένα στοιχεία συγκλίνουν στα παρακάτω:

- Η υψηλή έκφραση του ERCC1 αυξάνει τη συνολική επιβίωση στις ομάδες ελέγχου ή στους ασθενείς με πλήρη εκτομή όγκου που δεν χρειάστηκαν μετέπειτα ΧΜΘ^{303,304,305,316}.
- Η χαμηλή έκφραση του ERCC1 αυξάνει τη συνολική επιβίωση στους ασθενείς πρώιμου σταδίου που χρειάστηκαν και έλαβαν συμπληρωματική ΧΜΘ με πηλατίνα^{304,305,309,317,318}.
- Η χαμηλή έκφραση του ERCC1 αυξάνει τη συνολική επιβίωση στους ασθενείς προχωρημένου σταδίου που χρειάστηκαν και έλαβαν πρώτης γραμμής ΧΜΘ με πηλατίνα^{306,308,312,319,320,321,322,323,324,325}.
- Η χαμηλή έκφραση του ERCC1 ενδεχομένως να αυξάνει την ανταπόκριση στη ΧΜΘ (αξιολογημένη σύμφωνα με τα κριτήρια RECIST) στους ασθενείς προχωρημένου σταδίου που έλαβαν πρώτης γραμμής ΧΜΘ με πηλατίνα, αλλήλα τα στοιχεία είναι περιορισμένα^{307,311}.

Σκοπός διδακτορικής διατριβής

4.1 Η σημασία της έρευνας του μονοπατιού NER στον ΜΜΚΠ

Τα πιο σύγχρονα βιβλιογραφικά δεδομένα από τις πρόσφατες έρευνες στον τομέα της ογκολογίας δείχνουν ότι το μέλλον της θεραπευτικής αφορά σε μεγάλο βαθμό τις παρατηρήσεις που γίνονται σε γενετική βάση και που σχετίζονται άμεσα με την ανταπόκριση των ασθενών στη χημειοθεραπεία ή τους βιολογικούς παράγοντες. Με την ανάλυση των γενετικών συμπερασμάτων και την κλινική τους εφαρμογή ο πρωταρχικός στόχος της θεραπείας, δηλαδή η ποιοτική επιβίωση των πασχόντων, βελτιώνεται και αυξάνεται.

Τα πηλατινούχα φάρμακα είναι η ραχοκοκαλιά της χημειοθεραπείας στον ΜΜΚΠ. Δυστυχώς αρκετοί ασθενείς υποτροπιάζουν σύντομα ή αναπτύσσουν αντοχή στη θεραπεία τους. Η κυτταροτοξική δράση της πηλατίνης οφείλεται στη δημιουργία γενωμικών βλαβών, οι οποίες όμως συχνά επιδιορθώνονται από τον μηχανισμό NER³²⁶. Αυτός είναι ένας συχνός τρόπος δημιουργίας αντοχής στην πηλατίνη. Η περαιτέρω αποσαφήνιση της γενετικής βάσης που ευθύνεται για αυτή τη διαφορετική ανταπόκριση των ασθενών στη χημειοθεραπεία μέσω ίσως διαφορετικής απόκρισης του μηχανισμού NER θα μπορούσε να οδηγήσει σε πιο αποτελεσματικές θεραπευτικές προσεγγίσεις και εφαρμογές¹⁷². Το ERCC1 είναι ένα βασικό γονίδιο του μηχανισμού NER και ένας καλός δείκτης για τη δραστηριότητα του NER. Υπάρχουν πολλές ενδείξεις για τη χρησιμότητα του ERCC1 ως δείκτη για την κλινική αντοχή στη χημειοθεραπεία με βάση την πηλατίνη^{327,328}.

Γενικότερα, οι παράγοντες επιδιόρθωσης του DNA είναι καλοί στόχοι για την ανάπτυξη νέων θεραπειών που θα παρακάμψουν την αντοχή των κυττάρων στην χημειοθεραπεία. Εντούτοις, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες, για να διευκρινιστούν οι μηχανισμοί με τους οποίους αυτά τα γονίδια ρυθμίζονται και να καθοριστεί ένα πολυπαραγοντικό προφίλ γενετικών δεικτών που θα προβλέπουν την έκβαση της νόσου των ασθενών. Επιπλέον, αυτοί οι παράγοντες μπορούν να αποδειχθούν πιο κατάλληλοι στόχοι σε μερικούς τύπους καρκίνων από ότι σε άλλους, στους οποίους οι εναλλακτικοί μηχανισμοί αντίστασης μπορεί να υπερικχύουν. Επομένως, οι συγκρίσεις μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών σειρών και δειγμάτων ασθενών είναι απαραίτητες.

Η ερευνητική αυτή εργασία θα δώσει τη δυνατότητα να αναπτυχθούν μοριακοί αλγόριθμοι προσαρμογής της θεραπείας συγκεκριμένων ασθενών βάσει των γενετικών χαρακτηριστικών των όγκων. Το γεγονός αυτό καθιστά τη φαρμακογενωμική αυτή μελέτη κρίσιμη στην κατανόηση και τη βελτίωση της θεραπείας των ασθενών με ΜΜΚΠ. Η προτεινόμενη ερευνητική εργασία θα είναι ουσιώδης στην περαιτέρω ανάπτυξη της νεοσύστατης θεραπευτικής προσέγγισης των ασθενών βάσει της φαρμακογενωμικής, καθώς επίσης και θα συντελέσει στην εξέλιξη της έρευνας όσον αφορά την κατανόηση του ρόλου και ανάπτυξη νέων γενετικών δεικτών προς όφελος των ασθενών με ΜΜΚΠ.

4.2 Επιμέρους στόχοι διδακτορικής διατριβής

Κύριος σκοπός της μελέτης μας είναι η διερεύνηση της συσχέτισης της έκφρασης του γονιδίου ERCC1, τόσο σε επίπεδο mRNA, όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης, με την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και την επιβίωση ασθενών με ΜΜΚΠ προχωρημένου σταδίου που έλαβαν ΧΜΘ με πλατινούχους χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς. Δευτερευόντως, η διερεύνηση της συσχέτισης της έκφρασης του ERCC1 με την έκφραση διαφόρων άλλων γονιδίων/παραγόντων που έχουν προταθεί από τη βιβλιογραφία βασικής έρευνας πως ενδεχομένως να ρυθμίζουν τη δράση του (XPF, XPA, MZF1), και επομένως να επηρεάζουν τη σχέση της έκφρασης του ERCC1 με την ανταπόκριση στη ΧΜΘ και την επιβίωση των ασθενών.

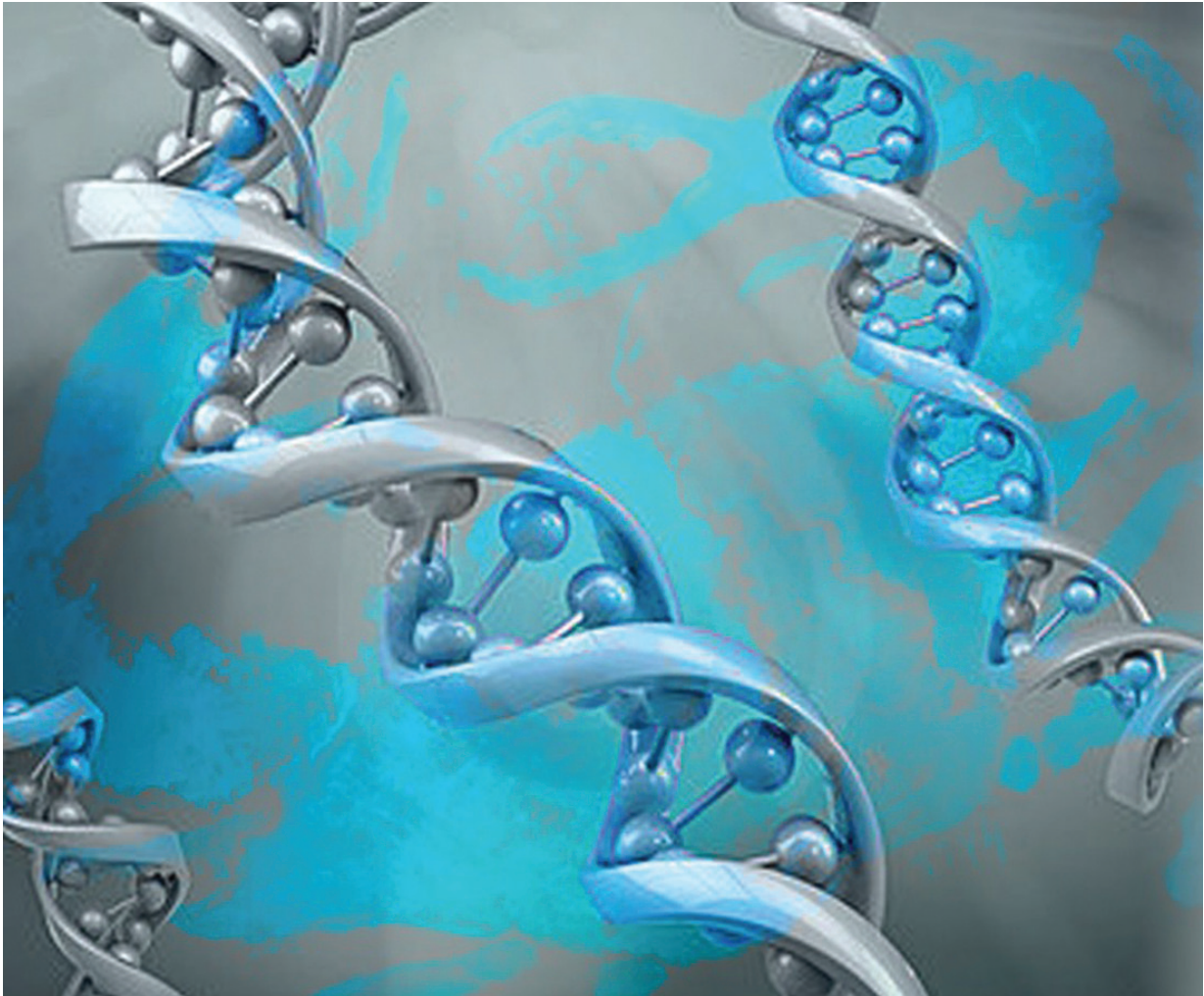
Αναλυτικότερα, *πρώτος στόχος* είναι η έκφραση του ERCC1 να διερευνηθεί τόσο σε γονιδιακό (έκφραση mRNA) όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, και να ελεγχθεί η ενδεχόμενη συσχέτισή τους, καθώς είναι γνωστό πως η ρύθμιση του ERCC1 από διάφορους παράγοντες μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικά επίπεδα έκφρασης mRNA & πρωτεΐνης.

Δεύτερος στόχος είναι να διερευνηθεί η συσχέτιση της έκφρασης του ERCC1 με τα δημογραφικά και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών, την ανταπόκριση τους στη χορηγούμενη ΧΜΘ, καθώς και τη συνολική τους επιβίωση.

Τρίτος στόχος είναι η ανίχνευση της mRNA έκφρασης των γονιδίων XPF, XPA, MZF1 στους ίδιους ασθενείς ώστε να συγκριθεί η έκφραση των γονιδίων αυτών με την έκφραση του ERCC1 και να διερευνηθεί κατά πόσον υπάρχει κάποια αλληλεπίδραση μεταξύ τους.

Τέλος και *απώτερος στόχος* είναι η συσχέτιση της έκφρασης και των 4 γονιδίων (ERCC1, XPF, XPA, MZF1) με την επιβίωση σε ασθενείς με ΜΜΚΠ που έλαβαν πλατινούχο συνδυασμό χημειοθεραπείας πρώτης γραμμής για τη νόσο τους, καθώς και η ενδεχόμενη συσχέτιση με την εμφάνιση αντοχής στη θεραπεία τους.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



«Είναι σημαντικότερο να γνωρίζει κανείς τι είδους άνθρωπος πάσχει από μια ασθένεια παρά από τι είδους ασθένεια πάσχει κάποιος άνθρωπος».

Ιπποκράτης (560-370 π.Χ.)

Ασθενείς & Μέθοδοι

5.1 Κριτήρια ένταξης ασθενών

Οι υποψήφιοι προς ένταξη στη μελέτη ασθενείς έπρεπε να πληρούν τα παρακάτω στοιχεία:

- να έχουν ιστολογικά και κλινικά επιβεβαιωμένη διάγνωση προχωρημένου σταδίου (ανεγχείρητο στάδιο III και IV) ΜΜΚΠ
- να έχουν λάβει χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με πλατινούχο συνδυασμό και να έχει γίνει αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς της σύμφωνα με τα κριτήρια RECIST
- να έχουν τεκμηριωμένη κλινική παρακολούθηση
- να υπάρχει επαρκής διαθεσιμότητα ποιοτικά αποδεκτού βιολογικού υλικού του όγκου για τη μελέτη

5.2 Συλλογή δειγμάτων

Το βιολογικό υλικό αφορούσε αρχειακό υλικό ιστών από τους όγκους των ασθενών της μελέτης που είχε ληφθεί είτε χειρουργικά είτε βρογχοσκοπικά, είχε μονιμοποιηθεί σε διάλυμα ουδέτερης φορμόλης 10% (3.7% β/ο φορμαλδεϋδη) και ακολούθως είχε εγκλισει σε παραφίνη (Formalin Fixed Parafin Embedded tissue - FFPE).

Η αρχική αξιολόγηση και επιλογή του κατάλληλου βιολογικού υλικού από κάθε ασθενή έγινε ιστοχημικά. Κόπηκαν με ειδικό μικροτόμο 1-2 τομές πάχους 4μm από τους κύβους παραφίνης, τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες SuperFrost, βάφτηκαν με τη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, καλύφθηκαν με καλυπτρίδα και παρατηρήθηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο. Με τη βοήθεια των έμπειρων παθολογοανατόμων Ε.Σ και Α.Κ επιλέχθηκαν τα κατάλληλα και πιο αντιπροσωπευτικά διαθέσιμα δείγματα του όγκου κάθε ασθενούς με κριτήρια το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων ανά πλακίδιο και την ποιότητα του ιστού.

Στη συνέχεια κόπηκε επαρκής αριθμός διαδοχικών τομών πάχους 4μm από τους επιλεγμένους κύβους παραφίνης, οι οποίες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες SuperFrost και φυλάχτηκαν σε θερμοκρασία 2-8°C (για τη διαφύλαξη της αντιγονικότητάς τους), ώστε να χρησιμοποιηθούν για την εκτέλεση του πειραματικού σκέλους της ερευνητικής εργασίας.

5.3 Μελέτη έκφρασης ERCC1 πρωτεΐνης

Η μελέτη της έκφρασης του ERCC1 σε επίπεδο πρωτεΐνης έγινε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας σύμφωνα με συγκεκριμένο πρωτόκολλο (Πίνακας 9). Οι τομές από τους κύβους παραφίνης απαιτούν προεργασία αποπαραφινοποίησης και προοδευτικής ενυδάτωσης, οι οποίες και έγιναν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που φαίνεται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7: Αποπαραφινοποίηση και ενυδάτωση τομών

1. Κλιβανισμός: 1 ώρα στους 56°C ή 45 λεπτά στους 60°C

2. Αποπαραφίνωση: Εμβάπτιση σε ξυλόλη για 15-20'

3. Ενυδάτωση: Εμβάπτιση σε ΕΤΟΗ 100% για 15'

- Εμβάπτιση σε ΕΤΟΗ 96% για 10'
- Εμβάπτιση σε ΕΤΟΗ 80% για 5'
- Εμβάπτιση σε ΕΤΟΗ 70% για 5'

4. Έκπλυση με νερό βρύσης & απεσταγμένο

Μετά την αποπαραφινοποίηση και ενυδάτωση, έγινε προ-επεξεργασία με τη χρήση φούρνου μικροκυμάτων και με διάλυμα κιτρικού οξέος για την αποκάλυψη των αντιγονικών θέσεων. Τα πλάκιδια τοποθετούνται σε κιτρικό buffer 10mM (pH 6.0) και θερμαίνονται στα 500 Watt για 5', επί 3 κύκλους. Ενδιάμεσα των κύκλων οι τομές αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να κρυώσουν. Η παρασκευή του κιτρικού buffer έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που φαίνεται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8: Παρασκευή κιτρικού buffer

- Παρασκευή Stock A: 21gr κιτρικό οξύ σε 1lt απεσταγμένο νερό
-
- Παρασκευή Stock B: 29.5gr κιτρικό νάτριο σε 1lt απεσταγμένο νερό
-
- Διάλυμα εργασίας: 9ml από το Stock A, 41ml από το Stock B, και 450 ml απεσταγμένο νερό. Το pH είναι έτοιμο 6.0

Το πρωτοταγές αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το μονοκλωνικό ERCC1 (κλώνος 8F1, Cat MS-671-P, Neomarkers, Fremont, CA, USA), σε αραιώση 1:100 ο/ο (όγκο κατ' όγκον). Η αραιώση του αντισώματος έγινε με το αντιδραστήριο antibody diluent Dako Real. 200ml αραιωμένου αντισώματος αρκούσαν για την πλήρη επικάλυψη του κάθε πλάκιδιου και επομένως του κάθε δείγματος ασθενούς. Η επώαση γινόταν επί 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Για την αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος χρησιμοποιήθηκε το Ultra Vision Detection System AP Polymer Kit (Lab Vision, UK), σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας. Ως

χρωμογόνο χρησιμοποιήθηκε το Fast Red Chromogen (LabVision, Cheshire, UK) για 20 λεπτά και η αντίχρωση έγινε με Mayer's αιματοξυλίνη για 3 λεπτά. Για όλες τις ενδιάμεσες εκπλύσεις τα πλάκidia εμβαπτίζονταν σε διάλυμα Tris Buffered Saline (TBS).

Η παρασκευή του buffer TBS 20X έγινε ως εξής: ανάμιξη (a) Tris 121.1 gr, (b) NaCL 175.5 gr και απεσταγμένο νερό (πιογότερο του 1lt). Πολύ καλή ανάδευση. pHμέτρηση με πυκνό HCL, μέχρι το pH να γίνει 7.6. Συμπλήρωση όγκου με απεσταγμένο νερό έως 1lt. Το διάλυμα αυτό μπορούσε να διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 μήνα και στο ψυγείο έως 3 μήνες. Για να χρησιμοποιηθεί στις εκπλύσεις της ανοσοϊστοχημείας αραιωνόταν 1/20 με απεσταγμένο νερό.

Η παρασκευή του διαλύματος χρωστικής Fast Red έγινε ως εξής: 1 ταμπλέτα Fast Red σε 5ml Nathol phosphate Substrate. Αργή ανάδευση για να μην κάνει αφρό. Το διάλυμα σκεπάζεται με αλουμινοχαρτο για να μην οξειδωθεί η χρωστική με το φως.

Για τον έλεγχο της αξιοπιστίας της ανοσοϊστοχημικής τεχνικής, σε όλα τα πειράματα

Πίνακας 9: Πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημικής χρώσης

1. Προσθήκη Ultra Vision Block για 7'

2. Προσθήκη πρωτοταγούς αντισώματος για 1ώρα σε RT

3. Έκπλυση σε TBS

4. Primary Antibody Enhancer για 20'

5. Έκπλυση σε TBS

6. AP Polymer για 30'

7. Έκπλυση σε TBS

8. Έκπλυση με απεσταγμένο νερό x 2

9. Προσθήκη χρωστικής Fast Red για 20'

10. Έκπλυση σε νερό βρύσης

11. Αιματοξυλίνη mayer's για 3'

12. Έκπλυση σε νερό βρύσης

13. 10-12 εμβαπτίσεις σε αμμωνία

14. Έκπλυση σε νερό βρύσης

15. Κάλυψη με Glycergel Mounting medium

16. Τοποθέτηση καλυπρίδας

χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες τομές από αμυγδαλή που έχει βρεθεί πως υπερεκφράζει ERCC1³⁰⁴. Ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές αμυγδαλής και ΜΜΚΠ χωρίς την προσθήκη του ειδικού πρωτοταγούς αντισώματος.

Η εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έγινε μικροσκοπικά σε μεγέθυνση x400 και x200 σε όλη την έκταση της κάθε τομής των υπό μελέτη ασθενών στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο της Ιατρικής Σχολής. Αξιολογήθηκε μόνο η πυρηνική χρώση ως θετικό σήμα, ενώ ως επιπλέον θετικοί μάρτυρες σε κάθε τομή λήφθηκαν υπ' όψιν οι ινοβλάστες και τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρνα λευκοκύτταρα. Στα ιστικά δείγματα όπου δεν υπήρχαν θετικοί μάρτυρες επαναλήφθηκε η χρώση από διαδοχικές τομές του ίδιου κύβου παραφίνης.

Η αξιολόγηση του βαθμού της χρώσης και επομένως της έκφρασης της ERCC1 πρωτεΐνης έγινε με τη μέθοδο H-score σύμφωνα με την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία³⁰⁴, λαμβάνοντας υπόψη τόσο την ένταση όσο και την έκταση της χρώσης. Η ένταση της χρώσης στο κάθε δείγμα βαθμολογήθηκε σύμφωνα με μία κλίμακα από 0 έως 3 (με τον υψηλότερο αριθμό να δείχνει μεγαλύτερη ένταση), (Πίνακας 10). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα στους ιστούς θετικού ελέγχου της αμυγδαλής χρησιμοποιήθηκαν ως ένταση αναφοράς βαθμού 2. Η έκταση της χρώσης βασίστηκε στο ποσοστό των θετικών κυττάρων ανά πλακίδιο/δείγμα (χρώση πυρήνων) και αποδόθηκε με μία κλίμακα από 0 έως 1.0 (Πίνακας 11)³⁰⁴.

Πίνακας 10: Κλίμακα έντασης ανοσοϊστοχημικής χρώσης

0	Αρνητική χρώση
1	Ασθενής χρώση
2	Μέτρια χρώση
3	Ισχυρή χρώση

Πίνακας 11: Κλίμακα έκτασης ανοσοϊστοχημικής χρώσης

0	0% των κυττάρων είχαν πυρηνική χρώση
0.1	1-9% των κυττάρων είχαν πυρηνική χρώση
0.5	10-49% των κυττάρων είχαν πυρηνική χρώση
1.0	≥50% των κυττάρων είχαν πυρηνική χρώση

Για κάθε ασθενή η έκταση πολλαπλασιάστηκε με την ένταση της πυρηνικής χρώσης για να ληφθεί ένα τελικό ημιποσοτικό H-Score. Η διάμεση τιμή όλων των H-Score επιλέχθηκε εκ των προτέρων ως σημείο αναφοράς για τον διαχωρισμό των ERCC1-θετικών όγκων από τους ERCC1-αρνητικούς³⁰⁴.

5.4 Μελέτη γονιδιακής έκφρασης ERCC1, MZF1, XPA, XPF

Η μελέτη της έκφρασης των υπό διερεύνηση γονιδίων, σε επίπεδο mRNA έγινε με τη μέθοδο της Real-time quantitative RT-PCR, καθώς αυτή η μέθοδος θεωρείται η πιο κατάλληλη για τη μελέτη γονιδιακής έκφρασης σε δείγματα FFPE. Ωστόσο, η διαδικασία της μονιμοποίησης με φορμόλη που ακολουθείται σε αυτά τα δείγματα προκαλεί τον σχηματισμό χιαστών συνδέσεων όλων των ιστικών συστατικών αυτών των δειγμάτων³²⁹. Κατά συνέπεια, το κύριο χαρακτηριστικό που διακρίνει αυτά τα δείγματα είναι ο κατακερματισμός των νουκλεϊνικών

οξέων. Συγκεκριμένα, αναφέρεται πως τα νουκλεϊνικά οξέα που απομονώνονται από τα δείγματα FFPE συνήθως δεν ξεπερνούν τα 300-400 bp όσον αφορά το DNA, και τα 200 bp όσον αφορά το RNA³³⁰. Για τον λόγο αυτόν, σε όλα τα στάδια της γονιδιακής μελέτης δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αποφευχθεί η περαιτέρω αποδόμηση του RNA των δειγμάτων αυτών.

5.4.1 Απομόνωση και καθαρισμός καρκινικών κυττάρων

Οι μικροτομημένοι μονιμοποιημένοι ιστοί κάθε ασθενούς (διαδοχικές τομές από τα ίδια δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοϊστοχημεία) χρωματίστηκαν με τη μέθοδο αιματοξυλίνης-ηωσίνης και έγινε απομόνωση των καρκινικών κυττάρων με τη χρήση ενός λείζερ μικροτόμου με ανεστραμμένο μικροσκόπιο (Piezo Power Eppendorf Microdissector, Germany). Η χρήση της τεχνικής LCM (Laser Capture Microdissection) που αφορά τη σύλληψη κυττάρων μέσω μικροτομής με λείζερ, επιτρέπει την εξαγωγή ενός καθαρού υποπληθυσμού κυττάρων από δείγματα με ετερογενείς ιστικές περιοχές (όπως π.χ. καρκινικοί ιστοί) για πιο αξιόπιστη και λεπτομερή μοριακή ανάλυση³³¹. Η απομόνωση επιτυγχάνεται κατευθύνοντας ένα σύντομο παλμό λείζερ σε συγκεκριμένα κύτταρα ενός τμήματος ιστού που έχει τοποθετηθεί σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Μεμονωμένα κύτταρα ή ομάδες κυττάρων μπορούν να επιλεγούν και δεδομένου ότι με αυτόν τον τρόπο τα κύτταρα και το περιεχόμενό τους δεν καταστρέφονται, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες γονιδιακής έκφρασης σε επίπεδο RNA³³². Πρόκειται για μία τεχνική ιδιαίτερα χρήσιμη σε μελέτες με δείγματα FFPE³³³.

Τα απομονωμένα κύτταρα μετά την LCM συλλήχθηκαν σε σωληνάρια, καθαρίστηκαν με πλύσεις απόλυτης (100%) αιθανόλης και στέγνωσαν σε μορφή κυτταρικής πελλέτας για την πλήρη αφαίρεση της αιθανόλης, καθώς υπολείμματα αιθανόλης αναστέλλουν τη δράση της πρωτεϊνάσης και ως εκ τούτου της πρωτεϊνικής πέψης που έπεται της διαδικασίας (Πίνακας 12).

Πίνακας 12: Καθαρισμός καρκινικών κυττάρων

1. Φυγοκέντρηση 8-10.000 rpm για 5' στους 4°C. Άδειασμα του υπερκλειμένου.
2. 100% ΕΤΟΗ 1.5-2 ml, ανάδευση με το χερι.
3. Φυγοκέντρηση 8-10.000 rpm για 5' στους 4°C. Άδειασμα του υπερκλειμένου.
4. 100% ΕΤΟΗ 1.5-2 ml, ανάδευση με το χερι.
5. Φυγοκέντρηση 8-10.000 rpm για 5' στους 4°C. Άδειασμα του υπερκλειμένου.
6. Αφήνουμε τις πελέτες να στεγνώσουν εντελώς στους 37 °C.

5.4.2 Εκχύλιση ολικού RNA

Στα απομονωμένα καρκινικά κύτταρα έγινε κυτταρική λύση, πρωτεϊνική πέψη και εκχύλιση ολικού RNA με τυποποιημένα αντιδραστήρια από ειδικές κοιλώνες (RNeasy FFPE Kit, Qiagen)

σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας.

Καμία έως τώρα διαθέσιμη μέθοδος απομόνωσης RNA δεν μπορεί να εγγυηθεί τη μη πρόσμιξή του με ίχνη DNA που μπορεί να διέφυγαν της διαδικασίας. Για τον λόγο αυτόν, μετά την εκχύλιση του, το ολικό RNA υπέστη επεξεργασία με δεοξυριβονουκλεάση (DNase), ένα ένζυμο που διασπά τυχόν θραύσματα DNA, ώστε να μην υπάρχουν ενδογενείς ή/και εξωγενείς προσμίξεις με ποσότητες DNA κατά τη μετέπειτα ποσοτικοποίηση και αξιολόγηση της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων. Για την επεξεργασία με Dnase χρησιμοποιήθηκαν τα προϊόντα: Dnase-free™ Kit της Ambion Applied Biosystems, και RNase-Free DNase Set της Qiagen σύμφωνα με τις οδηγίες της κάθε εταιρείας. Η δραστηριότητα και των δύο ενζύμων ελέγχθηκε πριν χρησιμοποιηθούν στα δείγματα των ασθενών της μελέτης και έδειξε παρόμοια αποτελέσματα.

5.4.3 Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος ολικού RNA

Στη συνέχεια, το RNA προσδιορίστηκε ποσοτικά και αξιολογήθηκε ποιοτικά για την καθαρότητά του με τη χρήση ενός φασφατοφωτομέτρου (Nanodrop, ND-1000), με βάση τον υπολογισμό του λόγου της οπτικής πυκνότητας κάθε δείγματος στα 260nm ως προς την οπτική του πυκνότητα στα 280nm, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η μέγιστη καθαρότητα αντιστοιχεί σε τιμή του λόγου ίση με 2. Για τη μέτρηση απαιτείται 1-2μl από κάθε δείγμα. Δείγματα με τιμές λόγου απορρόφησης A260/A280nm μεγαλύτερες από 1.8 και μικρότερες από 2.2 έγιναν δεκτά για την καθαρότητα τους και φυλάχθηκαν σε καταψύκτες στους -80°C έως ότου απομονωθεί το RNA όλων των υπό μελέτη δειγμάτων. Δείγματα με μη αποδεκτούς λόγους απορρόφησης θεωρήθηκαν ακατάλληλα για τη συνέχεια των πειραμάτων και είτε επαναλήφθηκε η μέθοδος από την αρχή της κοπής των ιστοτεμαχίων, απομόνωσης καρκινικών κυττάρων και εκχύλισης ολικού RNA, είτε αποκλείστηκαν από τη μελέτη.

5.4.4 Σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Η αντίστροφη μεταγραφή του RNA (reverse transcription PCR, rt-PCR) προς σύνθεση του συμπληρωματικού μονόκλωνου DNA (cDNA) καταλήφθηκε από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση Superscript III της Invitrogen, 200U/μl, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας. Ίση ποσότητα RNA (500ng) από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε για την αντίστροφη μεταγραφή. Το RNA των δειγμάτων FFPE όπως προαναφέρθηκε είναι κατακερματισμένο, για τον λόγο αυτόν κατά την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκαν τυχαία εξαμερή ως εκκινητές (συγκέντρωσης 250ng/μl), που υβριδοποιούνται μη ειδικά στο σύνολο των μορίων RNA που έχουν εκχυλιστεί, επιτρέποντας έτσι στην Superscript III να χρησιμοποιήσει ως εκμαγείο το σύνολο του RNA για να προσθέσει τα συμπληρωματικά με το κάθε μόριο τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια dNTP's (συγκέντρωσης 10mM) για τη δημιουργία του cDNA.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε ειδική συσκευή θερμικού κυκλοποιητή (MJ Research PTC-200 PCR Thermal Cycler) σε 20μl τελική αντίδραση για κάθε δείγμα (Πίνακες 13, 14). Στο τέλος της αντίδρασης κάθε δείγμα ήταν σε συγκέντρωση 25ng/μl (500ng αρχική ποσότητα RNA σε 20μl τελικό όγκο).

Πίνακας 13: Συγκεντρώσεις και όγκοι αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την τεχνική της αντίστροφης μεταγραφής

Αντιδραστήρια	Όγκος (Συγκέντρωση)
Μήτρα RNA	x μl (500ng)
Τυχαίοι εκκινητές (Random Primers)	1μl (250ng/μl)
Ολιγονουκλεοτίδια: dNTP Mix	1μl (10mM)
Ρυθμιστικό διάλυμα: First Strand Buffer	4μl (5X)
DTT	1μl (0.1M)
RNaseOUT	1μl (40 units/μl)
Ένζυμο: SuperScript™ III RT	1μl (200 units/μl)
DEPC water	Έως τελικό όγκο 20μl

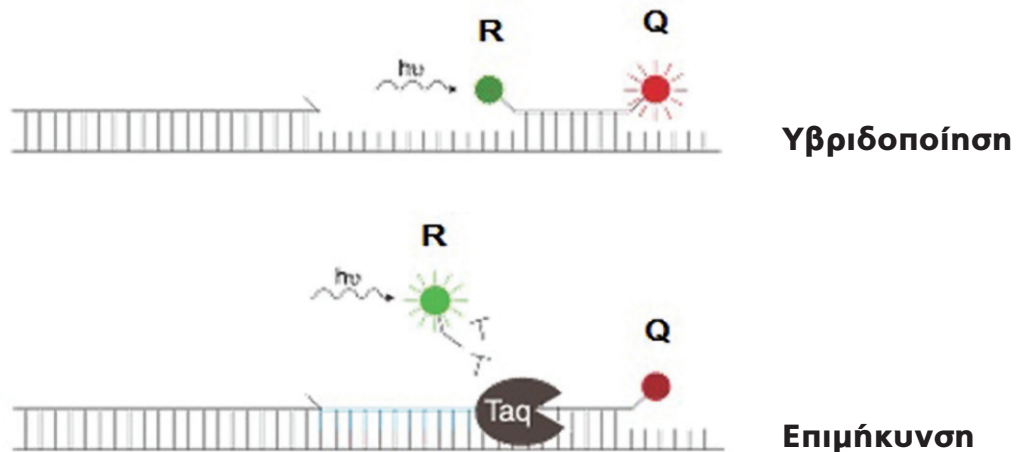
Πίνακας 14: Συνθήκες αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής

Αποδιάταξη εκκινητών και RNA	65°C για 5' & στον πάγο για τουλάχιστον 1'
Αναδιάταξη και υβριδοποίηση	25°C για 5'
Επιμήκυνση	55°C για 60'
Απενεργοποίηση του ενζύμου	70°C για 15'

Για τον έλεγχο της διαδικασίας και της μη επιμόλυνσης από εξωγενές DNA, ως αρνητικός μάρτυρας σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα που δεν περιείχε RNA αλλά μόνο νερό DEPC-treated. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε δείγμα από εμπορικό RNA πνεύμονα (Lung 1μg/l) που χρειάστηκε ως συγκριτικός παράγοντας έκφρασης (calibrator) για το επόμενο στάδιο της διαδικασίας.

5.4.5 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

Το 1992, οι Higuchi R. και συν. πρωτοδημοσίευσαν μια νέα αυτοματοποιημένη μέθοδο που ανέπτυξαν, με την οποία μπορούσαν ταυτόχρονα να ενισχύουν και να ανιχνεύουν αλληλουχίες DNA. Επρόκειτο για την κατά μεγάλο βαθμό βελτιωμένη έκδοση της απλής PCR, την ποσοτική



Εικόνα 23: Σχηματική αναπαράσταση της υδρόλυσης του Taqman ιχνηθέτη (probe) από την Taq πολυμεράση. Κατά την υβριδοποίηση η ενέργεια μικρού μήκους κύματος από το φθορίζον μόριο αναφοράς (Reporter, πράσινο) μεταφέρεται στο μόριο αποσβέστη μεγαλύτερου μήκους κύματος (Quencher, κόκκινο). Κατά την επιμήκυνση, όταν η πολυμεράση προσθέτει νουκλεοτίδια στο DNA εκμαγείο απελευθερώνει τον Reporter καθιστώντας το φθορίζον του σήμα ανιχνεύσιμο³⁴¹.

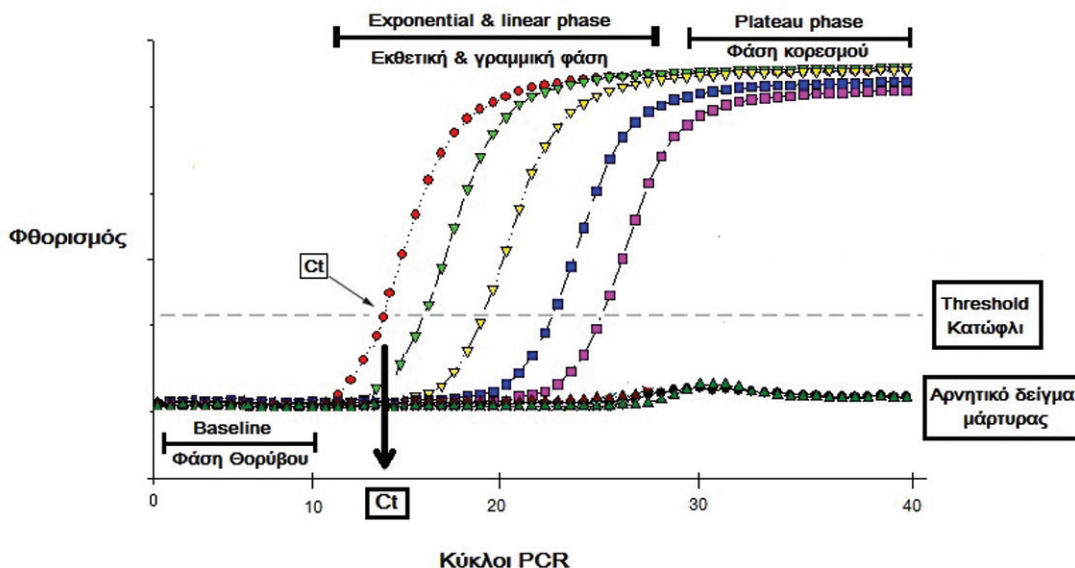
αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction, RTqPCR) και η χρήση της διαδόθηκε πολύ γρήγορα³³⁴. Η μέθοδος RTqPCR είναι μια ακριβής και ευαίσθητη μέθοδος για τη μελέτη γονιδιακής έκφρασης. Ειδικότερα για τα γονίδια με χαμηλό αριθμό μεταγράφων, αυτή είναι η μόνη μέθοδος διαθέσιμη, δεδομένου ότι η ευαισθησία των υπολοίπων (π.χ. Northern blotting) είναι πάρα πολύ χαμηλή για να ανιχνεύσει το υπάρχον mRNA³³⁵. Επιπλέον, για την ανάλυση, απαιτείται σχετικά λίγο RNA και επομένως είναι μια ιδανική μέθοδος για την έκφραση γονιδίων σε δείγματα ασθενών, η ποσότητα των οποίων είναι περιορισμένη, όπως δείγματα FFPE, δείγματα από βιοψίες ή κυτταρολογικές εξετάσεις³³⁶.

Στην παρούσα μελέτη, η μέθοδος RTqPCR τεχνολογίας TaqMan™, χρησιμοποιήθηκε για τη σχετική ποσοτικοποίηση της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων. Η Real-Time PCR τεχνολογίας TaqMan™ βασίζεται στην ιχνηθέτηση των προϊόντων της PCR και εν συνεχεία στην ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό του σήματος φθορισμού που εκλύεται εκθετικά κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Ο ιχνηθέτης φθορισμού ή ανιχνευτής υδρόλυσης (probe τύπου TaqMan) είναι 5'-3' διπλοϊχνηθετημένος έτσι ώστε στο 5' άκρο του να έχει ένα φθορίζον μόριο αναφοράς (reporter) και στο 3' άκρο του ένα μόριο αποσβέστη, το οποίο «διαλύει» το φθορίζον σήμα που εκπέμπει ο reporter (quencher)³³⁷. Συγκεκριμένα, ο quencher τεχνολογίας Taqman αποσβένει το σήμα του reporter με τη μεταφορά ενέργειας φθορισμού (FRET, fluorescence resonance energy transfer), μια διαδικασία κατά την οποία ο reporter μεταφέρει το σήμα φθορισμού στον quencher και εκείνος στη συνέχεια το απελευθερώνει σαν φωτεινή ενέργεια μεγαλύτερου μήκους κύματος. Ωστόσο, επειδή η μεταφορά τύπου FRET είναι εξαρτώμενη από την απόσταση μεταξύ των δύο εμπλεκόμενων μορίων, ο ιχνηθέτης

τύπου Taqman δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 40 ζεύγη βάσεων (bp) σε μήκος³³⁸.

Ο ικνηθέτης σχεδιάζεται έτσι ώστε να υβριδοποιείται συμπληρωματικά στην αλληλουχία του γονιδίου στόχου ανάμεσα στους εκκινητές (forward & reverse primers) της κλασικής PCR. Κατά την εκθετική ενίσχυση (πολλαπλασιασμό) του DNA εκμαγείου (που στην παρούσα μελέτη ήταν το cDNA κάθε δείγματος που παράχθηκε από τη διαδικασία που αναλύθηκε στο κεφάλαιο 5.4.4), η Taq πολυμεράση, στην πορεία της επιμήκυνσης της συμπληρωματικής αλυσσού, υδρολύει τον συνδεδεμένο probe, ο οποίος απελευθερώνεται από το DNA εκμαγείο με τα δύο του άκρα (reporter-quencher) διαχωρισμένα³³⁹, με αποτέλεσμα το σήμα φθορισμού από το 5' άκρο του να ανιχνεύεται αυξανόμενο εκθετικά ανάλογα με τον αριθμό των κύκλων της PCR. Η μέτρηση αυτού του εκπεμπόμενου φθορισμού των προϊόντων της PCR γίνεται σε κάθε κύκλο, δηλαδή σε πραγματικό χρόνο. Συνεπώς, η ένταση του σήματος στο τέλος κάθε κύκλου εξαρτάται από τη συγκέντρωση του παραγόμενου προϊόντος³⁴⁰.

Στην αρχή της αντίδρασης, δηλαδή στους πρώτους 3-15 κύκλους (baseline), το παραγόμενο προϊόν είναι λίγο και επομένως και ο εκπεμπόμενος φθορισμός είναι ασθενής και δεν ξεπερνάει τη «φάση θορύβου» (Background phase ή baseline fluorescence). Στο σημείο που η αντίδραση βρίσκεται στην εκθετική φάση, ένα σημείο-κατώφλι καθορίζει πότε όλα τα δείγματα μπορούν να συγκριθούν μεταξύ τους³⁴². Το κατώφλι υπολογίζεται με βάση τη φάση θορύβου και συγκεκριμένα ορίζεται ως 10 φορές της τυπικής απόκλισης (standard deviation) από το μέσο σήμα φθορισμού της baseline. Ο κλασματικός αριθμός των κύκλων που χρειάζεται κάθε δείγμα για να φτάσει και να ξεπεράσει αυτό το κατώφλι, ονομάζεται «οριακός κύκλος» (cycle threshold ή Ct).



Εικόνα 24: Ενδεικτική γραφική αναπαράσταση της ενίσχυσης ενός προϊόντος με τη μέθοδο RTqPCR. Οι καμπύλες ενίσχυσης έχουν τυπικά σιγμοειδή μορφή στην οποία η εκθετική φάση ενίσχυσης αποκαλύπτει τον αριθμό των κύκλων PCR που απαιτούνται για να επιτευχθεί μια ορισμένη ένταση φθορισμού³⁴³.

Όταν το σήμα φθορισμού υπερβαίνει τη φάση θορύβου, το προϊόν ενισχύεται εκθετικά σύμφωνα με την εξίσωση: $N = N_0 \times (1+E)^n$, όπου N: η ποσότητα της αλληλουχίας-στόχου μετά από n κύκλους, N_0 : η αρχική ποσότητα του στόχου, n: ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης, E: η απόδοση της αντίδρασης PCR³⁴⁴. Η εκθετική αύξηση του προϊόντος είναι εμφανής με τη μορφή της λογαριθμικής ή εκθετικής φάσης (exponential phase) της γραφικής παράστασης πολλαπλασιασμού του προϊόντος, και μετέπειτα της γραμμικής φάσης (linear phase), όπου η απόδοση της αντίδρασης είναι η μέγιστη. Στη συνέχεια, η απόδοση της αντίδρασης μειώνεται καθώς εισέρχεται στη φάση κορεσμού (plateau). Σε αυτό το σημείο όλα τα δείγματα έχουν το ίδιο επίπεδο φθορισμού, ενώ κατά τη λογαριθμική φάση ο φθορισμός των δειγμάτων διαφέρει και είναι άμεσα εξαρτώμενος από την αρχική συγκέντρωση της υπό ενίσχυση αλληλουχίας-στόχου στο δείγμα. Συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της υπό ενίσχυση αλληλουχίας-στόχου στο αρχικό δείγμα, τόσο λιγότεροι κύκλοι ενίσχυσης είναι απαραίτητοι ώστε ο εκλυόμενος φθορισμός να φτάσει το κατώφλι του οριακού κύκλου. Επομένως, μικρότερες τιμές Ct συνεπάγονται μεγαλύτερη συγκέντρωση της αλληλουχίας-στόχου στο αρχικό δείγμα³⁴⁵.

Η σχετική ποσοτικοποίηση μπορεί να γίνει είτε με τη μέθοδο της πρότυπης καμπύλης (Standard curve method), είτε με τη συγκριτική μέθοδο $\Delta\Delta Ct$ (Comparative CT method)³⁴⁶. Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε η συγκριτική μέθοδος, καθώς η μέθοδος πρότυπης καμπύλης απαιτεί μεγαλύτερες ποσότητες δειγμάτων. Στη συγκριτική μέθοδο χρησιμοποιείται ένα ενδογενές πρότυπο ελέγχου (endogenous/internal control) και ένας μάρτυρας σύγκρισης ή δείγμα ελέγχου (calibrator/control sample). Ως ενδογενή πρότυπα ελέγχου χρησιμοποιούνται διάφορα γονίδια αναφοράς (reference ή housekeeping genes), η έκφραση των οποίων υποτίθεται ότι είναι αμετάβλητη³⁴⁷ (βλ. Κεφ. 5.4.6). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται κάποιο άλλο δείγμα RNA, που να προέρχεται κατά προτίμηση από κανονικό, υγιή ιστό, χωρίς μορφολογικές αλλοιώσεις³³⁰, ενώ η χρήση ολικού RNA ως παράγοντα σύγκρισης θα πρέπει να αποφεύγεται³⁴⁸.

Η σχετική ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης κάθε δείγματος υπολογίζεται αρχικά με την ομαλοποίηση της έκφρασης του γονιδίου στόχου με εκείνη ενός κατάλληλου γονιδίου αναφοράς σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{γονιδίου στόχου}} - Ct_{\text{γονιδίου αναφοράς}}.$$

Στη συνέχεια η ομαλοποιημένη έκφραση κάθε γονιδίου στόχου για κάθε υπό μελέτη δείγμα συγκρίνεται με την αντίστοιχη ομαλοποιημένη έκφραση του μάρτυρα σύγκρισης σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{δείγματος}} - \Delta Ct_{\text{μάρτυρα}} = [Ct_{\text{γονιδίου στόχου}} - Ct_{\text{γονιδίου αναφοράς}}]_{\text{δείγματος}} - [Ct_{\text{γονιδίου στόχου}} - Ct_{\text{γονιδίου αναφοράς}}]_{\text{μάρτυρα}}.$$

Τέλος η αριθμητική ποσότητα της σχετικής έκφρασης του mRNA κάθε γονιδίου στόχου για κάθε δείγμα υπό μελέτη υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο³⁴⁹:

$$\text{mRNA σχετική έκφραση} = 2^{-\Delta\Delta Ct}.$$

Ουσιαστικά, αυτός ο τύπος μας δείχνει την αλληλαγή που έχει συμβεί στην ποσότητα του γονιδίου-στόχου στο υπό μελέτη δείγμα σε σχέση με την ποσότητά του στον φυσιολογικό ιστό του μάρτυρα. Για τον λόγο αυτόν στην παρούσα μελέτη, ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα εμπορικού RNA πνεύμονα (Human Adult Lung 1μg/l, Stratagene).

Επίσης, στην παρούσα μελέτη, η Real-Time PCR πραγματοποιήθηκε με τη συσκευή ABI PRISM 7900 HT Fast Real Time PCR System και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό Sequence Detection System (SDS2.3) της Applied Biosystems. Οι συνθήκες της αντίδρασης φαίνονται στον Πίνακα 15. Όλα τα πειράματα έγιναν σε πλάκες μικροτιτλοδότησης (plates) 384 θέσεων. Κάθε δείγμα καταλάμβανε 3 ξεχωριστές θέσεις στην πλάκα μικροτιτλοδότησης, για τον έλεγχο και την επιβεβαίωση της επαναληψιμότητας των πειραμάτων. Στα δείγματα με τυπική απόκλιση των 3 τιμών CT >0.2, είτε επαναλήφθηκε η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και RTqPCR, είτε εξαιρέθηκαν από τη μελέτη.

Για την αντίδραση της RTqPCR χρησιμοποιήθηκε ως ρυθμιστικό διάλυμα το αντιδραστήριο 1X Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG της Invitrogen. Ο τελικός όγκος της κάθε αντίδρασης ήταν 12.5μl, εκ των οποίων 2.5 μl καταλάμβανε το δείγμα του κάθε ασθενούς. Για το γονίδιο TBP, η συγκέντρωση των εκκινητών στην τελική αντίδραση ήταν 900nM, και του ιχνηθέτη 200nM. Για τα γονίδια ACT, ERCC1, MZF1, XPA, XPF, η συγκέντρωση των εκκινητών στην τελική αντίδραση ήταν 300nM, και των ιχνηθετών 100nM. Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση παρατίθενται στον Πίνακα 16. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ιχνηθέτες είναι εξαιρετικά ευαίσθητοι στο φως. Ως εκ τούτου φυλάσσονται σε κουτιά που τους προφυλάσσουν από την έκθεση στο φως και είναι το τελευταίο στοιχείο που προσθέτουμε στο μίγμα της αντίδρασης. Τέλος όλη η προετοιμασία της αντίδρασης στην πλάκα μικροτιτλοδότησης γινόταν σε χαμηλή θερμοκρασία (0°C) για την αποφυγή της ενεργοποίησης της Taq πολυμεράσης προτού τοποθετηθεί η πλάκα στη συσκευή ABI PRISM.

Σε κάθε plate υπήρχε αρνητικός μάρτυρας για τον έλεγχο επιμόλυνσης των αντιδραστηρίων όπου στη θέση του δείγματος έμπαινε ίση ποσότητα DEPC νερού (no template control, NTC). Επίσης σαν κανονικά δείγματα ενισχύθηκαν και ελέγχθηκαν για την αρνητική τους έκφραση όλοι οι αρνητικοί μάρτυρες της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής (βλ. Κεφ 5.4.4), καθώς και δείγματα από το εκχυλισμένο RNA των ασθενών που δεν είχαν υποστεί τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, ώστε να επιβεβαιωθεί η μη επιμόλυνση του αρχικού RNA από εξωγενές DNA. Η μη επιμόλυνση των δειγμάτων κατά τη διαδικασία της RTqPCR

Πίνακας 15: Συνθήκες αντίδρασης RTqPCR

Αρχικό βήμα ενεργοποίησης της πολυμεράσης	50°C για 2'
Αποδιάταξη cDNA	95°C για 10'
Αποδιάταξη και Υβριδοποίηση εκκινητών/ιχνηθέτη	95°C για 15" x 40 κύκλους
Επιμήκυνση	60°C για 1' x 40 κύκλους

επιτεύχθηκε με προσεκτικούς εργαστηριακούς χειρισμούς. Όλοι οι αρνητικοί μάρτυρες κατά το τέλος της ανάλυσης είχαν μηδενική ενίσχυση, γεγονός που επιβεβαίωσε την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων των δειγμάτων και απέκλεισε την πιθανότητα επιμόλυνσης από εξωγενές γονιδιωματικό DNA.

Πίνακας 16: Συγκεντρώσεις και όγκοι αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την RTqPCR

Αντιδραστήρια	Όγκος
cDNA εκμαγείο	2.5μl
Εκκινητές (Primers)	0.3μl
Ιχνηθέτες (Probes)	0.1 μl
PCR mix	6.25μl
DEPC water	3.05μl

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου είναι προαπαιτούμενο για τη χρήση της³⁴⁸. Αρχικά πολλαπλά πειράματα επαναληψιμότητας έγιναν τόσο για τη βελτιστοποίηση όλων των εργαστηριακών τεχνικών της μελέτης, όσο και για την επιβεβαίωση της επαναληψιμότητας των μεθόδων. Σε αυτά συμπεριλήφθηκαν δείγματα εμπορικών RNA (lung, liver), δείγματα φυσιολογικού πνεύμονα (FFPE) αλλά και δείγματα ασθενών (FFPE), δείγματα από κυτταρικές σειρές MMΚΠ, καθώς και δείγματα από τις κυτταρικές σειρές όπου τα κύτταρα επεξεργάζονταν με μονιμοποίηση σε φορμόλη και έγκλιση σε παραφίνη για την προσομοίωση της διαδικασίας και της ποιότητας των δειγμάτων των ασθενών της μελέτης. Όλα τα πειράματα επαναληψιμότητας τηρούσαν τις προϋποθέσεις των κατευθυντήριων οδηγιών της Applied Biosystems για τη συγκριτική μέθοδο³⁵⁰. Συγκεκριμένα, σε όλες τις περιπτώσεις, η κλίση της πρότυπης καμπύλης μεταξύ των τιμών DCT για διαδοχικές αραιώσεις όλων των προαναφερθέντων δειγμάτων ελέγχου για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας ήταν < 0.1.

5.4.6 Γονίδια αναφοράς

Ως γονίδια αναφοράς ορίζονται τα γονίδια των οποίων η έκφραση είναι παρούσα σε κάθε κύτταρο του οργανισμού και είναι αναγκαία για την επιβίωση του κυττάρου. Θεωρείται ότι παρουσιάζουν ελάχιστη διακύμανση της ποσότητας του αγγελιοφόρου mRNA τους σε διάφορους ιστούς και επομένως ελάχιστη μεταβολή κατά την έκφρασή τους σε διάφορες πειραματικές συνθήκες³⁴⁷. Αυτά τα γονίδια χρησιμοποιούνται για την εξομάλυνση και τον έλεγχο της σχετικής ποσοτικοποίησης άλλων γονιδίων υπό δοκιμή³⁵¹. Σε πολλές μελέτες χρησιμοποιείται μόνο ένα γονίδιο αναφοράς, παρόλο που δεν έχει έως τώρα ταυτοποιηθεί κάποιο «μοναδικό» γονίδιο αναφοράς³⁵². Ωστόσο, έχουν παρατηρηθεί τελικά διακυμάνσεις

στην έκφραση αρκετών γονιδίων αναφοράς σε διάφορους ιστούς³⁵³, και τέτοιες απρόβλεπτες αλληλαγές μπορεί πολύ εύκολα να οδηγήσουν σε εσφαλμένα αποτελέσματα και συμπεράσματα³⁵⁴. Επιπλέον τέτοιες αλληλαγές είναι πολύ δύσκολο να ανιχνευτούν όταν τα πειράματα περιλαμβάνουν μόνο ένα γονίδιο αναφοράς³⁵⁵. Για τον λόγο αυτόν είναι προτιμότερο και εγκυρότερο όσον αφορά τα αποτελέσματα μιας μελέτης να χρησιμοποιείται ως μέσο σύγκρισης ο μέσος όρος της έκφρασης περισσότερων του ενός γονιδίων αναφοράς κατά τη σχετική ποσοτικοποίηση με τη συγκριτική μέθοδο ΔΔCt³⁵⁵.

Ο προσδιορισμός ενός σωστού εσωτερικού προτύπου σύγκρισης αποτελεί θεμελιώδη προϋπόθεση για την έναρξη οποιασδήποτε εργασίας σχετικά με την ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης³⁵⁶. Τα γονίδια αναφοράς θα πρέπει να έχουν επίπεδο έκφρασης κοντά σε εκείνο του γονιδίου στόχου³⁵⁷. Όταν χρησιμοποιούνται πολλαπλά γονίδια αναφοράς, τα επιλεγμένα γονίδια αναφοράς θα πρέπει να ρυθμίζονται ανεξάρτητα και ιδανικά να αφορούν διαφορετικές φυσιολογικές οδούς. Η χρήση πολλών διαφορετικών γονιδίων αναφοράς στο ίδιο πείραμα συνιστάται έντονα από όλους τους συγγραφείς που εργάζονται στην ομαλοποίηση της συγκριτικής RTqPCR³⁵⁸, καθώς υπάρχουν δεδομένα που κρίνουν ακατάλληλη τη χρήση ενός μόνο γονιδίου αναφοράς σε μελέτες έκφρασης γονιδίων³⁵⁹.

Στην παρούσα μελέτη ως ενδογενή γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν τα ACTB (Beta actin) και TBP (TATA box Binding Protein).

Το γονίδιο ACTB κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού, συγκεκριμένα κωδικοποιεί μία από τις 6 διαφορετικές ισομορφές της ακτίνης που έχουν εντοπιστεί στον άνθρωπο³⁶⁰. Πρόκειται για εξαιρετικά διατηρημένες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην κυτταρική δομή, ακεραιότητα και κινητικότητα, και το γονίδιο έχει βρεθεί να παρουσιάζει υψηλή έκφραση σε σχεδόν όλους τους ανθρώπινους ιστούς³⁶¹. Το γονίδιο ACTB βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7, στη θέση 7q22 και περιέχει 6 εξώνια³⁶⁰. Το mRNA του εκτείνεται σε 1852bp³⁶² και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 375 αμινοξέων (41737 Da)³⁶³.

Το γονίδιο TBP κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που λειτουργεί ως υπομονάδα του μεταγραφικού παράγοντα TFIID της RNA πολυμεράσης II και παρουσιάζει μέτρια έκφραση στους περισσότερους ιστούς. Βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6, στη θέση 6q27 και περιέχει 8 εξώνια. Έχουν βρεθεί 2 εναλλακτικά μετάγραφα που κωδικοποιούν 2 διαφορετικές ισομορφές της TBP³⁶⁴. Το transcript variant 1 είναι το μεγαλύτερο μετάγραφο, εκτείνεται σε 1921 bp³⁶⁵ και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 339 αμινοξέων³⁶⁶. Το transcript variant 2 διαφέρει στην 5' UTR περιοχή, εκτείνεται σε 1719 bp³⁶⁷ και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 319 αμινοξέων που είναι βραχύτερη στο αμινοτελικό της άκρο σε σχέση με την ισομορφή 1³⁶⁸.

5.4.7 Σχεδιασμός εκκινητών και ανιχνευτή

Ο σχεδιασμός των αλληλουχιών των primers & probes που θα ενισχύουν ειδικά μόνο τα γονίδια στόχους και αναφοράς στα δείγματα των ασθενών της συγκεκριμένης μελέτης έγινε με τη χρήση των λογισμικών: Vector NTI και Primer Xpress™ 2.0 (Applied Biosystems). Δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή ώστε να τηρούνται οι ακόλουθοι κανόνες κατά τον σχεδιασμό:

- Το μήκος των εκκινητών να κυμαίνεται στις 15-30 βάσεις.
- Η θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (Tm) να είναι περίπου 58-60°C. Κάθε ζεύγος εκκινητών να έχει παρόμοια θερμοκρασία και οι ιχνηθέτες να έχουν θερμοκρασία κατά 8-10°C υψηλότερη.

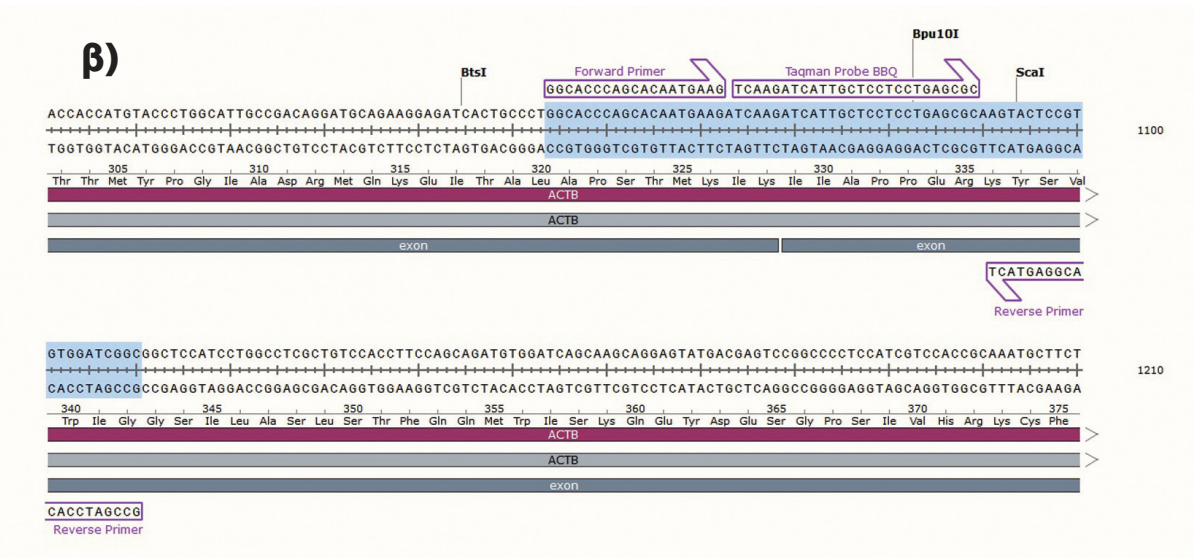
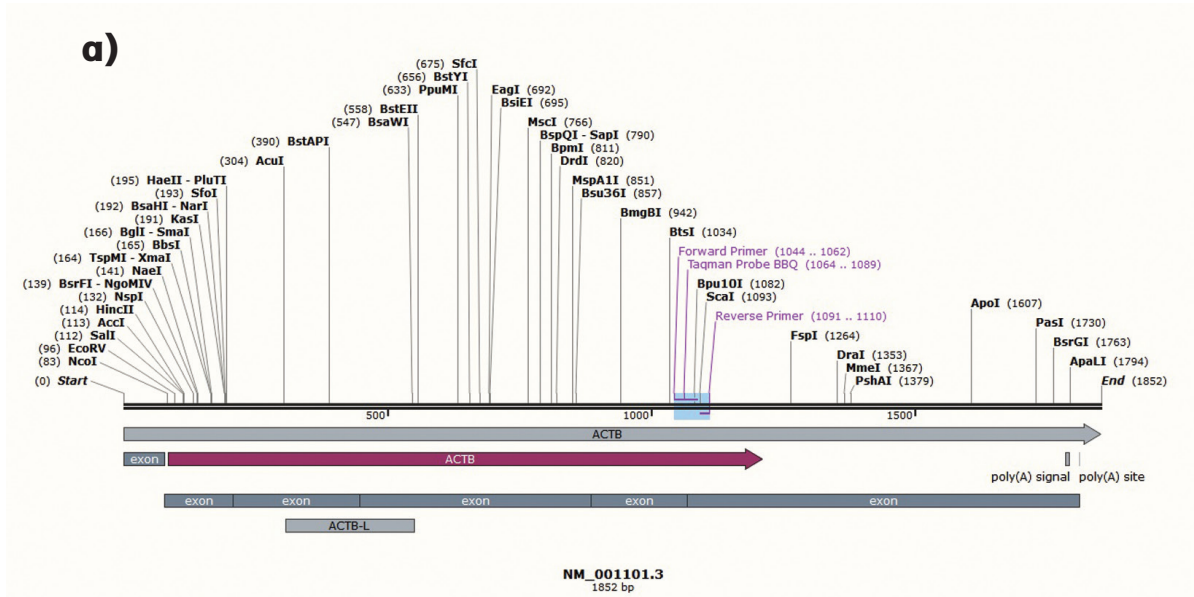
- Τόσο οι αλληλουχίες των εκκιντών όσο και των probes να μην σχηματίζουν ομοδιμερείς ή ετεροδιμερείς συνδέσεις ώστε να μην επηρεαστεί η απόδοση της αντίδρασης της RTqP-CR. Για τον λόγο αυτόν αποφεύχθηκαν οι διαδοχικά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ή βάσεις.
- Η περιεκτικότητα σε Gs και Cs να είναι 30-80%.
- Ο συνολικός αριθμός των Gs και Cs κατά τα τελευταία πέντε νουκλεοτίδια στο 3' άκρο του εκκιντή να μην υπερβαίνει τα τρία, ώστε να αποφεύγεται η λάθος υβριδοποίηση σε περιοχές πλούσιες σε GC, αλλιώς και για τη μείωση της μη-ειδικής εκκίνησης. Να μην υπάρχει G στο 5' άκρο και γενικά να υπάρχουν περισσότερα Cs από Gs.
- Το μέγιστο μήκος του εκμαγείου προς πολυπλοκασισμό να μην υπερβαίνει τα 100 ζεύγη βάσεων, λόγω κατακερματισμού του RNA στα FFPE δείγματα, όπως προαναφέρθηκε.
- Όταν ήταν δυνατόν οι εκκιντές να υβριδοποιούνται σε συνδέσεις διαδοχικών εξωνίων, σαν πρόσθετο μέτρο αποφυγής της ενίσχυσης μολυσματικού-γενωμικού DNA που περιέχει και ενδιάμεσα εσώνια.
- Η αναζήτηση Blast για όλους τους εκκιντές και ικνηθέτες να επιβεβαιώνει την ειδικότητά τους.

5.4.7.1 Γονίδιο ACT

Ο πρόσθιος εκκιντής για το γονίδιο ACTB, υβριδοποιείται στο τέλος του 5^{ου} εξωνίου στις θέσεις 1044-1062 και έχει βάρος 5815.8 Da. Ο ικνηθέτης υβριδοποιείται στη σύνδεση του 5^{ου} με το 6^ο εξώνιο, στις θέσεις 1064-1089 και έχει βάρος 7882.2 Da. Ο ανάστροφος εκκιντής υβριδοποιείται στην αρχή του 6^{ου} εξωνίου, στις θέσεις 1091-1110 και έχει βάρος 6087.0 Da (Εικόνα 25α). Το τμήμα του γονιδίου που ενισχύεται με αυτό το ζεύγος εκκιντών έχει μήκος 67 bp (Εικόνα 25β). Η αλληλουχία, το μήκος, το ποσοστό GC και η θερμοκρασία τήξης των εκκιντών και του ικνηθέτη που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου ACTB φαίνονται στον Πίνακα 17.

Πίνακας 17: Χαρακτηριστικά ζεύγους εκκιντών και ικνηθέτη για το γονίδιο ACTB

	Αλληλουχία	Μήκος (bp)	GC (%)	Tm (°C)
Πρόσθιος εκκιντής	5'- GGCACCCAGCACAATGAAG -3'	19	57.9	59
Ανάστροφος εκκιντής	5'- GCCGATCCACACGGAGTACT -3'	20	60.0	62
ΙΚνηθέτης	5'- 6FAM- TCAAGATCATTTGCTCCTCTGAGCGC -BBQ	26	53.8	67



Εικόνα 25: **a)** Θέσεις υβριδοποίησης εκκιντών-ιχνηθέτη στο mRNA του γονιδίου ACTB, **β)** Τμήμα ενίσχυσης του γονιδίου ACTB

5.4.7.2 Γονίδιο TBP

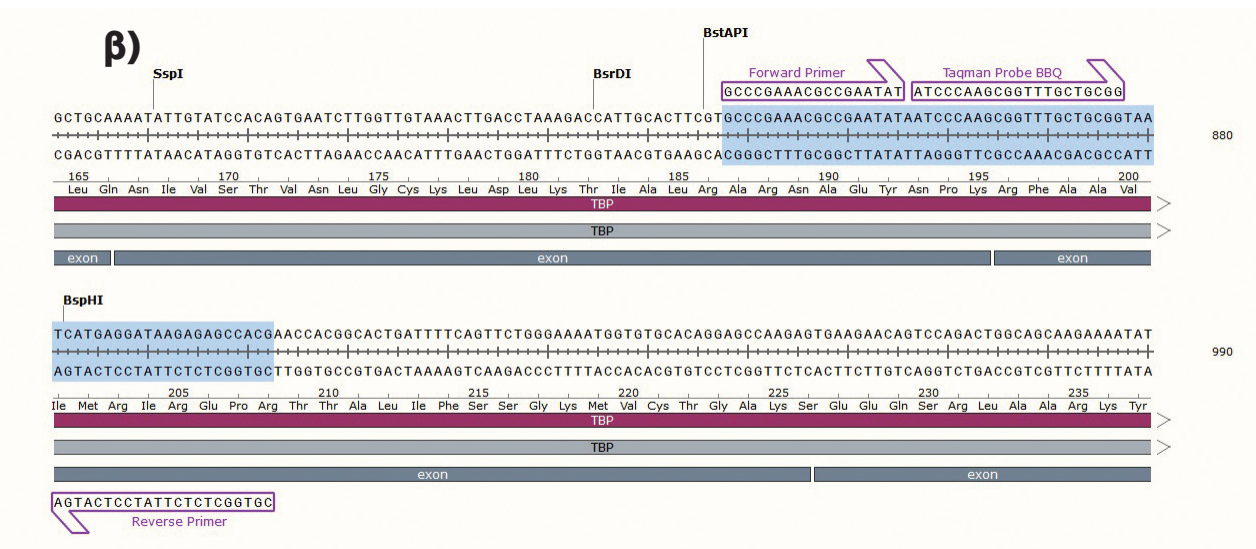
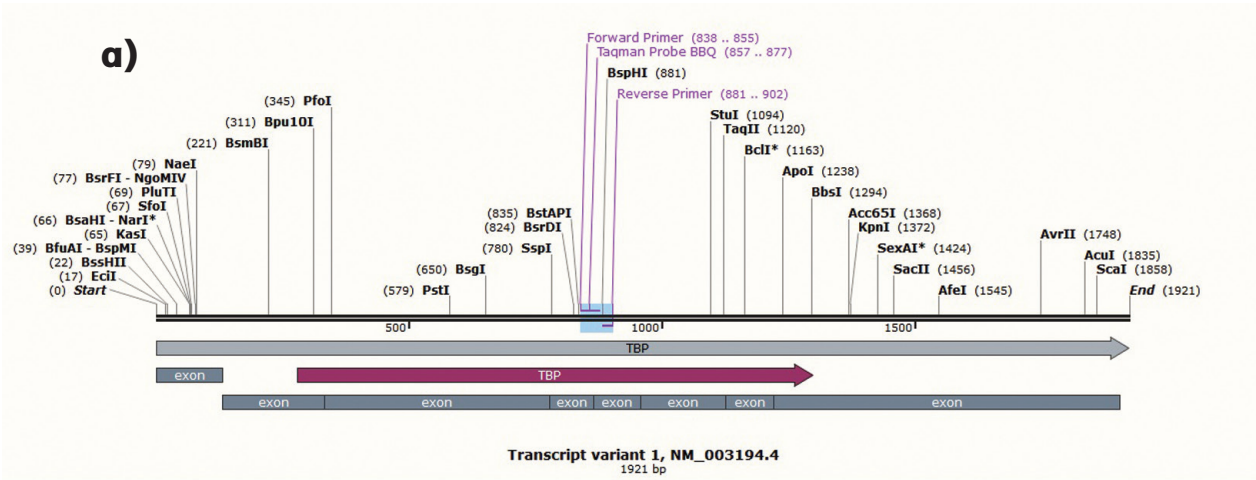
Όσον αφορά το 1^ο εναλλακτικό μετάγραφο (transcript variant 1 mRNA) του γονιδίου TBP, ο πρόσθιος εκκινητής, υβριδοποιείται στο τέλος του 4^{ου} εξωνίου στις θέσεις 838-855 και έχει βάρος 5477.6 Da. Ο ιχνηθέτης υβριδοποιείται στη σύνδεση του 4^{ου} με το 5^ο εξώνιο, στις θέσεις 857-877 και έχει βάρος 6438.2 Da. Ο ανάστροφος εκκινητής υβριδοποιείται στην αρχή του 5ου εξωνίου, στις θέσεις 881-902 και έχει βάρος 6652.4 Da (Εικόνα 26α).

Όσον αφορά το 2^ο εναλλακτικό μετάγραφο (transcript variant 2 mRNA) ο πρόσθιος εκκινητής, υβριδοποιείται στο τέλος του 3^{ου} εξωνίου στις θέσεις 636-653. Ο ιχνηθέτης υβριδοποιείται στη σύνδεση του 3^{ου} με το 4^ο εξώνιο, στις θέσεις 655-675, και ο ανάστροφος εκκινητής υβριδοποιείται στην αρχή του 4^{ου} εξωνίου, στις θέσεις 679-700 (Εικόνα 27α).

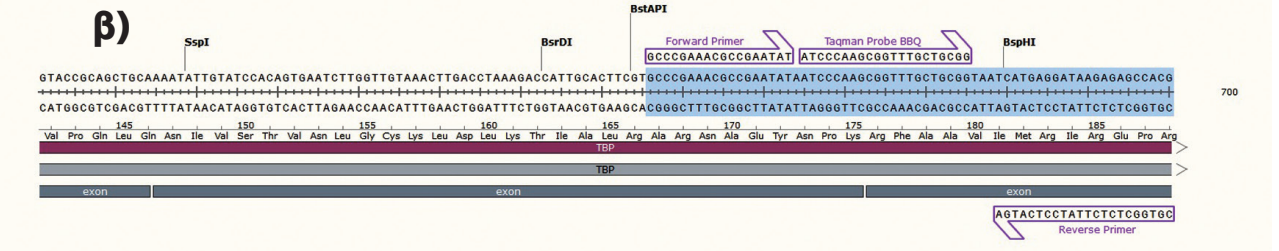
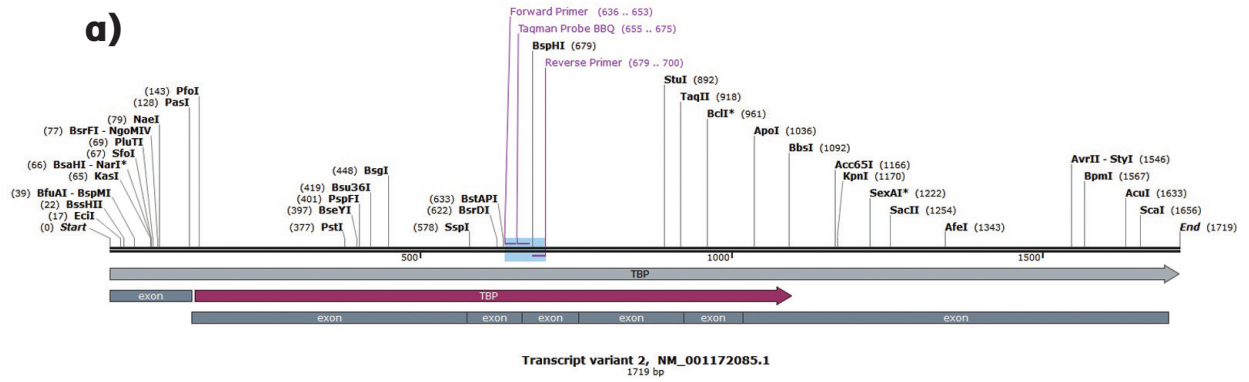
Το τμήμα του γονιδίου που ενισχύεται με αυτό το ζεύγος εκκινητών έχει μήκος 65 bp (Εικόνες 26β, 27β). Η αλληλουχία, το μήκος, το ποσοστό GC και η θερμοκρασία τήξης των εκκινητών και του ιχνηθέτη που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου TBP φαίνονται στον Πίνακα 18.

Πίνακας 18: Χαρακτηριστικά ζεύγους εκκινητών και ιχνηθέτη για το γονίδιο TBP

	Αλληλουχία	Μήκος (bp)	GC (%)	Tm (°C)
Πρόσθιος εκκινητής	5'- GCCCGAAACGCCGAATAT -3'	18	55.6	58
Ανάστροφος εκκινητής	5'- CGTGGCTCTCTTATCCTCATGA -3'	22	50.0	59
Ιχνηθέτης	5'- 6FAM- ATCCCAAGCGGTTTGCTGCGG -BBQ	21	61.9	66



Εικόνα 26: α) Θέσεις υβριδοποίησης εκκινητών-ιχνηθέτη στο transcript variant 1 mRNA του γονιδίου TBP, **β)** Τμήμα ενίσχυσης του γονιδίου TBP (transcript variant 1 mRNA).



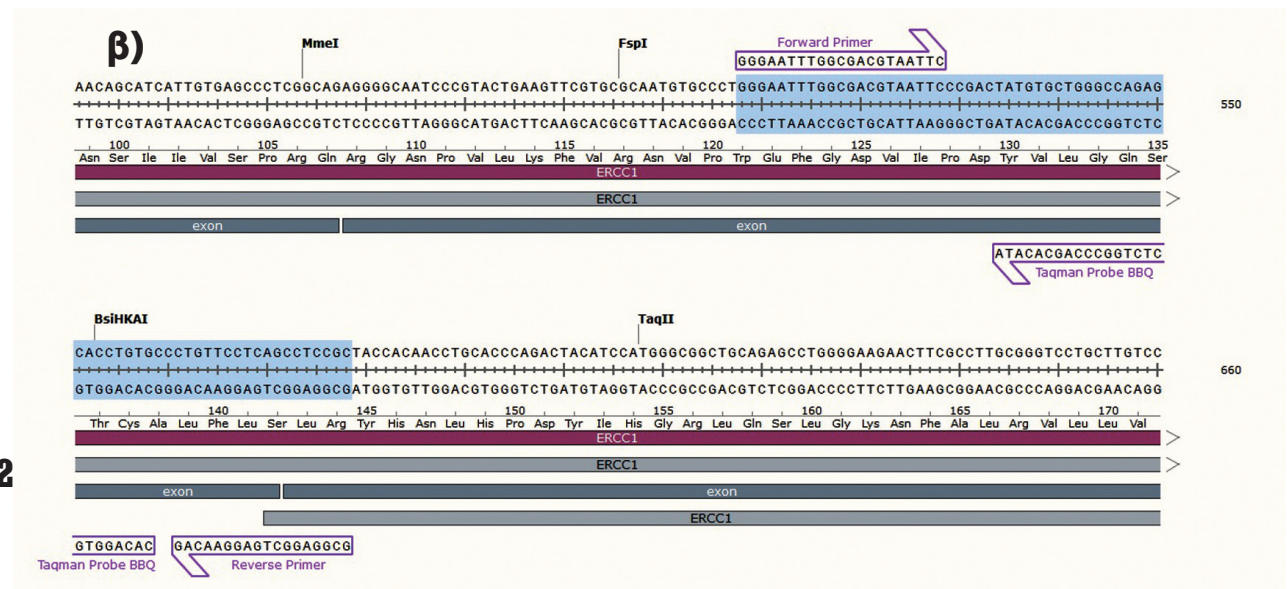
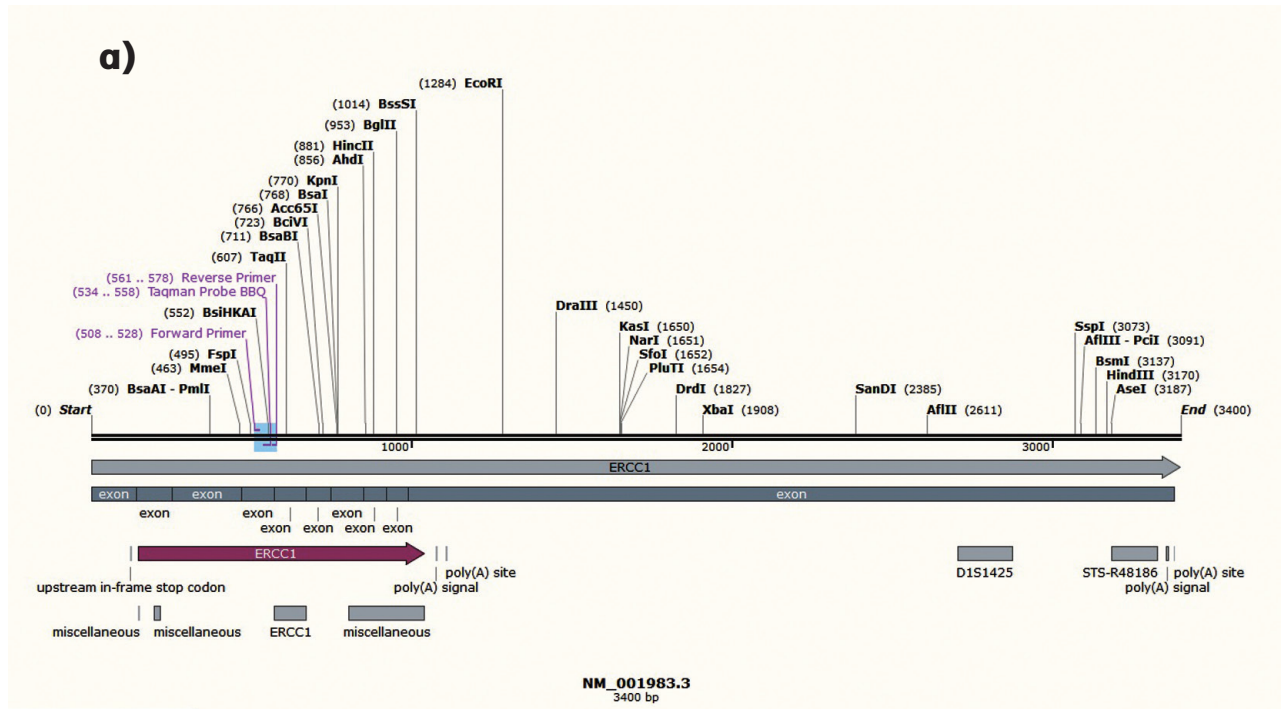
Εικόνα 27: **a)** Θέσεις υβριδοποίησης εκκιντών-ιχνθέτη στο transcript variant 2 mRNA του γονιδίου TBP, **β)** Τμήμα ενίσχυσης του γονιδίου TBP (transcript variant 2 mRNA).

5.4.7.3 Γονίδιο ERCC1

Ο πρόσθιος εκκινητής για το γονίδιο ERCC1, υβριδοποιείται στο τέλος του 4^{ου} εξωνίου στις θέσεις 508-528 και έχει βάρος 6501.3 Da. Ο ιχνηθέτης υβριδοποιείται επίσης στο τέλος του 4^{ου} εξωνίου, στις θέσεις 534-558 και έχει βάρος 7612.0 Da. Ο ανάστροφος εκκινητής υβριδοποιείται στη σύνδεση του 4^{ου} με το 5^ο εξώνιο, στις θέσεις 561-578 και έχει βάρος 5638.7 Da (Εικόνα 28α). Το τμήμα του γονιδίου που ενισχύεται με αυτό το ζεύγος εκκινητών έχει μήκος 71 bp (Εικόνα 28β). Η αλληλουχία, το μήκος, το ποσοστό GC και η θερμοκρασία τήξης των εκκινητών και του ιχνηθέτη που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου ERCC1 φαίνονται στον Πίνακα 19.

Πίνακας 19: Χαρακτηριστικά ζεύγους εκκινητών και ιχνηθέτη για το γονίδιο ERCC1

	Αλληλουχία	Μήκος (bp)	GC (%)	Tm (°C)
Πρόσθιος εκκινητής	5'- GGGAATTTGGCGACGTAATTC -3'	21	47.6	58
Ανάστροφος εκκινητής	5'- GCGGAGGCTGAGGAACAG -3'	18	66.7	60
Ιχνηθέτης	5'- CACAGGTGCTCTGGCCCAGCACATA -BBQ	25	60.0	69



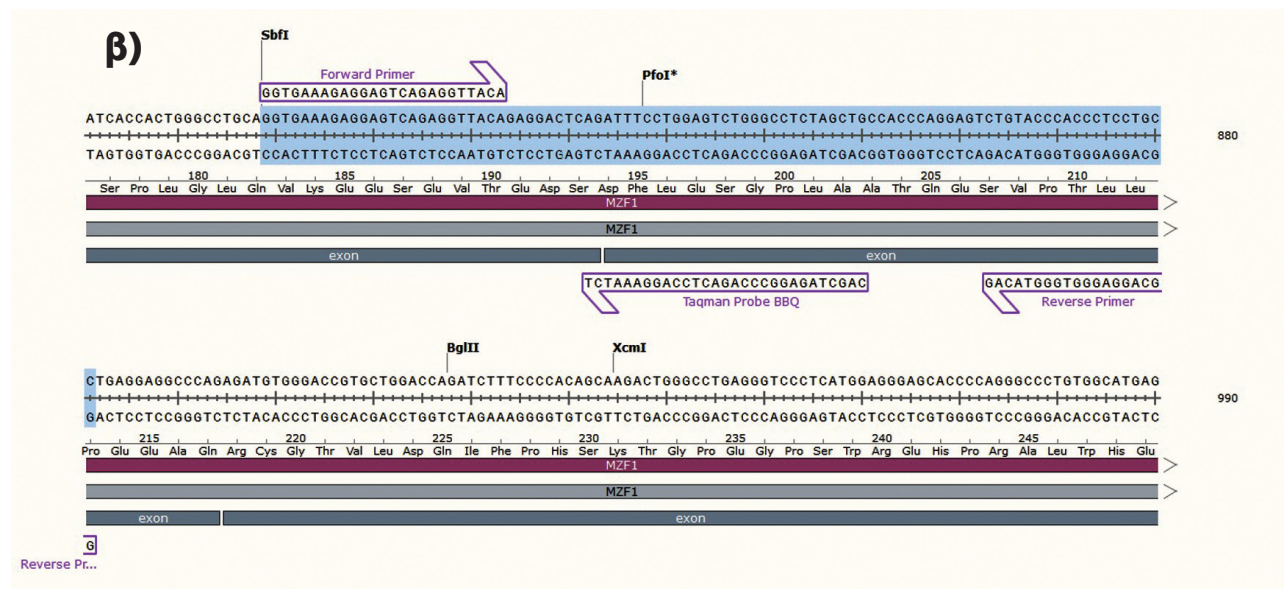
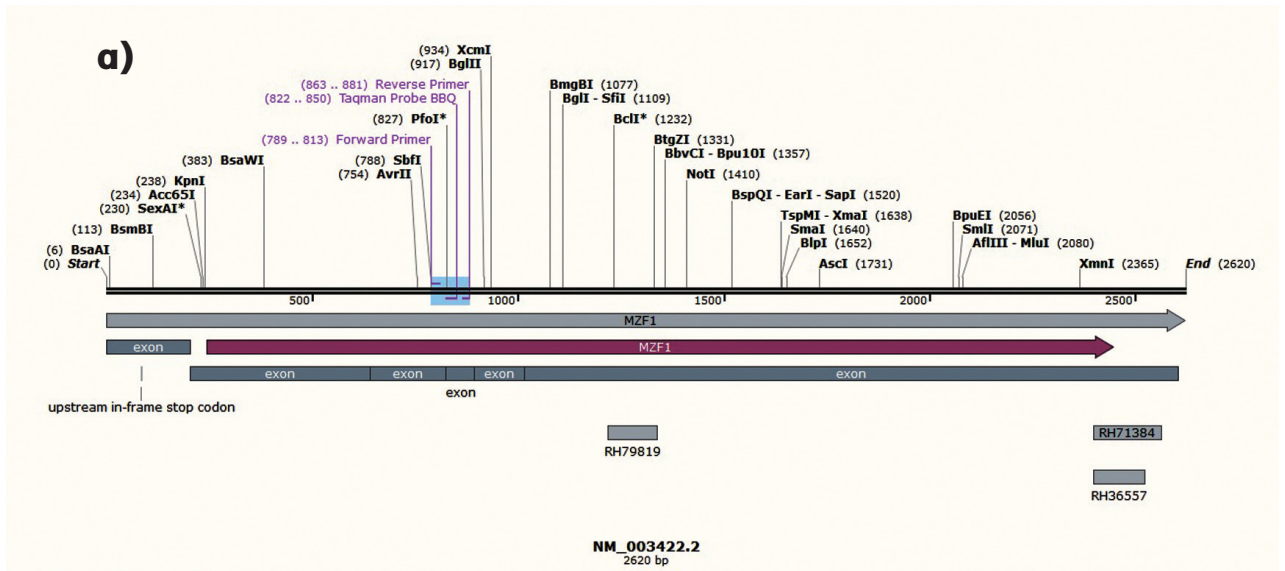
Εικόνα 28 α): Θέσεις υβριδοποίησης εκκινητών-ιχνηθέτη στο mRNA του γονιδίου ERCC1, **β)** Τμήμα ενίσχυσης του γονιδίου ERCC1.

5.4.7.4 Γονίδιο MZF1

Ο πρόσθιος εκκινητής για το γονίδιο MZF1, υβριδοποιείται στο τέλος του 3^{ου} εξωνίου στις θέσεις 789-813 και έχει βάρος 7844.2 Da. Ο ιχνηθέτης υβριδοποιείται στη σύνδεση του 3^{ου} με το 4^ο εξώνιο, στις θέσεις 822-850 και έχει βάρος 8880.8 Da. Ο ανάστροφος εκκινητής υβριδοποιείται στην αρχή του 4^{ου} εξωνίου, στις θέσεις 863-881 και έχει βάρος 5998.9 Da (Εικόνα 29α). Το τμήμα του γονιδίου που ενισχύεται με αυτό το ζεύγος εκκινητών έχει μήκος 93 bp (Εικόνα 29β). Η αλληλουχία, το μήκος, το ποσοστό GC και η θερμοκρασία τήξης των εκκινητών και του ιχνηθέτη που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου MZF1 φαίνονται στον Πίνακα 20.

Πίνακας 20: Χαρακτηριστικά ζεύγους εκκινητών και ιχνηθέτη για το γονίδιο MZF1

	Αλληλουχία	Μήκος (bp)	GC (%)	Tm (°C)
Πρόσθιος εκκινητής	5'- GGTGAAAGAGGAGTCAGAGGTTACA -3'	25	48.0	62
Ανάστροφος εκκινητής	5'- GGCAGGAGGGTGGGTACAG -3'	19	68.4	62
Ιχνηθέτης	5'- 6FAM- CAGCTAGAGGCCAGACTCCAGGAAATCT -BBQ	29	55.2	69



Εικόνα 29: α) Θέσεις υβριδοποίησης εκκινωτών-ιχνηθέτη στο mRNA του γονιδίου MZF1, **β)** Τμήμα ενίσχυσης του γονιδίου MZF1.

5.4.7.5 Γονίδιο ΧΡΑ

Ο πρόσθιος εκκινητής για το γονίδιο ΧΡΑ, υβριδοποιείται στο τέλος του 5^{ου} και στην αρχή του 6^{ου} εξωνίου στις θέσεις 788-806 και έχει βάρος 5901.9 Da. Ο ιχνηθέτης υβριδοποιείται στο 6^ο εξώνιο, στις θέσεις 811-834 και έχει βάρος 7541.0 Da. Ο ανάστροφος εκκινητής υβριδοποιείται επίσης στο 6^ο εξώνιο, στις θέσεις 841-864 και έχει βάρος 7324.8 Da (Εικόνα 30α). Το τμήμα του γονιδίου που ενισχύεται με αυτό το ζεύγος εκκινητών έχει μήκος 77 bp (Εικόνα 30β). Η αλληλουχία, το μήκος, το ποσοστό GC και η θερμοκρασία τήξης των εκκινητών και του ιχνηθέτη που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου ΧΡΑ φαίνονται στον Πίνακα 21.

Πίνακας 21: Χαρακτηριστικά ζεύγους εκκινητών και ιχνηθέτη για το γονίδιο ΧΡΑ

	Αλληλουχία	Μήκος (bp)	GC (%)	Tm (°C)
Πρόσθιος εκκινητής	5'- AAGAATTGCGGCGAGCAGT -3'	19	52.6	60
Ανάστροφος εκκινητής	5'- TTCTGGTCCATACTCATGTTGATG -3'	24	41.7	58
Ιχνηθέτης	5'- 6FAM- AGCAGCGTGTGGAAAAGGGAGACG -BBQ	24	58.3	68

5.4.7.6 Γονίδιο XPF

Ο πρόσθιος εκκινητής για το γονίδιο XPF, υβριδοποιείται στο τέλος του 10^{ου} εξωνίου στις θέσεις 2001-2022 και έχει βάρος 6694.4 Da. Ο ιχνηθέτης υβριδοποιείται στη σύνδεση του 10^{ου} με το 11^ο εξώνιο, στις θέσεις 2024-2046 και έχει βάρος 6951.5 Da. Ο ανάστροφος εκκινητής υβριδοποιείται στην αρχή του 11^{ου} εξωνίου, στις θέσεις 2063-2084 και έχει βάρος 6656.4 Da (Εικόνα 31α). Το τμήμα του γονιδίου που ενισχύεται με αυτό το ζεύγος εκκινητών έχει μήκος 84 ζεύγη βάσεων (bp) (Εικόνα 31β). Η αλληλουχία, το μήκος, το ποσοστό GC και η θερμοκρασία τήξης των εκκινητών και του ιχνηθέτη που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου XPF φαίνονται στον Πίνακα 22.

Πίνακας 22: Χαρακτηριστικά ζεύγους εκκινητών και ιχνηθέτη για το γονίδιο XPF

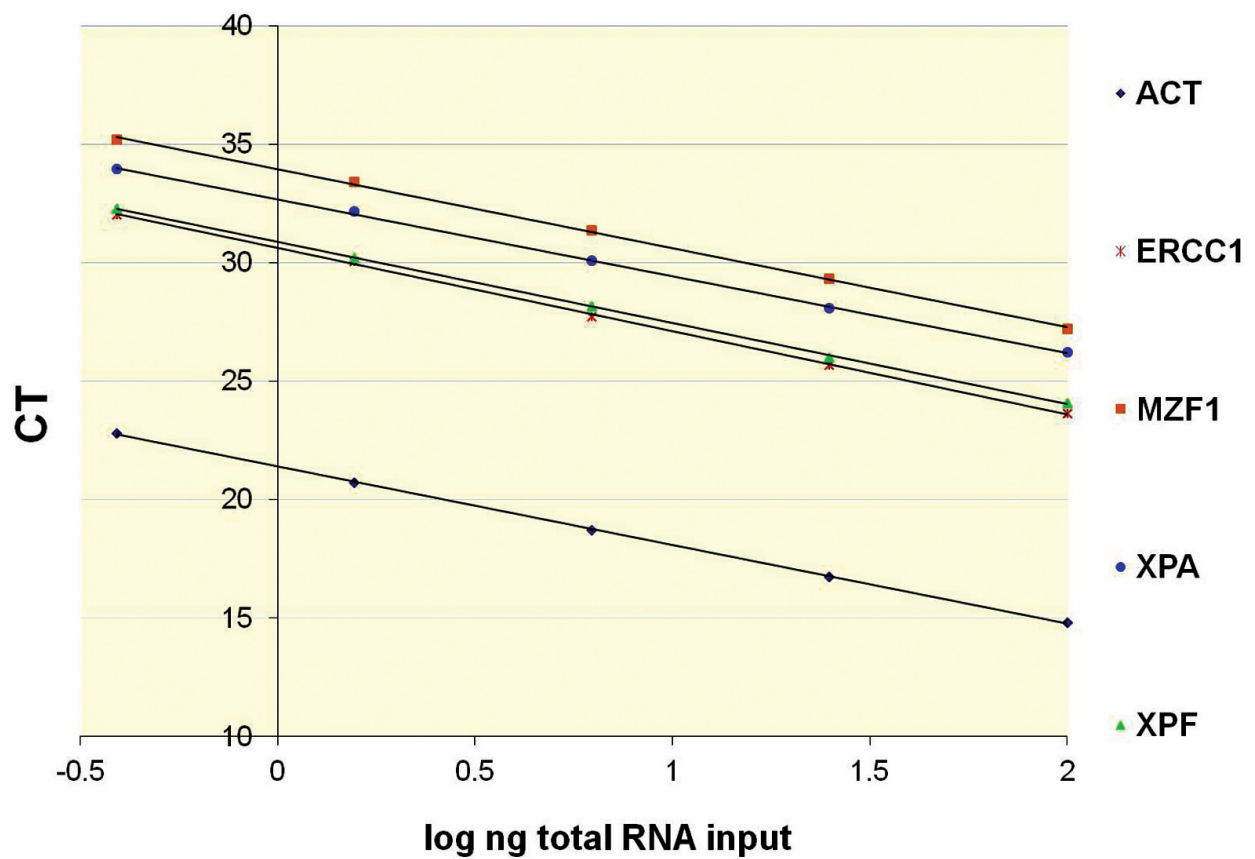
	Αλληλουχία	Μήκος (bp)	GC (%)	Tm (°C)
Πρόσθιος εκκινητής	5'- TGTTCCTCACTGACACTCGGAAA -3'	22	45.5	59
Ανάστροφος εκκινητής	5'- CGAAATTCACGCAATATCCACAA -3'	22	40.9	59
Ιχνηθέτης	5'- 6FAM- ACCATTCTGTTCCTGGCCACCGG -BBQ	23	60.9	69

5.4.8 Αξιολόγηση εκκινητών και ανιχνευτή

Η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης της RTqPCR είναι ζωτικής σημασίας, και λόγω της εκθετικής φύσης της ενίσχυσης, ακόμη και μικρές μη ελεγχμένες διαφορές στην αποτελεσματικότητά της μπορεί να οδηγήσουν σε εντελώς αποπροσανατολιστικά αποτελέσματα στο τέλος της αντίδρασης³⁵⁸. Γενικότερα, για να είναι η μέθοδος $\Delta\Delta C_t$ έγκυρη κατά τον υπολογισμό της έκφρασης των γονιδίων, θα πρέπει να είναι σχεδόν ίση η αποτελεσματικότητα του πολλαπλασιασμού των γονιδίων στόχων και των γονιδίων αναφοράς κατά την εκτέλεση της RTqPCR³⁶⁹. Για τον λόγο αυτόν οι εκκινητές/ανιχνευτές όλων των υπό μελέτη γονιδίων ελέγχθηκαν ενδελεχώς με τη μέθοδο της πρότυπης καμπύλης (βλ. Κεφ 5.4.6) όσον αφορά την ειδικότητα και την ευαισθησία τους σε ένα μεγάλο εύρος δειγμάτων, ανά διαφορετικές χρονικές στιγμές και σε διαφορετικές παραγγελίες των διαφόρων αντιδραστηρίων, για να βελτιωθούν οι συνθήκες και να αποκλειστούν όλοι οι πιθανοί παράγοντες που μπορεί να αλλοιώσουν τα αποτελέσματα της RTqPCR.

Ο σχηματισμός της πρότυπης καμπύλης αναφοράς γίνεται μεταξύ του λογάριθμου της συγκέντρωσης του εκμαγείου σε διαδοχικές αραιώσεις γνωστής ποσότητας εισόδου στην αντίδραση (οριζόντιος άξονας) και των τιμών C_t (κάθετος άξονας) που αντιστοιχούν σε αυτές τις συγκεντρώσεις³⁷⁰. Η κλίση της ευθείας (slope) δείχνει την αποτελεσματικότητα της αντίδρασης σύμφωνα με την εξίσωση: $E=10(-1/slope)$. Η αποτελεσματικότητα είναι δεκτή στο εύρος 90-110% (ιδανική κλίση: -3.3, αποδεκτό εύρος κλίσης: -3.1 έως -3.6)³⁷¹. Επίσης ο συντελεστής διακύμανσης (R^2) πρέπει να προσεγγίζει την τιμή 1³⁷². Τα αποτελέσματα των δοκιμών για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των εκκινητών/ιχνηθετών της παρούσας μελέτης τηρούσαν τις ανωτέρω προϋποθέσεις.

Στους παρακάτω πίνακες και εικόνες παρουσιάζονται οι πρότυπες καμπύλες, ενδεικτικά, από ένα μέρος των πειραμάτων σε ένα εύρος διαφορετικών δειγμάτων όπως εμπορικό RNA lung σε διαδοχικές αραιώσεις (1:4 - 5 fold) 100ng/well ως 0.039ng/well (Εικόνα 32, Πίνακας 23), σε διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις (1:10 - 5 fold) 100ng/well ως 0.01ng/well (Εικόνα 33, Πίνακας 24), και σε διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις (1:10 - 5 fold) 125 ng/well ως 0.0125 ng/well (Εικόνα 34, Πίνακας 25). Επίσης, καλλιιεργήθηκαν κύτταρα από την κυτταρική σειρά H1299. Πρόκειται για μία σειρά MMKP από καρκινικά κύτταρα λεμφαδενικής μετάστασης. Ακολούθησε εκχύλιση RNA, και όλα τα υπόλοιπα βήματα της μελέτης γονιδιακής έκφρασης όπως προαναφέρονται στο Κεφ 5.4 για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης σε διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις (1:10 - 5 fold) από 120ng/well ως 0.012ng/well (Εικόνα 35, Πίνακας 26). Τέλος, από τα κύτταρα της καρκινικής σειράς H1299 δημιουργήθηκε καψίδιο μονιμοποίησης σε φορμόλη και έγκλησις σε παραφίνη, με τις ίδιες συνθήκες που εκτελούνται κατά την παραλαβή χειρουργικών δειγμάτων των ασθενών από το Παθολογοανατομικό εργαστήριο, για την προσομοίωση όλων των συνθηκών που υφίστανται τα δείγματα των ασθενών της μελέτης. Ακολούθησε η ίδια διαδικασία εκχύλισης RNA και μελέτης της γονιδιακής έκφρασης όπως και στα δείγματα της μελέτης και παρουσιάζονται οι πρότυπες καμπύλες από διαδοχικές αραιώσεις (1:4 - 5 fold) 100ng/well ως 0.039ng/well (Εικόνα 36, Πίνακας 27), και διαδοχικές αραιώσεις (1:5 - 5 fold) 125ng/well ως 0.04ng/well (Εικόνα 37, Πίνακας 28).

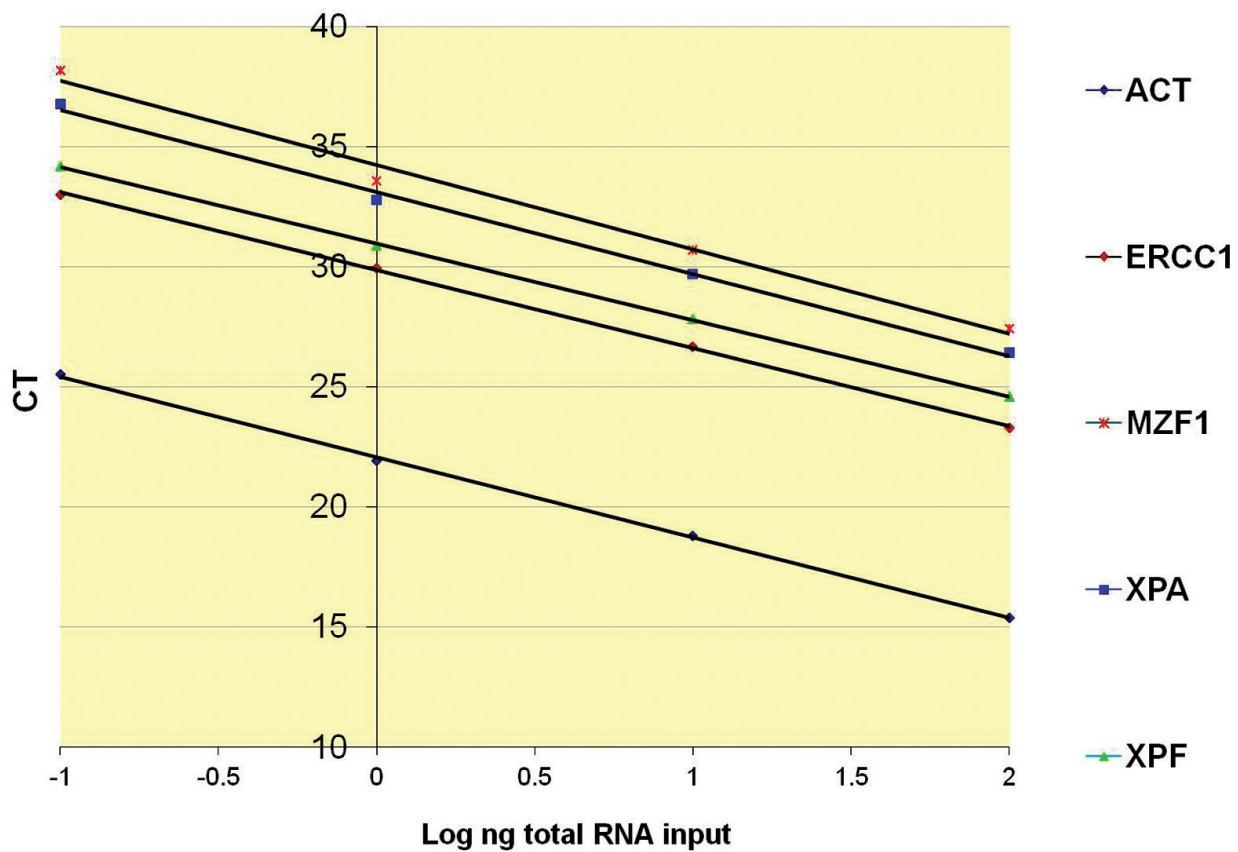


Εικόνα 32: Πρότυπες καμπύλες σε διαδοχικές αραιώσεις από εμπορικό Lung RNA (1:4 - 5 fold) 100ng/well ως 0.039ng/well.

Πίνακας 23: Αποτελεσματικότητα της RTqPCR σε δείγματα από εμπορικό Lung RNA*

Gene	Slope	Efficiency	R2
ACT	$y = -3.319x + 21.4$	100 %	0.9999
ERCC1	$y = -3.515x + 30.62$	93 %	0.9994
MZF1	$y = -3.33x + 33.95$	100 %	0.9993
XPA	$y = -3.248x + 32.68$	103 %	0.9995
XPF	$y = -3.422x + 30.86$	96 %	0.9998

*διαδοχικές αραιώσεις 1:4 - 5 fold - 100ng/well ως 0.039ng/well

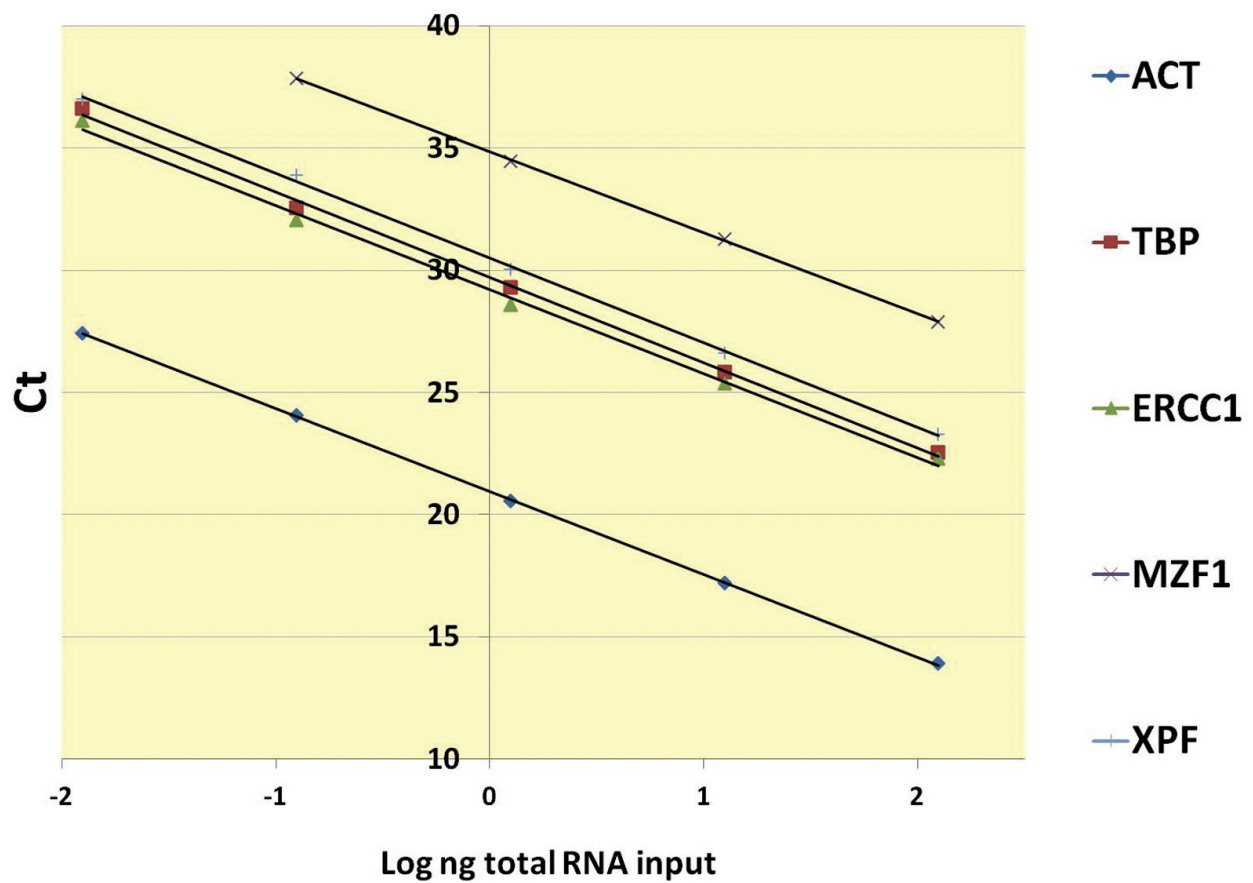


Εικόνα 33: Πρότυπες καμπύλες σε διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις από εμπορικό Lung RNA (1:10 - 5 fold) 100ng/well ως 0.01ng/well.

Πίνακας 24: Αποτελεσματικότητα της RTqPCR σε δείγματα από εμπορικό Lung RNA*

Gene	Slope	Efficiency	R2
ACT	$y = -3,3455x + 22,078$	99 %	0,9994
ERCC1	$y = -3.2428x + 29.848$	103 %	0.9996
MZF1	$y = -3,5119x + 34,228$	93 %	0,9899
XPA	$y = -3,4101x + 33,115$	96 %	0,9968
XPF	$y = -3,1828x + 30,964$	106 %	0,9997

*διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις 1:10 - 5 fold - 100ng/well ως 0.01ng/well

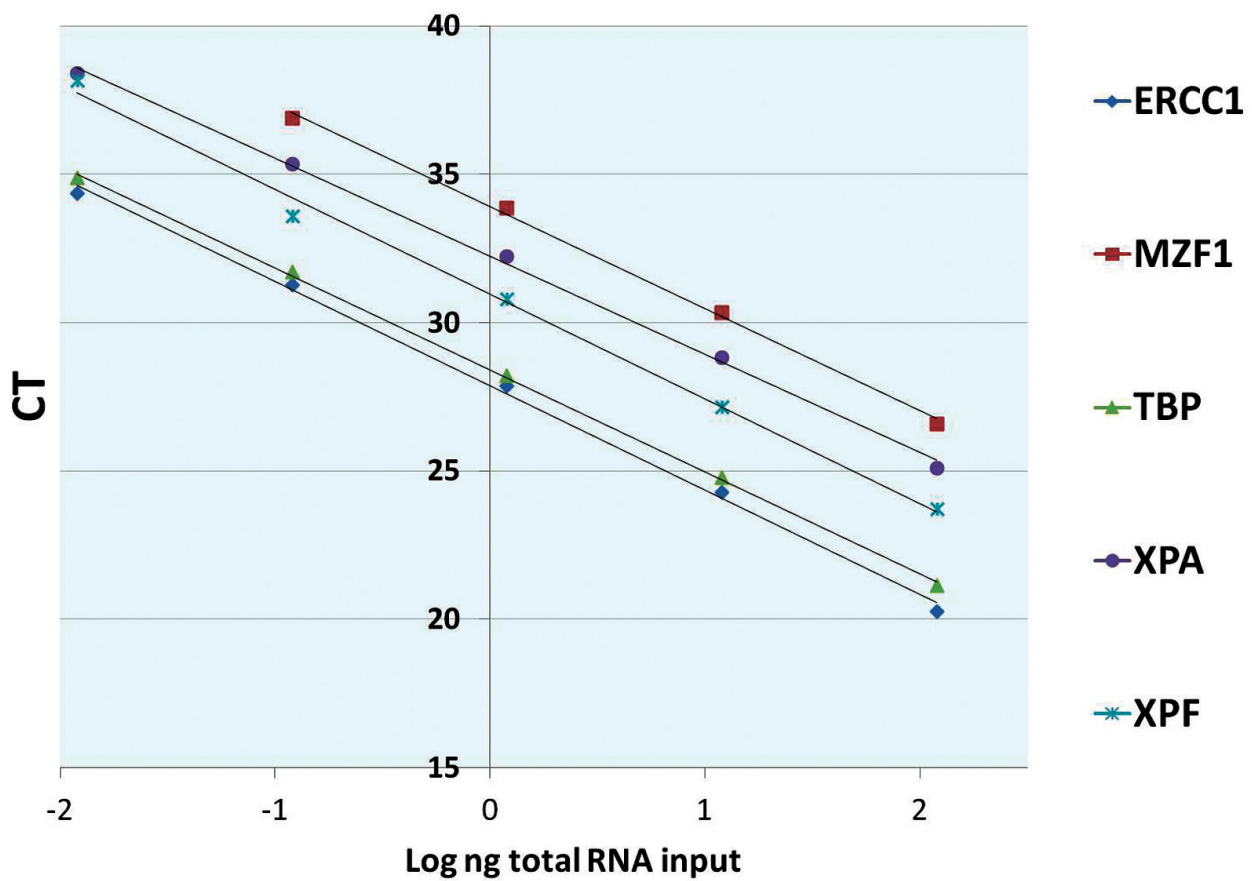


Εικόνα 34: Πρότυπες καμπύλες σε δεκαδικές αραιώσεις από εμπορικό Lung RNA (1:10 - 5 fold) 125 ng/well ως 0.0125 ng/well.

Πίνακας 25: Αποτελεσματικότητα της RTqPCR σε δείγματα από εμπορικό Lung RNA*

Gene	Slope	Efficiency	R2
ACT	$y = -3.3924x + 20.96$	97 %	0.9999
TBP	$y = -3.4881x + 29.71$	94 %	0.9984
ERCC1	$y = -3.4367x + 29.21$	95 %	0.9968
MZF1	$y = -3.3158x + 34.84$	100 %	0.9998
XPF	$y = -3.4681x + 30.49$	94 %	0.9991

*διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις 1:10 - 5 fold - 125 ng/well ως 0.0125 ng/well

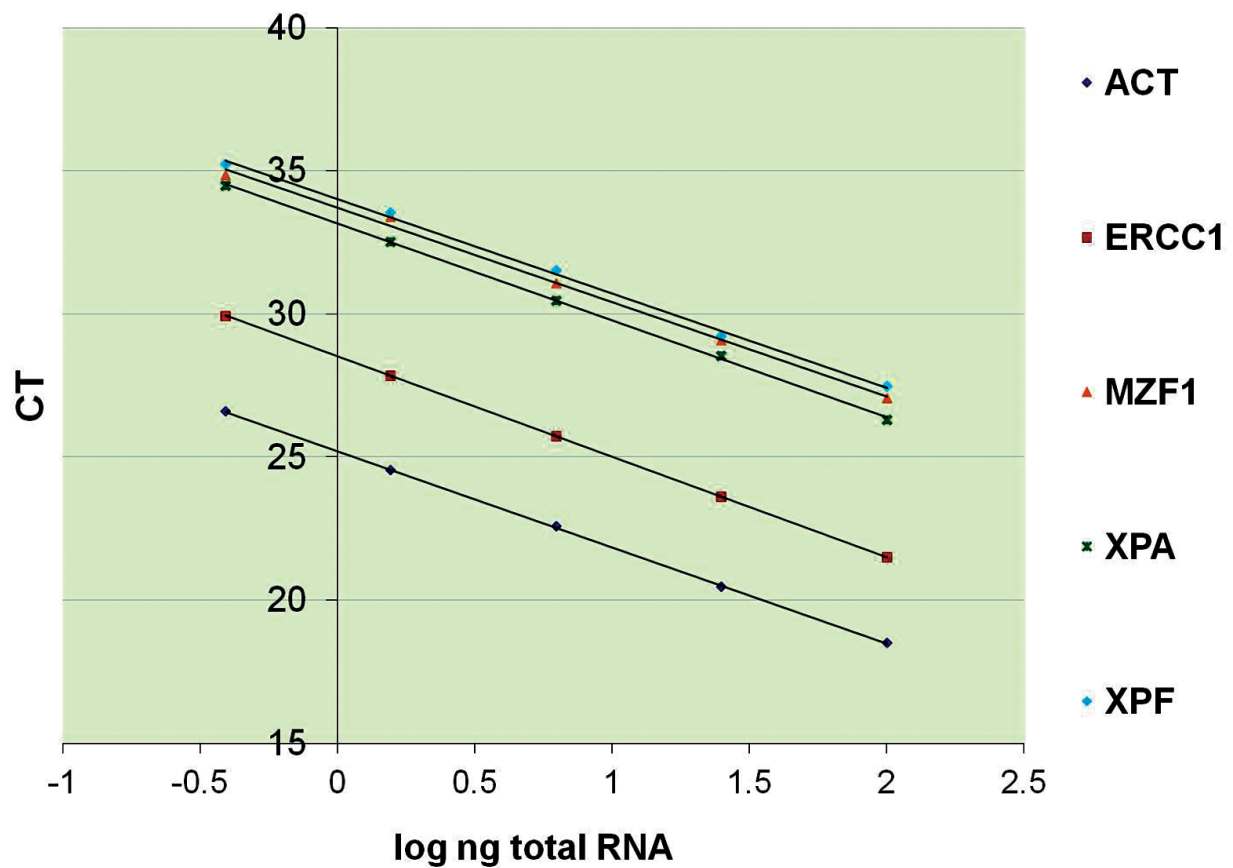


Εικόνα 35: Πρότυπες καμπύλες σε δεκαδικές αραιώσεις από δείγματα της κυτταρικής σειράς H1299 (1:10 - 5 FOLD) 120 ng/well ως 0.012 ng/well.

Πίνακας 26: Αποτελεσματικότητα της RTqPCR σε δείγματα από H1299 κύτταρα*

Gene	Slope	Efficiency	R2
TBP	$y = -3.440x + 28.40$	95 %	0.999
ERCC1	$y = -3.514x + 27.87$	93 %	0.997
MZF1	$y = -3.443x + 33.91$	95 %	0.997
XPA	$y = -3.415x + 32.35$	100 %	0.998
XPF	$y = -3.535x + 30.96$	92 %	0.995

*διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις 1:10 - 5 fold - 120 ng/well ως 0.012 ng/well

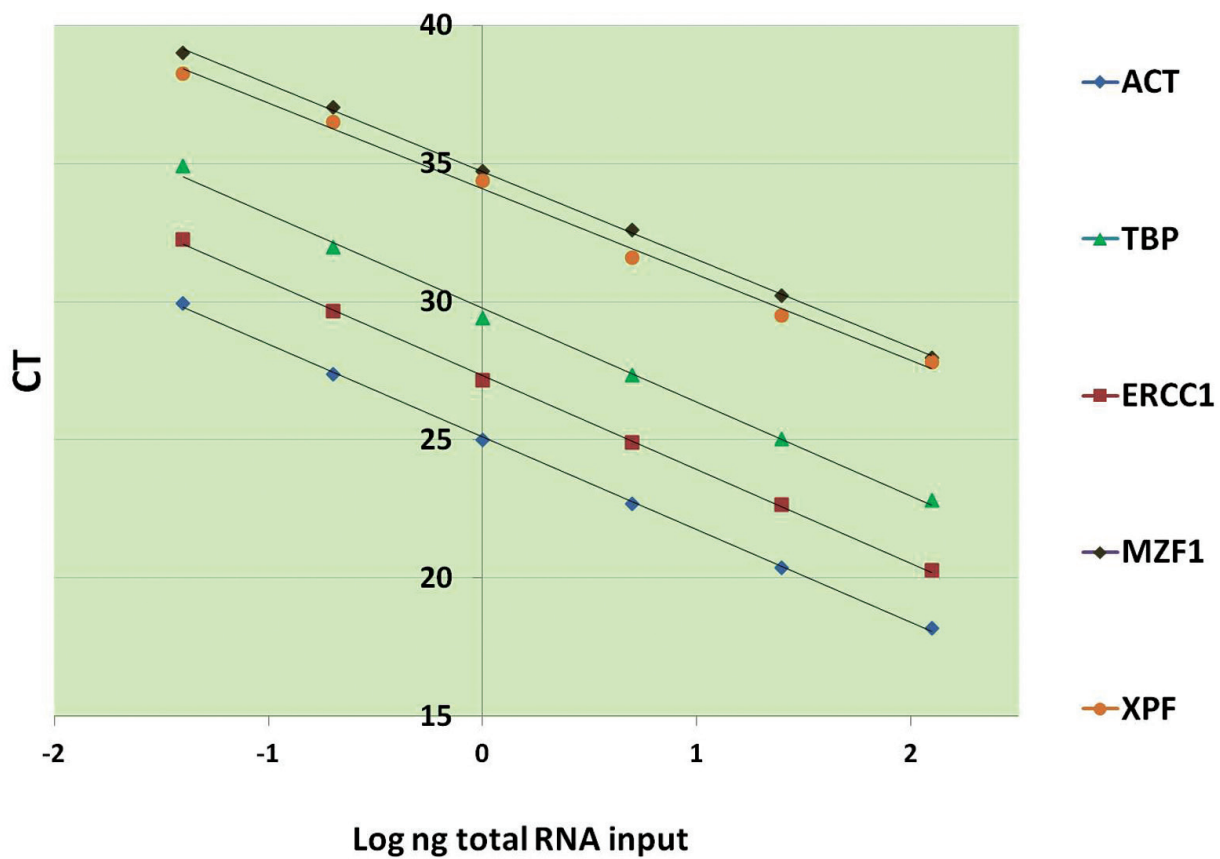


Εικόνα 36: Πρότυπες καμπύλες σε διαδοχικές αραιώσεις από δείγματα της κυτταρικής σειράς H1299 (1:4 - 5 fold) 100ng/well ως 0.039ng/well, μετά από μονιμοποίηση σε φορμόλη και έγκληση σε παραφίνη.

Πίνακας 27: Αποτελεσματικότητα της RTqPCR σε δείγματα από H1299 κύτταρα*

Gene	Slope	Efficiency	R2
ACT	$y = -3.363x + 25.20$	98 %	0.9999
ERCC1	$y = -3.503x + 28.50$	93 %	1
MZF1	$y = -3.301x + 33.71$	101 %	0.996
XPA	$y = -3.381x + 33.14$	98 %	0.9995
XPF	$y = -3.294x + 34.01$	101 %	0.9976

* που είχαν υποστεί επεξεργασία με μονιμοποίηση σε φορμόλη και έγκληση σε παραφίνη, σε διαδοχικές αραιώσεις 1:4 - 5 fold - 100ng/well ως 0.039ng/well)



Εικόνα 37: Πρότυπες καμπύλες σε αραιώσεις από δείγματα της κυτταρικής σειράς H1299 (1:5 - 6 fold) 125 ng/well ως 0.04 ng/well, μετά από μονιμοποίηση σε φορμόλη και έγκληση σε παραφίνη.

Πίνακας 28: Αποτελεσματικότητα της RTqPCR σε δείγματα από H1299 κύτταρα*

Gene	Slope	Efficiency	R2
ACT	$y = -3.3568x + 25.1$	99 %	0.9994
TBP	$y = -3.4082x + 29.77$	97 %	0.9965
ERCC1	$y = -3.4006x + 27.336$	97 %	0.9992
MZF1	$y = -3.1817x + 34.71$	106 %	0.9992
XPF	$y = -3.104x + 34.094$	110 %	0.9992

* που είχαν υποστεί επεξεργασία με μονιμοποίηση σε φορμόλη και έγκληση σε παραφίνη, σε διαδοχικές αραιώσεις 1:5 - 6 fold - 125 ng/well ως 0.04 ng/well)

5.5 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση της μελέτης έγινε με το εξειδικευμένο λογισμικό SPSS 20.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Στο πρώτο μέρος της ανάλυσης παρουσιάζονται στοιχεία που αφορούν τα δημογραφικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά των 94 ασθενών που συμμετείχαν στην έρευνα. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δείκτες της περιγραφικής στατιστικής (μέτρα θέσης και διασποράς, συχνότητες) έτσι ώστε να πάρουμε μια πρώτη εικόνα για το δείγμα και τις υπό μελέτη μεταβλητές.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση με χρήση κατάλληλων στατιστικών ελέγχων για να διερευνηθούν οι παρακάτω υποθέσεις:

- Η ύπαρξη πιθανής συσχέτισης μεταξύ των εργαστηριακών χαρακτηριστικών με τα δημογραφικά και κλινικά τους χαρακτηριστικά. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της λογιστικής παλινδρόμησης καθώς οι εξαρτημένες μεταβλητές ήταν διχοτομικές και οι ανεξάρτητες ήταν ποιοτικές με κάποια επίπεδα.
- Η ύπαρξη πιθανής αλληλεπιδράσεως μεταξύ των 5 υπό μελέτη παραγόντων (ERCC1, MZF1, XPA, XPF και ERCC1 PROTEIN). Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ο μη παραμετρικός συντελεστής συσχέτισης του Spearman.
- Η ύπαρξη πιθανής συσχέτισης μεταξύ των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών με τις μεταβλητές RR, DCR, TTP και OS. Ο χρόνος έως την εξέλιξη του όγκου (TTP) ορίζεται ως ο χρόνος από την έναρξη της χημειοθεραπείας έως την ημερομηνία της πρώτης τεκμηριωμένης εξέλιξης της νόσου ή θανάτου από οποιαδήποτε αιτία. Ο χρόνος συνολικής επιβίωσης (OS) ορίζεται ως ο χρόνος από την έναρξη της χημειοθεραπείας έως την ημερομηνία της τελευταίας παρακολούθησης ή θανάτου από οποιαδήποτε αιτία. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το ακριβές στατιστικό του Fisher (για τις μεταβλητές RR και DCR) καθώς και ο έλεγχος logrank (για τις μεταβλητές TTR και OS) για τη σύγκριση των καμπυλών επιβίωσης Kaplan Meier ανάμεσα στα διαφορετικά επίπεδα των ανεξάρτητων μεταβλητών¹.
- Η ύπαρξη πιθανής συσχέτισης των 5 υπό μελέτη παραγόντων με την ανταπόκριση στη θεραπεία. Επίσης, ελέγχθηκε η πιθανή αλληλεπίδραση των 5 παραγόντων στην ανταπόκριση της θεραπείας. Για τους σκοπούς αυτούς χρησιμοποιήθηκε το ακριβές στατιστικό του Fisher και η μέθοδος της λογιστικής παλινδρόμησης αντίστοιχα.
- Η ύπαρξη πιθανής συσχέτισης των 5 υπό μελέτη παραγόντων με τη συνολική επιβίωση (OS) και το διάστημα έως την υποτροπή (TTP). Η ανάλυση έγινε με βάση τις διχοτομημένες τιμές, και τα τριτημόρια για το σύνολο του πληθυσμού. Επίσης, ελέγχθηκε η πιθανή αλληλεπίδραση των 5 παραγόντων στην επιβίωση OS και TTP. Για τους σκοπούς αυτούς χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος logrank και οι καμπύλες Kaplan Meier.

Σε όλη την έκταση της ανάλυσης ως ελάχιστο επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή $p=0,05$.

¹ Ως ανεξάρτητες μεταβλητές θεωρήσαμε την ηλικιακή ομάδα, το φύλο, το είδος όγκου, τη χημειοθεραπεία, το στάδιο, το κάπνισμα, την ιστολογία, το είδος αντιμετώπισης και το ps.

Αποτελέσματα

6.1 Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά ασθενών

Το συνολικό δείγμα της μελέτης μας διαμορφώθηκε από 94 ασθενείς. Στον Πίνακα 29 παρουσιάζονται τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών από όπου και παρατηρούμε ότι συνολικά στην έρευνα συμμετείχαν 84 (89,4%) άντρες και 10 (10,6%) γυναίκες. Από την ομαδοποίηση των ασθενών σε ηλικιακές ομάδες παρατηρήθηκε ότι στο δείγμα υπήρχε ισοδύναμη συμμετοχή ασθενών κάτω (51,1%) και άνω (48,9%) των 60 ετών. Αναλυτικότερα, για τις ηλικίες των 94 ασθενών χωρίς ομαδοποίηση, παρουσιάζεται στην Εικόνα 38 το ιστόγραμμα σχετικών συχνοτήτων. Από τα δεδομένα παρατηρήθηκε ότι η μέση ηλικία των ασθενών ήταν τα 58,95 έτη (τ.α. 8,66) ενώ η διάμεση τιμή ήταν τα 59 έτη. Τέλος, προέκυψε ότι οι ηλικίες είχαν εύρος από 35 έως 73 έτη.

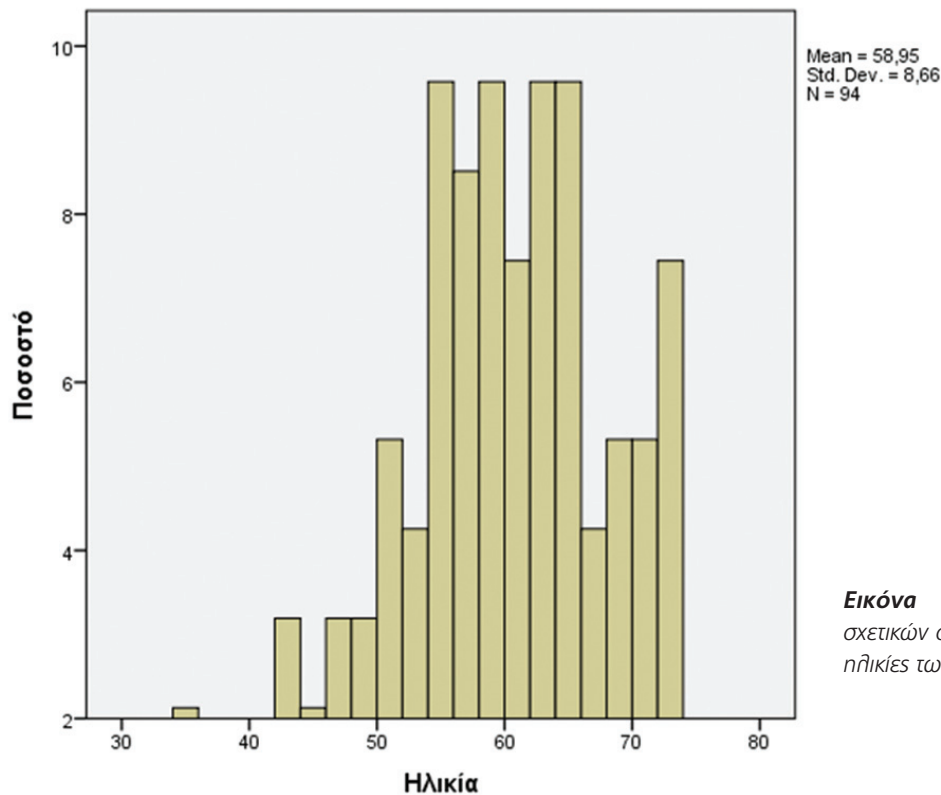
Επίσης, προέκυψε πως η πλειοψηφία των ασθενών ήταν ενεργοί καπνιστές, σε ποσοστό 60,06% επί του συνόλου, ενώ μόλις το 10,6% δήλωσε ότι δεν καπνίζει, και το 3,2% ότι ήταν πρώην καπνιστές. Από το σύνολο των ασθενών οι 85 (90,4%) είχαν PS=0 ή 1. Το 67% των ασθενών είχαν μη πηλκώδες καρκίνωμα. Η πλειοψηφία των ασθενών (60,6%) είχε ταξινομηθεί στο στάδιο IV (κατά TNM, 6η έκδοση) πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας τους.

Η ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία αξιολογήθηκε σύμφωνα με τα κριτήρια RECIST. Ως αντικειμενικό ποσοστό ανταπόκρισης (ORR) ορίστηκε το άθροισμα των περιπτώσεων πλήρους ανταπόκρισης (CR) και μερικής ανταπόκρισης (PR) διαιρούμενο με το συνολικό αριθμό των ασθενών και εκφρασμένο ως ποσοστό επί τοις εκατό. Έτσι λοιπόν, παρατηρήθηκε ότι μόνον 27 ασθενείς (28,7%) είχαν θετικό ORR. Ως ποσοστό ελέγχου της νόσου (DCR) ορίστηκε το άθροισμα των περιπτώσεων CR, PR και σταθερής νόσου (SD) διαιρούμενο με το συνολικό αριθμό των ασθενών και εκφρασμένο ως ποσοστό επί τοις εκατό. Συνεπώς, το 54,3% των ασθενών είχε θετικό DCR.

Στην πλειοψηφία των ασθενών (54,3%) μελετήθηκε ιστικό δείγμα από τον πρωτοπαθή όγκο. Σε 23 ασθενείς το δείγμα προερχόταν από βιοψία και σε 45 από χειρουργείο. Επίσης, η πλειοψηφία (61,7%) των ασθενών έλαβε ΧΜΘ με σισπλατίνη.

Πίνακας 29: Συχνότητα και σχετική συχνότητα των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των 94 ασθενών

Χαρακτηριστικό	Συχνότητα	Σχετική συχνότητα %	
Φύλο	Άντρας	84	89,4
	Γυναίκα	10	10,6
Ηλικιακή ομάδα	Κάτω των 60	48	51,1
	Άνω των 60	46	48,9
Κάπνισμα	Ναι	57	60,6
	Όχι	10	10,6
	Πρώην καπνιστής	3	3,2
	Δεν καταγράφηκε	24	25,5
PS	0	46	48,9
	1	39	41,5
	2	9	9,6
Στάδιο	IIIΑ-IIIΒ	37	39,4
	IV	57	60,6
Ιστολογία	Πλακώδες	31	33
	Μπ πλακώδες	63	67
Προέλευση όγκου	Πρωτοπαθής	51	54,3
	Μετάσταση	23	24,5
	Δεν καταγράφηκε	20	21,3
Είδος δείγματος	Χειρουργείο	45	47,8
	Βιοψία	23	24,5
	Δεν καταγράφηκε	26	27,6
Χημειοθεραπεία	Σισπλατίνη	58	61,7
	Ή Καρβοπλατίνη	31	33,0
	Οξαλοπλατίνη	5	5,3
RR	SD/PD/NE	67	71,3
	CR/PR	27	28,7
DCR	PD	43	45,7
	Όχι PD	51	54,3
Υποτροπή	Υποτροπίασαν	90	95,7
	Δεν υποτροπίασαν	4	4,3
Θνησιμότητα	Επιβίωσαν	14	14,9
	Απεβίωσαν	80	85,1



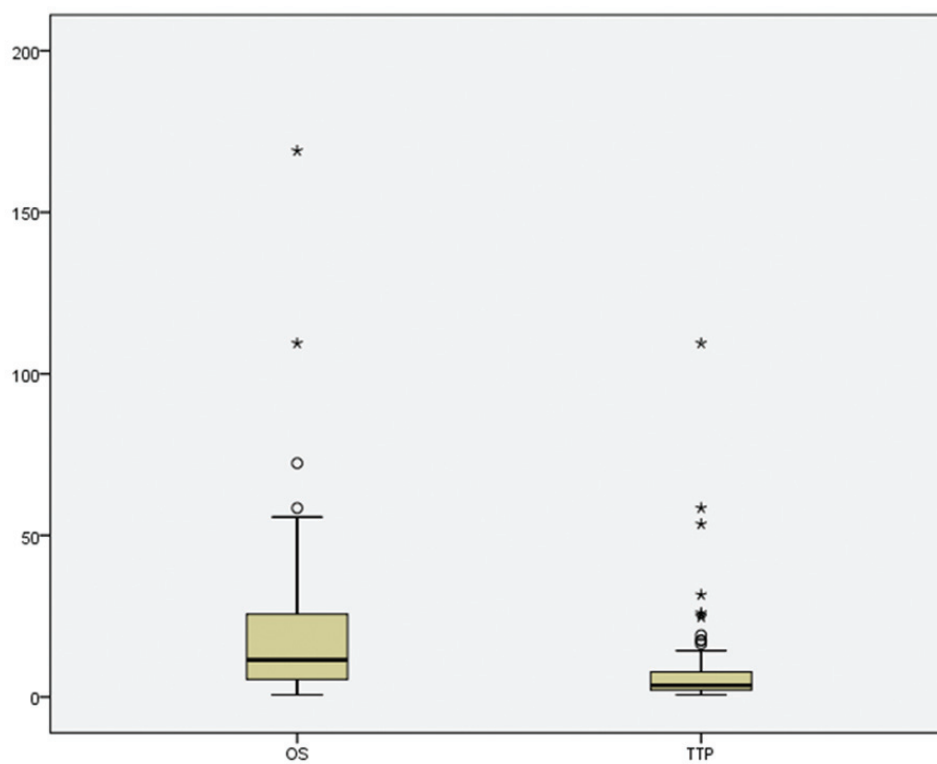
Εικόνα 38: Ιστόγραμμα σχετικών συχνοτήτων για τις ηλικίες των 94 ασθενών.

Στον Πίνακα 30 παρουσιάζονται οι μετρήσεις των μεταβλητών OS και TTP που σχετίζονται με την επιβίωση. Από την ανάλυση προέκυψε ότι για το σύνολο των ασθενών ο μέσος χρόνος επιβίωσης (OS) ήταν 20,08 μήνες (τ.α. 24,76) και ο διάμεσος 11,45 μήνες, ενώ αντίστοιχα ο μέσος χρόνος TTP ήταν 8,04 (τ.α. 14,17) και ο διάμεσος 3,57 μήνες. Ωστόσο, επειδή οι ασθενείς σταδίου III και IV στην κλινική πρακτική είναι διαφορετικής πρόγνωσης ομάδες αναφέρονται και οι ξεχωριστές μετρήσεις για το κάθε στάδιο. Συγκεκριμένα, για τους ασθενείς σταδίου III (N=37) προέκυψε ότι ο μέσος χρόνος επιβίωσης (OS) ήταν 20,2 μήνες (τ.α. 28,8) και ο διάμεσος 12,57 μήνες, ενώ αντίστοιχα ο μέσος χρόνος TTP ήταν 5,6 (τ.α. 5,9) και ο διάμεσος 3,37 μήνες. Για τους ασθενείς σταδίου IV (N=57) προέκυψε ότι ο μέσος χρόνος επιβίωσης (OS) ήταν 19,995 μήνες (τ.α. 22,02) και ο διάμεσος 10,83 μήνες, ενώ αντίστοιχα ο μέσος χρόνος TTP ήταν 9,63 (τ.α. 17,45) και ο διάμεσος 4,23 μήνες.

Πίνακας 30: Χαρακτηριστικά των μεταβλητών που σχετίζονται με την επιβίωση των ασθενών (OS, TTP)

	Μέση τιμή (μήνες)	Τυπική Απόκλιση (μήνες)	Διάμεση τιμή (μήνες)	Εύρος τιμών (μήνες)
OS (σύνολο)	20,08	24,76	11,45	0,63 - 169,03
OS (στάδιο III)	20,02	28,8	12,57	1,57 - 169,03
OS (στάδιο IV)	19,995	22,02	10,83	0,63 - 109,47
TTP (σύνολο)	8,04	14,17	3,57	0,63 - 109,47
TTP (στάδιο III)	5,6	5,9	3,37	1,03 - 25,40
TTP (στάδιο IV)	9,63	17,45	4,23	0,63 - 109,47

Στην Εικόνα 39 παρουσιάζεται το θηκόγραμμα για κάθε μία από τις μεταβλητές επιβίωσης (OS και TTP), και παρατηρούμε ότι η κατανομή των μετρήσεων και στις δύο περιπτώσεις αποκλίνει της κανονικής κατανομής, ενώ στις μετρήσεις και των δύο μεταβλητών παρατηρήθηκαν ακραίες τιμές. Οπότε στη μετέπειτα ανάλυση τους θα χρησιμοποιηθούν μη παραμετρικές μέθοδοι.



Εικόνα 39: Θηκόγραμμα των μεταβλητών OS και TTP.

6.2 Εργαστηριακά χαρακτηριστικά ασθενών

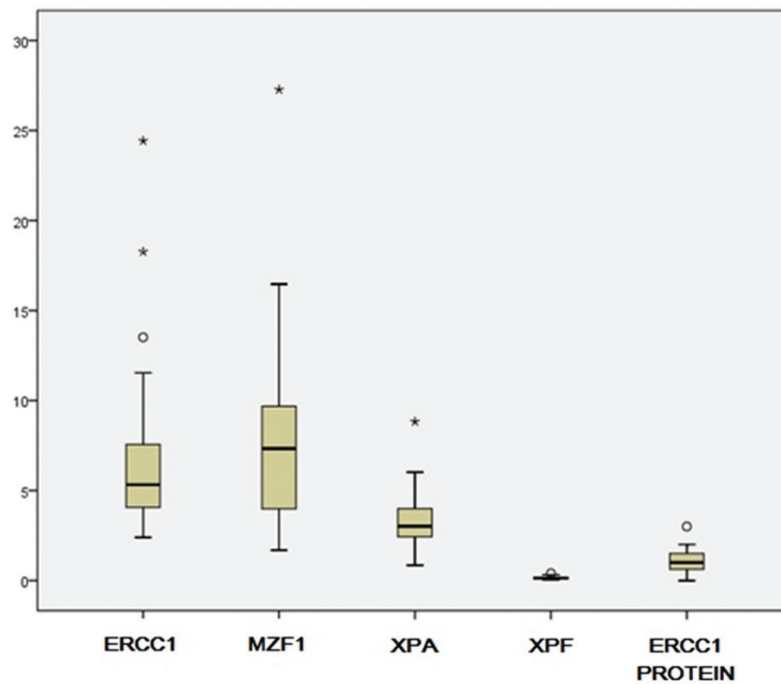
Παρουσιάζονται τα εργαστηριακά χαρακτηριστικά των ασθενών που βασίζονται στα πειράματα που έγιναν με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας και της μελέτης γονιδιακής έκφρασης όπως περιγράφονται στο Κεφάλαιο 5.

Από το σύνολο των δειγμάτων των ασθενών που μελετήθηκαν, σε όλους (N=94) είχαμε αξιολογήσιμα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής χρώσης και συνεπώς της πρωτεϊνικής έκφρασης του ERCC1. Οσον αφορά το κομμάτι της γονιδιακής μελέτης της παρούσας εργασίας, 31 ασθενείς εξαιρέθηκαν της μελέτης λόγω ανεπαρκούς και μη ποιοτικά αποδεκτού υλικού για τα πειράματα και των 6 γονιδίων ERCC1-MZF1-XPA-XPF-ACTB-TBP. Από τους εναπομέναντες 63 ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν τελικά στη μελέτη γονιδιακής έκφρασης, όλοι ενισχύθηκαν ως προς τα γονίδια ACTB-TBP-ERCC1-XPA, 62 ασθενείς ενισχύθηκαν ως προς το γονίδιο MZF1, ενώ μόνον 32 ασθενείς ενισχύθηκαν ως προς το γονίδιο XPF. Στον Πίνακα 31 παρουσιάζεται η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση, η διάμεση τιμή και το εύρος τιμών της έκφρασης των 5 υπό μελέτη παραγόντων για το συνολικό δείγμα της μελέτης.

Πίνακας 31: Εργαστηριακά χαρακτηριστικά των 94 ασθενών

Παράγοντες	Μέση τιμή	Τυπική Απόκλιση	Διάμεση τιμή	Εύρος τιμών
ERCC1	6,94	4,54	6,15	1,63 - 24,43
MZF1	7,87	5,50	6,90	1,05 - 27,27
XPA	4,81	14,22	2,78	0,48 - 114,85
XPF	0,15	0,08	0,13	0,05 - 0,40
ERCC1 PROTEIN	1,01	0,87	1,00	0,0 - 3,0

Στην Εικόνα 40 παρουσιάζεται το θηκόγραμμα για κάθε έναν από τους πέντε παράγοντες, όπου και παρατηρούμε ότι η κατανομή των μετρήσεων και στις πέντε περιπτώσεις αποκλίνει της κανονικής κατανομής, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις (ERCC1, MZF1, XPA) παρατηρήθηκαν και ακραίες τιμές. Οπότε στη μετέπειτα ανάλυση των πέντε παραγόντων θα χρησιμοποιηθούν μη παραμετρικές μέθοδοι.



Εικόνα 40: Θηκόγραμμα για τους 5 υπό μελέτη παράγοντες στο σύνολο του πληθυσμού.

6.3 Συσχέτιση των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών με τα εργαστηριακά τους χαρακτηριστικά

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η πιθανή συσχέτιση των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών με τα εργαστηριακά τους χαρακτηριστικά και συγκεκριμένα με τις διχοτομημένες τιμές έκφρασης των πέντε υπό μελέτη παραγόντων. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε πρώτα για το σύνολο των 94 ασθενών και στη συνέχεια για τους ασθενείς με δείγμα από τον πρωτοπαθή όγκο, καθώς και για τους ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπεία με CDDP ξεχωριστά. Επίσης, για την ύπαρξη πιθανής συσχέτισης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της λογιστική παλινδρόμησης θεωρώντας κάθε φορά ως εξαρτημένη μεταβλητή κάποιον από τους πέντε παράγοντες. Στον Πίνακα 32 παρουσιάζονται οι κατηγορίες αναφοράς των ανεξάρτητων μεταβλητών στο μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης.

Στον Πίνακα 33 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της λογιστικής παλινδρόμησης για τη γονιδιακή έκφραση του ERCC1 ως προς τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά. Από την ανάλυση και τον αντίστοιχο έλεγχο σημαντικότητας παρατηρήθηκε ότι δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική σχέση των ανεξάρτητων μεταβλητών με την ERCC1 έκφραση ($p > 0.05$ σε όλες τις περιπτώσεις).

Πίνακας 32: Κατηγορίες αναφοράς και σύγκρισης των υπό μελέτη ανεξάρτητων διχοτομημένων μεταβλητών

Μεταβλητή	Κατηγορία αναφοράς	Κατηγορία σύγκρισης
Ηλικία	Κάτω των 60	Άνω των 60
Κάπνισμα	Μη καπνιστές	Καπνιστές/Πρώην καπνιστές
Φύλο	Άντρες	Γυναίκες
PS	0-1	2
Στάδιο	IIIA-IIIB	IV
Ιστολογία	Μη πλακώδες	Πλακώδες
Προέλευση όγκου	Πρωτοπαθής	Μετάσταση
Είδος δείγματος	Χειρουργείο	Βιοψία
Χημειοθεραπεία	Σισπλατίνη	Καρβοπλατίνη/Οξαλοπλατίνη

Πίνακας 33: Αποτελέσματα λογιστικής παλινδρόμησης με εξαρτημένη μεταβλητή τη γονιδιακή έκφραση ERCC1

Μεταβλητές	B	S.E. ³	p	EXP(B)	95% Δ.Ε. ⁴ για EXP(B) Κάτω	Άνω
Ηλικία	0,61	1,01	0,54	1,85	0,25	13,38
Κάπνισμα	-21,33	40192,95	1,00	0,00	0,00	.
Φύλο	-42,79	56841,39	1,00	0,00	0,00	.
PS	-0,20	1,50	0,89	0,82	0,04	15,45
Στάδιο	-0,25	0,88	0,78	0,78	0,14	4,37
Ιστολογία	-0,76	0,91	0,41	0,47	0,08	2,80
Προέλευση όγκου	-1,35	1,26	0,28	0,26	0,02	3,06
Είδος δείγματος	1,94	1,55	0,21	6,98	0,33	145,77
Χημειοθεραπεία	1,88	1,40	1,00	6,57	0,42	101,94

Στον Πίνακα 34 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της λογιστικής παλινδρόμησης για τη γονιδιακή έκφραση MZF1 ως προς τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά. Από την ανάλυση προέκυψε μία στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της ηλικίας και της μεταβλητής MZF1 ($p=0.024 < 0.05$). Συγκεκριμένα μπορούμε να ισχυρισθούμε ότι όσοι είναι άνω των 60 ετών έχουν 50 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να έχουν αυξημένη έκφραση του MZF1 mRNA.

Πίνακας 34: Αποτελέσματα λογιστικής παλινδρόμησης με εξαρτημένη μεταβλητή τη γονιδιακή έκφραση MZF1						
Μεταβλητές	B	S.E.³	p	EXP(B)	95% Δ.Ε. για EXP(B)	
					Κάτω	Άνω
Ηλικία	-3,99	1,76	0,02*	0,02	0,00	0,59
Κάπνισμα	22,47	40192,9	1,00	5756249868	0,00	.
Φύλο	2,91	56841,4	1,00	18,40	0,00	.
PS	-0,56	1,86	0,76	0,57	0,01	21,93
Στάδιο	-1,26	0,30	0,33	0,28	0,02	3,59
Ιστολογία	0,41	1,11	0,72	1,50	0,17-	13,31
Προέλευση όγκου	-0,44	0,73	0,64	0,05	7,88	7,88
Είδος δείγματος	-1,92	2,02	0,34	0,15	0,00	7,63
Χημειοθεραπεία	1,88	1,40	1,00	6,57	0,42	101,94

Στον Πίνακα 35 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της λογιστικής παλινδρόμησης για τη γονιδιακή έκφραση ΧΡΑ, όπου και παρατηρείται ότι δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική σχέση των ανεξάρτητων μεταβλητών με την ΧΡΑ έκφραση ($p > 0.05$ σε όλες τις περιπτώσεις).

Πίνακας 35: Αποτελέσματα λογιστικής παλινδρόμησης με εξαρτημένη μεταβλητή τη γονιδιακή έκφραση ΧΡΑ

Μεταβλητές	B	S.E. ³	p	EXP(B)	95% Δ.Ε. ⁴ για EXP(B) Κάτω	Άνω
Ηλικία	1,37	1,27	0,28	3,94	0,33	47,20
Κάπνισμα	22,32	40192	1,00	4,9·105	0,00	.
Φύλο	0,22	56841	1,00	1,25	0,00	.
PS	0,44	1,74	0,80	1,56	0,05	47,46
Στάδιο	2,30	1,24	0,06	0,28	0,88	112,49
Ιστολογία	-1,34	1,26	0,29	,26	0,02	3,09
Προέλευση όγκου	-2,65	1,63	0,10	,07	0,00	1,71
Είδος δείγματος	1,99	1,86	0,29	7,31	0,19	282,17
Χημειοθεραπεία	1,88	1,40	0,18	6,57	0,42	101,94

Στον Πίνακα 36 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της λογιστικής παλινδρόμησης για τη γονιδιακή έκφραση ΧΡF, όπου και παρατηρείται ότι δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική σχέση των ανεξάρτητων μεταβλητών με την ΧΡF έκφραση ($p > 0.05$ σε όλες τις περιπτώσεις).

Πίνακας 36: Αποτελέσματα λογιστικής παλινδρόμησης με εξαρτημένη μεταβλητή τη γονιδιακή έκφραση ΧΡF

Μεταβλητές	B	S.E.	p	EXP(B)	95% Δ.Ε. για EXP(B) Κάτω	Άνω
Ηλικία	-1,57	1,49	0,29	0,21	0,01	3,89
PS	0,39	1,68	0,82	1,47	0,05	39,76
Στάδιο	-0,58	1,12	0,60	0,56	0,06	5,01
Ιστολογία	1,48	1,48	0,32	4,38	0,24	79,13
Πρόελευση όγκου	1,04	1,50	0,49	2,83	0,15	54,07
Είδος δείγματος	-1,65	1,49	0,27	0,19	0,01	3,56
Χημειοθεραπεία	0,95	1,25	0,45	2,58	0,22	29,95

Στον Πίνακα 37 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της λογιστικής παλινδρόμησης για την πρωτεϊνική έκφραση του ERCC1 ως προς τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά. Από την ανάλυση προέκυψε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της ιστολογίας ($p=0.024<0.05$) και της προέλευσης του όγκου ($p=0.000<0.05$) με τη μεταβλητή ERCC1 PROTEIN. Από τους αντίστοιχους συντελεστές του μοντέλου μπορούμε να πούμε ότι όσοι είχαν πηλακώδες καρκίνωμα είχαν 7,14 φορές ($1/Exp(B)=1/0.14$) μεγαλύτερη πιθανότητα να παρουσιάζουν υψηλή έκφραση της ERCC1 πρωτεΐνης σε σύγκριση με όσους είχαν μη πηλακώδες καρκίνωμα. Επίσης, προκύπτει ότι όσοι ασθενείς είχαν δείγμα από μετάσταση είχαν 100 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να παρουσιάζουν υψηλή έκφραση της ERCC1 πρωτεΐνης από όσους είχαν δείγμα από τον πρωτοπαθή όγκο.

Πίνακας 37: Αποτελέσματα λογιστικής παλινδρόμησης με εξαρτημένη μεταβλητή την πρωτεϊνική έκφραση του ERCC1

Μεταβλητές	B	S.E.	p	EXP(B)	95% Δ.Ε. ⁴ για EXP(B) Κάτω	Άνω
Ηλικία	-3,99	1,12	0,08	0,14	0,02	1,25
Φύλο	-23,59	19834	1,00	0,00	0,00	.
PS	4,18	2,31	0,07	65,56	0,71	6035
Στάδιο	-0,16	0,89	0,86	0,86	0,15	4,88
Ιστολογία	-2,00	1,03	0,05*	1,50	0,02	1,02
Προέλευση όγκου	-4,86	1,65	0,00*	0,01	0,00	0,20
Είδος δείγματος	1,03	1,11	0,35	2,81	0,32	24,64
Χημειοθεραπεία	1,37	1,14	0,23	3,94	0,42	36,7

6.4 Αλληλοσυσχετίσεις των 5 υπό μελέτη παραγόντων

Στη συνέχεια με χρήση του συντελεστή συσχέτισης του Spearman, λόγω της μη κανονικότητας των μετρήσεων, ελέγχθηκε αν οι 5 υπό μελέτη παράγοντες αλληλοσυσχετίζονται ως προς τη ρύθμιση των επιπέδων έκφρασής τους.

Στον Πίνακα 38 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης για το συνολικό δείγμα των ασθενών. Από τον συντελεστή συσχέτισης και την αντίστοιχη σημαντικότητα σε κάθε περίπτωση παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των πέντε παραγόντων για το δείγμα όλων των ασθενών ($p > 0.05$ σε όλες τις περιπτώσεις).

Πίνακας 38: Συντελεστής συσχέτισης Spearman και σημαντικότητα

		ERCC1	MZF1	XPA	XPF	ERCC1 PROTEIN
ERCC1	Συντελεστής συσχέτισης	1,000	0,181	-0,144	-0,301	0,166
	P	.	0,291	0,402	0,240	0,334
MZF1	Συντελεστής συσχέτισης		1,000	0,308	0,260	0,112
	P		.	0,067	0,314	0,516
XPA	Συντελεστής συσχέτισης			1,000	0,289	0,182
	P			.	0,260	0,288
XPF	Συντελεστής συσχέτισης				1,000	-0,141
	P				.	0,591
ERCC1 PROTEIN	Συντελεστής συσχέτισης p					1,000 .

6.5 Συσχέτιση δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών με την ανταπόκριση στη θεραπεία

Ελέγχθηκε η πιθανή συσχέτιση των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών με τις μεταβλητές RR και DCR. Στον Πίνακα 39 παρουσιάζονται οι συχνότητες και η σημαντικότητα του ελέγχου Fisher των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών ως προς την ανταπόκριση στη θεραπεία (μεταβλητή RR). Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική εξάρτηση ($p > 0.05$) σε όλες τις περιπτώσεις.

Πίνακας 39: Συσχέτιση δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών με τη μεταβλητή RR.

Μεταβλητές		RR		P
		SD/PD	CR/PR	
Ηλικία	Άνω των 60	66,7%	33,3%	0.366
	Κάτω των 60	76,1%	23,9%	
Κάπνισμα	Δεν κάπνισε ποτέ	80,0%	0,0%	0.712
	Καπνιστής- Πρώην καπνιστής	68,3%	31,7%	
Φύλο	Άντρας	72,6%	27,4%	0.465
	Γυναίκα	60,0%	40,0%	
PS	0-1	69,4%	30,6%	0.439
	2	88,9%	11,1%	
Στάδιο	IIIΑ-IIIΒ	73,0%	27,0%	0.819
	IV	70,2%	29,8%	
Ιστολογία	Μη πλακώδες	74,6%	25,4%	0,339
	Πλακώδες	64,5%	35,5%	
Χημειοθεραπεία	Σιοπλατίνη	72,4%	27,6%	0.475
	Καρβοπλατίνη	64,5%	35,5%	

Στον Πίνακα 40 παρουσιάζονται οι συχνότητες και η σημαντικότητα του ελέγχου Fisher των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών ως προς τη μεταβλητή DCR. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική εξάρτηση ($p>0.05$) σε όλες τις περιπτώσεις.

Πίνακας 40: Συσχέτιση δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών με τη μεταβλητή DCR

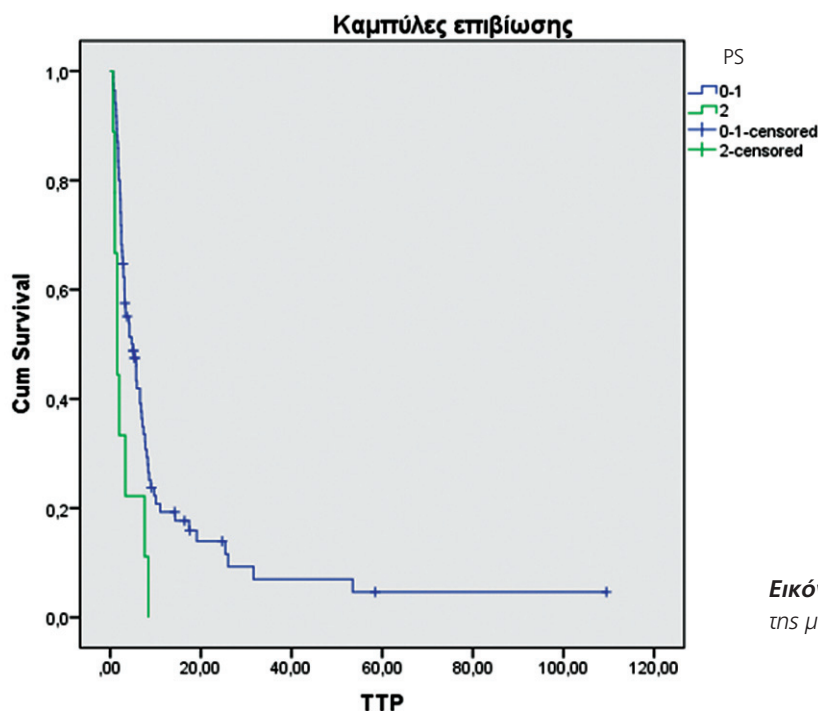
Μεταβλητές		DCR		P
		Non-PD	PD	
Ηλικία	Άνω των 60	52,1%	47,9%	0.684
	Κάτω των 60	56,5%	43,5%	
Κάπνισμα	Δεν κάπνισε ποτέ	70,0%	30,0%	0.498
	Καπνιστής- Πρώην καπνιστής	55,0%	31,7%	
Φύλο	Άντρας	53,6%	46,4%	0.750
	Γυναίκα	60,0%	40,0%	
PS	0-1	57,6%	42,4%	0.075
	2	22,2%	77,8%	
Στάδιο	IIIΑ-IIIΒ	56,8%	43,2%	0.832
	IV	52,6%	47,4%	
Ιστολογία	Μη πλακώδες	52,4%	41,9%	0.663
	Πλακώδες	58,1%	41,9%	
Χημειοθεραπεία	Σισπλατίνη	50,0%	50,0%	0.073
	Καρβοπλατίνη	71,0%	29,0%	

6.6 Συσχέτιση κλινικών και δημογραφικών χαρακτηριστικών με την επιβίωση

Ελέγχθηκε η πιθανή συσχέτιση των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών με τις μεταβλητές TTP και OS. Στον πίνακα 41 παρουσιάζεται η σημαντικότητα του ελέγχου Logrank ως προς τα κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών για τις μεταβλητές OS και TTP. Από την ανάλυση προέκυψε μια στατιστικά σημαντική διαφορά στις καμπύλες επιβίωσης στο διάστημα TTP ως προς το PS ($p=0.016$).

Πίνακας 41: Συσχέτιση δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών με την επιβίωση		
Μεταβλητή	P	
	OS	TTP
Ηλικία	0.385	0.757
Κάπνισμα	0.255	0.237
Φύλο	0.509	0.749
PS	0.095	0.016*
Στάδιο	0.809	0.279
Ιστολογία	0.701	0.677
Χημειοθεραπεία	0.748	0.274

Στην Εικόνα 41 παρουσιάζεται η καμπύλη Kaplan Meier για τη μεταβλητή TTP ως προς το PS. Παρατηρούμε ότι οι ασθενείς με PS 0-1 άργησαν να υποτροπιάσουν (μεγαλύτερο διάστημα TTP) (MD=4.2) σε σύγκριση με τους ασθενείς με PS 2 (MD=1.6).



Εικόνα 41: Καμπύλη Kaplan Meier της μεταβλητής TTP ως προς το PS.

6.7 Συσχέτιση των εργαστηριακών χαρακτηριστικών με την ανταπόκριση στη θεραπεία

Ελέγχθηκε με το ακριβές στατιστικό του Fisher η πιθανή συσχέτιση των εργαστηριακών χαρακτηριστικών των ασθενών με την ανταπόκριση στη θεραπεία και συγκεκριμένα με τις μεταβλητές RR και DCR. Στη συνέχεια με τη χρήση της λογιστικής παλινδρόμησης ελέγχθηκε η πιθανή αλληλεπίδραση των πέντε παραγόντων στις μεταβλητές της ανταπόκρισης στη θεραπεία. Σε όλες τις περιπτώσεις ως εξαρτημένες μεταβλητές θεωρήθηκαν οι μεταβλητές RR και DCR και ως ανεξάρτητες οι ERCC1, MZF1, XPA, XPF και ERCC1 PROTEIN.

Στον Πίνακα 42 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ελέγχου των πέντε υπό μελέτη παραγόντων ως προς τη μεταβλητή RR. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική εξάρτηση ($p > 0.05$) των παραγόντων σε όλες τις περιπτώσεις.

Πίνακας 42: Συσχέτιση εργαστηριακών χαρακτηριστικών με τη μεταβλητή RR

Μεταβλητές		RR		P
		SD/PD	CR/PR	
ERCC1	Χαμηλή έκφραση	65,6%	34,4%	0.788
	Υψηλή έκφραση	71,0%	29,0%	
MZF1	Χαμηλή έκφραση	67,7%	32,3%	1.000
	Υψηλή έκφραση	67,7%	32,3%	
XPA	Χαμηλή έκφραση	68,8%	31,2%	1.000
	Υψηλή έκφραση	67,7%	32,3%	
XPF	Χαμηλή έκφραση	56,2%	43,8%	0.716
	Υψηλή έκφραση	68,8%	31,2%	
ERCC1 PROTEIN	Χαμηλή έκφραση	64,1%	35,9%	0.249
	Υψηλή έκφραση	71,3%	23,6%	

Στον Πίνακα 43 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της λογιστικής παλινδρόμησης που πραγματοποιήθηκε με εξαρτημένη μεταβλητή το ποσοστό ανταπόκρισης στη ΧΜΘ RR και ανεξάρτητες μεταβλητές τους συνδυασμούς των πέντε υπό μελέτη παραγόντων. Από την ανάλυση δεν προέκυψε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση των συνδυασμών των 5 υπό μελέτη παραγόντων στη μεταβλητή RR ($p > 0.05$ σε όλες τις περιπτώσεις).

Πίνακας 43: Αποτελέσματα λογιστικής παλινδρόμησης με εξαρτημένη μεταβλητή την RR

Μεταβλητές	B	S.E.	p	EXP(B)	95% Δ.Ε. για EXP(B) Κάτω	Άνω
ERCC1 - MZF1	-0,045	0,591	0,939	0,956	0,300	3,05
ERCC1 - XPA	0,347	0,607	0,568	1,414	0,430	4,65
ERCC1 - XPF	0,405	0,801	0,613	1,500	0,312	7,21
ERCC1 - ERCC1 PROTEIN	0,449	0,585	0,443	1,566	0,498	4,93
MZF1 - XPA	-0,296	0,615	0,630	0,744	0,223	2,48
MZF1 - XPF	0,693	0,829	0,403	2,000	0,394	10,16
MZF1 - ERCC1 PROTEIN	-0,470	0,655	0,473	0,625	0,173	2,26
XPA - XPF	1,041	0,876	0,234	2,833	0,509	15,77
XPA - ERCC1 PROTEIN	0,449	0,585	0,443	1,566	0,498	4,93
XPF - ERCC1 PROTEIN	1,861	0,948	0,051	6,429	0,988	41,20

Στον Πίνακα 44 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ελέγχου Χ² των πέντε υπό μελέτη παραγόντων ως προς τη μεταβλητή DCR. Από την ανάλυση δεν προέκυψε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση των συνδυασμών των 5 υπό μελέτη παραγόντων στη μεταβλητή DCR ($p > 0.05$ σε όλες τις περιπτώσεις).

Πίνακας 44: Συσχέτιση εργαστηριακών χαρακτηριστικών με τη μεταβλητή DCR

Μεταβλητές		DCR		P
		Non PD	PD	
ERCC1	Χαμηλή έκφραση	65,6%	34,4%	0,079
	Υψηλή έκφραση	41,9%	58,1%	
MZF1	Χαμηλή έκφραση	51,6%	48,4%	0,799
	Υψηλή έκφραση	58,1%	41,9%	
XPA	Χαμηλή έκφραση	53,1%	46,9%	1,000
	Υψηλή έκφραση	54,8%	45,2%	
XPF	Χαμηλή έκφραση	68,8%	31,2%	0,285
	Υψηλή έκφραση	43,8%	56,2%	
ERCC1 PROTEIN	Χαμηλή έκφραση	66,7%	33,3%	0.059
	Υψηλή έκφραση	45,5%	54,5%	

Στον Πίνακα 45 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της λογιστικής παλινδρόμησης που πραγματοποιήθηκε με εξαρτημένη μεταβλητή το ποσοστό ελέγχου νόσου (DCR) και ανεξάρτητες μεταβλητές τους συνδυασμούς των πέντε υπό μελέτη παραγόντων. Από την ανάλυση δεν προέκυψε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση των συνδυασμών των 5 υπό μελέτη παραγόντων στη μεταβλητή DCR ($p > 0.05$ σε όλες τις περιπτώσεις).

Πίνακας 45: Αποτελέσματα λογιστικής παλινδρόμησης με εξαρτημένη μεταβλητή την DCR

Μεταβλητές	B	S.E.	p	EXP(B)	95% Δ.Ε για EXP(B) Κάτω	Άνω
ERCC1 - MZF1	-0,179	0,556	0,748	0,836	0,281	2,49
ERCC1 - XPA	-0,831	0,613	0,175	0,436	0,131	1,45
ERCC1 - XPF	-1,34	0,904	0,138	0,262	0,045	1,54
ERCC1 - ERCC1 PROTEIN	-1,089	0,605	0,072	0,337	0,103	1,102
MZF1 - XPA	0,591	0,565	0,296	1,806	0,597	5,46
MZF1 - XPF	-0,344	0,837	0,681	0,709	0,137	3,66
MZF1 - ERCC1 PROTEIN	-0,077	0,584	0,895	0,926	0,295	2,911
XPA - XPF	-1,872	1,152	0,104	0,154	0,106	1,471
XPA - ERCC1 PROTEIN	0,408	0,568	0,473	0,665	0,219	2,026
XPF - ERCC1 PROTEIN	-21,44	1519	0,999	0,000	0,000	-

6.8 Συσχέτιση των εργαστηριακών χαρακτηριστικών με την επιβίωση

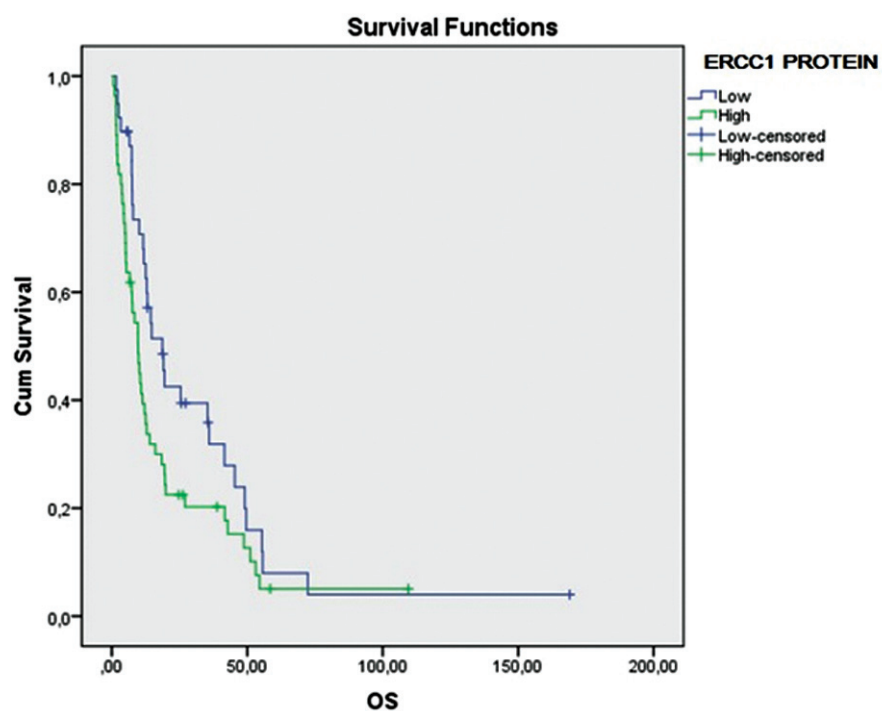
Με χρήση του ελέγχου logrank και των καμπυλών επιβίωσης ελέγχθηκε αν υπάρχει επίδραση των πέντε παραγόντων στην επιβίωση των ασθενών. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε τόσο με βάση τις διχοτομημένες τιμές των πέντε παραγόντων, όσο και με βάση τον διαχωρισμό τους σε τριτημόρια. Στη συνέχεια με τη χρήση της λογιστικής παλινδρόμησης ελέγχθηκε η πιθανή αλληλεπίδραση των πέντε παραγόντων στις μεταβλητές της επιβίωσης (OS, TTP). Σε όλες τις περιπτώσεις ως εξαρτημένες μεταβλητές θεωρήθηκαν οι μεταβλητές TTP και OS και ως ανεξάρτητες οι ERCC1, MZF1, XPA, XPF και ERCC1 PROTEIN.

Στον Πίνακα 46 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ελέγχου logrank για την επίδραση των πέντε παραγόντων (διχοτομημένες τιμές) στην επιβίωση των ασθενών (OS και TTP). Από την ανάλυση προέκυψε μια στατιστικά σημαντική διαφορά στις καμπύλες επιβίωσης ως προς την πρωτεϊνική έκφραση του ERCC1 στη συνολική επιβίωση OS ($p=0.009$).

Πίνακας 46: Συσχέτιση δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών με την επιβίωση για το σύνολο των ασθενών

Μεταβλητή	P	
	OS	TTP
ERCC1	0,072	0,893
MZF1	0,208	0,549
XPA	0,931	0,382
XPF	0,594	0,242
ERCC1 PROTEIN	0,009* (Breslow)	0,051 (Breslow)

Στην Εικόνα 42 παρουσιάζεται η καμπύλη Kaplan Meier για την πρωτεϊνική έκφραση του ERCC1 ως προς τη συνολική επιβίωση των ασθενών (OS) και παρατηρούμε ότι όσοι ασθενείς είχαν χαμηλή πρωτεϊνική έκφραση του ERCC1 (MD=18.7) επιβίωσαν για περισσότερο χρόνο (OS) σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν υψηλή έκφραση (MD=9.7).



Εικόνα 42: Καμπύλη Kaplan Meier για τη μεταβλητή OS ως προς τη διχοτόμηση της μεταβλητής ERCC1 PROTEIN.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η τυχόν επίδραση των τριτημορίων των πέντε παραγόντων στις εξαρτημένες μεταβλητές OS και TTP. Για τον σκοπό αυτό αρχικά εντοπίστηκαν τα όρια διαχωρισμού των τριών παραγόντων σε τριτημόρια και τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 47. Οι πέντε παράγοντες, με βάση τα υπολογισθέντα όρια χωρίστηκαν σε τρεις κατηγορίες (χαμηλή, μεσαία, υψηλή έκφραση).

Πίνακας 47: Τριτημόρια για το σύνολο των ασθενών

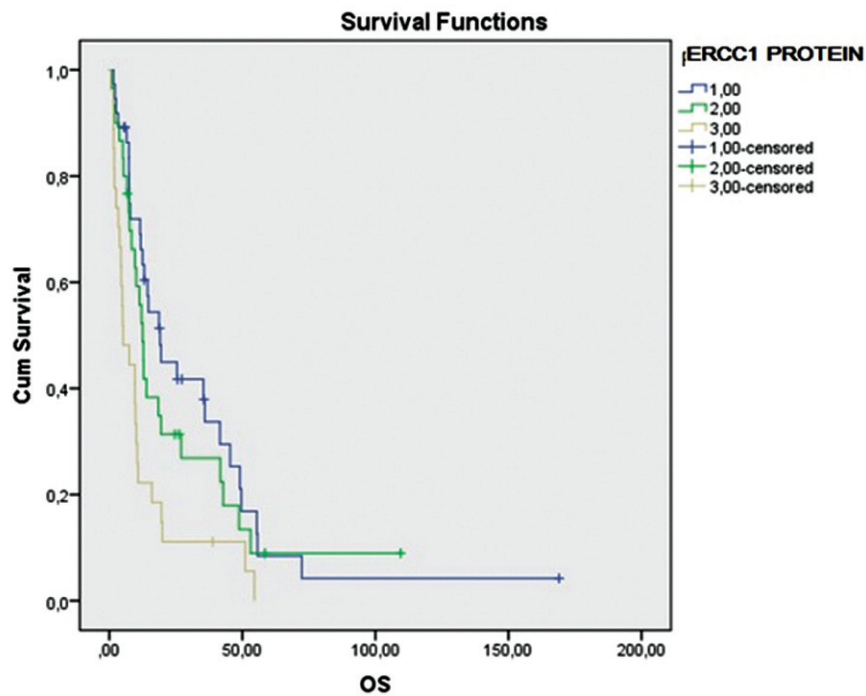
Παράγοντες	Όριοπρώτου-δεύτερου τριτημορίου	Όριο δεύτερου-τρίτου τριτημορίου
ERCC1	4,55	7,56
MZF1	4,67	9,15
XPA	2,11	3,59
XPF	0,10	0,15
ERCC1 PROTEIN	0,5	1,0

Στον Πίνακα 48 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ελέγχου logrank για την επίδραση των πέντε παραγόντων σε τριτημόρια στην επιβίωση των ασθενών (OS και TTP). Από την ανάλυση προέκυψαν δύο στατιστικά σημαντικές διαφορές στις καμπύλες επιβίωσης ως προς την πρωτεϊνική έκφραση του ERCC 1 στην περίπτωση της OS ($p=0.003$) και της TTP ($p=0.011$).

Πίνακας 48: Συσχέτιση εργαστηριακών χαρακτηριστικών (τριτημόρια) με την επιβίωση (OS, TTP)

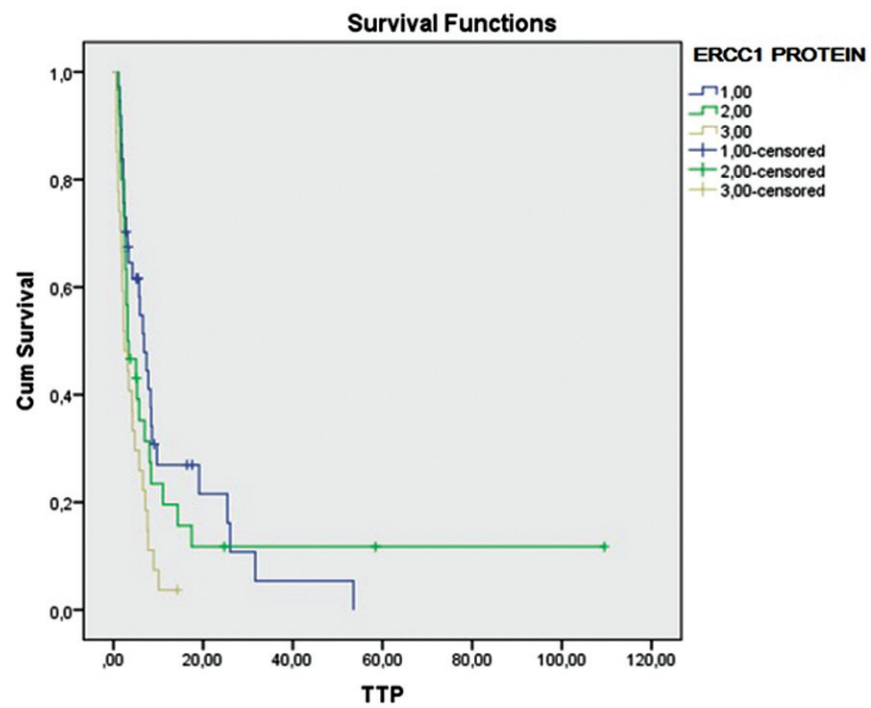
Μεταβλητή	P	
	OS	TTP
ERCC1	0,483	0,966
MZF1	0,096	0,096
XPA	0,737	0,607
XPF	0,464	0,151
ERCC1 PROTEIN	0,003*	0,011*

Στην Εικόνα 43 παρουσιάζεται οι καμπύλες Kaplan Meier για την OS ως προς τις κατηγορίες του παράγοντα ERCC1 PROTEIN. Από τα δεδομένα προκύπτει ότι οι ασθενείς που ανήκουν στην κατηγορία χαμηλής πρωτεϊνικής έκφρασης ERCC1 (MD=19,10) επιβίωσαν για μεγαλύτερο χρόνο σε σύγκριση με τους ασθενείς που ανήκουν στη μεσαία κατηγορία (MD=12,56) και τους ασθενείς που ανήκουν στην κατηγορία υψηλής έκφρασης (MD=5,200).



Εικόνα 43: Καμπύλη Kaplan Meier για τη μεταβλητή OS ως προς τα τριτημόρια της πρωτεϊνικής έκφραση ERCC1.

Στην Εικόνα 44 παρουσιάζονται οι καμπύλες Kaplan Meier για το διάστημα TTP ως προς τις κατηγορίες του παράγοντα ERCC1 PROTEIN. Από τα δεδομένα προκύπτει ότι οι ασθενείς που ανήκουν στην κατηγορία χαμηλής πρωτεϊνικής έκφρασης ERCC1 υποτροπίασαν αργότερα (MD=6,83) σε σύγκριση με τους ασθενείς που ανήκουν στην μεσαία κατηγορία (MD=3,20) και τους ασθενείς που ανήκουν στην κατηγορία υψηλής πρωτεϊνικής έκφρασης ERCC1 (MD=2,43).



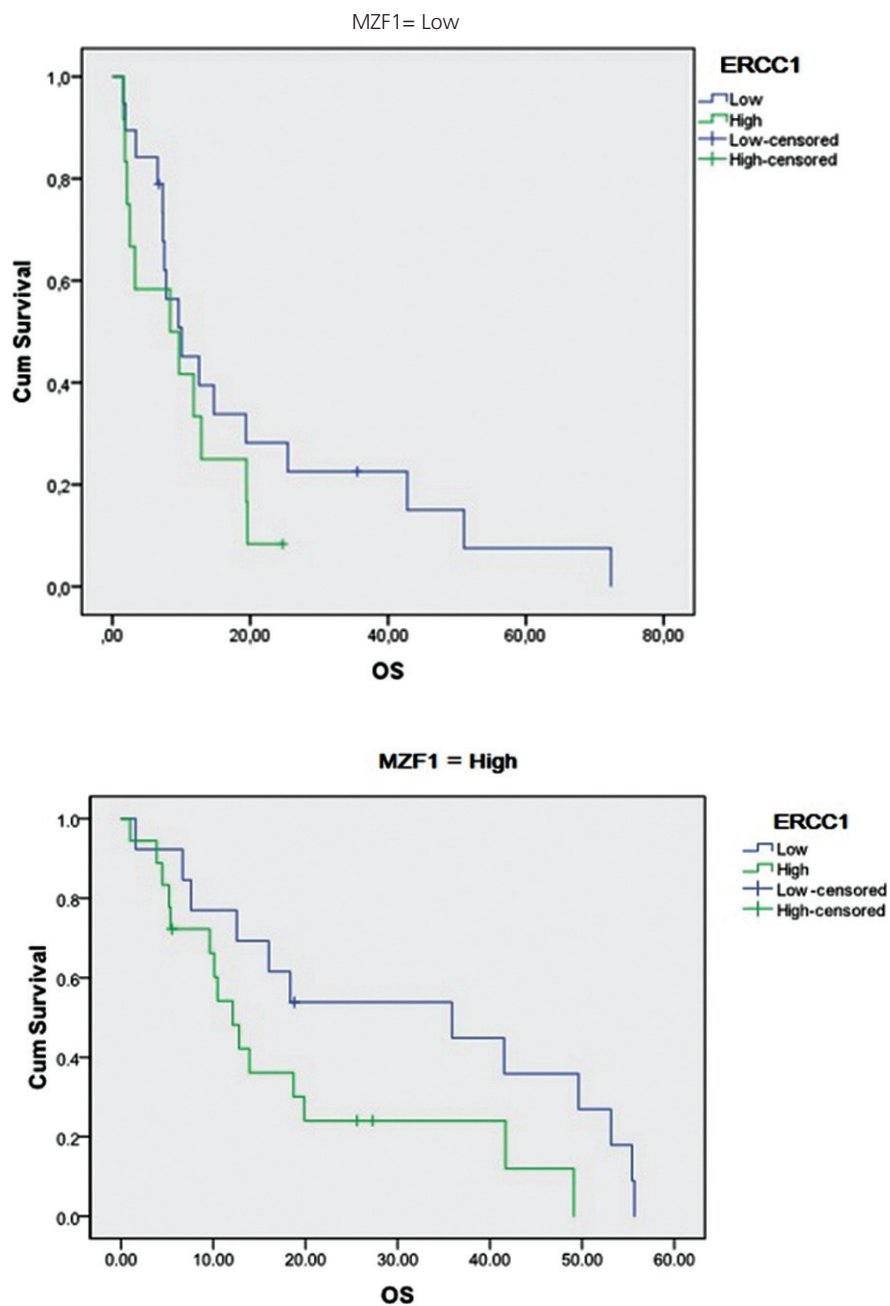
Εικόνα 44: Καμπύλη Kaplan Meier για τη μεταβλητή TTP ως προς τα τριτημόρια της πρωτεϊνικής έκφραση ERCC1.

Στον Πίνακα 49 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ελέγχου logrank που πραγματοποιήθηκε με εξαρτημένες μεταβλητές την επιβίωση (OS, TTP) και ανεξάρτητες μεταβλητές τους συνδυασμούς των πέντε υπό μελέτη παραγόντων. Από την ανάλυση προέκυψε μια στατιστικά σημαντική επίδραση της γονιδιακής έκφρασης ERCC1 συνδυασμένη με τη γονιδιακή έκφραση MZF1 στη συνολική επιβίωση (OS) των ασθενών, καθώς επίσης και άλλη μια στατιστικά σημαντική επίδραση της πρωτεϊνικής έκφρασης ERCC1 συνδυασμένη με τη γονιδιακή έκφραση MZF1 στη συνολική επιβίωση (OS) των ασθενών.

Πίνακας 49: Αλληλεπιδράσεις εργαστηριακών χαρακτηριστικών (δικοτομημένες τιμές) στην επιβίωση των ασθενών (OS, TTP)

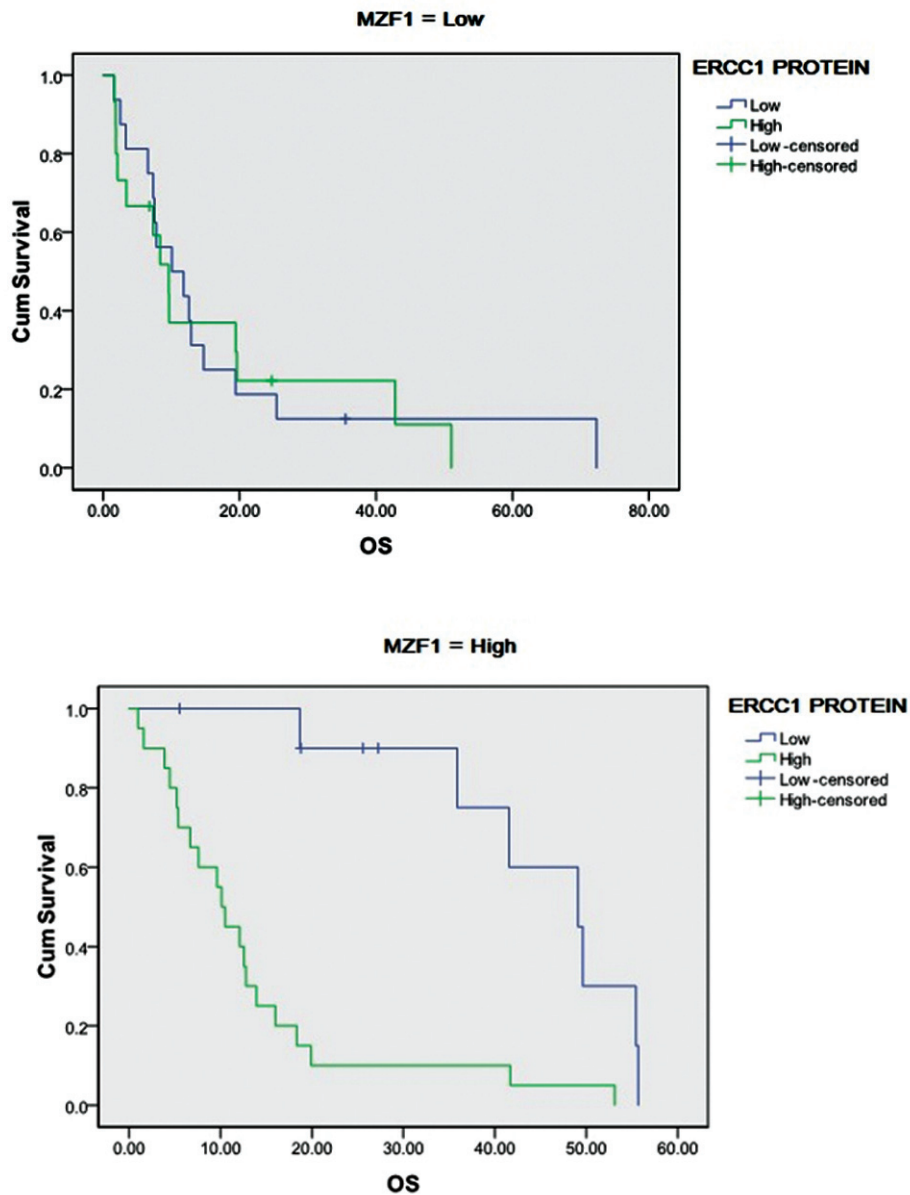
Μεταβλητή	P	
	OS	TP
ERCC1 - MZF1	0.037*	0.616
ERCC1 - XPA	0,094	0.826
ERCC1 - XPF	0.434	0.459
ERCC1 - ERCC1 PROTEIN	0.217	0.588
MZF1 - XPA	0,166	0.632
MZF1 - XPF	0.418	0.837
ERCC1 PROTEIN - MZF1	0.006*	0.075
XPA - XPF	0.642	0,908
XPA - ERCC1 PROTEIN	0.319	0.854
XPF - ERCC1 PROTEIN	0.621	0,908

Στην Εικόνα 45 παρουσιάζονται οι καμπύλες Kaplan Meier για την OS ως προς την επίδραση της γονιδιακής έκφρασης ERCC1 συνδυασμένη με τη γονιδιακή έκφραση MZF1. Από τα δεδομένα προκύπτει ότι οι ασθενείς που ανήκουν στην κατηγορία χαμηλής γονιδιακής έκφρασης ERCC1 και παράλληλα υψηλής γονιδιακής έκφρασης MZF1 επιβίωσαν για μεγαλύτερο χρόνο (MD=35,90) σε σύγκριση με τους ασθενείς που ανήκουν στον αντίθετο συνδυασμό, δηλαδή χαμηλής γονιδιακής έκφρασης MZF1 και υψηλής γονιδιακής έκφρασης ERCC1 (MD=8,37).



Εικόνα 45: Καμπύλες Kaplan Meier για τη μεταβλητή OS ως προς την αλληλεπίδραση της γονιδιακής έκφρασης ERCC1 συνδυασμένη με τη γονιδιακή έκφραση MZF1.

Στην Εικόνα 46 παρουσιάζονται οι καμπύλες Kaplan Meier για την OS ως προς την επίδραση της πρωτεϊνικής έκφρασης ERCC1 συνδυασμένη με τη γονιδιακή έκφραση MZF1. Από τα δεδομένα προκύπτει ότι οι ασθενείς που ανήκουν στην κατηγορία χαμηλής πρωτεϊνικής έκφρασης ERCC1 και παράλληλα υψηλής γονιδιακής έκφρασης MZF1 επιβίωσαν για μεγαλύτερο χρόνο (MD=36,90) σε σύγκριση με τους ασθενείς που ανήκουν στον αντίθετο συνδυασμό, δηλαδή χαμηλής γονιδιακής έκφρασης MZF1 και υψηλής πρωτεϊνικής έκφρασης ERCC1 (MD=7,18).



Εικόνα 46: Καμπύλες Kaplan Meier για τη μεταβλητή OS ως προς την αλληλεπίδραση της πρωτεϊνικής έκφρασης ERCC1 συνδυασμένη με τη γονιδιακή έκφραση MZF1.

Συζήτηση

Η καθιερωμένη θεραπευτική προσέγγιση στη συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών με προχωρημένου σταδίου ΜΜΚΠ είναι η χορήγηση πηλατινούχας ΧΜΘ, που ωστόσο, προσφέρει ελάχιστη μόνο βελτίωση της ολικής επιβίωσης^{35,102}. Συνεπώς είναι απαραίτητη η ανάπτυξη μιας νέας θεραπευτικής στρατηγικής. Η εξατομικευμένη επιλογή της θεραπείας κερδίζει συνεχώς έδαφος, τουλάχιστον σε ερευνητικό επίπεδο, και οι ελπίδες για ένα πιο αισιόδοξο μέλλον όσον αφορά στην κλινική αντιμετώπιση των ογκολογικών ασθενών έχουν στραφεί και προς τη φαρμακογενωμική κατεύθυνση. Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, το μονοπάτι ΝΕΡ φαίνεται να προσελκύει το ενδιαφέρον, με τον ιδιαίτερο ρόλο του ως φύλλακας της ακεραιότητας του DNA από εξωγενείς μηχανισμούς δημιουργίας γενωμικών βλαβών, στους οποίους συμπεριλαμβάνεται και η δράση της πηλατίνας¹⁷².

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της ενδεχόμενης επίδρασης βασικών γονιδίων του μονοπατιού ΝΕΡ, και συγκεκριμένα των γονιδίων ERCC1, MZF1, XPA, XPF, καθώς και της πρωτεΐνης ERCC1 στην ανταπόκριση στη ΧΜΘ και στην επιβίωση ασθενών με ΜΜΚΠ προχωρημένου σταδίου. Ωστόσο, ήδη από τα πρώτα ευρήματα της μελέτης που συμπεριέλαβε συνολικά 94 ασθενείς παρατηρήθηκε πως κάποιοι δημογραφικοί και κλινικοί παράγοντες συσχετίστηκαν σημαντικά είτε με την κλινική πορεία των ασθενών, είτε με την έκφραση των μοριακών δεικτών που μελετήσαμε.

Ο κύριος κλινικός παράγοντας που ξεχώρισε σε αυτές τις συσχετίσεις ήταν η λειτουργική κατάσταση του ασθενούς (PS). Συγκεκριμένα, το PS συσχετίστηκε με την επιβίωση, καθώς προέκυψε πως οι ασθενείς με PS 0-1 άργησαν να υποτροπιάσουν (TTP= 4.2 μήνες vs 1.6 μήνες, $p=0.016$) σε σύγκριση με τους ασθενείς με PS 2 (βλ. Κεφ. 6.6, Πίνακας 41 και Εικόνα 41). Αυτό το εύρημα βέβαια δεν μας εκπλήσσει, απεναντίας μας επιβεβαιώνει πως τα χαρακτηριστικά του συνολικού μας υπό μελέτη πληθυσμού είναι σε συμφωνία με την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία, στην οποία το PS έχει ήδη καθιερωθεί ως προγνωστικός αλλά και προβλεπτικός παράγοντας στην αντιμετώπιση του ΜΜΚΠ¹⁴⁸ (βλ Κεφ 1.9).

Ένας βασικός προβληματισμός από την αρχή της μελέτης ήταν το είδος της ΧΜΘ που έλαβαν οι ασθενείς. Καθότι κάποιος εμβαθύνοντας στις μελέτες βασικής έρευνας που αφορούν το μονοπάτι και τους παράγοντες ΝΕΡ, θα διαπιστώσει ότι σε όλα τα πειράματα που διεξήχθησαν σε κυτταρικές σειρές και διαγονιδιακά ζώα είχε χρησιμοποιηθεί συγκεκριμένα το πηλατινούχο ανάλογο σισπηλατίνη. Επίσης, στη βιβλιογραφία αναφέρεται μεν πως ο μηχανισμός δράσης της καρβοπηλατίνης είναι παρόμοιος με αυτόν της σισπηλατίνης, αλλά δεν υπάρχει εις

γνώσιν μας κάποια μελέτη βασικής έρευνας που να απαντά επί τούτου σε αυτό το ερώτημα, αν δηλαδή ο συγκεκριμένος μηχανισμός αντοχής στην πλάτινα, που αφορά το μονοπάτι NER και τους παράγοντές του, εμφανίζει διαφορετικά ή ίδια χαρακτηριστικά δράσης στα δύο πηλατινούχα ανάλογα (καρβοπηλατινή ή σισπηλατινή). Επίσης, στη βιβλιογραφία αναφέρεται ένα καλύτερο προφίλ ανεκτικότητας της καρβοπηλατινής από τον οργανισμό των ασθενών³⁷³, που ίσως θα μπορούσε να αντιστοιχεί και σε μια καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία. Η συσχέτιση της καρβοπηλατινής με βελτιωμένο προφίλ νοσηρότητας στον ΜΜΚΠ, σε σύγκριση με την σισπηλατινή, έχει δείχθει σε κάποιες μεμονωμένες μελέτες^{374,375}, αλλά σε επίπεδο μετα-αναλύσεων φάνηκε πως ίσως τελικά να υπερέχει μόνον στην εμφάνιση διαφορετικής τοξικότητας και όχι σημαντικά καλύτερης επιβίωσης^{121,376}. Αντιθέτως και παραδόξως, αν και η σισπηλατινή φαίνεται να συνδέεται με μεγαλύτερη νοσηρότητα, στο πλαίσιο της συνολικής επιβίωσης οι περισσότερες μελέτες συγκλίνουν στο ότι η σισπηλατινή μάλλον συνδέεται με καλύτερη επιβίωση σε σχέση με την καρβοπηλατινή¹²⁰.

Στην παρούσα μελέτη δεν ανευρέθηκε καμία σημαντική σχέση με το είδος της ΧΜΘ και την επιβίωση (OS, TTP). Όσον αφορά την ανταπόκριση (RR) στη ΧΜΘ επίσης δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση. Στο ποσοστό έλεγχου της νόσου (DCR), σε έναν πρώτο έλεγχο σημαντικότητας με βάση το Chi-Square του Pearson, προέκυψε πως οι ασθενείς που υπεβλήθησαν σε χημειοθεραπεία με καρβοπηλατινή είχαν μεγαλύτερες πιθανότητες να μην εμφανίσουν πρόοδο νόσου, σε σύγκριση με κάποιον που υποβλήθηκε σε χημειοθεραπεία με σισπηλατινή ($\chi^2(1)=3.630$, $OR=0.409$, $p=0.045$). Ωστόσο, ο τελικός έλεγχος με το τεστ Fisher ανέτρεψε αυτή τη σημαντικότητα όπως φαίνεται στα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν, καθώς με το τεστ Fischer η συσχέτιση τελικά ήταν μη σημαντική ($p=0.073$), (βλ. Κεφ. 6.5, Πίνακας 40).

Προχωρώντας στα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά που βρέθηκε να συσχετίζονται με την έκφραση των μοριακών δεικτών που μελετήσαμε, μια παρατήρηση είναι η σχέση της ηλικίας με την έκφραση του γονιδίου MZF1. Συγκεκριμένα, στο σύνολο του πληθυσμού βρέθηκε πως οι ασθενείς άνω των 60 ετών είναι πιθανόν να εμφανίσουν κατά 50 φορές αυξημένη τη γονιδιακή έκφραση MZF1 (βλ. Κεφ. 6.3, Πίνακας 34). Από τη θεωρία (βλ. Κεφ. 2.4) γνωρίζουμε ήδη πως το γονίδιο MZF1 βρίσκεται κοντά στο τελομερές του χρωμοσώματος 19²⁴⁷, ενώ παράλληλα είναι γνωστό πως με το γήρας τα τελομερή εκφυλίζονται, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχές της γονιδιακής έκφρασης της MZF1. Όπως προαναφέρθηκε, διάφορες μελέτες υποδεικνύουν πως η ανώμαλη έκφραση της MZF1 οδηγεί σε καρκίνο²⁵⁰. Επομένως, θα μπορούσε κάποιος να υποστηρίξει πως η αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης κακοήθους νόσου σε μεγαλύτερες ηλικίες γενικότερα θα μπορούσε να οφείλεται και σε γονίδια όπως της πρωτεΐνης MZF1, λόγω του εκφυλισμού των τελομερών. Μια τέτοια υπόθεση μένει να διερευνηθεί μελλοντικά, καθώς η έως τώρα βιβλιογραφία βασικής έρευνας παραμένει ελλιπής.

Ένα ακόμα αξιοσημείωτο εύρημα αφορά την έκφραση της ERCC1 πρωτεΐνης. Στο σύνολο του πληθυσμού προέκυψε πως η πρωτεϊνική έκφραση του ERCC1 επηρεάζεται από την ιστολογία αλλά και από την προέλευση του όγκου (βλ. Κεφ. 6.3, Πίνακας 37).

Συγκεκριμένα, όσον αφορά την ιστολογία, οι ασθενείς με όγκους π्लाκώδους τύπου είχαν 7,14 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να παρουσιάζουν υψηλή έκφραση της ERCC1 πρωτεΐνης σε σύγκριση με όσους είχαν μη π्लाκώδες καρκίνωμα. Η συσχέτιση αυτή έχει ήδη αναφερθεί στη βιβλιογραφία, καθώς έχουν υπάρξει πρόσφατες μελέτες μεγάλου πληθυσμού ασθενών που επιβεβαιώνουν τη συσχέτιση που βρήκαμε, ότι δηλαδή ο π्लाκώδης ιστολογικός υπότυπος ΜΜΚΠ σχετίζεται με υψηλή ERCC1 έκφραση τόσο σε επίπεδο γονιδίου³⁷⁷ όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης³¹². Όσον αφορά την προέλευση του όγκου, παρατηρήθηκε ότι όσοι ασθενείς είχαν δείγμα από μετάσταση είχαν 100 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να παρουσιάζουν υψηλή έκφραση της ERCC1 πρωτεΐνης από όσους είχαν δείγμα από τον πρωτοπαθή όγκο. Η παρατήρηση αυτή συνάδει με τις προηγηθείσες αναφορές μας στο κομμάτι της θεωρίας σχετικά με τη βιολογική ετερογένεια του ΚΠ και τις γονιδιακές μεταβολές κατά την πορεία της νόσου. Πράγματι λοιπόν, από τα αποτελέσματά μας προκύπτει πως οι μεταστατικές εστίες φαίνεται να συσχετίζονται με ένα γονιδιακό προφίλι μεγαλύτερης χημειοαντοχής και χειρότερης επιβίωσης, με αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση ERCC1 όσον αφορά το μονοπάτι NER. Προς υποστήριξη αυτού του αποτελέσματος, αν ανατρέξει κανείς στη βιβλιογραφία θα βρει μελέτες που αναφέρουν ότι έχει παρατηρηθεί ασυμφωνία στο μοριακό προφίλι του πρωτοπαθούς όγκου και του μεταστατικού δείγματος ενός ασθενούς. Το γεγονός αυτό, θα μπορούσε να εξηγηθεί και από την πολυσταδιακή ανάπτυξη και γενετική αλλοίωση της νόσου του ΚΠ, μπορεί ωστόσο να περιπλέκει τα συμπεράσματα σε προγνωστικές μοριακές μελέτες που περιλαμβάνουν δείγματα από βιοψίες διαφορετικής προέλευσης.

Οι Gomez-Roca et al, μελέτησαν ανοσοϊστοχημικά την έκφραση του ERCC1 τόσο σε δείγμα από τον πρωτοπαθή όγκο, όσο και στην αντίστοιχη μετάσταση, από 49 ασθενείς με ΜΜΚΠ. Στους 20 από αυτούς (41%) βρέθηκε πως η έκφραση ήταν διαφορετική στο μεταστατικό δείγμα από το πρωτοπαθές του ίδιου ασθενή³⁷⁸. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένη ERCC1 έκφραση στις εγκεφαλικές μεταστάσεις ($p=0.01$), γεγονός που μπορεί να ερμηνευτεί εν μέρει από την υπόθεση ότι οι μεταστατικές εστίες δημιουργούνται από μεταναστευτικά ανθεκτικά κύτταρα στη χορηγηθείσα θεραπεία, εν προκειμένω στην πλάτινα, και επομένως στους προχωρημένου σταδίου μεταστατικούς ασθενείς το μοριακό προφίλι της μεταστατικής εστίας όσον αφορά την έκφραση του ERCC1 θα περίμενε όντως κανείς να είναι εκείνο που αντιστοιχεί σε ανθεκτικότητα στην πλάτινα, δηλαδή αυξημένη ERCC1 έκφραση. Επιπλέον, η πρωτεϊνική έκφραση ERCC1 αξιολογήθηκε ανοσοϊστοχημικά σε ζεύγη δειγμάτων πρωτοπαθών όγκων και των αντίστοιχων μεταστατικών λεμφαδένων σε 82 ασθενείς πρώιμου σταδίου ΜΜΚΠ που έλαβαν επικουρική χημειοθεραπεία με σισπλάτινη³⁷⁹. Σε σύγκριση με τους πρωτοπαθείς όγκους, η ERCC1 έκφραση ήταν χαμηλότερη στους μεταστατικούς λεμφαδένες μόνο στο 8% των ασθενών ($p < 0,05$), αλλά υψηλότερη στο 55% αυτών. Τέλος, και οι Zhang W et al. παρατήρησαν σημαντικές αλλαγές στο προφίλι της πρωτεϊνικής έκφρασης ERCC1 μεταξύ πρωτοπαθών και μεταστατικών εστιών από 39 ασθενείς με ΜΜΚΠ³⁸⁰.

Παράλληλα με την προέλευση του δείγματος, η επιλογή του πιο κατάλληλου δείγματος είναι καίριας σημασίας για τις μοριακές μελέτες όχι μόνο για τεχνικούς λόγους, αλλά και

για το κατά πόσον αυτά τα δείγματα που επιλέγονται για την ανάλυση μπορεί να είναι αντιπροσωπευτικά του συνολικού όγκου, ιδιαίτερα όταν εξετάζεται το μοριακό προφίλ μίας νόσου όπως ο καρκίνος που χαρακτηρίζεται έτσι κι αλλιώς από την πολυκλωνική του φύση³⁸¹. Στα χειρουργικά δείγματα που προέρχονται από ασθενείς που υποβλήθηκαν σε πλήρη εξαίρεση του όγκου, αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη μοριακή ανάλυση όλων των δειγμάτων, οδηγώντας ωστόσο σε ένα οικονομικά και χρονικά τεράστιο κόστος που καθιστά μια τέτοια τακτική πρακτικά ανέφικτη. Οι Taillade et al. έδειξαν μεγάλα ποσοστά ασυμφωνίας (9-41%) στην έκφραση σημαντικών βιοδεικτών μεταξύ βιοπτικών και χειρουργικών δειγμάτων ΚΠ, συμπεραίνοντας πως η αξιολόγηση της έκφρασης βιολογικών δεικτών σε βρογχικές βιοψίες μπορεί να είναι παραπλανητική³⁸².

Στη δική μας μελέτη, στα χειρουργικά δείγματα εξετάστηκαν μικροσκοπικά με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης όλα τα παραφिनοποιημένα καψίδια του κάθε ασθενούς και επιλέχθηκε το πιο αντιπροσωπευτικό δείγμα ως προς την ποιότητα του νεοπλασματικού ιστού και την πυκνότητα νεοπλασματικών κυττάρων. Στους ασθενείς προχωρημένου σταδίου όμως, των οποίων η πλειοψηφία των δειγμάτων προέρχεται από βιοψίες και συνήθως από μεταστατικές εστίες, οι παράγοντες που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε παραπλανητικά αποτελέσματα πληθθαίνουν. Τα δείγματα σε αυτήν την περίπτωση είναι πολύ μικρά, αμφιβόλου ποιότητας και πυκνότητας νεοπλασματικού ιστού. Συνεπώς, λαμβάνοντας υπ' όψιν την ετερογένεια του όγκου και το εξαρτώμενο από την εντόπιση διαφορετικό μοριακό προφίλ των νεοπλασματικών εστιών που προαναφέραμε, τα βιοπτικά δείγματα των μεταστατικών ασθενών είναι αμφισβητήσιμα ως προς την αντιπροσωπευτικότητα της συνολικής νόσου και κατά συνέπεια και ως προς την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων που παρέχουν σε μοριακές αναλύσεις³⁸¹.

Επιστρέφοντας στους ερευνητικούς στόχους της μελέτης μας, η διερεύνηση της έκφρασης του γονιδίου ERCC1, τόσο σε επίπεδο mRNA, όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης και των υπολοίπων γονιδίων, με την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία (RR) δεν έδωσε θετικά αποτελέσματα. Δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ των μοριακών παραγόντων που μελετήθηκαν με την αντικειμενική ανταπόκριση στη ΧΜΘ (βλ. Κεφ. 6.7, Πίνακες 42, 43). Στον έλεγχο της νόσου (DCR), η πρωτεϊνική έκφραση ERCC1 φάνηκε να έχει μια τάση προς σημαντική συσχέτιση. Συγκεκριμένα, παρότι στον έλεγχο με Χ2 του Pearson προέκυψε πως η χαμηλή πρωτεϊνική έκφραση του ERCC1 συνδέεται με σημαντικά καλύτερο ποσοστό ελέγχου της νόσου, δηλαδή, πως οι ασθενείς που είχαν υψηλή πρωτεϊνική έκφραση του ERCC1, είχαν 2.4 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν πρόοδο νόσου, σε σύγκριση με όσους είχαν χαμηλή πρωτεϊνική έκφραση ($\chi^2(1)=4,1.37$, $OR=2.400$, $p=0.042$), όταν εφαρμόστηκε το ακριβές τεστ του Fisher η σημαντικότητα αυτή χάθηκε οριακά ($p=0.059$), (βλ. Κεφ. 6.7, Πίνακας 44).

Όπως έχουμε προαναφέρει στο κεφάλαιο 3.6, ενώ οι περισσότερες έως τώρα μελέτες έκφρασης της ERCC1 πρωτεΐνης (πλην ελάχιστων εξαιρέσεων) έχουν καταφέρει να βρουν σημαντική συσχέτιση με τη συνολική επιβίωση των ασθενών, στο κομμάτι της ανταπόκρισης στη ΧΜΘ τα αποτελέσματα δεν είναι τόσο ξεκάθαρα. Για την ακρίβεια είναι ελάχιστες οι

μελέτες που κατάφεραν να αναδείξουν μια τέτοια σημαντική σχέση^{307,311}. Επομένως, το αρνητικό αυτό εύρημα της παρούσας μελέτης δεν έρχεται σε αντίθεση με την πλειονότητα των ήδη υπάρχοντων μελετών της βιβλιογραφίας. Το γεγονός βέβαια ότι στην πλειονότητα των μελετών η πρωτεϊνική έκφραση του ERCC1 δεν έχει συσχετιστεί με την ανταπόκριση στη ΧΜΘ, ενώ την ίδια στιγμή φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την επιβίωση, είναι κατ'αρχήν δύσκολο να ερμηνευτεί. Σε όλες αυτές τις μελέτες -όπως και στη δική μας- η σταδιοποίηση έχει γίνει με ένα σύστημα που έχει πλέον αναθεωρηθεί με αρκετές αλλαγές (βλ. Πίνακας 5). Αυτό έχει σημασία, καθώς οι αλλαγές της σταδιοποίησης αναταξινομούν ένα μέρος των ασθενών όσον αφορά τη μετέπειτα θεραπευτική τους αντιμετώπιση και επομένως την ανταπόκριση σε αυτήν αλλά και την τελική πρόγνωση, μεταβάλλοντας έτσι τα συνολικά αποτελέσματα. Σίγουρα πάντως η παρατήρηση πως η χαμηλή πρωτεϊνική ERCC1 έκφραση στους ασθενείς με ΜΜΚΠ προχωρημένου σταδίου δεν επηρεάζει την ανταπόκριση στην ΧΜΘ αλλά αυξάνει τη συνολική επιβίωση χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Όσον αφορά τον αρχικό σκοπό και υπόθεση της μελέτης, από τους πέντε μοριακούς παράγοντες που μελετήθηκαν, η πρωτεΐνη ERCC1 φάνηκε να έχει θετικά αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που διεξήχθησαν στον συνολικό πληθυσμό έδειξαν πως η χαμηλή πρωτεϊνική έκφραση του ERCC1 συνδέεται με σημαντικά μεγαλύτερη συνολική επιβίωση (βλ. Κεφ. 6.8, Πίνακας 46, Εικόνα 42). Όταν δε, ο υπολογισμός έγινε με βάση τα τριτημόρια της πρωτεϊνικής έκφρασης του πληθυσμού, η συσχέτιση με τη συνολική επιβίωση ενδυναμώθηκε, ενώ παρατηρήθηκε συσχέτιση και με την επιβίωση έως την υποτροπή (βλ. Κεφ. 6.8, Πίνακας 48, Εικόνα 43). Συγκεκριμένα, όσοι ασθενείς είχαν χαμηλή πρωτεϊνική έκφραση του ERCC1 επιβίωσαν για περισσότερο χρόνο σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν υψηλή έκφραση (OS= 18,7 μήνες vs 9,7 μήνες, $p=0.009$, Breslow test). Στην περίπτωση του TTP, η χαμηλή πρωτεϊνική έκφραση του ERCC1 έδειξε μία ισχυρή τάση να συσχετιστεί με καθυστερημένη υποτροπή (TTP= 5,3 μήνες vs 3,2 μήνες, $p=0.051$, Breslow test). Επίσης, όταν ο συνολικός πληθυσμός χωρίστηκε σε τριτημόρια, η σημαντικότητα της πρωτεϊνικής έκφρασης ERCC1 στην επιβίωση των ασθενών ισχυροποιήθηκε. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με χαμηλή πρωτεϊνική έκφραση ERCC1 επιβίωσαν για μεγαλύτερο χρόνο και υποτροπίασαν αργότερα σε σύγκριση με τους ασθενείς μεσαίας ή υψηλής έκφρασης (βλ. Κεφ. 6.8, Πίνακας 48, Εικόνες 43, 44).

Από τους υπόλοιπους παράγοντες στο σύνολο του πληθυσμού, μόνον η γονιδιακή έκφραση της MZF1 φάνηκε να έχει κάποια επίδραση στη συνολική επιβίωση των ασθενών, αλλά μόνο συνδυαζόμενη με τη γονιδιακή ή πρωτεϊνική έκφραση ERCC1 (βλ. Κεφ. 6.8, Πίνακας 49). Συγκεκριμένα, οι ασθενείς που ανήκουν στην κατηγορία χαμηλής γονιδιακής ή πρωτεϊνικής έκφρασης ERCC1 και παράλληλα υψηλής γονιδιακής έκφρασης MZF1 εμφάνισαν σημαντικά καλύτερη συνολική επιβίωση (βλ. Κεφ. 6.8, Εικόνες 45, 46). Τα ευρήματα αυτά μπορούν να ερμηνευτούν από την υπάρχουσα θεωρία (βλ. Κεφ 3.3) μεταγραφικής ρύθμισης του ERCC1 από την MZF1, αλλά και από τον γενικότερο μεταγραφικά ανασταλτικό ρόλο της υπερέκφρασης της MZF1 στα προγονικά κύτταρα της αιμοποίησης γεγονός που θα μπορούσε

ενδεχομένως να συμβάλει στη μειωμένη αιμάτωση και διασπορά των όγκων (βλ. Κεφ 2.4).

Στο ερώτημα της παρούσας μελέτης, κατά πόσον υπάρχει κάποια αλληλεπίδραση ή ρύθμιση της έκφρασης μεταξύ των υπό μελέτη μοριακών παραγόντων, τα αποτελέσματα στον συνολικό πληθυσμό δεν ήταν ικανοποιητικά, καθώς δεν βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των πέντε παραγόντων (βλ. Κεφ. 6.4, Πίνακας 38). Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση πως δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση ούτε μεταξύ της πρωτεϊνικής και της mRNA έκφρασης του ERCC1 στον πληθυσμό της παρούσας μελέτης. Γεγονός που συνηγορεί υπέρ μιας μετα-μεταγραφικής ρύθμισης του ERCC1, αλλήθι θέτει πλέον σοβαρά το ερώτημα που προαναφέρθηκε στο γενικό μέρος, δηλαδή «ποιο από τα δύο θα μπορούσε να μας καθοδηγήσει στην ανάπτυξη της φαρμακογενωμικής του ERCC1 στην πλάτινα; και τελικά ποιο από τα δύο είναι προτιμότερο να μετράμε στις ερευνητικές μας μελέτες;».

Οι Britten RA και συν. είχαν μελετήσει την έκφραση του ERCC1 -τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης- σε κυτταρικές σειρές καρκίνου ωοθηκών με τις τεχνικές Northern and Western blotting. Από τα αποτελέσματά τους παρατήρησαν ότι μόνο η έκφραση του ERCC1 σε επίπεδο mRNA (και όχι σε επίπεδο πρωτεΐνης) συσχετίστηκε με την ανταπόκριση στην πλάτινα στα συγκεκριμένα κύτταρα ($p=0.011$)²⁷⁰. Οι συγγραφείς αναφέρουν τις αμφιβολίες τους σχετικά με το κατά πόσον είναι λογική η συσχέτιση αυτή μόνο σε επίπεδο mRNA ή αν πρόκειται τελικά για ένα «επιφανόμενο», δηλαδή τα επίπεδα ERCC1 mRNA να είναι ένας βοηθητικός δείκτης για κάποιον άλλο καθοριστικό παράγοντα/βιοδείκτη της απόκρισης στη θεραπεία που πιθανόν να επηρεάζεται από το ERCC1. Αντίστοιχα, οι Deloia JA και συν. μελέτησαν την πρωτεϊνική και mRNA έκφραση του ERCC1 σε δείγματα όγκων από 41 γυναίκες με καρκίνο των ωοθηκών. Και σε αυτή τη μελέτη δεν αναδείχθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης πρωτεΐνης & mRNA, ενώ παράλληλα μόνο η χαμηλή mRNA έκφραση και όχι η πρωτεϊνική συσχετίστηκε με καλύτερη επιβίωση³⁸³. Και σε αυτή την περίπτωση ωστόσο, οι συγγραφείς ανέφεραν το ενδεχόμενο του «επιφανομένου» και συγκεκριμένα την ενεργοποίηση του RAS που μπορεί εν μέρει να ρυθμίζει και τα επίπεδα ERCC1 mRNA. Η σχέση πρωτεϊνικής και mRNA έκφρασης του ERCC1 μελετήθηκε και από τους Hao D και συν. σε ασθενείς με πλάκωδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου (HNSCC). Ούτε σε αυτή τη μελέτη βρέθηκε κάποια θετική συσχέτιση μεταξύ πρωτεΐνης και mRNA³⁸⁴. Ωστόσο, σε αυτή τη μελέτη τα επίπεδα της ERCC1 πρωτεΐνης και όχι του mRNA παρουσίασαν προγνωστική αξία.

Στον ΜΜΚΠ η σχέση μεταξύ ERCC1 πρωτεΐνης και mRNA ερευνήθηκε από τους Tepeli E και συν. και δεν βρέθηκε καμία θετική συσχέτιση μεταξύ τους³⁸⁵. Αντιθέτως, οι Friboulet L και συν. ερευνώντας τις διαφορές στο μοριακό προφίλ ERCC1 θετικών vs ERCC1 αρνητικών όγκων κατάφεραν να βρουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ πρωτεΐνης και mRNA στους όγκους από 91 ασθενείς με ΜΜΚΠ αρχικού σταδίου (στάδια I-III) μετά από πλήρη εξαίρεση του όγκου. Η ανάλυση της πρωτεϊνικής έκφρασης έγινε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας, και η ανάλυση του mRNA με την RTqPCR παρότι δεν χρησιμοποίησαν την τεχνική του microdissection για να απομονώσουν τα καρκινικά κύτταρα σε αυτή τη μελέτη. Ωστόσο, ανέφεραν

πως υπήρχε ένας σημαντικός αριθμός δειγμάτων (32-33%) με μεγάλες αποκλίσεις μεταξύ πρωτεϊνικής και mRNA έκφρασης και πρότειναν ότι αυτό μπορεί να οφείλεται στην έκφραση miRNA (miR-409-3p) που μεταβάλλουν την πρωτεϊνική έκφραση ακόμα και στις περιπτώσεις υψηλής mRNA έκφρασης. Επίσης, η πρωτεϊνική έκφραση του ERCC1 δεν φάνηκε να έχει καμία προγνωστική αξία σε αυτή τη μελέτη³⁸⁶.

Συνοψίζοντας τα βιβλιογραφικά δεδομένα στον ΜΜΚΠ, μπορούμε να πούμε ότι από το 2006 πολλές μελέτες από διάφορα ερευνητικά κέντρα ερευνήσαν την πιθανότητα του ERCC1 ως προβλεπτικό ή προγνωστικό παράγοντα. Τα αποτελέσματά τους όσον αφορά την εμπλοκή του ERCC1 και στην ανταπόκριση στην πλατινούχα χημειοθεραπεία (RR), και στον συνολικό χρόνο επιβίωσης (OS), και στον χρόνο επιβίωσης ελεύθερο εξέλιξης της ασθένειας (PFS), δεν ήταν πάντα σύμφωνα μεταξύ τους. Άλλες έρευνες έβρισκαν σαφή συσχέτιση μόνο ανάμεσα στην ERCC1 έκφραση και την ανταπόκριση³⁰⁷, οι περισσότερες μόνο με την επιβίωση^{317,318,319,320,321,322,387,323,325}, κάποιες και με τα δύο, ενώ υπήρξαν και μερικές μεμονωμένες μελέτες που δεν υποστήριξαν την ύπαρξη οποιασδήποτε συσχέτισης φαρμακογενωμικής βάσης του ERCC1 στον ΜΜΚΠ^{315,324,388}.

Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να οφείλεται και σε αρκετά τεχνικά και πρακτικά εμπόδια όσον αφορά τη διεξαγωγή των μελετών. Ο αριθμός των ασθενών συνήθως ήταν περιορισμένος³⁸⁹. Υπήρχαν μελέτες που περιελάμβαναν ασθενείς διαφόρων σταδίων, ενώ γνωρίζουμε πως υπάρχει διαφορετική θεραπευτική αντιμετώπιση και προσδόκιμο επιβίωσης σε προχωρημένα vs πρώιμα στάδια της νόσου. Σε κάποιες μελέτες τα δείγματα αφορούσαν περιορισμένο βιοψιακό υλικό που ενδεχομένως να μην ήταν αντιπροσωπευτικό της μοριακής βάσης όλου του όγκου. Άλλες μελέτες χρησιμοποίησαν υλικά μόνο από τον πρωτοπαθή όγκο, ενώ άλλες και από τον πρωτοπαθή και από μεταστάσεις, ενώ υπάρχουν στη βιβλιογραφία διαφορετικές απόψεις για το εάν η βιολογία της μετάστασης παραμένει η ίδια με του πρωτοπαθούς^{378,382}. Άλλες μελέτες αξιολόγησαν την πρωτεϊνική έκφραση του ERCC1 και άλλες την mRNA έκφραση με διαφορετικές τεχνικές μεθόδους, αλλιώς και διαφορετικές μεθόδους αξιολόγησης, καθώς και διαφορετικά σημεία cut off.

Η ανοσοϊστοχημεία για την αξιολόγηση της πρωτεϊνικής έκφρασης είναι μια εύκολη, σταθερή, γρήγορη, οικονομική και αποτελεσματική μέθοδος. Επιπλέον ανιχνεύοντας την έκφραση της πρωτεΐνης, αξιολογείται η πραγματική λειτουργικότητα του ERCC1 στον μηχανισμό NER, καθώς το mRNA μπορεί να επηρεάζεται από διαδικασίες όπως εναλλακτικό μάτισμα, παρεμβολή microRNAs, πολυμορφισμούς που να μεταβάλλουν τη μετάφραση του mRNA ή τη δράση της πρωτεΐνης³¹⁵ κλπ. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί ζητήματα ως προς την αξιοπιστία της μεθόδου, καθώς η ανοσοϊστοχημεία περιορίζεται από την ευαισθησία και ειδικότητα του κάθε αντισώματος, αλλιώς και την εμπειρία και υποκειμενικότητα του παρατηρητή κατά την αξιολόγηση. Επίσης, τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας μπορεί εύκολα να μεταβληθούν αλλιάζοντας τα σημεία cut off του πληθυσμού. Επομένως, είναι απαραίτητη μια κοινή εφαρμοζόμενη μέθοδος αξιολόγησης της ανοσοϊστοχημείας, καθώς και σωστά επικυρωμένα αντισώματα για την ορθότερη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των διαφόρων μελετών³⁹⁰. Στην παρούσα

μελέτη χρησιμοποιήθηκε ταυτόσημη μέθοδος αξιολόγησης με εκείνην που χρησιμοποιήθηκε στη μεγαλύτερη σε πληθυσμό έως τώρα μελέτη που διερεύνησε γενικότερα τον ρόλο της πρωτεϊνικής ERCC1 έκφρασης στην παγκόσμια βιβλιογραφία³⁰⁴.

Παρομοίως η Real Time PCR, ως τεχνική είναι πιο χρονοβόρα, πολύπλοκη και απαιτεί ιδιαίτερα σταθερές συνθήκες και προτυποποιήσεις. Ωστόσο, ακόμα κι αν όλες οι συνθήκες πληρούν τους απαραίτητους κανόνες, τα διαφορετικά μηχανήματα, οι διαφορετικοί εκκινητές/ιχνητές, τα διαφορετικά γονίδια αναφοράς και κυρίως οι διαφορετικές μέθοδοι συντήρησης των ιστικών δειγμάτων μπορούν να επηρεάσουν άμεσα και να διαφοροποιήσουν σημαντικά τα αποτελέσματα.

Επίσης, ένα σημαντικό μειονέκτημα της μέτρησης της mRNA έκφρασης είναι η «επιμόλυνση» του καρκινικού ιστού από στρωματικά κύτταρα (λευκοκύτταρα, ινοβλάστες, ενδοθηλιακά) που επίσης έχουν βρεθεί πως εκφράζουν το ERCC1 και επομένως μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά την προγνωστική δύναμη της έκφρασης του ERCC1 mRNA σε κλινικό υλικό^{270,315}. Αυτό μπορεί να αποφευχθεί σε ένα βαθμό με τη χρήση του microdissection, όπως κάναμε στη μελέτη μας, αλλιώς σίγουρα δεν μπορεί να αποκλειστεί τελείως μια τέτοια «επιμόλυνση».

Αρκετές φορές έχει επισημανθεί η ανάγκη για την επίλυση όλων αυτών των σημαντικών τεχνικών θεμάτων που αφορούν την τυποποίηση και τη βελτιστοποίηση των εργαστηριακών διαδικασιών για την ανάλυση του ERCC1 -και όχι μόνο- σε δείγματα όγκων, ώστε αυτή η μεθοδολογία να μπορεί να εφαρμοστεί στην καθημερινή κλινική πρακτική³⁹¹ και τα αποτελέσματα μεταξύ των διαφόρων μελετών να είναι καλύτερα συγκρίσιμα με τελικό όφελος την καλύτερη κλινική αντιμετώπιση και επιβίωση των ογκολογικών ασθενών.

Το παρόν ερευνητικό έργο μελέτησε για πρώτη φορά την έκφραση και των 5 μοριακών παραγόντων (ERCC1 mRNA, MZF1 mRNA, XPA mRNA, XPF mRNA, ERCC1 protein) στον προχωρημένου σταδίου ΜΜΚΠ. Παρά ταύτα, τα αποτελέσματά θα πρέπει να ερμηνευτούν με προσοχή, δεδομένου πως πρόκειται για μια αναδρομική, μη τυχαιοποιημένη μελέτη, με αρκετούς περιορισμούς, όπως: i) τον σχετικά μικρό αριθμό ασθενών (N = 94), ii), το διαφορετικό στάδιο νόσου των ασθενών (III vs IV), iii) τα διαφορετικά χημειοθεραπευτικά σχήματα με βάση την πλατίνα στα οποία υπεβλήθησαν οι ασθενείς, και iv) το διαφορετικό είδος των δειγμάτων όγκου τα οποία ελήφθησαν είτε με χειρουργική επέμβαση είτε με βιοψία, είτε από την πρωτοπαθή είτε από την μεταστατική εστία.

Εν κατακλείδι, η πρωτεϊνική έκφραση ERCC1 ως προγνωστικός και προβλεπτικός μοριακός δείκτης φαίνεται να έχει αξία στο ευρύ πεδίο της αντιμετώπισης και θεραπείας του ΜΜΚΠ. Αντιθέτως, η γονιδιακή έκφραση των ERCC1, MZF1, XPA, XPF απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Μελλοντικές προοπτικές, καλά σχεδιασμένες, δοκιμές, με επαρκή αριθμό ασθενών, σαφώς καθορισμένες ομάδες με αναλυτικά κλινικά δεδομένα, που θα χρησιμοποιούν επιστημονικά και τεχνικά επικυρωμένες και τυποποιημένες μεθόδους, καθώς και λεπτομερή κριτήρια αξιολόγησης θα διαλευκάνουν το τοπίο και θα επικυρώσουν τη χρησιμότητα ή μη αυτών των μοριακών παραγόντων στη θεραπευτική στρατηγική των ασθενών με ΜΜΚΠ.

Συμπεράσματα

Συνοπτικά, από την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

1. Επιβεβαιώνεται στον πληθυσμό μας πως η λειτουργική κατάσταση (PS) είναι ένας βασικός προγνωστικός και προβλεπτικός παράγοντας στους ασθενείς με ΜΜΚΠ, όπως έχει αναφερθεί στην παγκόσμια βιβλιογραφία.
2. Το είδος της ΧΜΘ ανάμεσα στα πλατινούχα παράγωγα δεν επιβεβαιώνεται σαφώς στην παρούσα μελέτη ότι παίζει κάποιον ρόλο στη διαφορετική κλινική πορεία των ασθενών.
3. Η ERCC1 πρωτεΐνη φαίνεται να αποτελεί προγνωστικό και προβλεπτικό μοριακό παράγοντα στο σύνολο του πληθυσμού της παρούσας μελέτης.
4. Η πρωτεϊνική έκφραση ERCC1 φαίνεται να επηρεάζεται σαφώς από τον ιστολογικό υπότυπο του ΜΜΚΠ, με τα πλακώδη καρκινώματα να εμφανίζουν υψηλότερη έκφραση.
5. Η πρωτεϊνική έκφραση ERCC1 φαίνεται να επηρεάζεται από την εντόπιση του όγκου με τις μεταστατικές εστίες να εμφανίζουν σαφώς υψηλότερη έκφραση σε σχέση τους πρωτοπαθείς όγκους.
6. Καμία σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ της έκφρασης των ERCC1, MZF1, XPA, XPF δεν επιβεβαιώθηκε ξεκάθαρα.
7. Καμία σημαντική συσχέτιση δεν βρέθηκε ανάμεσα στην πρωτεϊνική και την mRNA έκφραση του ERCC1.
8. Η πρωτεϊνική έκφραση ERCC1 φαίνεται να έχει μια τάση θετικής συσχέτισης στον έλεγχο της νόσου αλλά όχι στην αντικειμενική ανταπόκριση στη ΧΜΘ.
9. Η έκφραση του γονιδίου MZF1 φαίνεται να είναι διαφορετική με την πάροδο της ηλικίας, πιθανώς λόγω του εκφυλισμού των τελομερών, και αυτό ενδεχομένως να παίζει κάποιο ρόλο στην εμφάνιση και πορεία της κακοήθους νόσου.
10. Η γονιδιακή έκφραση MZF1 μπορεί να έχει κάποιον προβλεπτικό ρόλο, αλλά μόνο συνδυαζόμενη με τη γονιδιακή ή πρωτεϊνική έκφραση ERCC1.

A	Αδενίνη
ADC	Αδενοκαρκίνωμα (Adenocarcinoma)
AIS	Adenocarcinoma In Situ
BAC	Βρογχοκυψελιδικό Καρκίνωμα (Bronchioloalveolar Carcinoma)
bp	Ζεύγη Βάσεων (Base Pairs)
CDDP	Σισπλατίνη
cDNA	συμπληρωματικό DNA (complementary DNA)
CLs	cross-links
CR	Πλήρης Ανταπόκριση (Complete Response)
CS	Σύνδρομο Cockayne's (Cockayne's syndrome)
CT	Αξονική Τομογραφία (Computed Tomography)
Ct	Οριακός Κύκλος (Cycle Threshold)
DCR	Ποσοστό Ελέγχου της Νόσου (Disease Control Rate)
DFS	Χρόνος που μεσολαμβάνει για την Εξέλιξη της Νόσου (Disease Free Survival)
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό Οξύ
EGFR	Υποδοχέας του Επιδερμικού Αυξητικού Παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor)
ERCC1	Excision Repair Cross Complementing-1
FFPE	Ιστοί μονιμοποιημένοι σε φορμόλη και εγκλεισμένοι σε παραφίνη (Formalin Fixed Parafin Embedded tissue)
FU	Χρόνος Παρακολούθησης (Follow up)
G	Γουανίνη
Gem	Γεμισταμπίνη
GG-NER	Global Genome NER
HCC	Ηπατοκυτταρικό Καρκίνωμα (Hepatocellular Carcinoma)
HNSCC	Πλακώδες Καρκίνωμα Κεφαλής & Τραχήλου (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma)
LCC	Καρκίνωμα εκ Μεγάλων Κυττάρων (Large Cell Carcinoma)
LCM	Μικροτομή με λέιζερ (Laser Capture Microdissection)
MIA	Ελάχιστα Επεμβατικό Αδενοκαρκίνωμα (Minimally Invasive Adenocarcinoma)
MR	Μαγνητική Τομογραφία (Magnetic Resonance)
mRNA	Αγγελιοφόρο RNA (messenger RNA)
MVD	Πυκνότητα Μικροαγγείων (Microvessel Density)
MZF1	Myeloid Zinc Finger 1
NER	Μηχανισμός Επιδιόρθωσης Νουκλεοτιδικών Βλαβών (Nucleotide Excision Repair)
NSCLC	Μη Μικροκυτταρικός Καρκίνος του Πνεύμονα (Non Small Cell Lung Cancer)

ORR	Αντικειμενικός Ρυθμός Ανταπόκρισης (<i>Objective Response Rate</i>)
OS	Συνολική Επιβίωση (<i>Overall Survival</i>)
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PD	Επιδείνωση ή Πρόοδος της Νόσου (<i>Progressive Disease</i>)
PFS	Χρόνος Επιβίωσης Ελεύθερος Εξέλιξης Της Ασθένειας (<i>Progression-Free Survival Time</i>)
PR	Μερική Ανταπόκριση (<i>Partial Response</i>)
PS	Δείκτης Λειτουργικής Κατάστασης Ασθενούς (<i>Performance Status</i>)
RECIST	Κριτήρια Αξιολόγησης της Ανταπόκρισης σε Συμπαγείς Ογκούς (<i>Response Evaluation Criteria in Solid Tumors</i>)
RFC	<i>Replication Factor C</i>
RFS	Επιβίωση Ελεύθερη Υποτροπής (<i>Relapse Free Survival</i>)
RNA	Ριβονουκλεϊκό Οξύ
RPA	<i>Replication Protein A</i>
rpm	στροφές ανά λεπτό (<i>rounds per minute</i>)
RR	Αντικειμενικό ποσοστό ανταπόκρισης (<i>Response Rate</i>)
rt-PCR	Αντίστροφη Μεταγραφή του RNA (<i>reverse transcription PCR</i>)
RTqPCR	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (<i>Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
SCC	Καρκίνωμα εκ πλάκωδών Κυττάρων (<i>Squamous Cell Carcinoma</i>)
SCLC	Μικροκυτταρικός Καρκίνος του Πνεύμονα (<i>Small Cell Lung Cancer</i>)
SD	Σταθερή Νόσος (<i>Stable Disease</i>)
TC-NER	<i>Transcription Coupled NER</i>
TFIIH	Μεταγραφικός Παράγοντας IIIH (<i>Transcriptor Factor IIIH</i>)
TNM	Σύστημα Σταδιοποίησης TNM (<i>Tumor-Node-Metastasis</i>)
TTD	Τριχοθειοδυστροφία (<i>Trichothiodystrophy</i>)
TTP	Χρόνος που μεσολαβεί για την Εξέλιξη της Νόσου (<i>Time to Tumor Progression</i>)
TS	Θυμιδυλική Συνθάση
UTR	μη μεταφραζόμενη περιοχή (<i>untranslated region</i>)
VEGF	Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντας (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
WHO	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (<i>World Health Organization</i>)
XP	Μελαγχρωματική Ξηροδερμία (<i>Xeroderma Pigmentosum</i>)
XPA	<i>Xeroderma Pigmentosum A</i>
XPB	<i>Xeroderma Pigmentosum B</i>
XPC	<i>Xeroderma Pigmentosum C</i>
XPD	<i>Xeroderma Pigmentosum D</i>
XPF	<i>Xeroderma Pigmentosum F</i>
XPG	<i>Xeroderma Pigmentosum G</i>
β/ο	βάρος κατ' όγκον (<i>mass/volume, m/v</i>)
γρ	γραμμάρια
ΚΠ	Καρκίνος του Πνεύμονα
ΜΜΚΠ	Μη Μικροκυτταρικός Καρκίνος του Πνεύμονα
ο/ο	όγκος κατ' όγκον (<i>volume/volume, v/v</i>)
ΠΟΥ	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (<i>World Health Organization</i>)
ΧΜΘ	Χημειοθεραπεία

BIBLIOGRAFIA

1. Willis RA. Pathology of Tumors. 3rd ed. London: Butterworth & Co.; 1960.
2. Okada F. Inflammation-related carcinogenesis: current findings in epidemiological trends, causes and mechanisms. *Yonago Acta Med.* 2014;57(2):65-72.
3. Wistuba II, Berry J, Behrens C, et al. Molecular changes in the bronchial epithelium of patients with small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2000;6(7):2604-10.
4. Global Cancer Facts & Figures.; 2008. Available at: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiology-surveillance/documents/document/acspc-027766.pdf>.
5. Langevin SM, Kratzke RA, Kelsey KT. Epigenetics of lung cancer. *Transl. Res.* 2014.
6. Cancer Statistics 2014.; 2014.
7. Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2013. *Ann. Oncol.* 2013;24(3):792-800.
8. Alberg AJ, Brock M V, 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-29S.
9. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* 61(2):69-90. doi:10.3322/caac.20107.
10. Youlden DR, Cramb SM, Baade PD. The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends. *J. Thorac. Oncol.* 2008;3(8):819-31.
11. Hubaux R, Becker-Santos DD, Enfield KSS, Lam S, Lam WL, Martinez VD. Arsenic, asbestos and radon: emerging players in lung tumorigenesis. *Environ. Health* 2012;11:89.
12. Field RW, Withers BL. Occupational and environmental causes of lung cancer. *Clin. Chest Med.* 2012;33(4):681-703.
13. Algranti E, Buschinelli JTP, De Capitani EM. Occupational lung cancer. *J. Bras. Pneumol. publicação o Of. da Soc. Bras. Pneumol. e Tisiologia* 36(6):784-94.
14. de Groot P, Munden RF. Lung cancer epidemiology, risk factors, and prevention. *Radiol. Clin. North Am.* 2012;50(5):863-76.
15. Pope CA, Burnett RT, Thun MJ, et al. Lung cancer, cardiovascular mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002;287(9):1132-41.
16. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, 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.
17. Chen BH, Hong CJ, Pandey MR, Smith KR. Indoor air pollution in developing countries. *World Health Stat. Q.* 1990;43(3):127-38.
18. Hosgood HD, Boffetta P, Greenland S, et al. In-home coal and wood use and lung cancer risk: a pooled analysis of the International Lung Cancer Consortium. *Environ. Health Perspect.* 2010;118(12):1743-7.
19. Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin. Chest Med.* 2011;32(4):605-44.
20. Romano CA. Radon: implications for the health professional. *J. Am. Acad. Nurse Pract.* 2(1):24-8.
21. National Research Council (US) Committee on Health Risks of Exposure to Radon. Health Effects of Exposure to Radon. National Academies Press (US); 1999.
22. Hornung RW. Health effects in underground uranium miners. *Occup. Med.* 16(2):331-44.
23. Polpong P, Bovornkitti S. Indoor radon. *J. Med. Assoc. Thai.* 1998;81(1):47-57.
24. Krewski D, Lubin JH, Zielinski JM, et al. Residential radon and risk of lung cancer: a combined analysis of 7 North American case-control studies. *Epidemiology* 2005;16(2):137-45.
25. Darby S, Hill D, Auvinen A, 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.
26. Ruano-Ravina A, Figueiras A, Freire-Garabal M, Barros-Dios JM. Antioxidant vitamins and risk of lung cancer. *Curr. Pharm. Des.* 2006;12(5):599-613.
27. Freudenheim JL, Ritz J, Smith-Warner SA, et al. Alcohol consumption and risk of lung cancer: a pooled analysis of cohort studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005;82(3):657-67.
28. Lee I-M. Physical activity and cancer prevention--data from epidemiologic studies. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2003;35(11):1823-7.
29. Tardon A, Lee WJ, Delgado-Rodriguez M, et al. Leisure-time physical activity and lung cancer: a meta-analysis. *Cancer Causes Control* 2005;16(4):389-97.
30. Alfano CM, Klesges RC, Murray DM, et al. Physical activity in relation to all-site and lung cancer incidence and mortality in current and former smokers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2004;13(12):2233-41.
31. Marshall AL, Christiani DC. Genetic susceptibility to lung cancer--light at the end of the tunnel? *Carcinogenesis* 2013;34(3):487-502.
32. Lissowska J, Foretova L, Dabek J, et al. Family history and lung cancer risk: international multicentre case-control study in Eastern and Central Europe and meta-analyses. *Cancer Causes Control* 2010;21(7):1091-104.
33. Gomes M, Teixeira AL, Coelho A, Araújo A, Medeiros R. The role of inflammation in lung cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014;816:1-23.
34. Brenner DR, Boffetta P, Duell EJ, et al. Previous lung diseases and lung cancer risk: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium. *Am. J. Epidemiol.* 2012;176(7):573-85.
35. Li C, Wang L-E, Wei Q. DNA repair phenotype and

- cancer susceptibility--a mini review. *Int. J. Cancer* 2009;124(5):999-1007.
36. Spitz MR, Wei Q, Dong Q, Amos CI, Wu X. Genetic susceptibility to lung cancer: the role of DNA damage and repair. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2003;12(8):689-98.
 37. Wei Q, Cheng L, Hong WK, Spitz MR. Reduced DNA repair capacity in lung cancer patients. *Cancer Res.* 1996;56(18):4103-7.
 38. Wei Q, Cheng L, Amos CI, et al. Repair of tobacco carcinogen-induced DNA adducts and lung cancer risk: a molecular epidemiologic study. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000;92(21):1764-72.
 39. Friedberg EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2001;1(1):22-33.
 40. Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, Harris CC. *Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart (IARC WHO Classification of Tumours)*. 1 edition. World Health Organization; 2004.
 41. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. Lung cancer: diagnosis and management. *Am. Fam. Physician* 2007;75(1):56-63.
 42. 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.
 43. Travis WD. Pathology of lung cancer. *Clin. Chest Med.* 2011;32(4):669-92.
 44. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J. Thorac. Oncol.* 2011;6(2):244-85.
 45. Xu L, Tavora F, Battafarano R, Burke A. Adenocarcinomas with prominent lepidic spread: retrospective review applying new classification of the American Thoracic Society. *Am. J. Surg. Pathol.* 2012;36(2):273-82.
 46. Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, et al. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Mod. Pathol.* 2011;24(5):653-64.
 47. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. Diagnosis of lung adenocarcinoma in resected specimens: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2013;137(5):685-705.
 48. Travis WD, Brambilla E, Riely GJ. New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials. *J. Clin. Oncol.* 2013;31(8):992-1001.
 49. Russell PA, Wainer Z, Wright GM, Daniels M, Conron M, Williams RA. Does lung adenocarcinoma subtype predict patient survival?: A clinicopathologic study based on the new International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary lung adeno. *J. Thorac. Oncol.* 2011;6(9):1496-504.
 50. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, 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.
 51. Nikliński J, Niklińska W, Laudanski J, Chyczewska E, Chyczewski L. Prognostic molecular markers in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001;34 Suppl 2:S53-8.
 52. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest* 1997;111(6):1710-7.
 53. Goldstraw P. New staging system: how does it affect our practice? *J. Clin. Oncol.* 2013;31(8):984-91.
 54. Greene F, David P, Fleming I, et al., eds. *AJCC Cancer Staging Manual*. 6th editio. New York: Springer-Verlag; 2002.
 55. Tsim S, O'Dowd CA, Milroy R, Davidson S. Staging of non-small cell lung cancer (NSCLC): a review. *Respir. Med.* 2010;104(12):1767-74.
 56. Carson J, Finley DJ. Lung cancer staging: an overview of the new staging system and implications for radiographic clinical staging. *Semin. Roentgenol.* 2011;46(3):187-93.
 57. Mountain CF, Carr DT, Anderson WA. A system for the clinical staging of lung cancer. *Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med.* 1974;120(1):130-8.
 58. Mountain CF. A new international staging system for lung cancer. *Chest* 1986;89(4 Suppl):225S-233S.
 59. Mountain CF. Staging classification of lung cancer. A critical evaluation. *Clin. Chest Med.* 2002;23(1):103-21.
 60. Groome PA, Bolejack V, Crowley JJ, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *J. Thorac. Oncol.* 2007;2(8):694-705.
 61. Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT. The new lung cancer staging system. *Chest* 2009;136(1):260-71.
 62. Rami-Porta R, Ball D, Crowley J, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the T descriptors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 2007;2(7):593-602.
 63. Detterbeck FC, Postmus PE, Tanoue LT. The stage classification 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):e191S-210S.
 64. Rusch VW, Asamura H, Watanabe H, Giroux DJ, Rami-Porta R, Goldstraw P. The IASLC lung cancer staging project: a proposal for a new international lymph node map in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 2009;4(5):568-77.
 65. Postmus PE, Brambilla E, Chansky K, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for revision of the M descriptors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 2007;2(8):686-93.
 66. Marshall HM, Leong SC, Bowman R V, Yang IA, Fong KM. The science behind the 7th edition Tumour, Node, Me-

- tastasis staging system for lung cancer. *Respirology* 2012;17(2):247-60.
67. Chheang S, Brown K. Lung cancer staging: clinical and radiologic perspectives. *Semin. Intervent. Radiol.* 2013;30(2):99-113.
 68. Vansteenkiste J, De Ruysscher D, Eberhardt WEE, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2013;24 Suppl 6:vi89-98.
 69. Weiss GJ, Bunn PA, Camidge DR. From radiotherapy to Targeted therapy: 20 years in the management of non-small-cell lung cancer. *Oncology (Williston Park).* 2006;20(12):1515-24; discussion 1524-5, 1530, 1535.
 70. Kates M, Swanson S, Wisnivesky JP. Survival following lobectomy and limited resection for the treatment of stage I non-small cell lung cancer <=1 cm in size: a review of SEER data. *Chest* 2011;139(3):491-6.
 71. Pirker R. Adjuvant chemotherapy of non-small cell lung cancer. *Tanaffos* 2012;11(1):12-7.
 72. Vansteenkiste J, Crin  L, Dooms C, et al. 2nd ESMO Consensus Conference on Lung Cancer: early-stage non-small-cell lung cancer consensus on diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2014;25(8):1462-74.
 73. Howington JA, Blum MG, Chang AC, Balekian AA, Murthy SC. Treatment of stage I and II non-small cell 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):e278S-313S.
 74. Pignon J-P, Tribodet H, Scagliotti G V, et al. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J. Clin. Oncol.* 2008;26(21):3552-9.
 75. McElnay P, Lim E. Adjuvant or neoadjuvant chemotherapy for NSCLC. *J. Thorac. Dis.* 2014;6 Suppl 2:S224-7. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2014.04.26.
 76. Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon J-P, Vansteenkiste J. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2004;350(4):351-60.
 77. Arriagada R, Auperin A, Burdett S, et al. Adjuvant chemotherapy, with or without postoperative radiotherapy, in operable non-small-cell lung cancer: two meta-analyses of individual patient data. *Lancet* 2010;375(9722):1267-77.
 78. Veeramachaneni NK, Feins RH, Stephenson BJK, Edwards LJ, Fernandez FG. Management of stage IIIA non-small cell lung cancer by thoracic surgeons in North America. *Ann. Thorac. Surg.* 2012;94(3):922-6; discussion 926-8.
 79. Scagliotti G V, Pastorino U, Vansteenkiste JF, et al. Randomized phase III study of surgery alone or surgery plus preoperative cisplatin and gemcitabine in stages IB to IIIA non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2012;30(2):172-8.
 80. Gilligan D, Nicolson M, Smith I, et al. Preoperative chemotherapy in patients with resectable non-small cell lung cancer: results of the MRC LU22/NVALT 2/EORTC 08012 multicentre randomised trial and update of systematic review. *Lancet* 2007;369(9577):1929-37.
 81. Hillinger S, Weder W. Extended surgical resection in stage III non-small cell lung cancer. *Front. Radiat. Ther. Oncol.* 2010;42:115-21.
 82. Ramnath N, Dilling TJ, Harris LJ, et al. Treatment of stage III non-small cell 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):e314S-40S.
 83. Atagi S, Kawahara M, Yokoyama A, et al. Thoracic radiotherapy with or without daily low-dose carboplatin in elderly patients with non-small-cell lung cancer: a randomised, controlled, phase 3 trial by the Japan Clinical Oncology Group (JCOG0301). *Lancet. Oncol.* 2012;13(7):671-8.
 84. D'Addario G, Felip E. Non-small-cell lung cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2009;20 Suppl 4:68-70.
 85. Sculier J-P, Meert A-P, Berghmans T. Updates in oncology. *Eur. Respir. Rev.* 2014;23(131):69-78.
 86. Delbaldo C, Michiels S, Syz N, Soria J-C, Le Chevalier T, Pignon J-P. Benefits of adding a drug to a single-agent or a 2-agent chemotherapy regimen in advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis. *JAMA* 2004;292(4):470-84.
 87. Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, et al. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1. *J. Clin. Oncol.* 2004;22(5):777-84.
 88. Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, et al. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2. *J. Clin. Oncol.* 2004;22(5):785-94.
 89. Herbst RS, Prager D, Hermann R, et al. TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2005;23(25):5892-9.
 90. Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2006;355(24):2542-50.
 91. Yang K, Wang Y-J, Chen X-R, Chen H-N. Effectiveness and safety of bevacizumab for unresectable non-small-cell lung cancer: a meta-analysis. *Clin. Drug Investig.* 2010;30(4):229-41.
 92. Tassinari D, Sartori S, Papi M, et al. Bevacizumab in the treatment of advanced, non-squamous non-small cell lung cancer: an evidence-based approach. *Oncology* 2011;80(5-6):350-8.
 93. Stinchcombe TE, Socinski MA. Current treatments for advanced stage non-small cell lung cancer. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2009;6(2):233-41.
 94. Johnson DH, Schiller JH, Bunn PA. Recent clinical advances in lung cancer management. *J. Clin. Oncol.* 2014;32(10):973-82.
 95. Kumar A, Wakelee H. Second- and third-line treatments in non-small cell lung cancer. *Curr. Treat. Options Oncol.* 2006;7(1):37-49.
 96. Bunn PA, Thatcher N. Systemic treatment for advanced

- (stage IIIb/IV) non-small cell lung cancer: more treatment options; more things to consider. Conclusion. *Oncologist* 2008;13 Suppl 1:37-46.
97. Hanna N, Shepherd FA, Fossella F V, et al. Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 2004;22(9):1589-97.
 98. Gebbia V. Does an optimal therapeutic sequence exist in advanced non-small cell lung cancer? *Expert Opin. Pharmacother.* 2008;9(8):1321-37.
 99. Bunn PA, Thatcher N. Systemic treatment for advanced (stage IIIb/IV) non-small cell lung cancer: more treatment options; more things to consider. Introduction. *Oncologist* 2008;13 Suppl 1:1-4.
 100. Thatcher N. First- and second-line treatment of advanced metastatic non-small-cell lung cancer: a global view. *BMC Proc.* 2008;2 Suppl 2:S3.
 101. Suehisa H, Toyooka S. Adjuvant chemotherapy for completely resected non-small-cell lung cancer. *Acta Med. Okayama* 2009;63(5):223-30.
 102. Zalcman G, Bergot E, Lechapt E. Update on nonsmall cell lung cancer. *Eur. Respir. Rev.* 2010;19(117):173-85.
 103. Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br. J. Cancer* 1993;67(6):1171-6.
 104. Andrews PA, Howell SB. Cellular pharmacology of cisplatin: perspectives on mechanisms of acquired resistance. *Cancer Cells* 1990;2(2):35-43.
 105. Reedijk J. Metal-Ligand Exchange Kinetics in Platinum and Ruthenium Complexes. *Platin. Met. Rev.* 2008;52(1):2-11.
 106. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* 2012;31(15):1869-83.
 107. Boulikas T, Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. [Review]. *Oncol. Rep.* 10(6):1663-82.
 108. Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell. Mol. Life Sci.* 2000;57(8-9):1229-35.
 109. Chvůlová K, Brabec V, Kaspůrková J. Mechanism of the formation of DNA-protein cross-links by antitumor cisplatin. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(6):1812-21.
 110. Boulikas T. Molecular mechanisms of cisplatin and its liposomally encapsulated form, Lipoplatin™. *Lipoplatin™ as a chemotherapy and antiangiogenesis drug.* *Cancer Ther.* 2007;5:351-376.
 111. Kartalou M, Essigmann JM. Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutat. Res.* 2001;478(1-2):1-21.
 112. Woźniak K, Walter Z. Induction of DNA-protein cross-links by platinum compounds. *Z. Naturforsch. C.* 55(9-10):731-6.
 113. Zwelling LA, Anderson T, Kohn KW. DNA-protein and DNA interstrand cross-linking by cis- and trans-platinum(II) diamminedichloride in L1210 mouse leukemia cells and relation to cytotoxicity. *Cancer Res.* 1979;39(2 Pt 1):365-9.
 114. Olinski R, Wedrychowski A, Schmidt WN, Briggs RC, Hnilica LS. In vivo DNA-protein cross-linking by cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res.* 1987;47(1):201-5.
 115. Eastman A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacol. Ther.* 1987;34(2):155-66.
 116. Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem. Rev.* 1999;99(9):2467-98.
 117. Boulikas T, Vougiouka M. Recent clinical trials using cisplatin, carboplatin and their combination chemotherapy drugs (review). *Oncol. Rep.* 2004;11(3):559-95.
 118. Tiseo M, Martelli O, Mancuso A, et al. Short hydration regimen and nephrotoxicity of intermediate to high-dose cisplatin-based chemotherapy for outpatient treatment in lung cancer and mesothelioma. *Tumori* 93(2):138-44.
 119. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 2007;7(8):573-84.
 120. Rajeswaran A, Trojan A, Burnand B, Giannelli M. Efficacy and side effects of cisplatin- and carboplatin-based doublet chemotherapeutic regimens versus non-platinum-based doublet chemotherapeutic regimens as first line treatment of metastatic non-small cell lung carcinoma: a systematic review of randomi. *Lung Cancer* 2008;59(1):1-11.
 121. Ardizzoni A, Boni L, Tiseo M, et al. Cisplatin- versus carboplatin-based chemotherapy in first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer: an individual patient data meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* 2007;99(11):847-57.
 122. Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat. Res.* 2001;478(1-2):23-43.
 123. Sekine I, Minna JD, Nishio K, Tamura T, Saijo N. A literature review of molecular markers predictive of clinical response to cytotoxic chemotherapy in patients with lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 2006;1(1):31-7.
 124. Brabec V, Kasparkova J. Modifications of DNA by platinum complexes. Relation to resistance of tumors to platinum antitumor drugs. *Drug Resist. Updat.* 2005;8(3):131-46.
 125. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003;22(47):7265-79.
 126. Perez RP. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur. J. Cancer* 1998;34(10):1535-42.
 127. Zeng-Rong N, Paterson J, Alpert L, Tsao MS, Viallet J, Alaoui-Jamali MA. Elevated DNA repair capacity is associated with intrinsic resistance of lung cancer to chemotherapy. *Cancer Res.* 1995;55(21):4760-4.
 128. Desoize B, Madoulet C. Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2002;42(3):317-25.
 129. Therasse P. Measuring the clinical response. What does it mean? *Eur. J. Cancer* 2002;38(14):1817-23.
 130. Diederich S, Engeser P, Junker K, et al. [Response judgement - conventional versus new methods]. *Onkologie* 2009;32 Suppl 1:9-17.
 131. Hazelton TR, Coppage L. Imaging for lung cancer restaging. *Semin. Roentgenol.* 2005;40(2):182-92.
 132. Eagan RT, Fleming TR, Schoonover V. Evaluation of response criteria in advanced lung cancer. *Cancer* 1979;44(3):1125-8.

133. Yaghai V, Miller FH, Rezai P, Benson AB, Salem R. Response to treatment series: part 2, tumor response assessment--using new and conventional criteria. *AJR. Am. J. Roentgenol.* 2011;197(1):18-27.
134. James K, Eisenhauer E, Christian M, et al. Measuring response in solid tumors: unidimensional versus bidimensional measurement. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999;91(6):523-8.
135. World Health Organisation. Handbook for Reporting Results of Cancer Treatment. Geneva [Switzerland]: World Health Organization Offset Publication no48; 1979.
136. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, 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. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000;92(3):205-16.
137. Suzuki C, Jacobsson H, Hatschek T, et al. Radiologic measurements of tumor response to treatment: practical approaches and limitations. *Radiographics* 28(2):329-44.
138. Warr D, McKinney S, Tannock I. Influence of measurement error on assessment of response to anticancer chemotherapy: proposal for new criteria of tumor response. *J. Clin. Oncol.* 1984;2(9):1040-6.
139. Park JO, Lee S II, Song SY, et al. Measuring response in solid tumors: comparison of RECIST and WHO response criteria. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2003;33(10):533-7.
140. Padhani AR, Ollivier L. The RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) criteria: implications for diagnostic radiologists. *Br. J. Radiol.* 2001;74(887):983-6.
141. Therasse P, Eisenhauer EA, Verweij J. RECIST revisited: a review of validation studies on tumour assessment. *Eur. J. Cancer* 2006;42(8):1031-9.
142. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur. J. Cancer* 2009;45(2):228-47.
143. Shanbhogue AKP, Karnad AB, Prasad SR. Tumor response evaluation in oncology: current update. *J. Comput. Assist. Tomogr.* 2010;34(4):479-84.
144. <http://www.recist.com/recist-in-practice/17.html>.
145. Tran LN, Brown MS, Goldin JG, et al. Comparison of treatment response classifications between unidimensional, bidimensional, and volumetric measurements of metastatic lung lesions on chest computed tomography. *Acad. Radiol.* 2004;11(12):1355-60.
146. Jaffe CC. Measures of response: RECIST, WHO, and new alternatives. *J. Clin. Oncol.* 2006;24(20):3245-51.
147. Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ. Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress. *Chest* 2002;122(3):1037-57.
148. Marijon H, Bouyon A, Vignot S, Besse B. [Prognostic and predictive factors in lung cancer]. *Bull. Cancer* 2009;96(4):391-404.
149. Albain KS, Crowley JJ, LeBlanc M, Livingston RB. Survival determinants in extensive-stage non-small-cell lung cancer: the Southwest Oncology Group experience. *J. Clin. Oncol.* 1991;9(9):1618-26.
150. Buccheri G, Ferrigno D. Prognostic factors in lung cancer: tables and comments. *Eur. Respir. J.* 1994;7(7):1350-64.
151. Buccheri G, Ferrigno D, Tamburini M. Karnofsky and ECOG performance status scoring in lung cancer: a prospective, longitudinal study of 536 patients from a single institution. *Eur. J. Cancer* 1996;32A(7):1135-41.
152. Lemonnier I, Guillemin F, Arveux P, et al. Quality of life after the initial treatments of non-small cell lung cancer: a persistent predictor for patients' survival. *Health Qual. Life Outcomes* 2014;12:73.
153. Socinski MA, Crowell R, Hensing TE, et al. Treatment of non-small cell lung cancer, stage IV: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007;132(3 Suppl):277S-289S.
154. Nakamura H, Ando K, Shinmyo T, et al. Female gender is an independent prognostic factor in non-small-cell lung cancer: a meta-analysis. *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2011;17(5):469-80.
155. Scagliotti G V, Longo M, Novello S. Nonsmall cell lung cancer in never smokers. *Curr. Opin. Oncol.* 2009;21(2):99-104.
156. Birim O, Kappetein AP, van Klaveren RJ, Bogers AJJC. Prognostic factors in non-small cell lung cancer surgery. *Eur. J. Surg. Oncol.* 2006;32(1):12-23.
157. Sun Z, Aubry M-C, Deschamps C, et al. Histologic grade is an independent prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer: an analysis of 5018 hospital- and 712 population-based cases. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2006;131(5):1014-20.
158. Koutsami MK, Gorgoulis VG, Kastrinakis NG, Asimacopoulos PJ, Kittas C. Prognostic factors in non-small cell lung carcinoma. *Anticancer Res.* 22(1A):347-74.
159. Salgia R. Prognostic significance of angiogenesis and angiogenic growth factors in nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2011;117(17):3889-99.
160. Giatromanolaki A. Prognostic role of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 21(6B):4373-82.
161. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin. Proc.* 2008;83(5):584-94.
162. Rossi A, Galetta D, Gridelli C. Biological prognostic and predictive factors in lung cancer. *Oncology* 2009;77 Suppl 1:90-6.
163. Danesi R, de Braud F, Fogli S, et al. Pharmacogenetics of anticancer drug sensitivity in non-small cell lung cancer. *Pharmacol. Rev.* 2003;55(1):57-103.
164. Lindahl T, Wood RD. Quality control by DNA repair. *Science* 1999;286(5446):1897-905.
165. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol. Pharmacol.* 2001;59(4):657-63.
166. Reardon JT, Vaisman A, Chaney SG, Sancar A. Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and Bis-aceto-amine-dichloro-cyclohexylamine-platinum(IV) [JM216] platinum intrastrand DNA diadducts. *Cancer Res.* 1999;59(16):3968-71.
167. Wood RD. Nucleotide excision repair in mammalian cells.

- J. Biol. Chem. 1997;272(38):23465-8.
168. Kemp MG, Gaddameedhi S, Choi J-H, Hu J, Sancar A. DNA repair synthesis and ligation affect the processing of excised oligonucleotides generated by human nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.* 2014;289(38):26574-83.
 169. Falik-Zaccai TC, Keren Z, Slor H. The versatile DNA nucleotide excision repair (NER) and its medical significance. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* 2009;7(2):37-42.
 170. Nospikel T. DNA repair in mammalian cells: Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009;66(6):994-1009.
 171. Gillet LCJ, Schärer OD. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem. Rev.* 2006;106(2):253-76.
 172. Simon GR, Ismail-Khan R, Bepler G. Nuclear excision repair-based personalized therapy for non-small cell lung cancer: from hypothesis to reality. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007;39(7-8):1318-28.
 173. Zamble DB, Mu D, Reardon JT, Sancar A, Lippard SJ. Repair of cisplatin--DNA adducts by the mammalian excision nuclease. *Biochemistry* 1996;35(31):10004-13.
 174. Leibeling D, Laspe P, Emmert S. Nucleotide excision repair and cancer. *J. Mol. Histol.* 2006;37(5-7):225-38.
 175. Cleaver JE. Common pathways for ultraviolet skin carcinogenesis in the repair and replication defective groups of xeroderma pigmentosum. *J. Dermatol. Sci.* 2000;23(1):1-11.
 176. Mareddy S, Reddy J, Babu S, Balan P. Xeroderma pigmentosum: man deprived of his right to light. *ScientificWorldJournal.* 2013;2013:534752.
 177. Nospikel T. Nucleotide excision repair and neurological diseases. *DNA Repair (Amst).* 2008;7(7):1155-67.
 178. Jaarsma D, van der Pluijm I, van der Horst GTJ, Hoeijmakers JHJ. Cockayne syndrome pathogenesis: lessons from mouse models. *Mech. Ageing Dev.* 134(5-6):180-95.
 179. de Boer J, Hoeijmakers JH. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 2000;21(3):453-60.
 180. Kraemer KH, Patronas NJ, Schiffmann R, Brooks BP, Tamura D, DiGiovanna JJ. Xeroderma pigmentosum, trichothiodystrophy and Cockayne syndrome: a complex genotype-phenotype relationship. *Neuroscience* 2007;145(4):1388-96.
 181. Sarasin A, Sary A. Human cancer and DNA repair-deficient diseases. *Cancer Detect. Prev.* 1997;21(5):406-11.
 182. Hoeijmakers JH. Nucleotide excision repair. II: From yeast to mammals. *Trends Genet.* 1993;9(6):211-7.
 183. Schärer OD. Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013;5(10):a012609.
 184. Martein JA, Lans H, Vermeulen W, Hoeijmakers JHJ. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014;15(7):465-81.
 185. van Cuijk L, Vermeulen W, Martein JA. Ubiquitin at work: The ubiquitous regulation of the damage recognition step of NER. *Exp. Cell Res.* 2014.
 186. Vermeulen W, Fousteri M. Mammalian transcription-coupled excision repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013;5(8):a012625.
 187. Dijk M, Typas D, Mullenders L, Pines A. Insight in the multi-level regulation of NER. *Exp. Cell Res.* 2014.
 188. Fagbemi AF, Orelli B, Schärer OD. Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst).* 2011;10(7):722-9.
 189. Fousteri M, Mullenders LHF. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res.* 2008;18(1):73-84.
 190. Liu L, Lee J, Zhou P. Navigating the nucleotide excision repair threshold. *J. Cell. Physiol.* 2010;224(3):585-9.
 191. Fan L, Arvai AS, Cooper PK, Iwai S, Hanaoka F, Tainer JA. Conserved XPB core structure and motifs for DNA unwinding: implications for pathway selection of transcription or excision repair. *Mol. Cell* 2006;22(1):27-37.
 192. Rudolf J, Rouillon C, Schwarz-Linek U, White MF. The helicase XPD unwinds bubble structures and is not stalled by DNA lesions removed by the nucleotide excision repair pathway. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(3):931-41.
 193. Oksenyshyn V, Coin F. The long unwinding road: XPB and XPD helicases in damaged DNA opening. *Cell Cycle* 2010;9(1):90-6.
 194. de Laat WL, Jaspers NG, Hoeijmakers JH. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 1999;13(7):768-85.
 195. Evans E, Moggs JG, Hwang JR, Egly JM, Wood RD. Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *EMBO J.* 1997;16(21):6559-73.
 196. de Laat WL, Appeldoorn E, Jaspers NG, Hoeijmakers JH. DNA structural elements required for ERCC1-XPF endonuclease activity. *J. Biol. Chem.* 1998;273(14):7835-42.
 197. Matsunaga T, Mu D, Park CH, Reardon JT, Sancar A. Human DNA repair excision nuclease. Analysis of the roles of the subunits involved in dual incisions by using anti-XPG and anti-ERCC1 antibodies. *J. Biol. Chem.* 1995;270(35):20862-9.
 198. Mu D, Hsu DS, Sancar A. Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease. *J. Biol. Chem.* 1996;271(14):8285-94.
 199. Staresincic L, Fagbemi AF, Enzlin JH, et al. Coordination of dual incision and repair synthesis in human nucleotide excision repair. *EMBO J.* 2009;28(8):1111-20.
 200. Kemp MG, Reardon JT, Lindsey-Boltz LA, Sancar A. Mechanism of release and fate of excised oligonucleotides during nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.* 2012;287(27):22889-99.
 201. Hu J, Choi J-H, Gaddameedhi S, Kemp MG, Reardon JT, Sancar A. Nucleotide excision repair in human cells: fate of the excised oligonucleotide carrying DNA damage in vivo. *J. Biol. Chem.* 2013;288(29):20918-26.
 202. Reardon JT, Sancar A. Nucleotide excision repair. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 2005;79:183-235.
 203. Shivji MK, Podust VN, Hübscher U, Wood RD. Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC, and RPA. *Biochemistry* 1995;34(15):5011-7.
 204. van Duin M, de Wit J, Odijk H, et al. Molecular characteriza-

- tion of the human excision repair gene ERCC-1: cDNA cloning and amino acid homology with the yeast DNA repair gene RAD10. *Cell* 1986;44(6):913-23.
205. Besse B, Olausson KA, Soria J-C. ERCC1 and RRM1: ready for prime time? *J. Clin. Oncol.* 2013;31(8):1050-60.
 206. GenBank. Homo sapiens excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 [includes overlapping antisense sequence] [ERCC1], RefSeqGene on chromosome 19, Reference Sequence: NG_015839.2, NCBI, NIH.
 207. Thompson LH. Properties and applications of human DNA repair genes. *Mutat. Res.* 1991;247(2):213-9.
 208. ERCC1. genecards.org.
 209. GenBank. Homo sapiens excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1), transcript variant 2, mRNA, Reference Sequence: NM_001983.3, NCBI, NIH.
 210. GenPept. DNA excision repair protein ERCC-1 isoform 2 [Homo sapiens], Reference Sequence: NP_001974.1, NCBI, NIH.
 211. Brookman KW, Lamerdin JE, Thelen MP, et al. ERCC4 (XPF) encodes a human nucleotide excision repair protein with eukaryotic recombination homologs. *Mol. Cell. Biol.* 1996;16(11):6553-62.
 212. ERCC4. genecards.org.
 213. Entrez. ERCC4 excision repair cross-complementation group 4 [Homo sapiens (human)], Gene ID: 2072, NCBI, NIH.
 214. GenPept. DNA repair endonuclease XPF [Homo sapiens], Reference Sequence: NP_005227.1, NCBI, NIH.
 215. GenBank. Homo sapiens excision repair cross-complementation group 4 (ERCC4), mRNA, Reference Sequence: NM_005236.2, NCBI, NIH.
 216. Tripsianes K, Folkers G, Ab E, et al. The structure of the human ERCC1/XPF interaction domains reveals a complementary role for the two proteins in nucleotide excision repair. *Structure* 2005;13(12):1849-58.
 217. McNeil EM, Melton DW. DNA repair endonuclease ERCC1-XPF as a novel therapeutic target to overcome chemoresistance in cancer therapy. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(20):9990-10004.
 218. Bunick CG, Chazin WJ. Two blades of the [ex]scissor. *Structure* 2005;13(12):1740-1.
 219. Park C-J, Choi B-S. The protein shuffle. Sequential interactions among components of the human nucleotide excision repair pathway. *FEBS J.* 2006;273(8):1600-8.
 220. Tsodikov O V, Enzlin JH, Schärer OD, Ellenberger T. Crystal structure and DNA binding functions of ERCC1, a subunit of the DNA structure-specific endonuclease XPF-ERCC1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102(32):11236-41.
 221. Volker M, Moné MJ, Karmakar P, et al. Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol. Cell* 2001;8(1):213-24.
 222. Entrez. XPA xeroderma pigmentosum, complementation group A [Homo sapiens (human)], Gene ID: 7507, NCBI, NIH.
 223. GenPept. DNA repair protein complementing XP-A cells [Homo sapiens], Reference Sequence: NP_000371.1, NCBI, NIH.
 224. Miyamoto I, Miura N, Niwa H, Miyazaki J, Tanaka K. Mutational analysis of the structure and function of the xeroderma pigmentosum group A complementing protein. Identification of essential domains for nuclear localization and DNA excision repair. *J. Biol. Chem.* 1992;267(17):12182-7.
 225. XPA. genecards.org.
 226. GenBank. Homo sapiens xeroderma pigmentosum, complementation group A (XPA), transcript variant 1, mRNA, Reference Sequence: NM_000380.3, NCBI, NIH.
 227. GenBank. Homo sapiens xeroderma pigmentosum, complementation group A (XPA), transcript variant 2, non-coding RNA, Reference Sequence: NR_027302.1, NCBI, NIH.
 228. Li L, Lu X, Peterson CA, Legerski RJ. An interaction between the DNA repair factor XPA and replication protein A appears essential for nucleotide excision repair. *Mol. Cell. Biol.* 1995;15(10):5396-402.
 229. Petrusheva IO, Evdokimov AN, Lavrik OI. Molecular mechanism of global genome nucleotide excision repair. *Acta Naturae* 2014;6(1):23-34.
 230. Croteau DL, Peng Y, Van Houten B. DNA repair gets physical: mapping an XPA-binding site on ERCC1. *DNA Repair (Amst.)* 2008;7(5):819-26.
 231. Entrez. MZF1 myeloid zinc finger 1 [Homo sapiens (human)] Gene ID: 7593, NCBI, NIH.
 232. Perotti D, Melotti P, Skorski T, Casella I, Peschle C, Calabretta B. Overexpression of the zinc finger protein MZF1 inhibits hematopoietic development from embryonic stem cells: correlation with negative regulation of CD34 and c-myc promoter activity. *Mol. Cell. Biol.* 1995;15(11):6075-87.
 233. Morris JF, Hromas R, Rauscher FJ. Characterization of the DNA-binding properties of the myeloid zinc finger protein MZF1: two independent DNA-binding domains recognize two DNA consensus sequences with a common G-rich core. *Mol. Cell. Biol.* 1994;14(3):1786-95.
 234. MZF1. genecards.com.
 235. Peterson MJ, Morris JF. Human myeloid zinc finger gene MZF produces multiple transcripts and encodes a SCAN box protein. *Gene* 2000;254(1-2):105-18.
 236. GenBank. Homo sapiens myeloid zinc finger 1 (MZF1), transcript variant 1, mRNA, Reference Sequence: NM_003422.2, NCBI, NIH.
 237. GenBank. Homo sapiens myeloid zinc finger 1 (MZF1), transcript variant 2, mRNA, Reference Sequence: NM_198055.1, NCBI, NIH.
 238. GenPept. Myeloid zinc finger 1 isoform 1 [Homo sapiens], Reference Sequence: NP_003413.2, NCBI, NIH.
 239. GenPept. Myeloid zinc finger 1 isoform 1 [Homo sapiens], Reference Sequence: NP_932172.1, NCBI, NIH.
 240. GenBank. Homo sapiens myeloid zinc finger 1 (MZF1), transcript variant 3, mRNA, Reference Sequence: NM_001267033.1, NCBI, NIH.
 241. GenPept. Myeloid zinc finger 1 isoform 2 [Homo sapiens], Reference Sequence: NP_001253962.1, NCBI, NIH.
 242. Gallagher RE. SCANNing for PML nuclear bodies with My-

- eloid Zinc Finger 1. *Leuk. Res.* 2008;32(11):1650-2.
243. Peterson FC, Hayes PL, Waltner JK, et al. Structure of the SCAN domain from the tumor suppressor protein MZF1. *J. Mol. Biol.* 2006;363(1):137-47.
 244. Hui P, Guo X, Bradford PG. Isolation and functional characterization of the human gene encoding the myeloid zinc finger protein MZF-1. *Biochemistry* 1995;34(50):16493-502.
 245. Hromas R, Davis B, Rauscher FJ, et al. Hematopoietic transcriptional regulation by the myeloid zinc finger gene, MZF-1. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996;211:159-64.
 246. Gaboli M, Kotsi PA, Gurrieri C, et al. Mzf1 controls cell proliferation and tumorigenesis. *Genes Dev.* 2001;15(13):1625-30.
 247. Hoffman SM, Hromas R, Amemiya C, Mohrenweiser HW. The location of MZF-1 at the telomere of human chromosome 19q makes it vulnerable to degeneration in aging cells. *Leuk. Res.* 1996;20(3):281-3.
 248. Porcellini E, Carbone I, Martelli PL, et al. Haplotype of single nucleotide polymorphisms in exon 6 of the MZF-1 gene and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* 2013;34(2):439-47.
 249. Hromas R, Morris J, Cornetta K, et al. Aberrant expression of the myeloid zinc finger gene, MZF-1, is oncogenic. *Cancer Res.* 1995;55(16):3610-4.
 250. Noll L, Peterson FC, Hayes PL, Volkman BF, Sander T. Heterodimer formation of the myeloid zinc finger 1 SCAN domain and association with promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Leuk. Res.* 2008;32(10):1582-92.
 251. Hromas R, Boswell S, Shen RN, et al. Forced over-expression of the myeloid zinc finger gene MZF-1 inhibits apoptosis and promotes oncogenesis in interleukin-3-dependent FDCP.1 cells. *Leukemia* 1996;10(6):1049-50.
 252. Hsieh Y-H, Wu T-T, Tsai J-H, Huang C-Y, Hsieh Y-S, Liu J-Y. PKC α expression regulated by Elk-1 and MZF-1 in human HCC cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;339(1):217-25.
 253. Hsieh Y-H, Wu T-T, Huang C-Y, Hsieh Y-S, Liu J-Y. Suppression of tumorigenicity of human hepatocellular carcinoma cells by antisense oligonucleotide MZF-1. *Chin. J. Physiol.* 2007;50(1):9-15.
 254. Mudduluru G, Vajkoczy P, Allgayer H. Myeloid zinc finger 1 induces migration, invasion, and in vivo metastasis through Axl gene expression in solid cancer. *Mol. Cancer Res.* 2010;8(2):159-69.
 255. Deng Y, Wang J, Wang G, et al. p53/PIK transcriptionally activated by MZF1 promotes colorectal cancer cell proliferation. *Biomed Res. Int.* 2013;2013:868131.
 256. Yue C-H, Chiu Y-W, Tung J-N, et al. Expression of protein kinase C α and the MZF-1 and Elk-1 transcription factors in human breast cancer cells. *Chin. J. Physiol.* 2012;55(1):31-6.
 257. Jou Y-C, Chiu Y-W, Chen Y-H, et al. Expression of protein kinase C α and the MZF-1 and elk-1 transcription factors in human bladder transitional cell carcinoma cells. *Chin. J. Physiol.* 2012;55(2):75-81.
 258. Tsai S-J, Hwang J-M, Hsieh S-C, Ying T-H, Hsieh Y-H. Over-expression of myeloid zinc finger 1 suppresses matrix metalloproteinase-2 expression and reduces invasiveness of SiHa human cervical cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012;425(2):462-7.
 259. National Human Genome Research Institute. Available at: <http://www.genome.gov/glossary/>.
 260. Zhong X, Thornton K, Reed E. Computer based analyses of the 5'-flanking regions of selected genes involved in the nucleotide excision repair complex. *Int. J. Oncol.* 2000;17(2):375-80.
 261. Dabholkar MD, Berger MS, Vionnet JA, et al. Malignant and Nonmalignant Brain Tissues Differ in Their Messenger RNA Expression Patterns for ERCC1 and ERCC2. *Cancer Res.* 1995;55(6):1261-1266.
 262. Dabholkar MD, Berger MS, Vionnet JA, et al. Comparative analyses of relative ERCC3 and ERCC6 mRNA levels in gliomas and adjacent non-neoplastic brain. *Mol. Carcinog.* 1996;17(1):1-7.
 263. Dabholkar M, Thornton K, Vionnet J, Bostick-Bruton F, Yu JJ, Reed E. Increased mRNA levels of xeroderma pigmentosum complementation group B (XPB) and Cockayne's syndrome complementation group B (CSB) without increased mRNA levels of multidrug-resistance gene (MDR1) or metallothionein-II (MT-II) in platinum-resistant human . *Biochem. Pharmacol.* 2000;60(11):1611-9.
 264. Reed E, Dabholkar M, Thornton K, Thompson C, Yu JJ, Bostick-Bruton F. Evidence for in the appearance of mRNAs of nucleotide excision repair genes, in human ovarian cancer tissues. *Oncol. Rep.* 7(5):1123-8.
 265. Yan Q-W, Reed E, Zhong X-S, Thornton K, Guo Y, Yu JJ. MZF1 possesses a repressively regulatory function in ERCC1 expression. *Biochem. Pharmacol.* 2006;71(6):761-71.
 266. Reed E. Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. *Cancer Treat. Rev.* 1998;24(5):331-44.
 267. Lee KB, Parker RJ, Bohr V, Cornelison T, Reed E. Cisplatin sensitivity/resistance in UV repair-deficient Chinese hamster ovary cells of complementation groups 1 and 3. *Carcinogenesis* 1993;14(10):2177-80.
 268. Li Q, Gardner K, Zhang L, Tsang B, Bostick-Bruton F, Reed E. Cisplatin induction of ERCC-1 mRNA expression in A2780/CP70 human ovarian cancer cells. *J. Biol. Chem.* 1998;273(36):23419-25.
 269. Li Q, Yu JJ, Mu C, et al. Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells. *Anticancer Res.* 20(2A):645-52.
 270. Britten RA, Liu D, Tessier A, Hutchison MJ, Murray D. ERCC1 expression as a molecular marker of cisplatin resistance in human cervical tumor cells. *Int. J. Cancer* 2000;89(5):453-7.
 271. Selvakumaran M, Pisarcik DA, Bao R, Yeung AT, Hamilton TC. Enhanced cisplatin cytotoxicity by disturbing the nucleotide excision repair pathway in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.* 2003;63(6):1311-6.
 272. States JC, Reed E. Enhanced XPA mRNA levels in cisplatin-resistant human ovarian cancer are not associated

- with XPA mutations or gene amplification. *Cancer Lett.* 1996;108(2):233-7.
273. Wu X, Fan W, Xu S, Zhou Y. Sensitization to the cytotoxicity of cisplatin by transfection with nucleotide excision repair gene xeroderma pigmentosum group A antisense RNA in human lung adenocarcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* 2003;9(16 Pt 1):5874-9.
 274. Wang S, Pan H, Liu D, et al. Excision repair cross complementation group 1 is a chemotherapy-tolerating gene in cisplatin-based treatment for non-small cell lung cancer. *Int. J. Oncol.* 2014.
 275. Köberle B, Masters JR, Hartley JA, Wood RD. Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumours. *Curr. Biol.* 1999;9(5):273-6.
 276. Welsh C, Day R, McGurk C, Masters JRW, Wood RD, Köberle B. Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines. *Int. J. Cancer* 2004;110(3):352-61.
 277. Köberle B, Roginskaya V, Zima KS, Masters JRW, Wood RD. Elevation of XPA protein level in testis tumor cells without increasing resistance to cisplatin or UV radiation. *Mol. Carcinog.* 2008;47(8):580-6.
 278. Usanova S, Piée-Staffa A, Sied U, et al. Cisplatin sensitivity of testis tumour cells is due to deficiency in interstrand-crosslink repair and low ERCC1-XPF expression. *Mol. Cancer* 2010;9:248.
 279. Köberle B, Ditz C, Kausch I, Wollenberg B, Ferris RL, Albers AE. Metastases of squamous cell carcinoma of the head and neck show increased levels of nucleotide excision repair protein XPF in vivo that correlate with increased chemoresistance ex vivo. *Int. J. Oncol.* 2010;36(5):1277-84.
 280. Arora S, Kothandapani A, Tillison K, Kalman-Maltese V, Patrick SM. Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells. *DNA Repair (Amst).* 2010;9(7):745-53.
 281. Dabholkar M, Bostick-Bruton F, Weber C, Bohr VA, Egwuagu C, Reed E. ERCC1 and ERCC2 expression in malignant tissues from ovarian cancer patients. *J. Natl. Cancer Inst.* 1992;84(19):1512-7.
 282. Dabholkar M, Vionnet J, Bostick-Bruton F, Yu JJ, Reed E. Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *J. Clin. Invest.* 1994;94(2):703-8.
 283. Codegoni AM, Broggin M, Pitelli MR, et al. Expression of genes of potential importance in the response to chemotherapy and DNA repair in patients with ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 1997;65(1):130-7.
 284. Steffensen KD, Waldstrøm M, Jakobsen A. The relationship of platinum resistance and ERCC1 protein expression in epithelial ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2009;19(5):820-5.
 285. Bellmunt J, Paz-Ares L, Cuello M, et al. Gene expression of ERCC1 as a novel prognostic marker in advanced bladder cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *Ann. Oncol.* 2007;18(3):522-8.
 286. Hoffmann A-C, Wild P, Leicht C, et al. MDR1 and ERCC1 expression predict outcome of patients with locally advanced bladder cancer receiving adjuvant chemotherapy. *Neoplasia* 2010;12(8):628-36.
 287. Kim KH, Do I-G, Kim HS, et al. Excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) expression in advanced urothelial carcinoma patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *APMIS* 2010;118(12):941-8.
 288. Sun J-M, Sung J-Y, Park SH, et al. ERCC1 as a biomarker for bladder cancer patients likely to benefit from adjuvant chemotherapy. *BMC Cancer* 2012;12:187.
 289. Warnecke-Eberz U, Metzger R, Miyazono F, et al. High specificity of quantitative excision repair cross-complementing 1 messenger RNA expression for prediction of minor histopathological response to neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer. *Clin. Cancer Res.* 2004;10(11):3794-9.
 290. Joshi M-BM, Shirota Y, Danenberg KD, et al. High gene expression of TS1, GSTP1, and ERCC1 are risk factors for survival in patients treated with trimodality therapy for esophageal cancer. *Clin. Cancer Res.* 2005;11(6):2215-21.
 291. Kim MK, Cho K-J, Kwon GY, et al. ERCC1 predicting chemoradiation resistance and poor outcome in oesophageal cancer. *Eur. J. Cancer* 2008;44(1):54-60.
 292. Fareed KR, Al-Attar A, Soomro IN, et al. Tumour regression and ERCC1 nuclear protein expression predict clinical outcome in patients with gastro-oesophageal cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Br. J. Cancer* 2010;102(11):1600-7.
 293. Metzger R, Leichman CG, Danenberg KD, et al. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 1998;16(1):309-16.
 294. Shirota Y, Stoehlmacher J, Brabender J, et al. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 2001;19(23):4298-304.
 295. Cheng L, Sturgis EM, Eicher SA, Spitz MR, Wei Q. Expression of nucleotide excision repair genes and the risk for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 2002;94(2):393-7.
 296. Jun HJ, Ahn MJ, Kim HS, et al. ERCC1 expression as a predictive marker of squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based concurrent chemoradiation. *Br. J. Cancer* 2008;99(1):167-72.
 297. Handra-Luca A, Hernandez J, Mountzios G, et al. Excision repair cross complementation group 1 immunohistochemical expression predicts objective response and cancer-specific survival in patients treated by Cisplatin-based induction chemotherapy for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2007;13(13):3855-9.
 298. Vaezi A, Wang X, Buch S, et al. XPF expression correlates with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin. Cancer Res.* 2011;17(16):5513-22.
 299. Sun J-M, Ahn M-J, Park MJ, et al. Expression of exci-

- sion repair cross-complementation group 1 as predictive marker for nasopharyngeal cancer treated with concurrent chemoradiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2011;80(3):655-60.
300. Maithel SK, Coban I, Kneuertz PJ, et al. Differential expression of ERCC1 in pancreas adenocarcinoma: high tumor expression is associated with earlier recurrence and shortened survival after resection. *Ann. Surg. Oncol.* 2011;18(9):2699-705.
 301. Hwang IG, Jang JS, Do JH, et al. Different relation between ERCC1 overexpression and treatment outcomes of two platinum agents in advanced biliary tract adenocarcinoma patients. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2011;68(4):935-44.
 302. Lord RVN, Brabender J, Gandara D, et al. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2002;8(7):2286-91.
 303. Simon GR, Sharma S, Cantor A, Smith P, Bepler G. ERCC1 expression is a predictor of survival in resected patients with non-small cell lung cancer. *Chest* 2005;127(3):978-83.
 304. Olausson KA, Dunant A, Fouret P, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 2006;355(10):983-91.
 305. Bepler G, Olausson KA, Vataire A-L, et al. ERCC1 and RRM1 in the international adjuvant lung trial by automated quantitative in situ analysis. *Am. J. Pathol.* 2011;178(1):69-78.
 306. Ceppi P, Volante M, Novello S, et al. ERCC1 and RRM1 gene expressions but not EGFR are predictive of shorter survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin and gemcitabine. *Ann. Oncol.* 2006;17(12):1818-25.
 307. Cobo M, Isla D, Massuti B, et al. Customizing cisplatin based on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expression: a phase III trial in non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2007;25(19):2747-54.
 308. Simon G, Sharma A, Li X, et al. Feasibility and efficacy of molecular analysis-directed individualized therapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2007;25(19):2741-6.
 309. Z, Chen T, Li X, Haura E, Sharma A, Bepler G. DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2007;356(8):800-8.
 310. Hwang IG, Ahn MJ, Park BB, et al. ERCC1 expression as a prognostic marker in N2(+) non-small-cell lung cancer patients treated with platinum-based neoadjuvant concurrent chemoradiotherapy. *Cancer* 2008;113(6):1379-86.
 311. Reynolds C, Obasaju C, Schell MJ, et al. Randomized phase III trial of gemcitabine-based chemotherapy with in situ RRM1 and ERCC1 protein levels for response prediction in non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2009;27(34):5808-15.
 312. Vilmar AC, Santoni-Rugiu E, Sú rensen JB. ERCC1 and histopathology in advanced NSCLC patients randomized in a large multicenter phase III trial. *Ann. Oncol.* 2010;21(9):1817-24.
 313. Chen S, Zhang J, Wang R, Luo X, Chen H. The platinum-based treatments for advanced non-small cell lung cancer, is low/negative ERCC1 expression better than high/positive ERCC1 expression? A meta-analysis. *Lung Cancer* 2010;70(1):63-70.
 314. Roth JA, Carlson JJ. Prognostic role of ERCC1 in advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Lung Cancer* 2011;12(6):393-401.
 315. Booton R, Ward T, Ashcroft L, Morris J, Heighway J, Thatcher N. ERCC1 mRNA expression is not associated with response and survival after platinum-based chemotherapy regimens in advanced non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 2007;2(10):902-6.
 316. Rosell R, Skrzypski M, Jassem E, et al. BRCA1: a novel prognostic factor in resected non-small-cell lung cancer. *PLoS One* 2007;2(11):e1129.
 317. Azuma K, Komohara Y, Sasada T, et al. Excision repair cross-complementation group 1 predicts progression-free and overall survival in non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Cancer Sci.* 2007;98(9):1336-43.
 318. Li X-Q, Li J, Shi S-B, Chen P, Yu L-C, Bao Q-L. Expression of MRP1, BCRP, LRP and ERCC1 as prognostic factors in non-small cell lung cancer patients receiving postoperative cisplatin-based chemotherapy. *Int. J. Biol. Markers* 24(4):230-7.
 319. Holm B, Mellemegaard A, Skov T, Skov BG. Different impact of excision repair cross-complementation group 1 on survival in male and female patients with inoperable non-small-cell lung cancer treated with carboplatin and gemcitabine. *J. Clin. Oncol.* 2009;27(26):4254-9.
 320. Ota S, Ishii G, Goto K, et al. Immunohistochemical expression of BCRP and ERCC1 in biopsy specimen predicts survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin-based chemotherapy. *Lung Cancer* 2009;64(1):98-104.
 321. Lee HW, Choi Y-W, Han JH, et al. Expression of excision repair cross-complementation group 1 protein predicts poor outcome in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based doublet chemotherapy. *Lung Cancer* 2009;65(3):377-82.
 322. Ikeda S, Takabe K, Suzuki K. Expression of ERCC1 and class IIIbeta tubulin for predicting effect of carboplatin/paclitaxel in patients with advanced inoperable non-small cell lung cancer. *Pathol. Int.* 2009;59(12):863-7.
 323. Ren S, Zhou S, Zhang L, et al. High-level mRNA of excision repair cross-complementation group 1 gene is associated with poor outcome of platinum-based doublet chemotherapy of advanced nonsmall cell lung cancer patients. *Cancer Invest.* 2010;28(10):1078-83.
 324. Wachters FM, Wong LSM, Timens W, Kampinga HH, Groen HJM. ERCC1, hRad51, and BRCA1 protein expression in relation to tumour response and survival of stage III/IV NSCLC patients treated with chemotherapy. *Lung Cancer* 2005;50(2):211-9.
 325. Su C, Zhou S, Zhang L, et al. ERCC1, RRM1 and BRCA1 mRNA expression levels and clinical outcome of advanced non-small cell lung cancer. *Med. Oncol.* 2011;28(4):1411-7.
 326. Riedl T, Hanaoka F, Egly J-M. The comings and goings of

- nucleotide excision repair factors on damaged DNA. *EMBO J.* 2003;22(19):5293-303.
327. Felip E, Rosell R. Testing for excision repair cross-complementing 1 in patients with non-small-cell lung cancer for chemotherapy response. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2007;7(3):261-8. doi:10.1586/14737159.7.3.261.
 328. Olausson KA, Mountzios G, Soria J-C. ERCC1 as a risk stratifier in platinum-based chemotherapy for nonsmall-cell lung cancer. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2007;13(4):284-9.
 329. Castiglione F, Rossi Degl'Innocenti D, Taddei A, et al. Real-time PCR analysis of RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues: effects of the fixation on outcome reliability. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 2007;15(3):338-42.
 330. Lehmann U, Kreipe H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods* 2001;25(4):409-18.
 331. Walch A, Specht K, Smida J, et al. Tissue microdissection techniques in quantitative genome and gene expression analyses. *Histochem. Cell Biol.* 2001;115(4):269-76.
 332. Esposito G. Complementary techniques: laser capture microdissection--increasing specificity of gene expression profiling of cancer specimens. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007;593:54-65.
 333. Lehmann U, Bock O, Glöckner S, Kreipe H. Quantitative molecular analysis of laser-microdissected paraffin-embedded human tissues. *Pathobiology* 2000;68(4-5):202-8.
 334. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology.* (N. Y.). 1992;10(4):413-7.
 335. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 2001;25(4):386-401.
 336. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 2000;25(2):169-93.
 337. Jung R, Soondrum K, Neumaier M. Quantitative PCR. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2000;38(9):833-6.
 338. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 2002;29(1):23-39.
 339. Didenko V V. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques* 2001;31(5):1106-16, 1118, 1120-1.
 340. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 1996;6(10):995-1001.
 341. www.probes.com.
 342. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J. Biomol. Tech.* 2004;15(3):155-66.
 343. Akilesh S, Shaffer DJ, Roopenian D. Customized molecular phenotyping by quantitative gene expression and pattern recognition analysis. *Genome Res.* 2003;13(7):1719-27.
 344. Vaerman JL, Saussoy P, Ingargiola I. Evaluation of real-time PCR data. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 18(2):212-4.
 345. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6(10):986-94.
 346. Bustin SA, Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin. Sci. (Lond).* 2005;109(4):365-79.
 347. Zhu J, He F, Hu S, Yu J. On the nature of human housekeeping genes. *Trends Genet.* 2008;24(10):481-4.
 348. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 1999;26(1):112-22, 124-5.
 349. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
 350. Real-Time PCR Systems. In: *Applied Biosystems.*; 2005.
 351. Szabo A, Perou CM, Karaca M, et al. Statistical modeling for selecting housekeeper genes. *Genome Biol.* 2004;5(8):R59. doi:10.1186/gb-2004-5-8-r59.
 352. Hsiao LL, Dangond F, Yoshida T, et al. A compendium of gene expression in normal human tissues. *Physiol. Genomics* 2001;7(2):97-104.
 353. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.* 1999;75(2-3):291-5.
 354. Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* 2000;29(2):332-7.
 355. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3(7):RESEARCH0034.
 356. Hendriks-Balk MC, Michel MC, Alewijnse AE. Pitfalls in the normalization of real-time polymerase chain reaction data. *Basic Res. Cardiol.* 2007;102(3):195-7.
 357. Lion T. Current recommendations for positive controls in RT-PCR assays. *Leukemia* 2001;15(7):1033-7.
 358. Thellin O, ElMoualij B, Heinen E, Zorzi W. A decade of improvements in quantification of gene expression and internal standard selection. *Biotechnol. Adv.* 27(4):323-33.
 359. Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, et al. Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal. Biochem.* 2002;309(2):293-300.
 360. Entrez. ACTB actin, beta [Homo sapiens (human)], Gene ID: 60, NCBI, NIH.
 361. Hanukoglu I, Tanese N, Fuchs E. Complementary DNA sequence of a human cytoplasmic actin. Interspecies divergence of 3' non-coding regions. *J. Mol. Biol.* 1983;163(4):673-8.
 362. GenBank. Homo sapiens actin, beta [ACTB], mRNA, Reference Sequence: NM_001101.3, NCBI, NIH.
 363. GenPept. actin, cytoplasmic 1 [Homo sapiens], Reference Sequence: NP_001092.1, NCBI, NIH.
 364. Entrez. TBP TATA box binding protein [Homo sapiens (human)], Gene ID: 6908.

365. GenBank. Homo sapiens TATA box binding protein (TBP), transcript variant 1, mRNA, Reference Sequence: NM_003194.4, NCBI, NIH.
366. GenPept. TATA-box-binding protein isoform 1 [Homo sapiens], Reference Sequence: NP_003185.1, NCBI, NIH.
367. GenBank. Homo sapiens TATA box binding protein (TBP), transcript variant 2, mRNA, Reference Sequence: NM_001172085.1, NCBI, NIH.
368. GenPept. TATA-box-binding protein isoform 2 [Homo sapiens], Reference Sequence: NP_001165556.1, NCBI, NIH.
369. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 2005;6(4):279-84.
370. Sanders R, Mason DJ, Foy CA, Huggett JF. Considerations for accurate gene expression measurement by reverse transcription quantitative PCR when analysing clinical samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014;406(26):6471-83.
371. Bolha L, Dusanic D, Nart M, Oven I. Comparison of methods for relative quantification of gene expression using real-time PCR. *Acta Agric Slov.* 2012;(100):97-106.
372. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
373. Sanborn RE. Cisplatin versus carboplatin in NSCLC: is there one "best" answer? *Curr. Treat. Options Oncol.* 2008;9(4-6):326-42.
374. Santana-Davila R, Devisetty K, Szabo A, et al. Cisplatin and Etoposide Versus Carboplatin and Paclitaxel With Concurrent Radiotherapy for Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer: An Analysis of Veterans Health Administration Data. *J. Clin. Oncol.* 2014.
375. de Castria TB, da Silva EMK, Gois AFT, Riera R. Cisplatin versus carboplatin in combination with third-generation drugs for advanced non-small cell lung cancer. *Cochrane database Syst. Rev.* 2013;8:CD009256.
376. Azzoli CG, Kris MG, Pfister DG. Cisplatin versus carboplatin for patients with metastatic non-small-cell lung cancer--an old rivalry renewed. *J. Natl. Cancer Inst.* 2007;99(11):828-9.
377. Maus MKH, Mack PC, Astrow SH, et al. Histology-related associations of ERCC1, RRM1, and TS biomarkers in patients with non-small-cell lung cancer: implications for therapy. *J. Thorac. Oncol.* 2013;8(5):582-6.
378. Gomez-Roca C, Raynaud CM, Penault-Llorca F, et al. Differential expression of biomarkers in primary non-small cell lung cancer and metastatic sites. *J. Thorac. Oncol.* 2009;4(10):1212-20.
379. Kang CH, Jang BG, Kim D-W, et al. Differences in the expression profiles of excision repair cross-complementation group 1, x-ray repair cross-complementation group 1, and betaIII-tubulin between primary non-small cell lung cancer and metastatic lymph nodes and the significance in mid-term s. *J. Thorac. Oncol.* 2009;4(11):1307-12.
380. Zhang W, Guo N, Yu C, et al. Differential expression of ERCC-1 in the primary tumors and metastatic lymph nodes of patients with non-small cell lung cancer adenocarcinoma. *Tumour Biol.* 2012;33(6):2209-16.
381. Bergot E, Levallet G, Campbell K, Dubois F, Lechapt E, Zalzman G. Predictive biomarkers in patients with resected non-small cell lung cancer treated with perioperative chemotherapy. *Eur. Respir. Rev.* 2013;22(130):565-76.
382. Taillade L, Penault-Llorca F, Boulet T, et al. Immunohistochemical expression of biomarkers: a comparative study between diagnostic bronchial biopsies and surgical specimens of non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* 2007;18(6):1043-50.
383. Deloia JA, Bhagwat NR, Darcy KM, et al. Comparison of ERCC1/XPF genetic variation, mRNA and protein levels in women with advanced stage ovarian cancer treated with intraperitoneal platinum. *Gynecol. Oncol.* 2012;126(3):448-54.
384. Hao D, Lau HY, Eliasziw M, et al. Comparing ERCC1 protein expression, mRNA levels, and genotype in squamous cell carcinomas of the head and neck treated with concurrent chemoradiation stratified by HPV status. *Head Neck* 2012;34(6):785-91.
385. Tepeli E, Caner V, Büyükpınarbal N, et al. Expression of ERCC1 and its clinicopathological correlations in non-small cell lung cancer. *Mol. Biol. Rep.* 2012;39(1):335-41.
386. Friboulet L, Barrios-Gonzales D, Commo F, et al. Molecular Characteristics of ERCC1-Negative versus ERCC1-Positive Tumors in Resected NSCLC. *Clin. Cancer Res.* 2011;17(17):5562-72.
387. Kang CH, Jang BG, Kim D-W, 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.
388. Rosell R, Felip E, Taron M, et al. Gene expression as a predictive marker of outcome in stage IIB-III A-III B non-small cell lung cancer after induction gemcitabine-based chemotherapy followed by resectional surgery. *Clin. Cancer Res.* 2004;10(12 Pt 2):4215s-4219s.
389. Vilmar A, SÚ rensen JB. Excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) in platinum-based treatment of non-small cell lung cancer with special emphasis on carboplatin: a review of current literature. *Lung Cancer* 2009;64(2):131-9.
390. Vassalou H, Stathopoulos E, Fiolitaki G, et al. Excision-repair-cross-complement-1 protein as a prognostic factor in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with platinum-based first-line chemotherapy. *Lung Cancer* 2013;82(2):324-9.
391. Mountzios G, Dimopoulos M-A, Papadimitriou C. Excision Repair Cross-Complementation Group 1 Enzyme as a Molecular Determinant of Responsiveness to Platinum-Based Chemotherapy for non Small-Cell Lung Cancer. *Biomark. Insights* 2008;3:219-226.



Excision-repair-cross-complement-1 protein as a prognostic factor in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with platinum-based first-line chemotherapy



Helen Vassalou^a, Efstathios Stathopoulos^b, Georgia Fiolitaki^b, Anastasios Koutsopoulos^b, Alexandra Voutsina^a, Vassilis Georgoulas^{a,c}, Dimitris Mavroudis^{a,c,*}

^a Laboratory of Tumor Cell Biology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece

^b Department of Pathology, University General Hospital of Heraklion, Crete, Greece

^c Department of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, Crete, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 April 2013

Received in revised form 21 July 2013

Accepted 1 August 2013

Keywords:

Non small cell lung cancer

ERCC1

Platinum-based chemotherapy

Front-line chemotherapy

Immunohistochemistry

ABSTRACT

Excision-repair-cross-complement-1 (ERCC1) protein expression in tumor cells has been associated with resistance to platinum compounds, the backbone of treatment in NSCLC. In the current study the impact of the tumoral ERCC1 protein expression on the outcome of patients with advanced stage NSCLC treated with platinum-based chemotherapy, was investigated. Ninety-four patients with inoperable stage III–IV NSCLC, treated with platinum-based first-line chemotherapy, were retrospectively analyzed. Pre-treatment tumor samples were analyzed for ERCC1 protein expression using immunohistochemistry. Response to treatment, time to tumor progression (TTP), and overall survival (OS) were correlated with patients' clinicopathological characteristics and ERCC1 protein expression on tumor cells. ERCC1 protein low expression was detected in 39 (41.5%) patients and did not correlate with patients' clinicopathological characteristics or response to chemotherapy. However, ERCC1 protein low expression showed a trend for better disease control rate ($p=0.059$), longer TTP (5.3 vs. 3.2 months; $p=0.051$) and significantly longer OS (18.7 vs. 9.7 months; $p=0.009$). ERCC1 could have a role in refining prognosis and thus individualizing chemotherapy for advanced stage NSCLC.

© 2013 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lung cancer is the leading cause of cancer-related mortality in the western world [1–3]. Non-small cell lung cancer (NSCLC) accounts for approximately 80–85% of all lung cancer cases and its 5-year survival rate is almost 15% for all stages combined, with significant variation depending on the stage of disease at the time of diagnosis [3,4].

Although chemotherapy is appropriate for many patients with lung cancer, it seems that the use of traditional chemotherapeutic agents has reached a therapeutic plateau [5]. Moreover, clinical outcome varies among patients with NSCLC, even within groups that have the same stage at the time of diagnosis and are treated in a similar way [4]. Therefore, the determination of different factors that may identify specific subgroups of patients who would mostly benefit from a specific treatment has been of increasing

interest. Since drug resistance is a major cause of chemotherapy failure, pharmacogenomic studies, analyzing genes responsible for variable drug efficacy, have become the focus of intense research.

Platinum-based chemotherapy, despite of the associated toxicities, has been widely accepted as the standard of care for NSCLC [3,6]. The anticancer cytotoxic effect of platinum drugs is based on their capacity to bind to DNA and to create bulky platinum-DNA adducts leading to intrastrand and/or interstrand cross-links, which disrupt the DNA structure. Such alterations activate the DNA damage recognition units and repair cellular mechanisms. Consequently, a critical mechanism of resistance to platinum drugs is DNA repair capability [7–9].

Excision repair cross complementation 1 (ERCC1) is a key enzyme of the nucleotide excision repair (NER) pathway, which is involved in the removal and repair of platinum-DNA adducts [9,10]. In many *in vitro* and *in vivo* studies, platinum compounds have been found to induce the ERCC1 protein both in different cancer cell lines and in human cancer tissues [9,11–13]. Likewise, ERCC1 protein levels have been demonstrated to influence the response and/or resistance to platinum-based chemotherapy in various human cancers [9,14–25].

* Corresponding author at: Department of Medical Oncology, University Hospital of Heraklion, Voutes, 71110 Heraklion, Crete, Greece. Tel.: +30 2810 392823; fax: +30 2810 392802.

E-mail addresses: mavrudis@med.uoc.gr, georgsec@med.uoc.gr (D. Mavroudis).

In this retrospective study, we assessed the tumoral ERCC1 protein expression of advanced stage NSCLC patients, treated with platinum-based first-line chemotherapy, in order to define its predictive and/or prognostic clinical value.

2. Patients and methods

2.1. Eligibility criteria

To be included in this study, patients had to fulfill the following criteria: histologically confirmed diagnosis of advanced stage (inoperable stage IIIB and IV) NSCLC, front-line chemotherapy with a platinum-based regimen and evaluation of its efficacy according to the RECIST criteria, documented clinical follow up as well as availability of paraffin-embedded tumor tissue with more than 70% tumor cells per section for the immunohistochemical assessment of ERCC1 protein expression.

2.2. Patients and treatment

Ninety four patients who fulfilled the above eligibility criteria were retrospectively included into the study cohort. Patients were treated with different combinations of platinum-based first-line chemotherapy. Cisplatin- and carboplatin-based chemotherapy was administered in 58 (61.7%) and 31 (33.0%) patients, respectively, whereas five (5.3%) additional patients received oxaliplatin (LOHP)-based chemotherapy. Stage of disease was determined according to the TNM classification at the time of chemotherapy administration.

Time to tumor progression (TTP) was defined as the time between the onset of chemotherapy and the date of first documented disease progression or death from any cause. Overall survival (OS) was defined as the time between the onset of chemotherapy and the date of the last follow up or death from any cause. Tumor response to treatment was evaluated according to RECIST criteria (Response evaluation criteria in solid tumors) [26]. Overall response rate (RR) was defined as the sum of the complete response (CR) and partial response (PR) cases divided by the total number of cases and expressed as a percentage. Disease control rate (DCR) was defined as the sum of the CR, PR and stable disease (SD) cases divided by the total number of cases and expressed as a percentage.

2.3. Immunohistochemical staining and evaluation

Archival, pre-treatment, formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor samples of patients were evaluated for ERCC1 protein expression using immunohistochemistry (IHC). Immunohistochemical staining was performed in 3 μ m thick tumor sections using the mouse anti-human monoclonal antibody against the full-length human ERCC1 protein (dilution 1:100 v/v; clone 8F1; Neomarkers, Fremont, CA, USA) and the Ultra Vision Detection System AP-Polymer & Fast Red Chromogen (TL-125-AL, LabVision, Cheshire, UK) according to the manufacturer's instructions. Slides were deparaffinized in xylene and rehydrated in a graded ethanol series. Antigens were retrieved by heating the slides in a 10 mM citrate buffer solution (pH 6.0) in a microwave oven at 500Watts for a total of 15 min, while allowing the slides in between every 5 min to cool at room temperature. Slides were incubated with the primary antibody for 1 hour at room temperature. Subsequently, slides were counterstained with Mayer's hematoxylin for 3 min. Slides were immersed in tris buffered saline (TBS) solution for all the in-between washes.

Endothelial cells, lymphocytes and/or fibroblasts of each sample were used as positive internal controls [27]. Slides from consecutive cuts stained following omission of the primary antibody were

used as negative controls [27]. All stained tissue sections were evaluated in their entirety at a 400 \times magnification. Tumor specimens were considered for evaluation of ERCC1 protein expression only when internal controls were stained appropriately [27]. Only nuclear tumor cell staining was considered and evaluated as positive [27]. For each patient, the extent (proportion score) as well as the intensity of the tumor cell staining were calculated and graded on a scale 0–1 (0 = 0%, 0.1 = <10%, 0.5 = 10–49%, 1 = \geq 50% of positive tumor cells), and 0–3 (0 = no staining, 1 = weak, 2 = moderate, 3 = strong staining), respectively, with the endothelial cells of the tonsil considered as of staining intensity grade 2 [27]. ERCC1 protein expression was quantified using a semi-quantitative H-score. H-score was calculated for each sample on the basis of both the percentage of positive tumor cells and staining intensity by multiplying their grades [27]. The median value of H-scores was a priori chosen as the cutoff point to classify ERCC1 protein expression as either high or low [27].

2.4. Statistical analysis

Response to treatment (RR) and disease control rate (DCR) were correlated with patients' clinicopathological characteristics and ERCC1 protein expression using the Fisher's exact test. TTP and OS curves were estimated using the Kaplan–Maier method and compared using the log-rank test or Breslow test when appropriate. All tests performed were two-sided and p -value <0.05 was considered statistically significant. The statistical analysis software SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for all the analyses.

3. Results

3.1. Patients' characteristics and clinical outcome

Patients' clinicopathological characteristics are listed in Table 1. Patients' median age was 59 years (range, 35–73 years). Eighty four patients (89.4%) were male and 85 (90.4%) patients had an ECOG performance status 0 or 1. Thirty-one (33%) patients had squamous cell carcinoma and 56 (59.6%) had stage IV disease.

Sixty eight (72.3%) tumor samples were obtained from the primary tumor site, 8 (8.5%) from the lymph nodes and 18 (19.2%) from other metastatic sites. Seventy two (76.6%) tumor specimens were resected surgically and 22 (23.4%) were obtained by biopsy. Mean cellular tumor percentage per slide was 82.5%.

At the time of the analysis, the median follow up time was 109.0 months (range 0.63–169.0) and 89 (94.7%) patients had relapsed while 14 (14.9%) were lost to follow up. Median TTP and OS were 3.4 months (range 0.6–109.0) and 12.1 months (range 0.6–169.0), respectively. Overall RR and DCR to chemotherapy were 28.7% and 54.2%, respectively. No significant correlations were found between patients' clinicopathological characteristics and RR or DCR.

Univariate analysis was carried out to identify the factors that were significantly associated with TTP and OS. There were no significant associations except for patients with good PS who had a significantly better TTP (4.2 months vs. 1.6 months; $p=0.016$) but not OS (12.6 months vs. 5.0 months; $p=0.095$) (Table 2).

3.2. ERCC1 protein expression and patients' characteristics

Patients' H-scores values ranged from 0 to 3. Heterogeneity in the intensity and the frequency of positively stained nuclei both in the tumor cells as well as in the internal control cells was observed in the majority of patients. A cut-off value was set according to the median value of H-scores. The median value of H-scores was 1. Patients with H-score equal or higher than 1 were considered to over-express ERCC1. Fig. 1 shows tumor samples with high and low ERCC1 protein expression. Thirty-nine (41.5%) patients were

Table 1
Patients' clinicopathological characteristics.

Characteristics	N	(%)
Age (years)		
Median	59	
Range	35–73	
Gender		
Male	84	(89.4)
Female	10	(10.6)
Smoking status		
Smokers	57	(60.6)
Non-smokers	10	(10.6)
Ex-smokers	3	(3.2)
Unknown smoking status	24	(24.5)
Histopathology		
Squamous Cell Carcinoma	31	(33)
Adenocarcinoma	49	(52.1)
Poorly differentiated	9	(9.6)
Other	5	(5.3)
ECOG PS		
0	46	(48.9)
1	39	(41.5)
2	9	(9.6)
Stage (TNM)		
IIIB	38	(40.4)
IV	56	(59.6)
Chemotherapy		
Cisplatin-based	58	(61.7)
Carboplatin-based	31	(33)
Oxaliplatin-based	5	(5.3)
Response to chemotherapy		
CR	5	(5.3)
PR	22	(23.4)
SD	24	(25.5)
PD	43	(45.8)
Relapse		
Yes	89	(94.7)
No	5	(5.3)
Status		
Lost to follow up	14	(14.9)
Dead	80	(85.1)

Table 2
Univariate analysis for TTP and OS.

Characteristics	TTP (months)	p (Log-rank)	HR (95% CI)	p (Cox)	OS (months)	p (Log-rank)	HR (95% CI)	p (Cox)
Age (years)								
<60	4.23	0.718	0.927	0.719	11.57	0.385	1.216	0.386
≥60 (ref)	3.27		(0.612–1.404)		13.13		(0.781–1.892)	
Gender								
Male	3.37	0.924	1.033	0.924	12.57	0.509	0.780	0.510
Female (ref)	5.27		(0.533–2.000)		9.63		(0.373–1.634)	
Smoking Status								
Smokers	4.73	0.471	1.285	0.473	12.10	0.255	1.582	0.259
Never-smokers (ref)	5.73		(0.648–2.547)		41.57		(0.713–3.509)	
Histopathology								
SCC (ref)	5.07	0.646	1.110	0.647	12.8	0.701	0.911	0.911
Non-SCC	3.40		(0.710–1.737)		11.3		(0.566–1.466)	
ECOG PS								
0,1 (ref)	4.23	0.016	2.299	0.020	12.57	0.095	1.808	0.100
2	1.57		(1.142–4.626)		5.03		(0.894–3.657)	
Stage (TNM)								
IIIB (ref)	3.37	0.231	0.770	0.233	12.57	0.809	0.946	0.809
IV	4.23		(0.501–1.183)		11.33		(0.603–1.483)	
Chemotherapy								
Cisplatin-based	3.17	0.580	1.134	0.582	12.1	0.748	1.085	0.748
Carboplatin-based (ref)	5.73		(0.726–1.770)		18.7		(0.660–1.783)	
ERCC1								
Low (ref)	5.30	0.051 (Breslow)	1.325	0.190	18.70	0.009 (Breslow)	1.580	0.047
High	3.17		(0.870–2.018)		9.67		(1.005–2.483)	

In bold *p* values showing statistical significance or a high trend.

Table 3
ERCC1 protein expression and patients' clinicopathological characteristics.

Characteristics	ERCC1 expression		<i>p</i>
	Low (%)	High (%)	
Age (years)			
<60	16 (41.0)	32 (58.2)	0.143
≥60	23 (59.0)	23 (41.8)	
Gender			
Male	35 (89.7)	49 (89.1)	0.999
Female	4 (10.3)	6 (10.9)	
Smoking status			
Smokers	25 (89.3)	35 (83.3)	0.729
Never-smokers	3 (10.7)	7 (16.7)	
Histopathology			
SCC	11 (28.2)	20 (36.4)	0.506
Non-SCC	28 (71.8)	35 (63.6)	
ECOG PS			
0,1	37 (94.9)	48 (87.3)	0.297
2	2 (5.1)	7 (12.7)	
Stage (TNM)			
IIIB	17 (43.6)	20 (36.4)	0.525
IV	22 (56.4)	35 (63.6)	
Chemotherapy			
Cisplatin-based	23 (60.5)	35 (68.6)	0.502
Carboplatin-based	15 (39.5)	16 (31.4)	
Response			
CR+PR	14 (35.9)	13 (23.6)	0.249
SD+PD	25 (64.1)	42 (76.4)	
Disease control			
CR+PR+SD	26 (66.7)	25 (45.5)	0.059
PD	13 (33.3)	30 (54.5)	

found with low ERCC1 protein expression and 55 (58.5%) with high. The median percentage of tumor cells with positive nuclear staining per sample was 35% (range 0–97%). There were no significant correlations between ERCC1 protein expression and patients' clinicopathological characteristics (Table 3).

3.3. ERCC1 protein expression and clinical outcome

Although there was no correlation between ERCC1 protein expression and response to treatment, there was a trend for a better

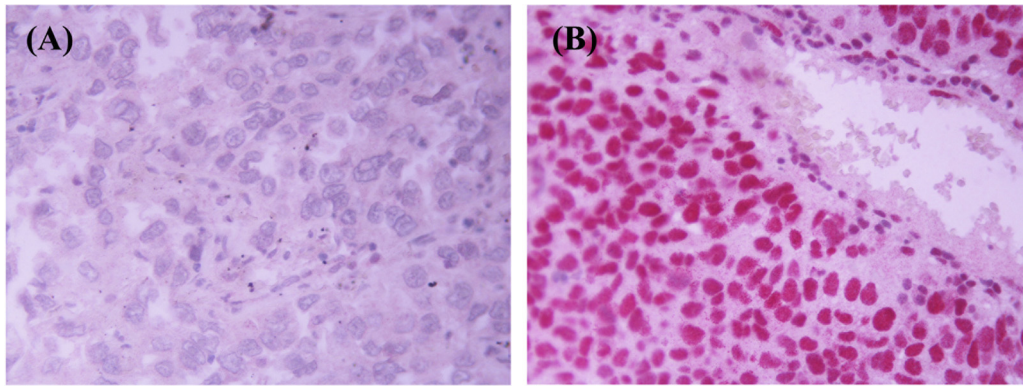


Fig. 1. Immunohistochemical staining of ERCC1 (400×). (A) Low expression of ERCC1 (negative). (B) High expression ERCC1 with present internal controls (intensity grade 3).

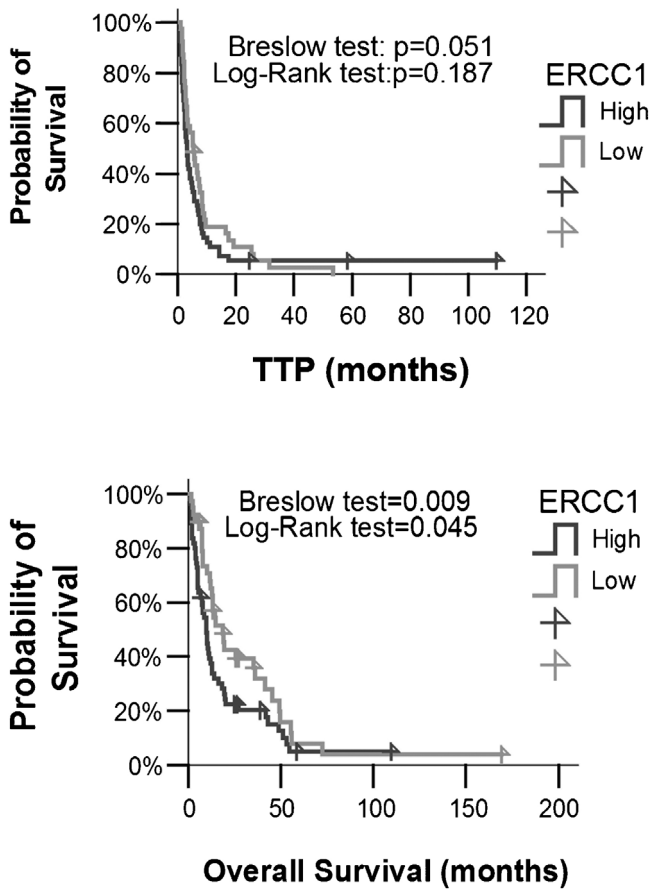


Fig. 2. Kaplan–Meier survival analysis of ERCC1 protein expression for TTP and OS.

DCR with ERCC1 low expression ($p = 0.059$; Table 3). ERCC1 protein low expression was also associated with a trend for a significantly longer median TTP (5.3 months vs. 3.2 months; $p = 0.051$, Breslow test), and with a significantly longer OS (18.7 months vs. 9.7 months; $p = 0.009$, Breslow test) (Table 2, Fig. 2).

4. Discussion

In the present study, we found a significant correlation of overall survival and ERCC1 protein expression in advanced stage, platinum treated NSCLC patients. Indeed, low ERCC1 protein expression was associated with a significantly longer OS ($p = 0.009$, Breslow test)

and showed a high trend for better TTP ($p = 0.051$, Breslow test) and DCR ($p = 0.059$).

So far, several studies, using different assessment methods, have already evaluated the role of ERCC1 protein expression on the outcome of patients with advanced stage NSCLC treated with platinum-based chemotherapy, albeit with conflicting results (Table 4). Lee et al. reported that in 50 patients, high expression of ERCC1 was an independent prognostic factor for poor OS ($p = 0.002$) along with poor PS ($p = 0.028$) and lack of DCR ($p = 0.001$), in multivariate analysis. ERCC1 expression did not correlate with RR ($p = 0.768$) in univariate analysis. However, a different grading scale for the extent of staining (proportion score) was used [28]. Ota et al. explored the ERCC1 protein expression in 156 biopsy specimens using not an H-score grading system but a 10% cut-off of stained tumor cells, and showed that ERCC1 status could not emerge as an independent factor associated with OS in multivariate analysis [29]. Holm et al. confirmed the prognostic value of ERCC1 protein expression in 163 patients treated with carboplatin and gemcitabine [30]. They used a different cut-off point (H-score > 0), due to an increased number ($N = 93$; 57%) of negative specimens (H-score = 0). In that study, patients with ERCC1-negative tumors had an increased survival compared to patients with ERCC1-positive tumors ($p = 0.02$); this difference was mainly attributed to a survival difference among men ($p = 0.005$), whereas no survival benefit could be demonstrated for women ($p = 0.70$). In our study there was no correlation between gender and ERCC1 expression or gender and clinical outcome. However, only 12% of our patients were women whereas in the Holm's study women represented 50% of the studied population. Ikeda et al. demonstrated that low ERCC1 protein status was associated with a better OS ($p = 0.014$) in 40 patients [31]. In that study a 10% cut-off of stained tumor cells was used for the IHC evaluation. Using a similar method, Wang et al. reported that in 124 patients ERCC1 protein low expression was associated with better RR ($p = 0.022$) and better OS ($p = 0.006$) [32]. Jeong et al. evaluated ERCC1 protein expression in 39 patients and failed to find a significant association between the patients' clinicopathologic characteristics, RR or OS and ERCC1 expression [33]. A different grading scale on the extent of staining (proportion score) was used in the calculation of the semiquantitative H-score. In a randomized phase III trial, 264 patients were evaluated for their ERCC1 status by IHC [34]. Low ERCC1 protein expression was found to be prognostic of a better OS ($p = 0.028$) and PFS ($p = 0.026$) but not RR ($p = 0.78$). Another randomized phase III study used a fluorescent-based IHC method combined with automated quantitative analysis (AQUA) in order to determine the in situ expression levels for ERCC1 protein in 170 patients. ERCC1 protein expression was predictive of response to gemcitabine and to gemcitabine plus carboplatin therapy but not prognostic of survival [35]. Finally, Das et al. using fiber array

Table 4

Studies that have evaluated ERCC1 protein expression in advanced stage NSCLC patients treated with platinum-based first-line chemotherapy.

Study	Pts No	Pts stage	Assessment method	ERCC1 expression evaluation	Significant correlations	Non-significant correlations
Lee et al. [28]	50	IIIB–IV	IHC: Ab-2	H-score (median value)	ERCC1–OS ($p = 0.002$)	ERCC1–RR ($p = 0.768$)
Ota et al. [29]	156	IV	IHC: 8F1	10% cut off	ERCC1–OS ($p = 0.03$)	ERCC1–RR ($p > 0.09$) ERCC1–PFS ($p = 0.06$)
Holm et al. [30]	163	IIB–IV	IHC: 8F1	H-score > 0	ERCC1–OS ($p = 0.005$) in men	ERCC1–OS ($p = 0.70$) in women
Ikeda et al. [31]	40	III–IV	IHC: 8F1	10% cut off	ERCC1–OS ($p = 0.014$)	None reported
Wang et al. [32]	124	IIIB–IV	IHC: 8F1	10% cut off	ERCC1–RR ($p = 0.022$) ERCC1–OS ($p = 0.006$)	None reported
Jeong et al. [33]	39	III	IHC: Ab-2	H-score (median value)	None	ERCC1–RR ERCC1–OS ($p = 0.209$)
Vilmar et al. [34]	264	III–IV	IHC: Ab-2	H-score (median value)	ERCC1–OS ($p = 0.028$) ERCC1–PFS ($p = 0.026$)	ERCC1–RR ($p = 0.78$)
Reynolds et al. [35]	170	IIIB–IV (PS = 2)	AQUA	AQUA adjusted scores	ERCC1–RR	ERCC1–PFS ($p = 0.53$) ERCC1–OS ($p = 0.19$)
Das et al. [36]	17	IV	CTCs labeling IgG2b	ERCC1 positive score > 1	ERCC1–PFS ($p < 0.02$)	None reported

scanning technology and immunofluorescence labeling for circulating tumor cells (CTCs) detection reported that low expression of ERCC1 on CTCs collected from the peripheral blood of 17 patients with metastatic NSCLC receiving platinum-based therapy, correlated with longer PFS (266 days vs. 172 days, log-rank, $p < 0.02$) [36]. They also noted that ERCC1 expression in CTCs was heterogeneous even for the same patient. However, they used a different than the median ERCC1 expression threshold (ERCC1 expression level of 1 as a cutoff) and a different method of quantification. Moreover, 65% of the patients' samples were collected during or after platinum chemotherapy, while many previous studies have linked platinum administration to ERCC1 protein expression induction [9,11–13].

Obviously, the evaluation of ERCC1 protein expression has not been uniform in all the above studies conducted to investigate its role in advanced NSCLC. We stress the need for a consistent IHC evaluation method, in order to be able to accurately compare the results between the different studies. In our study, we used an IHC evaluation method that was identical to the one used in the larger-up until now-NSCLC study investigating the role of ERCC1 protein expression [27]. Nevertheless, our results should be interpreted with caution since our study is a retrospective, non-randomized one with several limitations such as: (i) the relatively small number of studied patients ($N = 94$) obviously impacts on the study's power; (ii) patients were treated with various platinum-based chemotherapeutic regimens and (iii) tumor samples were obtained either by surgery or by biopsy, from the primary or the metastatic tumor sites.

It is noteworthy that, there have been questions raised regarding the reliability and reproducibility of several biomarkers' evaluation results in bronchial biopsies as compared with the corresponding surgical specimens [37]. Taillade et al. assessed ERCC1 protein levels in 27 patients with operable stage IA–IIIB NSCLC in both bronchial biopsies and surgical specimens; they dichotomized the expression values in order to investigate the hypothesis that treatment decisions could be made on the basis of the positivity or negativity of ERCC1 expression and found a discordance rate of 9%. Consequently, the authors concluded that the substitution of the whole tumor sample by the bronchial biopsy is not always applicable or advisable and indicated the necessity of obtaining multiple biopsies from different areas of the tumor in an effort to enhance the validity of the results [37].

There have been also suggestions that biomarkers' expression results from metastatic tissue specimens might not correlate with those of the primary tumor [38,39]. ERCC1 protein status was found to be discordant between the primary tumor and its corresponding metastasis in 20 cases (41%) of 49 NSCLC patients [38]. Additionally, ERCC1 was evaluated by IHC in paired samples of primary tumors and metastatic lymph nodes in 82 patients with operable stage

IIA–IIIA NSCLC who received adjuvant cisplatin-based chemotherapy [39]. When compared with primary tumors, ERCC1 expression in the metastatic lymph nodes was downregulated in only 8% of patients ($p < 0.05$), but was upregulated in 55% of them. Therefore, the authors suggested that ERCC1 protein-guided treatment should be performed only after integrative interpretation of expression profiles in both primary and metastatic sites.

Questions regarding the validation of antibodies against ERCC1 have also been raised. 8F1 is the most cited antibody for IHC (Table 4) but its specificity has been questioned since it has been found to detect a second cross-reactive antigen. The extensive clinical literature on 8F1 IHC does, however, indicate that this antibody may have a prognostic value. Ma et al. screened a number of commonly used anti-ERCC1 antibodies and reported that only two newly generated monoclonal antibodies (4F9 and 2E12) demonstrated ultra-specificity against ERCC1 protein and had superior performance for IHC analyses. None of these antibodies, however, has been used and approved in clinical studies hitherto [40].

Friboulet et al. tried to validate their previous findings [27] in the adjuvant setting and found that none of the 16 currently available antibodies could distinguish between the four ERCC1 protein isoforms, whereas only one isoform produced a protein that had full capacities for nucleotide excision repair and cisplatin resistance [41]. They suggested a change in the performance of the 8F1 antibody since 2006 and concluded that immunohistochemical analysis with the use of currently available ERCC1 antibodies could not specifically detect the unique functional ERCC1 isoform.

Taking into account the current data, we conclude that ERCC1 expression as a prognostic biomarker in NSCLC still requires further evaluation and clarification. Future prospective, well-designed, adequately-powered trials, with large numbers of patients, clearly defined cohorts, use of scientifically and technically validated, standardized and qualified biomarker assays, highly monospecific and clinically approved antibodies, unanimous and detailed evaluation criteria and well-annotated clinical data are warranted to validate the utility of ERCC1 as a prognostic and/or predictive marker. Such trials could provide the evidence whether the incorporation of ERCC1 expression in the therapeutic strategy can lead to an improved clinical outcome for NSCLC patients.

Conflict of interest statement

None declared.

Acknowledgements

The authors are grateful to Maria Klinaki for her technical advice in IHC and Alexandros Xyrafas for his assistance in the statistical

analysis. This work was financially supported in part by the Cretan Association for Biomedical Research (CABR).

References

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62(1):10–29.
- [2] Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007;18(3):581–92.
- [3] Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc* 2008;83(5):584–94.
- [4] Molina JR, Adjei AA, Jett JR. Advances in chemotherapy of non-small cell lung cancer. *Chest* 2006;130(4):1211–9.
- [5] Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002;346(2):92–8.
- [6] D'Addario G, Felip E. Non-small-cell lung cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009;20(Suppl. 4):68–70.
- [7] Reed E. Nucleotide excision repair and anti-cancer chemotherapy. *Cytotechnology* 1998;27(1–3):187–201.
- [8] Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res* 2001;478(1–2):23–43.
- [9] Altaha R, Liang X, Yu JJ, Reed E. Excision repair cross complementing-group 1: gene expression and platinum resistance. *Int J Mol Med* 2004;14(6):959–70.
- [10] Gazdar AF. DNA repair and survival in lung cancer—the two faces of Janus. *N Engl J Med* 2007;356(8):771–3.
- [11] Li Q, Ding L, Yu JJ, Mu C, Tsang B, Bostick-Bruton F, et al. Cisplatin and phorbol ester independently induce ERCC-1 protein in human ovarian carcinoma cells. *Int J Oncol* 1998;13(5):987–92.
- [12] Li Q, Yu JJ, Mu C, Yunbamb MK, Slavsky D, Cross CL, et al. Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells. *Anticancer Res* 2000;20(2A):645–52.
- [13] Papay J, Sapi Z, Egri G, Gyulai M, Szende B, Losonczy G, et al. Platinum-based chemotherapy in lung cancer affects the expression of certain biomarkers including ERCC1. *Pathol Oncol Res* 2009;15(3):445–50.
- [14] Handra-Luca A, Hernandez J, Mountzios G, Taranchon E, Lacau-St-Guilly J, Soria JC, et al. Excision repair cross complementation group 1 immunohistochemical expression predicts objective response and cancer-specific survival in patients treated by cisplatin-based induction chemotherapy for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13(13):3855–9.
- [15] Lee HW, Hwang YH, Han JH, Choi JH, Kang SY, Jeong SH, et al. High expression of excision repair cross-complementation group 1 protein predicts poor outcome in patients with nasopharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2010;46(3):209–13.
- [16] Kim MK, Cho KJ, Kwon GY, Park SI, Kim YH, Kim JH, et al. Patients with ERCC1-negative locally advanced esophageal cancers may benefit from preoperative chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res* 2008;14(13):4225–31.
- [17] Kim MK, Cho KJ, Kwon GY, Park SI, Kim YH, Kim JH, et al. ERCC1 predicting chemoradiation resistance and poor outcome in oesophageal cancer. *Eur J Cancer* 2008;44(1):54–60.
- [18] Steffensen KD, Waldstrom M, Jakobsen A. The relationship of platinum resistance and ERCC1 protein expression in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2009;19(5):820–5.
- [19] Steffensen KD, Waldstrom M, Jeppesen U, Brandslund I, Jakobsen A. Prediction of response to chemotherapy by ERCC1 immunohistochemistry and ERCC1 polymorphism in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2008;18(4):702–10.
- [20] Lee HW, Han JH, Kim JH, Lee MH, Jeong SH, Kang SY, et al. Expression of excision repair cross-complementation group 1 protein predicts poor outcome in patients with small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2008;59(1):95–104.
- [21] Hwang IG, Ahn MJ, Park BB, Ahn YC, Han J, Lee S, et al. ERCC1 expression as a prognostic marker in N2(+) non-small-cell lung cancer patients treated with platinum-based neoadjuvant concurrent chemoradiotherapy. *Cancer* 2008;113(6):1379–86.
- [22] Azuma K, Komohara Y, Sasada T, Terazaki Y, Ikeda J, Hoshino T, et al. Excision repair cross-complementation group 1 predicts progression-free and overall survival in non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Cancer Sci* 2007;98(9):1336–43.
- [23] 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.
- [24] Azuma K, Sasada T, Kawahara A, Hattori S, Kinoshita T, Takamori S, et al. Expression of ERCC1 and class III beta-tubulin in non-small cell lung cancer patients treated with a combination of cisplatin/docetaxel and concurrent thoracic irradiation. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;64(3):565–73.
- [25] Azuma K, Sasada T, Kawahara A, Takamori S, Hattori S, Ikeda J, et al. Expression of ERCC1 and class III beta-tubulin in non-small cell lung cancer patients treated with carboplatin and paclitaxel. *Lung Cancer* 2009;64(3):326–33.
- [26] Shanbhogue AK, Karnad AB, Prasad SR. Tumor response evaluation in oncology: current update. *J Comput Assist Tomogr* 2010;34(4):479–84.
- [27] Olaussen KA, Dunant A, Fourret P, Brambilla E, Andre F, Haddad V, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006;355(10):983–91.
- [28] Lee HW, Choi YW, Han JH, Kim JH, Jung JH, Jeong SH, et al. Expression of excision repair cross-complementation group 1 protein predicts poor outcome in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based doublet chemotherapy. *Lung Cancer* 2009;65(3):377–82.
- [29] Ota S, Ishii G, Goto K, Kubota K, Kim YH, Kojika M, et al. Immunohistochemical expression of BCRP and ERCC1 in biopsy specimen predicts survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin-based chemotherapy. *Lung Cancer* 2009;64(1):98–104.
- [30] Holm B, Mellemegaard A, Skov T, Skov BG. Different impact of excision repair cross-complementation group 1 on survival in male and female patients with inoperable non-small-cell lung cancer treated with carboplatin and gemcitabine. *J Clin Oncol* 2009;27(26):4254–9.
- [31] Ikeda S, Takabe K, Suzuki K. Expression of ERCC1 and class III beta tubulin for predicting effect of carboplatin/paclitaxel in patients with advanced inoperable non-small cell lung cancer. *Pathol Int* 2009;59(12):863–7.
- [32] Wang X, Zhao J, Yang L, Mao L, An T, Bai H, et al. Positive expression of ERCC1 predicts a poorer platinum-based treatment outcome in Chinese patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Med Oncol* 2010;27(2):484–90.
- [33] Jeong SH, Jung JH, Han JH, Kim JH, Choi YW, Lee HW, et al. Expression of Bcl-2 predicts outcome in locally advanced non-small cell lung cancer patients treated with cisplatin-based concurrent chemoradiotherapy. *Lung Cancer* 2010;68(2):288–94.
- [34] Vilmar AC, Santoni-Rugiu E, Sorensen JB. ERCC1 and histopathology in advanced NSCLC patients randomized in a large multicenter phase III trial. *Ann Oncol* 2010;21(9):1817–24.
- [35] Reynolds C, Obasaju C, Schell MJ, Li X, Zheng Z, Boulware D, et al. Randomized phase III trial of gemcitabine-based chemotherapy with in situ RRM1 and ERCC1 protein levels for response prediction in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009;27(34):5808–15.
- [36] Das M, Riess JW, Frankel P, Schwartz E, Bennis R, Hsieh HB, et al. ERCC1 expression in circulating tumor cells (CTCs) using a novel detection platform correlates with progression-free survival (PFS) in patients with metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC) receiving platinum chemotherapy. *Lung Cancer* 2012;77(2):421–6.
- [37] Taillade L, Penault-Llorca F, Boulet T, Fourret P, Michiels S, Taranchon E, et al. Immunohistochemical expression of biomarkers: a comparative study between diagnostic bronchial biopsies and surgical specimens of non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2007;18(6):1043–50.
- [38] Gomez-Roca C, Raynaud CM, Penault-Llorca F, Mercier O, Commo F, Morat L, et al. Differential expression of biomarkers in primary non-small cell lung cancer and metastatic sites. *J Thorac Oncol* 2009;4(10):1212–20.
- [39] Kang CH, Jang BG, Kim DW, Chung DH, Kim YT, Jheon S, et al. Differences in the expression profiles of excision repair cross-complementation group 1, X-ray repair cross-complementation group 1, and betaIII-tubulin between primary non-small cell lung cancer and metastatic lymph nodes and the significance in mid-term survival. *J Thorac Oncol* 2009;4(11):1307–12.
- [40] Ma D, Baruch D, Shu Y, Yuan K, Sun Z, Ma K, et al. Using protein microarray technology to screen anti-ERCC1 monoclonal antibodies for specificity and applications in pathology. *BMC Biotechnol* 2012;12(November):88.
- [41] Friboulet L, Olaussen KA, Pignon JP, Shepherd FA, Tsao MS, Graziano S, et al. ERCC1 isoform expression and DNA repair in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2013;368(March (12)):1101–10.