



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

UNIVERSITY OF CRETE

FACULTY OF MEDICINE



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ- ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη των μεταβολών της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό και τη δράση χημειοθεραπευτικών στον πρωτοπαθή όγκο και στους επιχώριους και μεσοθωρακικούς διηθημένους λεμφαδένες σε χειρουργήσιμο μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (ΜΜΚΚΠ)

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΤΡΥΦΩΝΙΔΗΣ

ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ- ΟΓΚΟΛΟΓΟΣ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2018

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας την διδακτορική μου διατριβή θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους κ. Σουγκλάκο και κ. Γεωργούλια για την τεράστια εμπιστοσύνη και υποστήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια ώστε να κατορθώσω να φέρω εις πέρας αυτή την πολύ σημαντική εργασία. Σε μια πολύ μακριά διαδρομή και κατά την οποία οι επαγγελματική μου δραστηριότητα με οδήγησε εκτός των συνόρων της χώρας μου, τους είμαι πραγματικά ευγνώμων που υπήρξαν πραγματικοί καθοδηγητές σε όλη αυτή την μεγάλη προσπάθεια. Αισθάνομαι ιδιαίτερη χαρά να βλέπω την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής αφού κατά την διάρκειά της είχαμε ν' αντιμετωπίσουμε πάρα πολλές δυσκολίες , κάτι που αποδεικνύει ότι αυτός που επιμένει κερδίζει στο τέλος.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και την ευγνωμοσύνη μου στην Χαρά Παπαδάκη για την πολύτιμη βοήθειά της και την πολύ χρήσιμη καθοδήγησή της στο εργαστηριακό κομμάτι της διατριβής, αφού χωρίς την Χαρά η ολοκλήρωσή της θα ήταν αδύνατη. Πολλές ευχαριστίες και στην Ελένη Λαγουδάκη για την πολύ μεγάλη προσπάθειά της να συλλέξει όλο αυτό το πολύτιμο βιολογικό υλικό αλλά και για την ενεργό συμμετοχή της στην συλλογή των κλινικών δεδομένων.

Σ' αυτήν την προσπάθεια μου έλαβα σημαντική βοήθεια επίσης από τις Μαρία Τρυπάκη, Ελευθερία Τσακαλάκη και Μαρία Σφακιανάκη, οι οποίες ακούραστα βοήθησαν στην προετοιμασία του βιολογικού υλικού αλλά και μου προσέφεραν σημαντική καθοδήγηση καθ'όλην τη διάρκεια της διενέργειας των πειραμάτων στο εργαστήριο.

Η εργασία αυτή βέβαια κατόρθωσε να φθάσει στην ολοκλήρωσή της με την βοήθεια των στατιστικών του Ευρωπαϊκού Οργανισμού για την έρευνα και θεραπεία του καρκίνου στις Βρυξέλλες (EORTC). Ήταν μια ευχάριστη εμπειρία να εργασθώ μαζί τους και στην προσπάθεια τους' αναλύσουν όλα αυτά τα δεδομένα, μια συνεργασία που πραγματικά με δίδαξε πολλά. Ευχαριστώ θερμά αυτόν τον οργανισμό στον οποίο εργάσθηκα και ο οποίος υποστήριξε επιστημονικά το πέρας της διατριβής μου.

Αν κάτι κέρδισα από όλη αυτή την διαδικασία , είναι η συνεργασία με υπέροχους ανθρώπους , επαγγελματίες στην έρευνα και επιστήμονες που μου προσέφεραν απλόχερα την εμπειρία και την γνώση τους και όλη αυτή η διαδικασία με οδήγησε στο να καταλάβω ότι η συλλογική προσπάθεια είναι αυτή που αποτελεί την πιο σημαντική βάση και θεμελιώδη αρχή

της επιτυχίας στον δύσκολο αυτό δρόμο της έρευνας κατά του καρκίνου.

Δυστυχώς, οι δυσκολίες τις οποίες περνάει η χώρα μας τα τελευταία χρόνια, με ανάγκασαν ν' αναζητήσω εργασία στο εξωτερικό μετά το τέλος της ειδικότητάς μου, όμως όλες οι αρχές τις οποίες διδάχτηκα κατά την διαδικασία της διατριβής μου αλλά και της ειδικότητάς μου σηματοδότησαν τα όσα κατόρθωσα να πετύχω εκτός συνόρων. Είναι σημαντικό οι νέοι γιατροί μας να καταλάβουν, ότι πραγματικά τίποτα δεν πάει χαμένο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τ' αδέρφια μου, που πάντοτε με υποστήριζαν, με συμβούλευαν σε όλες τις δυσκολίες μου και θέλω να τους πω, ότι οι κόποι τους δεν πήγαν χαμένοι και ότι ελπίζω με την διαδρομή μου να κατάφερα να προσφέρω βοήθεια σε κάποιους από τους συνανθρώπους μας που είχαν την οδυνηρή ατυχία να νοσήσουν από καρκίνο. Ένα μεγάλο ευχαριστώ επίσης και σ' ένα μοναδικό και υπέροχο άνθρωπο ο οποίος ήταν πάντα εκεί και έτοιμος να με βοηθήσει όταν το χρειαζόμουν.

Τελειώνοντας θα ήθελα να αφιερώσω αυτή την διατριβή στον μικρό Αλέξανδρο, που ήρθε στη ζωή πριν ένα χρόνο, με την ευχή να είναι λαμπερός και φωτεινός ο δρόμος της ζωής που ανοίγεται μπροστά του.

Όταν μπορείς να μετρήσεις και να εκφράσεις αριθμητικά αυτό για το οποίο μιλάς, τότε γνωρίζεις κάτι γι' αυτό, ενώ όταν δεν μπορείς να το μετρήσεις και να το εκφράσεις αριθμητικά τότε η γνώση σου είναι περιορισμένη και ανεπαρκής

WilliamThompson, Βρετανός Μαθηματικός (1824- 1907)

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ ΥΠΟΨΗΦΙΟΥ ΔΙΔΑΚΤΟΡΑ

Ο Κωνσταντίνος Τρυφωνίδης έλαβε το πτυχίο της ιατρικής από το Πανεπιστήμιο Masaryk στο Βrno της Τσεχίας και την ειδικότητα της παθολογικής ογκολογίας από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Κρήτης - Ηράκλειο. Η ειδίκευσή του έχει την πιστοποίηση της Ευρωπαϊκής Εταιρίας της Ογκολογίας (ESMO) μετά από επιτυχή συμμετοχή του στις εξετάσεις ESMO 2012. Στη συνέχεια, εργάσθηκε στην έδρα του Ευρωπαϊκού Οργανισμού για την Έρευνα και την Θεραπεία του Καρκίνου (EORTC) στις Βρυξέλλες-Βέλγιο ως κλινικός ερευνητής με τις ομάδες του καρκίνου του μαστού και της ογκολογίας των ηλικιωμένων ασθενών, όπου είχε την ευκαιρία να οργανώσει και διαχειριστεί πολυκεντρικές διεθνείς μελέτες φάσης II και III. Η σημαντική συμβολή του ήταν η ολοκλήρωση και η δημοσίευση των αποτελεσμάτων της μελέτης Φάσης III MINDACT, η οποία αξιολόγησε την κλινική χρησιμότητα της υπογραφής των 70 γονιδίων στις θεραπευτικές αποφάσεις στον πρώιμο καρκίνο του μαστού. Παράλληλα με το έργο του στο EORTC ήταν ιατρός και στο Τμήμα Παθολογικής Ογκολογίας στο Ινστιτούτο Jules Bordet, Βρυξέλλες-Βέλγιο, υπό την εποπτεία της καθηγήτριας Prof. Martine Piccart. Έχει συγγράψει και συμμετάσχει σε πάνω από 50 δημοσιεύσεις, συμπεριλαμβανομένων άρθρων σε περιοδικά όπως το NEJM, το LancetOncology, το Annals of Oncology, NatureReviewsClinicalOncology και παρουσίασε δικές του εργασίες σε διεθνή συνέδρια ογκολογίας. Είναι πλήρες μέλος της Αμερικάνικης Εταιρίας Κλινικής Ογκολογίας (ASCO), της Ευρωπαϊκής

Εταιρίας της Ογκολογίας(ESMO),της Ελληνικής Εταιρίας Παθολογικής Ογκολογίας (HESMO)και της Βελγικής Ομοσπονδίας Ιατρικής Ογκολογίας (BSMO). Από τον Ιανουάριο του 2018, είναι ιατρικός διευθυντής στο τμήμα κλινικής έρευνας και ανάπτυξης νέων φαρμάκων και είναι υπεύθυνος για το πρόγραμμα ανάπτυξης της ανοσοθεραπείας στο πρώιμο καρκίνο του μαστού, στην φαρμακευτική εταιρία MERCK&CO, με έδρα της Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (ΗΠΑ).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Περίληψη στην αγγλική

2. Περίληψη

A. Γενικό Μέρος

1. Επιδημιολογία του καρκίνου του πνεύμονα
2. Ιστοπαθολογία
3. Παράγοντες κινδύνου
4. Επιβίωση
5. Αντιμετώπιση του μη- μεταστατικού καρκίνου του πνεύμονα
6. Ο ρόλος της επικουρικής χημειοθεραπείας
7. Μοριακά στοχεύουσες θεραπείες
8. Ο ρόλος της φαρμακογενωμικής στον καρκίνο του πνεύμονα
9. Η ετερογένεια του καρκίνου και ο σκοπός της παρούσας διατριβής

B. Ειδικό Μέρος

1. Μέθοδοι
2. Τεχνικές
3. Στατιστική Ανάλυση

Γ. Αποτελέσματα

1. Χαρακτηριστικά Ασθενών
2. Διαφορές έκφρασης μεταξύ πρωτοπαθούς όγκου και περιοχικών λεμφαδένων
3. Γονιδιακή έκφραση στο επίπεδο του πρωτοπαθούς όγκου
4. Γονιδιακή έκφραση στο επίπεδο των λεμφαδένων
5. Επίπτωση στην έκβαση των ασθενών

Δ. Συζήτηση

Ε. Επίλογος

ΣΤ. Παράρτημα Α- Πρωτότυπο δημοσιευμένο άρθρο της συγκεκριμένης διατριβής

Ζ. Παράρτημα Β- Δημοσιεύσεις του υποψήφιου διδάκτορα στα πλαίσια της παρούσας διατριβής και των συναφών ερευνητικών δραστηριοτήτων.

Η. Βιβλιογραφία

ΠΕΡΙΛΗΨΗΣΤΗΝΑΓΓΛΙΚΗ

Differences in gene expression levels between the primary tumors (PTs) and matched regional lymph nodal metastases (LNs) in patients with totally excised non- small cell lung cancer (NSCLC) were explored. Microdissected formalin- fixed paraffin- embedded (FFPE) samples from (PT) and their matched infiltrated LNs, from 239 patients [183 (with matched PT and LNs samples)- case& 56 PT only samples- control cohorts] were analyzed for *BRCA1*, *ERCC1*, *RAP80*, *PKM2*, *RRM1*, *RRM2*, *TS*, *TSP1* and *TXR1* mRNA expression by quantitative real- time polymerase- chain reaction (PCR). Moderately positive correlation between the expression of each gene in the PT and the matched LNs was observed. Concordance rates between the PT and the LNs were: *BRCA1* (67.7%), *ERCC1* (68.4%), *PKM2* (63.4%), *RAP80* (68.8%), *RRM1* (70.9%), *RRM2* (69%), *TS* (72.9%), *TSP1* (69.8%), *TXR1* (63.7%). Expression levels and their differences were correlated with Relapse- Free Survival (RFS) and Overall Survival (OS). High *BRCA1* PT in patients with squamous histology was associated with increased OS ($p= 0.036$). High *TSP1* PT levels were shown to be the only independent prognostic factor for OS and RFS ($p= 0.023$ and $p=0.007$). *PKM2* low levels in both PT and matched LNs were associated with better OS irrespective of the underlying histology ($p= 0.031$). *RRM1* discordant levels between PT and matched LNs were associated with worse OS in squamous tumors ($p= 0.019$) compared to patients with both low expression in PT and LN. *TXR1* high levels in both PT and matched LNs were associated with better OS in patients with squamous tumors ($p= 0.007$). These findings indicate that there is different gene expression between PT and matched LNs which may affect the outcome in early NSCLC and therefore PT's molecular biology should not be the sole determinant for prognostication.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή:

Το πρωτοπαθές καρκίνωμα του πνεύμονα αποτελεί τη συχνότερη αιτία θανάτου από νεοπλασία παγκοσμίως (1). Το μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα, (ΜΜΚΠ) αποτελεί το 85% των καρκινωμάτων του πνεύμονα, με κυριότερους ιστολογικούς υπότυπους το αδenoκαρκίνωμα (ADC, ~48%), το ακανθοκυτταρικό (SCC, ~28%) το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (LCC, ~24%), το μεικτό και τέλος, το αδιαφοροποίητο καρκίνωμα. Παρά τις προσπάθειες για πρώιμη διάγνωση η πλειονότητα των ασθενών με ΜΜΚΠ διαγιγνώσκεται σε προχωρημένο κλινικό στάδιο και έχει φτωχή πρόγνωση. Αν και γενικά συγκαταλέγεται στους συμπαγείς όγκους με μέτρια χημειοευαισθησία και πτωχή πρόγνωση, ο ΜΜΚΠ χαρακτηρίζεται από ετερογένεια στη βιολογική του συμπεριφορά. Δεδομένου ότι στα προχωρημένα στάδια της νόσου ο ρόλος της συστηματικής θεραπείας είναι μόνο ανακουφιστικός, τα επιδιωκόμενα οφέλη (παράταση της επιβίωσης, έλεγχος των συμπτωμάτων και βελτίωση της ποιότητας ζωής) πρέπει να εξισορροπούν την αναμενόμενη τοξικότητα. Αν και τα χημειοθεραπευτικά σχήματα με βάση την πλατίνα έχουν καθιερωθεί στη θεραπεία πρώτης γραμμής, οι μη-πλατινούχοι συνδυασμοί, όπως της γεμισιταβίνης (gemcitabine) με τις ταξάνες, αναγνωρίζονται ως εναλλακτική επιλογή με παρόμοια αποτελεσματικότητα και ευνοϊκότερο τοξικό προφίλ. Η ανταπόκριση του ΜΜΚΠ στα σχήματα αυτά φαίνεται να συσχετίζεται με την έκφραση

συγκεκριμένων γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό ή/και στο μηχανισμό δράσης, σύμφωνα με τα δεδομένα προκλινικών αναδρομικών κλινικών μελετών αλλά και προοπτικών κλινικών δοκιμών. Είναι επομένως, επιτακτική η ανεύρεση αξιόπιστων προβλεπτικών και προγνωστικών μοριακών δεικτών που να επιτρέπουν την εξατομίκευση της θεραπείας στον ΜΜΚΠ, προς όφελος των ασθενών, με παράλληλη μείωση του οικονομικού κόστους. Ένα βασικό ερώτημα αποτελεί αν η γονιδιακή έκφραση μεταβάλλεται ανάλογα με το αν προέρχεται από τον πρωτοπαθή όγκο ή μια μεταστατική εστία. Το ερώτημα αυτό είναι δύσκολο να απαντηθεί αφού θα απαιτούσε τη διενέργεια βιοψιών σε ασθενείς με μεταστατική νόσο χωρίς αναμενόμενο όφελος για αυτούς. Εναλλακτικά μπορεί να απαντηθεί συγκρίνοντας την γονιδιακή έκφραση μεταξύ του πρωτοπαθούς όγκου και των επιχώριων ή μεσοθωρακικών λεμφαδένων κατά το χειρουργείο εκτομής του όγκου που εμφανίζουν διήθηση.

Σκοπός της μελέτης:

Ν' αναζητήσει μεταβολές της έκφρασης, στον πρωτοπαθή όγκο ασθενών και τους επιχώριους και μεσοθωρακικούς λεμφαδένες, γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό ή/και τη δράση χημειοθεραπευτικών που χορηγούνται στο ΜΜΚΠ και να μελετήσει την προγνωστική και προβλεπτική αξία της γονιδιακής έκφρασης στον πρωτοπαθή όγκο και τους διηθημένους λεμφαδένες (επίδραση στην επιβίωση και το διάστημα ελεύθερο νόσου)

Υλικό και μέθοδοι μελέτης:

Η μελέτη διεξήχθη στο Εργαστήριο Βιολογίας του Καρκίνου του Ιατρικού τμήματος του Πανεπιστημίου Κρήτης σε αρχειακό υλικό που έχει ήδη

αρχειοθετηθεί στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του ΠΑ.Γ.Ν.Η., και σε συνδυασμό με τα κλινικά δεδομένα της Παθολογικής Ογκολογικής Κλινικής (Π.ΟΓΚ.) του Νοσοκομείου. Η έρευνα διενεργήθηκε σε κύβους παραφίνης ασθενών που έχουν υποβληθεί σε θεραπευτική χειρουργική επέμβαση για ΜΜΚΠ σταδίων I-IIIΑ με την μέθοδο της qRT-PCR για την ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται με αντίσταση στις κύριες κατηγορίες χημειοθεραπευτικών:

- a. Ταξάνες: *TS, TXR1, TSP1, BRCA1*
- b. Ανάλογα της Πλατίνας: *ERCC1, BRCA1, BRCA2, RAP80, PKM2,*
- c. Gemcitabine: *RRM1, RRM2*

Η ανάλυση έγινε σε καρκινικά κύτταρα μετά την απομόνωση τους από την ιστού με τη χρήση piezo-electric microdissector (Eppendorf). Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης έγινε με τη μέθοδο της ΔΔCT, με τη χρήση ρυθμιστών εμπορικού RNA (από πνεύμονα και ήπαρ) καθώς και RNA κυτταρικής σειράς εμποτισμένης με φορμόλη και εγκλωβισμένη σε παραφίνη, και την έκφραση των γονιδίων *β-ACTIN* και *PGK* σαν εσωτερικό πρότυπο.

Στατιστική ανάλυση:

Ο υπολογισμός της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων έγινε με βάση τη μέση τιμή. Fisher's exact test χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη συγκρίσεων σε πίνακες 2 επί 2 ενώ το χ^2 test για μελέτη συγκρίσεων σε πίνακες μεγαλύτερους από 2 επί 2. Η συσχέτιση της συν-έκφρασης των

διαφόρων γονιδίων έγινε με βάση το Spearman correlation coefficients test. Mann-Whitney-test για τη μελέτη συσχέτισης μεταξύ συνεχών μεταβλητών (π.χ. γονιδιακή έκφραση) και κατηγορικών μεταβλητών (π.χ. φύλλο, αρχικό στάδιο διάγνωσης). Logistic regression ανάλυση έγινε για την ανάδειξη στατιστικώς σημαντικών παραγόντων στην μονοπαραγοντική ανάλυση. Πολυπαραγοντική ανάλυση με Cox's proportional hazards πραγματοποιήθηκε για την ανάδειξη της σημαντικότητας των στατιστικώς σημαντικών παραγόντων στη μονοπαραγοντική ανάλυση σε σχέση με την ανταπόκριση, το διάστημα έως την υποτροπή και την ολική επιβίωση. Το διάστημα ελεύθερο νόσου (έως την υποτροπή) και η συνολική επιβίωση των ασθενών εκτιμήθηκε με τη μέθοδο Kaplan-Meier. Για όλα τα test το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται για $p=0.05$.

Αποτελέσματα:

Δείγματα όγκου και κλινικά δεδομένα από 239 ασθενείς με διαγνωσθέντα ΜΜΚΠ κατά τη διάρκεια των τελευταίων 20 ετών αναλύθηκαν (183 δείγματα πρωτοπαθούς όγκου καθώς και αντίστοιχα δείγματα διηθημένων λεμφαδένων αντιπροσωπεύοντας την πειραματική ομάδα και επιπροσθέτως 56 δείγματα πρωτοπαθούς όγκου χωρίς λεμφαδενική διήθηση αντιπροσωπεύοντας την ομάδα ελέγχου, αντίστοιχα). Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 64 ετών και η μέσος χρόνος παρακολούθησης ήταν τα 8 έτη. Η υψηλή έκφραση *BRCA1* στον πρωτοπαθή όγκο σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα και η χαμηλή έκφραση *TXR1* επίσης στον πρωτοπαθή όγκο σε ασθενείς με μη-πλακώδες καρκίνωμα συσχετίστηκε με αυξημένη ολική επιβίωση (OS) ($p = 0,036$ & $p = 0,04$, αντίστοιχα). Η υψηλή

έκφραση *TSP1* στον πρωτοπαθή όγκο ήταν ο μόνος ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για την ολική επιβίωση αλλά και για το διάστημα ελεύθερο της νόσου (OS / RFS) ($p = 0,023$ / $p = 0,007$ αντίστοιχα). Παρατηρήθηκε γραμμική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης κάθε γονιδίου στον πρωτοπαθή όγκο και στους τοπικοπεριοχικούς λεμφαδένες. Η χαμηλή έκφραση του *PKM2* τόσο σε πρωτοπαθή όγκο όσο και σε τοπικοπεριοχικούς λεμφαδένες συσχετίστηκε με αυξημένη επιβίωση ανεξάρτητα από την υποκείμενη ιστολογία ($p = 0,031$). Διαφορετική έκφραση του *RRM1* σε πρωτοπαθή όγκο και τους τοπικοπεριοχικούς λεμφαδένες συσχετίστηκαν με μειωμένη επιβίωση σε πλακώδεις όγκους ($p = 0,019$) σε σύγκριση με ασθενείς με χαμηλή έκφραση σε πρωτοπαθή όγκο και σε τοπικοπεριοχικούς λεμφαδένες. Η υψηλή έκφραση του *TXR1* τόσο σε πρωτοπαθή όγκο όσο και στους λεμφαδένες σχετίζονται με αυξημένη επιβίωση ($p = 0,007$) αλλά και παρατεταμένο διάστημα ελεύθερο της νόσου ($p = 0,004$) σε πλακώδη ιστολογία του όγκου.

Συμπέρασμα:

Η πολυμορφία στις γονιδιακές εκφράσεις μεταξύ πρωτοπαθούς όγκου και διηθημένων τοπικοπεριοχικών λεμφαδένων μπορεί να επηρεάσει την έκβαση και επιβίωση των ασθενών με χειρουργήσιμο ΜΜΚΠ. Η βιολογία του πρωτοπαθούς όγκου κατά συνέπεια δεν θα πρέπει να θεωρείται ως ο μόνος καθοριστικός προγνωστικός παράγοντας για την έκβαση της νόσου.

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ (ΚΠ)

Ο ΚΠ είναι η κυριότερη αιτία θανάτου από καρκίνου στο Δυτικό κόσμο και εμφανίζει συνεχόμενη αύξηση στις αναπτυσσόμενες χώρες. Υπολογίζεται ότι το 10% των νέων περιπτώσεων κακοήθων νεοπλασιών που διαγιγνώσκονται ετησίως είναι καρκινώματα του πνεύμονα. Το 75% περίπου των νέων ασθενών έχουν τοπικοπεριοχική προχωρημένη ή μεταστατική νόσο με αποτέλεσμα η ριζική εγχείρηση να μην αποτελεί θεραπευτική λύση(SiegelRLetal, 2017).

Σε παγκόσμιο επίπεδο, ο ΚΠ είναι ο συχνότερος καρκίνος όσον αφορά στη διάγνωση νέων περιπτώσεων καρκίνου (1.350.000 νέες περιπτώσεις και 12.4% των συνολικών νέων περιπτώσεων καρκίνου) και η συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο (1.180.000 θάνατοι και 17.6% από τους συνολικούς θανάτους από καρκίνο). Το πενταετές ποσοστό επιβίωσης στις Ηνωμένες Πολιτείες για το ΚΠ είναι 15,6% και παρόλο που έχει σημειωθεί κάποια βελτίωση κατά τις τελευταίες δεκαετίες, η βελτίωση στην επιβίωση που έχουν παρατηρηθεί σε άλλες κακοήθειες, δεν έχει ακόμη επιτευχθεί στον ΚΠ. Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μια μεγάλη σχετική αύξηση του αριθμού των περιπτώσεων ΚΠ στις αναπτυσσόμενες χώρες. Περίπου το ήμισυ

(49,9%) των περιπτώσεων εμφανίζεται τώρα στις αναπτυσσόμενες χώρες, ενώ το 1980 το 69% των περιπτώσεων ήταν σε ανεπτυγμένες χώρες. Ο εκτιμώμενος αριθμός κρουσμάτων ΚΠ παγκοσμίως αυξήθηκε κατά 51% από το 1985 (αύξηση 44% στους άνδρες και αύξηση κατά 76% στις γυναίκες). Στις Ηνωμένες Πολιτείες, ο ΚΠ κατατάσσεται στη δεύτερη θέση στα δύο φύλα, με περίπου 115.060 νέες περιπτώσεις σε άνδρες (14% όλων των νέων καρκίνων) και 106.070 σε γυναίκες (14% όλων των νέων καρκίνων). Το ποσοστό εμφάνισης του ΚΠ είναι 62 ανά 100.000 άνδρες και γυναίκες ετησίως στις Ηνωμένες Πολιτείες, με ποσοστό συχνότητας εμφάνισης υψηλότερο στους άνδρες από ό, τι στις γυναίκες (75.2 έναντι 52.3 ανά 100.000) . Ο αριθμός των εκτιμώμενων θανάτων ετησίως είναι ο υψηλότερος στην λίστα όλων των θανάτων από καρκίνο (85.600 ή 28% όλων των θανάτων από καρκίνο για άνδρες και 71.340 ή το 26% όλων των θανάτων από καρκίνο για γυναίκες)(**Siegel RL et al, 2017 & Dela Cruz C et al, 2011**)

2. ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑ

Ο ΚΠ διακρίνεται σε δύο κυρίως τύπους, το μη- μικροκυτταρικό (ΜΜΚΠ) και το μικροκυτταρικό (ΜΚΠ). Ο ΜΜΚΠ είναι μια ετερογενής ομάδα καρκίνου της οποίας οι βασικοί υπότυποι είναι τα αδενοκαρκινώματα (περίπου 50%), τα καρκινώματα από πλακώδη κύτταρα (περίπου 30- 35%) και μια πιο σπάνια κατηγορία, τα μεγαλοκυτταρικά καρκινώματα (περίπου 5- 10%). Η ταξινόμηση αυτή είναι ένας σημαντικός παράγοντας ώστε να καθοριστεί η θεραπευτική αντιμετώπιση και να δοκιμαστούν νέα φάρμακα

στοχεύουσας θεραπείας δραστικά έναντι συγκεκριμένων στόχων χαρακτηριστικών για κάθε υπότυπο **(JackmanDMetal, 2005)**

Το πλακώδες καρκίνωμα συνδέεται κατά κύριο λόγο με το κάπνισμα και έχει την τάση να εμφανίζεται σε κεντρικά τμήματα του πνεύμονα και εμφανίζεται συχνότερα στους άνδρες. Αντιθέτως τ 'αδενοκαρκινώματα εντοπίζονται συνηθέστερα στην περιφέρεια του πνεύμονα και εμφανίζεται συχνότερα στις γυναίκες. Φαίνεται ότι και οι δυο τύποι καρκινώματος να συσχετίζονται πλέον με το κάπνισμα αν και το πλακώδες φαίνεται να έχει την μεγαλύτερη συσχέτιση **(Beadsmooreetal, 2003, Subramanianetal 2007)**.

3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Το κάπνισμα είναι αιτιολογικά σχετιζόμενο με τον ΚΠ. Το μέγεθος της επίδρασης του καπνίσματος υπερέβαινε κατά πολύ όλους τους άλλους παράγοντες που προκαλούν ΚΠ. Υπολογίζεται ότι ο μέσος καπνιστής είχε περίπου 9/πλάσιο έως 10/πλάσιο κίνδυνο για ανάπτυξη ΚΠ, με τους καπνιστές να έχουν τουλάχιστον 20 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο από τους μη- καπνιστές. Ο Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC) έχει εντοπίσει τουλάχιστον πενήντα (50) καρκινογόνους παράγοντες στον καπνό του τσιγάρου. Οι παράγοντες που φαίνεται να συσχετίζονται ιδιαίτερα με το καρκίνωμα του πνεύμονα είναι οι Ν-νιτροζαμίνες (TSNAs) που έχουν σχηματιστεί με τη νιτροποίηση της νικοτίνης κατά τη διάρκεια της επεξεργασία του καπνού και κατά τη διάρκεια του καπνίσματος. Έχουν περιγραφεί οκτώ TSNAs,

συμπεριλαμβανομένης της 4- (μεθυλο νιτροσαμινο) -1 (3-πυριδυλο) -1-βουτανόνης (NNK), η οποία είναι γνωστό ότι προκαλεί αδenoκαρκίνωμα του πνεύμονα σε πειραματόζωα. Άλλα TSNA έχουν συνδεθεί με καρκίνο του οισοφάγου, της ουροδόχου κύστης, του παγκρέατος, της στοματικής κοιλότητας και του λάρυγγα. Τα TSNA εισέρχονται απευθείας στον πνεύμονα με την εισπνοή του καπνού αλλά και συστηματικά με την αιματογενή απελευθέρωση μέσω της πνευμονικής κυκλοφορίας.

Ένας στους 9 καπνιστές τελικά αναπτύσσει ΚΠ(**Jemal A, et al 2005**). Ο σχετικός κίνδυνος εμφάνισης ΚΠ σε μακροχρόνιους καπνιστές εκτιμάται ότι είναι 10 έως 30 φορές μεγαλύτερος σε σύγκριση με τους μη καπνιστές κατά τη διάρκεια της ζωής(**Mattson ME, et al 1987**). Ο κίνδυνος καρκίνου του πνεύμονα είναι ανάλογος προς τον αριθμό των τσιγάρων και των πακέτων ανά ημέρα, η ηλικία έναρξης του καπνίσματος, ο βαθμός εισπνοής, η περιεκτικότητα των σε πίσσα και νικοτίνη και η χρήση των μη φιλτραρισμένων τσιγάρων. Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι το κάπνισμα καπνού παραμένει ο σημαντικότερος τροποποιησιμος παράγοντας κινδύνου για τον καρκίνο του πνεύμονα(**Shapiro JA, et al 2000**). Έχει υπολογιστεί ότι έως και το 20% όλων των θανάτων από καρκίνο παγκοσμίως θα μπορούσε να προληφθεί με την εξάλειψη του καπνίσματος. Είναι επίσης σαφές ότι η ατομική ευαισθησία είναι ένας παράγοντας καρκινογένεσης. Αν και πάνω από το 80% των καρκίνων του πνεύμονα εμφανίζονται σε άτομα με έκθεση σε καπνό, λιγότερο από το 20% των καπνιστών εμφανίζουν καρκίνο του πνεύμονα(**Pisani P, et al 2002**). Αυτή η μεταβλητότητα στην ευαισθησία του καρκίνου πιθανόν

επηρεάζεται από άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες ή από την γενετική προδιάθεση(**Dela Cruz C, et al 2011**).

Ο όρος, μη καπνιστής, αναφέρεται σε άτομα που έχουν καπνίσει λιγότερο από 100 τσιγάρα κατά την διάρκεια της ζωής τους, συμπεριλαμβανομένων των εντελώς μη καπνιστών. Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν στην τάση των ποσοστών καρκίνου του πνεύμονα περιλαμβάνουν συχνά και τους καπνιστές και τους μη καπνιστές και λίγες μελέτες μελετούν τα ποσοστά εμφάνισης ΚΠ για τους μη καπνιστές, λόγω της περιορισμένης συλλογής και αξιοπιστίας των πληροφοριών σχετικών με το κάπνισμα σε πληθυσμιακά μητρώα. Ωστόσο, από τα διαθέσιμα στοιχεία, τα συνολικά στατιστικά στοιχεία σε παγκόσμιο επίπεδο εκτιμούν ότι το 15% των ΚΠ στους άνδρες και έως και το 53% στις γυναίκες δεν οφείλονται στο κάπνισμα (**ParkinDM, et al 2002**). Ο καρκίνος στους μη καπνιστές αν εξεταζόταν χωριστά, θα ήταν η έβδομη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως πριν από τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, του παγκρέατος και του προστάτη (**RudinCM, et al 2009**). Άλλες μελέτες έχουν επίσης δείξει μια σχέση μεταξύ του ΚΠ και του οικογενειακού ιστορικού, ένα εύρημα που υποδεικνύει το ρόλο των γενετικών παραγόντων. Μελέτη περιπτώσεων ΚΠ έδειξαν 25% επιπλέον κίνδυνο για καρκίνο σε συγγενείς πρώτου βαθμού με περιπτώσεις ΚΠ. Δεν έχουν εντοπιστεί ειδικοί γενετικοί παράγοντες σε αυτές τις μελέτες. Ωστόσο, μερικές μελέτες υποδεικνύουν το ρόλο του μονοπατιού του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), του ανθρώπινου γονιδίου επιδιόρθωσης (hMSH2) και των διαφόρων κυτοχρώμων όπως του P450 και των ενζύμων της γλουταθειόνης-S-τρανσφοράσης(**BellDW, et al 2005 &WenzlaffASetal2005**

&WenzlaffAS, CoteML, BockCH, etal. 2005&JungCY, etal2006 &PaoW,etal. 2004&ShigematsuH, et al 2005).

Άλλους παράγοντες κινδύνου αποτελούν η μόλυνση της ατμόσφαιρας, οι προϋπάρχουσες παθήσεις των πνευμόνων όπως η φυματίωση, οι υψηλές δόσεις ακτινοβολίας και η έκθεση σε βιομηχανικά ή χημικά καρκινογόνα όπως η άσβεστος, το πυρίτιο και το αρσενικό (**Wakeleeetal 2007, Billelloetal 2002**).

4. ΕΠΙΒΙΩΣΗ

Η πρόγνωση των ασθενών με ΚΠ παραμένει φτωχή. Είναι κοινώς αποδεκτό ότι σχεδόν όλοι οι ασθενείς που διαγιγνώσκονται με ΚΠ πεθαίνουν από την συγκεκριμένη νόσο. Ένας κύριος λόγος είναι η διάγνωση σε προχωρημένο στάδιο όταν οι θεραπευτικές επιλογές είναι περιορισμένες (**Koyi et al 2002, Salomaa et al 2005**). Παρά τις πτωτικές ή σταθεροποιητικές τάσεις στον ΚΠ και την πληθώρα νέων φαρμάκων, οι ειδικοί προβλέπουν ότι ο ΚΠ θα συνεχίσει να είναι η κύρια αιτία θανάτου και εκτιμάται ότι μέχρι το 2030, ο ΚΠ θα αποτελεί την 6^η αιτία θανάτου από την 9^η που βρίσκεται τώρα.

5. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΜΗ- ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟΥ ΚΠ

Για τους σκοπούς αυτής της διατριβής θα επικεντρωθούμε στην θεραπεία του τοπικοπεριοχικού (μη- μεταστατικού) καρκίνου του πνεύμονα I- IIIA.

Η θεραπεία του ΚΠ βασίζεται στη γνώση της έκτασης της νόσου και του ιστολογικού τύπου του. Η χειρουργική αντιμετώπιση για τον ΜΚΠ είναι για πολύ επιλεγμένους ασθενείς με πολύ περιορισμένη νόσο, αλλά αποτελεί

την καθιερωμένη επιλογή για ασθενείς με ΜΜΚΠ αρχικού σταδίου. Έτσι γενικά μπορούμε να αναφέρουμε ότι ενώ η αρχική θεραπεία για τον ΜΜΚΠ είναι η χειρουργική, για τον μικροκυτταρικό είναι συνήθως η μέγιστη δόση συνδυασμένης χημειοθεραπείας με διάφορα φάρμακα.

Στον ΜΜΚΠ τα αποτελέσματα της βασικής θεραπείας είναι συνήθως πτωχά στη μεγάλη πλειοψηφία των ασθενών. Αν και η χειρουργική είναι η κύρια θεραπευτική επιλογή στους ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο, η χημειοθεραπεία μαζί με την ακτινοθεραπεία εφαρμόζεται σε πολύ λίγους ως ανακουφιστική επιλογή. Σε προχωρημένο στάδιο νόσου, η χημειοθεραπεία προσφέρει μέτρια βελτίωση στη μέση επιβίωση, η συνολική επιβίωση είναι πτωχή, ενώ έχει αναφερθεί ότι προσφέρει μικρής διάρκειας βελτίωση των συμπτωμάτων της νόσου.

Στάδιο I ΜΜΚΠ (T1N0M0, T2N0M0)

Η χειρουργική αφαίρεση είναι η θεραπεία εκλογής των ασθενών με καρκίνο αυτού του σταδίου. Η άμεση μετεγχειρητική θνησιμότητα είναι ανάλογη με την ηλικία. Ασθενείς με ελαττωμένη πνευμονική λειτουργία μπορούν να υποβληθούν σε τμηματική ή σφηνοειδή εκτομή του πρωτοπαθούς όγκου, σε μια όμως μελέτη της ομάδας μελέτης του καρκίνου του πνεύμονα (Lungcancerstudygroup), οι ασθενείς με λοβεκτομή είχαν μείωση της τοπικής υποτροπής, σε σχέση με αυτούς που έκαναν τμηματεκτομή ή σφηνοειδή εκτομή, αλλά χωρίς καμία σημαντική διαφορά στη συνολική επιβίωση (GinsbergRJ, etal1995, &WarrenWHetal 1994).

Στάδιο II ΜΜΚΠ (T1N1M0)(T2N1M0)(T3N0M0)

Η χειρουργική είναι η θεραπεία εκλογής ασθενών με στάδιο II ΜΜΚΠ. Πολλοί ασθενείς, μετά από χειρουργική θεραπεία, εμφανίζουν τοπικές ή απομακρυσμένες μεταστάσεις. Μια μετα-ανάλυση 9 τυχαιοποιημένων μελετών αξιολογώντας τη μετεγχειρητική ακτινοβολία έναντι της χειρουργικής θεραπείας μόνο, έδειξε μείωση κατά 7% της ολικής επιβίωσης σε ασθενείς σταδίου I, II με τη συμπληρωματική ακτινοθεραπεία (PORT Meta-analysis Trialists Group, 1998). Μια κλινική μελέτη που συνέκρινε τη μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία σε συνδυασμό αυτής με πλατίνα και ετοποσίδη δεν έδειξε κανένα πλεονέκτημα στο διάστημα ελεύθερο νόσου ούτε στη συνολική επιβίωση (Keller S Metal, 2000). Με βάση αυτά τα δεδομένα η συμπληρωματική θεραπεία δεν αποτελεί καθιερωμένη κλινική πρακτική (Vlastos F. 2004).

Στάδιο IIIA ΜΜΚΠ (T1N2M0), T2N2M0, T3N1M0, T3N2M0)

Οι βασικότεροι τύποι θεραπείας για τον τύπο IIIA, είναι η ακτινοθεραπεία, η χημειοθεραπεία και η χειρουργική καθώς και συνδυασμοί αυτών. Η προσθήκη χημειοθεραπείας στην ακτινοθεραπεία αποδείχθηκε ότι βελτιώνει την επιβίωση σε προοπτικές κλινικές μελέτες με χημειοθεραπευτικά σχήματα βασισμένα στη πλατίνα (Sause WT et al 1995). Μια μετανάλυση συνολικά 11 τυχαιοποιημένων μελετών έδειξαν ότι η χημειοθεραπεία με πλατίνα μαζί με ακτινοθεραπεία μειώνει περίπου κατά 10% την πιθανότητα θανάτου σε σύγκριση με την ακτινοθεραπεία μόνο (Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from randomized clinical trials.

ameta-
analysis using updated data on individual patients from
52
Non-

smallCellLungCancerCollaborativeGroup1995). Η χρήση προεγχειρητικής χημειοθεραπείας (neo-adjuvant) έδειξε ότι είναι αποτελεσματική σε 2 τυχαιοποιημένες μελέτες 120 ατόμων σταδίου IIIA(**RosellR, etal 1994 &RothJA, 1994**). Παρόλο που οι περισσότερες αναδρομικές μελέτες δείχνουν ότι η μετεγχειρητική θεραπεία μπορεί να βελτιώσει την τοπική εξέλιξη ασθενών των οποίων ο όγκος αφαιρέθηκε, είναι αμφίβολο αν μπορεί να βελτιώσει την επιβίωση(**EmamiB et al 1997 &SawyerTE, 1997**). Επίσης, η μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία μόνον, σε σύγκριση με ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία με ετοποσίδη και πλατίνα δεν παρουσίασε διαφορά στη συνολική επιβίωση ή στο διάστημα χωρίς νόσο με τη συνδυασμένη θεραπεία (**KellerSM et al 2000**).

Όγκοκορυφής του πνεύμονος(T3N0(N1)M0)

Πρόκειται για τοπικά διηθητικούς όγκους με μειωμένη τάση για μακρινές μεταστάσεις. Σε αυτούς τους όγκους η τοπική θεραπεία έχει θεραπευτικές δυνατότητες ειδικά για T3N1. Προεγχειρητική χημειοθεραπεία με ακτινοθεραπεία συνοδευόμενη από χειρουργική εξαίρεση μπορεί να έχει πολύ καλά αποτελέσματα(**RuschVW et al 2001**).

6. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΕΠΙΚΟΥΡΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ

Η συνηθέστερη αποτυχία μετά από ενδεχομένως θεραπευτική χειρουργική εκτομή είναι η ανάπτυξη απομακρυσμένων μεταστάσεων και έτσι ένας αριθμός τυχαιοποιημένων δοκιμών έχουν αξιολογήσει τον ρόλο της επικουρικής χημειοθεραπείας μετά από χειρουργική εκτομή όπου μια συγκεντρωτική ανάλυση αυτών των δοκιμών έδειξε 5,4% απόλυτο όφελος επιβίωσης σε 5 έτη(**PignonJP, etal 2008**). Αν και για το στάδιο I η αξία της

επικουρικής χημειοθεραπείας είναι αμφιλεγόμενη και με βάση τα μέχρι τώρα δεδομένα φαίνεται ότι έχει δυσμενή επίδραση για τους ασθενείς σταδίου IA σε σύγκριση με το στάδιο IB, η αξία της επικουρικής χημειοθεραπείας στους όγκους σταδίου II και III είναι πιο καλά αποδεδειγμένη (**Douillard JY, et al 2006;7(9):719-727**). Δεδομένου ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στην αποτελεσματικότητα μεταξύ των διαφόρων χημειοθεραπευτικών σχημάτων στην προχωρημένη νόσο, πολλοί ογκολόγοι χορηγούν στην πρώιμη νόσο φάρμακα τρίτης γενεάς, όπως η πεμετρεξίδη, η δοσεταξέλη και η γεμισιταβίνη σε συνδυασμό με σισπλατίνη, παρά την έλλειψη αποδείξεων επιπέδου I.

7. ΜΟΡΙΑΚΑ ΣΤΟΧΕΥΟΥΣΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ ΣΤΟΝ ΚΠ

Η κατανόηση της μοριακής παθογένειας του ΚΠ έχει οδηγήσει σε μια ευρεία ανάπτυξη στοχευμένων παραγόντων που μπορούν να αποτελέσουν ελπιδοφόρα αλλαγή στην πρόγνωση της νόσου. Ο αναστολέας του υποδοχέα της τυροσινικής κινάσης (erlotinib and gefitinib) αλλά και το crizotinib, ένας αναστολέας της ALK-κινάσης, έδειξαν θεαματικά αποτελέσματα στην μεταστατική νόσο (**Kwak E L et al 2010 & Shaw A T et al. 2013 & Peters S, et al 2017 & Thatcher, N. et al., 2005**). Ο ρόλος τους όμως στην πρώιμη νόσο παραμένει υπό αμφισβήτηση. Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαπενταετίας, μια πλειάδα δεδομένων από το μοριακό προφίλ του ΚΠ οδήγησε στον εντοπισμό νέων ογκογενετικών μονοπατιών και συνεπώς στην ανακάλυψη νέων πιθανών στόχων που έχουν μετατρέψει τη θεραπεία του ΚΠ σε μια εξατομικευμένη προσέγγιση (**Rikova K et al., 2007**). Στην

πραγματικότητα, όταν η γνώση συγκεκριμένων γενετικών αλλαγών συνδέεται με μια στοχεύουσα θεραπεία, μπορούν να παρατηρηθούν δραματικές βελτιώσεις στην ανταπόκριση και το κλινικό όφελος χωρίς οποιαδήποτε απαιτούμενη αρχική θεραπεία με κυτταροτοξική χημειοθεραπεία. Τα πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα των δοκιμών που περιλάμβαναν τέτοια φάρμακα μας φέρνουν ένα βήμα πιο κοντά στον εξατομικευμένο ΚΠ, στον οποίο οι ασθενείς δεν αντιμετωπίζονται εμπειρικά με κυτταροτοξική χημειοθεραπεία αλλά με στοχευμένους παράγοντες διαμορφωμένους στο βιολογικό (γενετικό) προφίλ των όγκων. Για παράδειγμα, η χορήγηση τέτοιων φαρμάκων σε όγκους με γνωστές μοριακές αλλαγές ήταν ο στόχος της ευρέως διαδεδομένης μελέτης φάσης II που ονομάστηκε BATTLE. Αυτή η δοκιμή χρησιμοποίησε ένα προσαρμοστικό σχεδιασμό τυχαιοποίησης (adaptive randomization design) για να ταιριάξει τέσσερα φάρμακα με συγκεκριμένες μοριακές υπογραφές ή βιοδείκτες. Οι πρώτοι 97 ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν σε ένα από τα τέσσερα όπλα erlotinib, vandetanib, erlotinib συν bezarotene και sorafenib. Καθώς η μελέτη προχώρησε, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν προσαρμοστική τυχαιοποίηση για να ενσωματώσουν δεδομένα βιοδεικτών από τα προηγούμενα δείγματα όγκων και να καθοδηγήσουν την περαιτέρω εισαγωγή ασθενών σε ένα από τα θεραπευτικά σκέλη. Το 46% των ασθενών στη μελέτη είχε έλεγχο της νόσου σε 8 εβδομάδες σε σύγκριση με το 30% των ιστορικών ελέγχων και τα δεδομένα έδειξαν ότι οι ασθενείς με συγκεκριμένη μετάλλαξη ανταποκρίθηκαν καλύτερα στο αντίστοιχο φάρμακο-στόχος σε σχέση με τα άλλα τρία σχήματα (KimES et al, 2011). Ωστόσο, πολλές δοκιμές απέτυχαν

να επιδείξουν όφελος από συγκεκριμένους στοχευμένους παράγοντες ενώ άλλες μελέτες εξέτασαν διαφορετικές στοχεύουσες θεραπείες χωρίς συγκεκριμένους προγνωστικούς βιοδείκτες.

8. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΩΜΙΚΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Η φαρμακογενωμική στοχεύει στην πρόβλεψη της ανταπόκρισης ενός συγκεκριμένου όγκου στην θεραπεία μ' ένα συγκεκριμένο φάρμακο με βάση την μοριακή βιολογία του. Εξελίξεις τα τελευταία χρόνια έχουν δείξει ότι τα αδενοκαρκινώματα έχουν γενωμικές αλλαγές με βάση τις οποίες μπορούν να υποκατηγοριοποιηθούν σε μοριακούς υπότυπους με κλινική σημασία. Αυτοί οι υπότυποι αν και είναι όμοιοι μορφολογικά έχουν την ιδιαιτερότητα να φέρουν μια μετάλλαξη, η οποία είναι υπεύθυνη για την εξέλιξη του όγκου. Για παράδειγμα, οι όγκοι που φέρουν μεταλλάξεις του *EGFR*, είναι αυτοί που παρουσιάζουν ευαισθησία στους αναστολείς της τυροσινικής κινάσης (**Thatcher, N. et al., 2005**). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι και μ' ένα μόνο γονίδιο, οι όγκοι μπορούν να ταξινομηθούν σε περαιτέρω κατηγορίες ανάλογα με τις τροποποιήσεις του συγκεκριμένου γονιδίου, για παραδειγμά οι απαλείψεις στο εξόνιο 19 και οι σημειακές μεταλλάξεις στο εξόνιο 21 (L858R) του *EGFR* προσδίδουν ευαισθησία στους *EGFR* TKIs (αναστολείς της τυροσινικής κινάσης του *EGFR*) , ενώ οι προσθήκες στο εξόνιο 20 προσφέρουν πρωτογενή αντίσταση (**WuSG et al, 2008**).

Άλλα γονίδια σχετιζόμενα με την επιδιόρθωση του DNA, όπως το *ERCC1* και το *BRCA1*, συντελούν στην εκλεκτική αντίσταση στην πλατίνα και τις ταξάνες. Πολυμορφισμοί σ' αυτά τα γονίδια μπορούν να εξελιχθούν σε σημαντικούς προβλεπτικούς δείκτες της επιβίωσης σε ορισμένα

χημειοθεραπευτικά σχήματα βασισμένα στην πλατίνα(Papadaki C, et al 2012).

Το *BRCA1* είναι ένα άλλο γονίδιο που παίζει σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση της βλάβης του DNA. Χαμηλά επίπεδα της έκφρασης *BRCA1* επιφέρουν αυξημένη ευαισθησία σε πλατινούχα σκευάσματα και αντίσταση στα αντι- μικροσωληναριακά φάρμακα όπως η πακλιταξέλη, η δοσεταξέλη και η βινoreλμπίνη, ενώ υψηλά επίπεδα έκφρασης οδηγούν σε αντίσταση στην πλατίνη, την ετοποσίδη και ευαισθησία στην πακλιταξέλη, δοσεταξέλη και βινoreλμπίνη(Quinn JE et al, 2003 & Lafarge S et al 2001). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι άρση της λειτουργίας του *BRCA1* οδηγεί σε αντίσταση στα αντι- μικροσωληναριακά φάρμακα και η ρύθμιση προς τα κάτω της έκφρασης μεσολαβεί στην αντίσταση στην πακλιταξέλη, μέσω απενεργοποίησης της λειτουργίας της ατράκτου σε MCF-7 κύτταρα μέσω της ρύθμισης προς τα κάτω του BubR1 (Chabaliere C, et al 2006).

Αυτά τα ευρήματα καταλήγουν ότι οι ασθενείς με υψηλά επίπεδα *BRCA1* θα μπορούσαν ν' απαντήσουν καλύτερα όχι σε πλατινούχα σχήματα αλλά σε αντιμικροσωληναριακά φάρμακα. Αν και η γεμισιταμπίνη είναι ένα ουδέτερο φάρμακο για την δράση του *BRCA1*, παρατηρήθηκε ότι υψηλές τιμές *BRCA1* σχετίζονται με υψηλά επίπεδα *RRM1*, που είναι ένας από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς αντίστασης στην γεμισιταμπίνη. Σε μια μελέτη συσχέτισης της έκφρασης των *RRM1* και *BRCA1* με την κλινική έκβαση σε ασθενείς με πρώιμο στάδιο ΜΜΚΠ, οι ασθενείς ταξινομήθηκαν ανάλογα με την γονιδιακή έκφραση σε τέσσερις κατηγορίες: σε αυτούς που παρουσίασαν υψηλά επίπεδα και στα δύο γονίδια, υψηλά επίπεδα

του ενός ή του άλλου και χαμηλά επίπεδα και στα δύο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μόνο οι ασθενείς με υψηλή έκφραση και στα δύο είχαν στατιστικά σημαντικά καλύτερο διάστημα ελεύθερο νόσου και ολικής επιβίωσης (**ZhongZhengetal , 2007**). Η αντίσταση στη γεμισιταμίνη έχει συσχετισθεί τόσο με την υπερέκφραση του γονιδίου *RRM1* όσο και με την *RRM2* και συχνά παρατηρείται μειωμένη έκφραση του mRNA (miRNA) let-7 σε NSCLC και οδηγεί συχνά σε υπερέκφραση *RRM1* και *RRM2*(**Takamizawa J, et al 2004 &JohnsonCD, etal2007 &DavidsonJD et al 2004 &GoanYG, etal1999**). Τέλος η αντοχή στις ταξάνες μπορεί να οφείλεται και στο γονίδιο 1 της ανθεκτικότητας στην ταξόλη (*TXR1*), έναν προ- αποπτοτικό παράγοντα, ο οποίος φαίνεται να παρεμποδίζει την απόπτωση που προκαλείται από τις ταξάνες μέσω της γλυκοπρωτεΐνης θρομβοσπονδίνης (*TSP1*) (**Lih CJ, et al 2006 &LawlerJ. 2002**).

9. Η ΕΤΕΡΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΚΑΙ ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Πολλές μελέτες σε διάφορους τύπους όγκων έχουν μελετήσει την γενετική τους ετερογένεια. Η ετερογένεια στο εσωτερικό του όγκου αναφέρεται σε διαφορές είτε μεταξύ διαφορετικών περιοχών στον πρωτογενή όγκο, μεταξύ δύο διαφορετικών μεταστατικών βλαβών ή μεταξύ του πρωτεύοντος όγκου και της μεταστατικής βλάβης, και ως εκ τούτου έχει βαθιές κλινικές συνέπειες. Τα δεδομένα αποδεικνύουν ότι η εξέλιξη του όγκου ακολουθεί τους νόμους της *δαρβινικής εξέλιξης*, όπου οι ξεχωριστοί κλώνοι των κυττάρων που δημιουργούν τους όγκους, φέρουν διάφορες γενετικές μεταλλάξεις και κατα συνέπεια δημιουργούνται διαφορετικοί πληθυσμοί καρκινικών κυττάρων οι οποίοι αλληλεπιδρούν με

ανταγωνιστικούς ή μερικές φορές με αμοιβαίους τρόπους όσον αφορά την εξέλιξη της νόσου. Η συνδυασμένη επίδραση της γενετικής και της επιγενετικής αστάθειας αλλά και των διαφορικών εκλεκτικών πιέσεων που δημιουργεί το μικροπεριβάλλον και οι διαφορετικές θεραπευτικές παρεμβάσεις, δημιουργούν πολλά και διαφορετικά εξελικτικά ογκογενετικά μονοπάτια, οδηγώντας σε αυτό που αποκαλείται ετερογένεια του όγκου. Έτσι, αντί να θεωρούμε ότι ο κάθε ασθενής με καρκίνο πάσχει από έναν τύπο όγκου, ίσως αξίζει να θεωρηθεί ότι ο κάθε ασθενής φιλοξενεί πολλαπλές γενετικά διακριτές κακοήθειες που μπορεί να τις καταστήσουν ανθεκτικές σε συγκεκριμένες συστηματικές θεραπείες που στοχεύουν στον γενικότερο πληθυσμό των κυττάρων που δημιουργούν τον όγκο. Πολλές αναλύσεις είτε με κλασικές κυτταρογενετικές μεθόδους, αλλά και πιο πρόσφατα με πιο εξελιγμένες μεθόδους, έχουν δημιουργήσει αναμφισβήτητες ενδείξεις αυτού του φαινομένου (**Charlotte KYNg et al, 2012**). Ο αντίκτυπος της ετερογένειας του καρκίνου στην απόκριση και η αντίσταση στη θεραπεία αρχίζει όμως πλέον να γίνεται κατανοητός και η αντιμετώπιση της μπορεί να βοηθήσει τους κλινικούς να οριοθετήσουν το μοριακό υπόβαθρο του καρκίνου προς μια προηγμένη εξατομικευμένη θεραπεία. Σήμερα, η εισαγωγή τεχνολογιών υψηλής απόδοσης, όπως το NextGeneration Sequencing (NGS), επιτρέπει πιο λεπτομερή διερεύνηση της βιολογίας αρκετών τύπων όγκων. Καθώς η ετερογένεια έχει συνέπειες στο επίπεδο λήψης αποφάσεων, απαιτεί την εφαρμογή καινοτόμων προσεγγίσεων για την καλύτερη βελτιστοποίηση της θεραπευτικής προσέγγισης του καρκίνου (**Zardavas D et al, 2015**). Με βάση το πιο πάνω σκεπτικό αποφασίσαμε να διενεργήσουμε αυτή την μελέτη με σκοπό να

μελετήσουμε τις διαφορές όσον αφορά στην έκφραση εννέα γονιδίων που σχετίζονται με την δράση κλασσικών χημειοθεραπευτικών φαρμάκων μεταξύ διαφορετικών εστιών νόσου σε ασθενείς με πρώιμο ΜΜΚΠ.

Πιο συγκεκριμένα, η παρούσα διατριβή είναι μια συσχέτιση κλινικών και εργαστηριακών αποτελεσμάτων με στόχους:

α) Ν' αναζητήσει μεταβολές της έκφρασης, στον πρωτοπαθή όγκο ασθενών και τους επιχώριους και μεσοθωρακικούς λεμφαδένες, γονιδίων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό ή/και τη δράση χημειοθεραπευτικών που χορηγούνται στο ΜΜΚΠ με την χρησιμοποίηση της μεθόδου της qRT-PCR για την ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται με αντίσταση στις κύριες κατηγορίες χημειοθεραπευτικών:

a. Ταξάνες: *TXR1, TSP1, BRCA1*

b. Ανάλογα της Πλατίνης: *ERCC1, BRCA1, RAP80, PKM2*

c. Gemcitabine: *RRM1, RRM2*

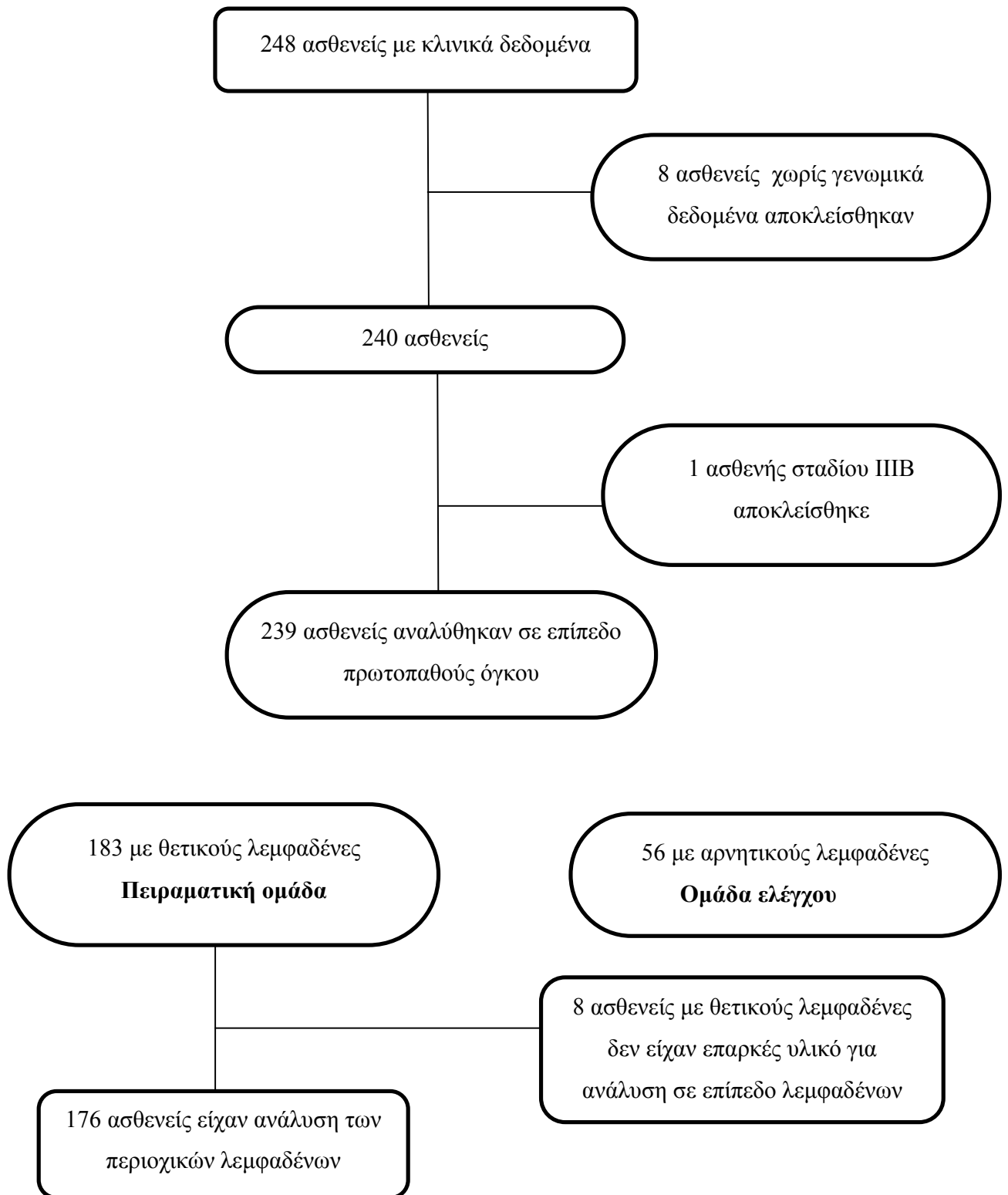
β) Να μελετήσει την προγνωστική και προβλεπτική αξία της γονιδιακής έκφρασης στον πρωτοπαθή όγκο και τους διηθημένους λεμφαδένες συσχετίζοντας δεδομένα όσον αφορά την επιβίωση των ασθενών με τα ευρήματα της γονιδιακής έκφρασης τόσο σε επίπεδο πρωτοπαθούς όγκου όσο και σε επίπεδο διηθημένων λεμφαδένων (επίδραση στην επιβίωση, τη δραστηριότητα της θεραπείας και το διάστημα ελεύθερο νόσου).

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΜΕΘΟΔΟΙ

Συμπεριλήφθηκαν συνολικά 239 ασθενείς με χειρουργήσιμο ΜΜΚΠ που διαγνώστηκαν κατά την διάρκεια της 20 ετίας 1993 με 2013 στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου Κρήτης. Όλοι οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε πλήρη χειρουργική αφαίρεση του πρωτοπαθούς όγκου και των σύστοιχων λεμφαδένων . Στη συνέχεια, οι ασθενείς με στάδιο IB-IIIΑ έλαβαν επικουρική χημειοθεραπεία με πλατινούχο συνδυασμό(4 κύκλοι βινορελβίνη ή πακλιταξέλη σε συνδυασμό με σισπλατίνη ή καρβοπλατίνη) ενώ επικουρική ακτινοθεραπεία χορηγήθηκε σε ασθενείς με νόσο σταδίου IIIΑ. Ένα σύνολο 183 δειγμάτων πρωτοπαθούς όγκου με τους αντίστοιχα διηθημένους λεμφαδένες και 56 δείγματα πρωτοπαθούς όγκου χωρίς διηθημένους λεμφαδένες χρησιμοποιήθηκαν ως η πειραματική ομάδα και η ομάδα ελέγχου, αντίστοιχα. Χρησιμοποιήθηκε αρχειακό υλικό από τον πρωτοπαθή όγκο και των περιοχικών λεμφαδένων. Το υλικό αξιολογήθηκε στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου και επιλέχθησαν οι κύβοι παραφίνης που ήταν πιο αντιπροσωπευτικοί για τον όγκο από εξειδικευμένο παθολογοανατόμο (Ε. Λαγουδάκη). Οι ιατρικοί φάκελοι των ασθενών χρησιμοποιήθηκαν για τη συλλογή των κλινικών χαρακτηριστικών.

CONSORT ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ



2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ- ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Ι. ΧΡΩΣΗ ΑΙΜΑΤΟΞΥΛΙΝΗΣ- ΗΩΣΙΝΗΣ

Η χρώση αιματοξυλίνης – ηωσίνης χρησιμοποιείται για τον χρωματισμό ιστολογικών τομών παραφίνης που έχουν δημιουργηθεί με την βοήθεια ειδικού μικροτόμου και πραγματοποιείται με την χρησιμοποίηση δύο επιμέρους χρωστικών, της αιματοξυλίνης και της ηωσίνης. Πρόκειται για χρωστικές που περιέχουν αρωματικούς δακτυλίους και έχουν την ιδιότητα να απορροφούν φωτόνια σε συγκεκριμένα μήκη κύματος αφήνοντας ελεύθερα τα υπόλοιπα φωτόνια τα οποία διαπερνώντας τα μόρια αυτά προσδίδουν χαρακτηριστικό χρώμα. Η αιματοξυλίνη προσδίδει ένα έντονο μωβ- μπλέ χρώμα όταν δεσμεύεται από τα βασεόφιλα/ όξινα μέρη του κυττάρου όπως τον πυρήνα, ενώ η ηωσίνη δεσμεύεται από τα οξεόφιλα/ βασικά μέρη προσδίδοντας ένα ιώδες- ερυθρό χρώμα στις υπόλοιπες κυτταρικές δομές. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να εντοπισθούν οι μη φυσιολογικές κητταρικές δομές και να διαχωρισθούν τα καρκινικά από τα μη καρκινικά τμήματα.

Μεθοδολογία- Μέσα σε προθερμασμένο κλίβανο θερμοκρασίας 50- 55°C τοποθετούνται αντικειμενοφόροι με τις τομές παραφίνης για διάστημα 6- 10 λεπτών. Στην συνέχεια ακολουθεί το στάδιο της ενυδάτωσης με διαδοχικές εμβάπτισης σε φθίνουσες συγκεντρώσεις αιθανόλης (100% αρχικά για 1 λεπτό, 95% μετά για 30 δευτερόλεπτα και 70% για άλλα 30 δευτερόλεπτα) αφού πρώτα οι δομές εμβάπτιστούν σε ξυλόλη (για 6 λεπτά). Τελικώς γίνεται ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό (0% σε αιθανόλη). Στην συνέχεια πραγματοποιείται εμβάπτιση σε αιματοξυλίνη για 30 δευτερόλεπτα. Ακολουθεί ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό και εμβάπτιση

στην ηωσίνη για 1 λεπτό και ακολουθεί εμβάπτιση σε διαδοχικές φθίνουσες συγκεντρώσεις αιθανόλης (95% για 90 δευτερόλεπτα και 100% για 30 δευτερόλεπτα). Ακολουθεί διαύγαση με εμβάπτιση σε ξυλόλη για 2 λεπτά. Οι τομές ακολουθώντας στεγνώνουν και τοποθετούνται στις καρτέλες μεταφοράς τους για την παρατήρησή τους και απομόνωση επιθυμητών δομών με την βοήθεια μικροσκοπίου micro- dissector.

II. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ- Αυτό γίνεται με την βοήθεια ανεστραμμένου μικροσκοπίου και την χρήση πιεζο- ηλεκτρικού- microdissector (Erpendorf). Ο μικροτόμος αυτός φέρει δύο βραχίονες, εκ των οποίων ο ένας φέρει νυστερίδιο και ο άλλος φέρει ρύγχος αναρρόφησης. Ο χειριστής μέσω μικροχειριστηρίων επιλέγει και απομονώνει τα καρκινικά κύτταρα με το νυστερίδιο και τα αναρροφά με το ρύγχος. Τα κύτταρα που απομονώνονται συλλέγονται σε σωληνάρια τύπου Erpendorf για να αποπαραφινωποιηθούν ως εξής: Τα τοποθετημένα σε αιθανόλη δείγματα, φυγοκεντρώνται σε 10,000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρείται για ν' ακολουθήσει μια πλύση με απόλυτη (100%) αιθανόλη. Τα δείγματα αναδεύονται και φυγοκεντρώνται για 5 λεπτά σε 10,000 rpm στους 4°C. Η αιθανόλη αφαιρείται και ακολουθεί ένας τελικός κύκλος φθογοκέντρωσης ώστε ν' απομονωθεί η κυτταρική πελέτα.



III. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΥΣΗ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗ ΠΕΨΗ- Προκειμένου να γίνει αυτή η διαδικασία χρησιμοποιείται ένα ειδικό διάλυμα λύσης και μια ενζυμική πρωτεΐνάση. Στα σωληνάρια που περιέχουν τα κύτταρα προς λύση προστέθηκαν 400 μl από το διάλυμα λύσης και κατόπιν 30 μl πρωτεΐνάσης (10 mg/ ml). Στην συνέχεια έγινε τοποθέτηση των δειγμάτων στην θερμική συσκευή για επώαση (overnight) σε θερμοκρασία 60°C με ανάδευση για την διευκόλυνση της πλήρους ενζυμικής λύσης.



IV. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ RNA- Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε TrizolLS, ένα μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης. Αρχικά τα λυμένα από το ένζυμο της πρωτεΐνάσης κύτταρα καθαρίστηκαν μετά από φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε 12,000 rpm στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέγεται σε σωληνάρια 2 ml. Προστίθεται όγκος TrizolLS 1200 μl και τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 5 λεπτά. Ακολούθως προστίθεται χλωροφόρμιο σε αναλογία 0.2 ml χλωροφόρμιο/ 1 ml TrizolLS και τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 3 λεπτά για ν' ακολουθήσει φυγοκέντρηση σε 12,000 rpm στους 4°C για 15 λεπτά. Το RNA συγκεντρώνεται στην επάνω υδατική φάση και η οποία μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο. Στην συνέχεια προστίθεται ίσος όγκος χλωροφόρμιου και ακολουθεί επώαση στον πάγο για 5 λεπτά και κατόπιν

γίνεται φυγοκέντρηση σε 12,000 rpm στους 4°C για 8 λεπτά. Στην συνέχεια γίνεται προσθήκη 2.5 μl γλυκογόνου για κάθε δείγμα (50 μg), οξικού νατρίου όγκου ίσου με το 1/10 του υπάρχοντος στα δείγματα και ισοπροπανόλη σε αναλογία 1/1 με τον όγκο της υδατικής φάσης. Τα δείγματα τοποθετούνται σε - 80 °C για 16 ώρες, ώστε να ολοκληρωθεί η κατακρήμνιση. Γίνεται εν συνεχεία φυγοκέντρηση σε 12,000 rpm στους 4°C για 10 λεπτά. Το RNA σχηματίζεται σε ζελατινώδη πελέτα και κατόπιν αφαιρείται το υπερκείμενο και γίνεται έκπλυση με αιθανόλη 2 φορές 75% κάθε μια ακολουθήθηκε από φυγοκέντρηση σε 12,000 rpm στους 4°C για 5 λεπτά. Στην φάση αυτή πρέπει το δείγμα που απομονώθηκε ν' απαλλαχθεί από την ύπαρξη DNA, με την χρησιμοποίηση του ενζύμου της DNAάσης. Κατά την φάση αυτή αρχικά προστίθενται 10 μl νερό και 1 μl του ενζύμου μαζί με 1 μl ρυθμιστικού διαλύματος. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 30 λεπτά. Έπειτα προστίθενται 2 μl από τον παράγοντα απενεργοποίησης ο οποίος αφέθηκε να δράσει 3- 4 λεπτά. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 2 λεπτά σε 10,000 rpm στους 4°C. Συλλέγεται σε σωληνάριο το μέρος που έφερε το RNA για ν' ακολουθήσει η φασματοφωτομετρική μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA.

V. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΧΡΗΣΗ ΕΙΔΙΚΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟΥ- Με την χρησιμοποίηση του ειδικού φασματοφωτόμετρου Nanodropspectrophotometer προσδιορίζονται η συγκέντρωση του RNA του μετρούμενου διαλύματος σε ngRNA/ μl διαλύματος, η τιμή του λόγου 260/280 και η τιμή του λόγου 260/230. Τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν στα 260 nm. Οι πρωτεΐνες και η φαινόλη απορροφούν στα 260 nm αλλά και στα 280 nm που δεν απορροφούν τα

νουκλειϊκά οξέα. Για να θεωρείται ένα δείγμα καθαρό ο λόγος απορρόφησης 260/280 πρέπει να είναι κοντά στην τιμή 2, ενώ ελάχιστο όριο αξιοπιστίας τίθεται το 1.6. Στα 230 nm απορροφούν ανόργανες ενώσεις οπότε ελέγχεται και αυτή η παράμετρος. Η διαδικασία έχει ως εξής: τοποθετείται ποσότητα 1.5 μl νερού κατεργασμένο με διαιθυλοπυροκαρβονικό εστέρα (DEPC) στην επιφάνεια της συσκευής και ενεργοποιείται η μέτρηση. Μετά από καθαρισμό της επιφάνειας μέτρησης, επαναλαμβάνεται τοποθέτηση νερού για να γίνει η μέτρηση που μηδενίζει την συσκευή (blanc) θεωρώντας τιμή 0 αυτή που προκύπτει από την μέτρηση αυτή και υπολογίζοντας τις επόμενες που θ' ακολουθήσουν σύμφωνα με αυτή. Στη συνέχεια γίνονται οι υπόλοιπες κανονικές μετρήσεις μετρώντας με προσοχή ποσότητα 1,5 μl από την επιφάνεια του RNA. Ενδιάμεσα, πρέπει να γίνεται μέτρηση με 1,5 μl DEPC νερού ώστε να διασφαλιστεί ότι η κάθε επόμενη μέτρηση δεν επηρεάζεται από το RNA της προηγούμενης.



VI- ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)- Για την εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν η « αντίστροφη μεταγραφή- PCR» και η « πραγματικού χρόνου PCR». Η πραγματικού χρόνου PCR έχει μεγαλύτερη ευαισθησία και ικανότητα ανίχνευσης του προϊόντος, η οποία γίνεται με την μελέτη των C_q (quantification cycles) που ορίζεται ως ο κλασματικός αριθμός κύκλων όπου ο φθορισμός μιας αντίδρασης τέμνει την γραμμή threshold. Η ποσοτικοποίηση μπορεί να είναι σχετική ή απόλυτη. Η σχετική γίνεται με μια δεδομένη ποσότητα ανάφορας. Η απόλυτη γίνεται με δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς μεταξύ του δεκαδικού λογαρίθμου της ποσότητας του DNA και των C_q για διαδοχικές γνωστές ποσότητες cDNA. Η κλίση της ευθείας δίνει την απόδοση ενώ το R² πρέπει να προσεγγίζει την τιμή 1. Αναφορικά με την μέθοδο που ακολουθείται, τοποθετούνται ανα

δείγμα συνολικός όγκος 50 ng/ γονίδιο που μελετήθηκε και επιπλέον η απαραίτητη ποσότητα DEPC νερού για να συμπληρωθεί ο όγκος έως τα 10 μl. Υπάρχει και ένα δείγμα μόνο με νερό σε κάθε οχτάδα όπως επίσης χρησιμοποιούμε RNA από φυσιολογικούς ιστούς ανθρώπου, τα οποία θέτουν την βάση σύγκρισης (calibrators). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ως calibrators 2 διαφορετικά εμπορικά RNA σε ποσότητες 1 μgLiver (plus 9 μlDEPC) και 1μgLung (plus 9 μlDEPC). Κατόπιν ετοιμάζεται ένα συνολικό μίγμα από τα dNTPs και τους randomprimers(εξαμερή), υπολογίζοντας 500Mμ για κάθε dNTPs και 250 ng randomprimers ανα αντίδραση. Προστίθεται 2 μl από αυτό σε κάθε δείγμα RNA καθώς και στον αρνητικό μάρτυρα. Τα δείγματα τοποθετούνται στην συσκευή για πέντε λεπτά στους 65 °C. Ένα δεύτερο μίγμα ετοιμάζεται με 4 μl ρυθμιστικού διαλύματος 5x, 1 μl 0,1 MDTT (10mM ανα αντίδραση), 1 μl RNaseout (32.6 units ανα αντίδραση) και 1 μl superscriptIII. Πέντε λεπτά μετά προστίθενται σε κάθε δείγμα 7 μl από το μίγμα. Ακολουθούν οι επόμενοι κύκλοι με θερμοκρασίες κατάλληλες για την δράση του ενζύμου (65°C για 5 λεπτά, 25 °C για 10 λεπτά, 42 °C για 50 λεπτά, 70 °C για 15 λεπτά). Το cDNA αποθηκεύεται στους -80 °C για την πραγματικού χρόνου PCR. Κατά την τελευταία, τοποθετούνται στις ειδικές υποδοχές από 12,5 μl αντίδρασης που αντιπροσωπεύει ένα ξεχωριστό δείγμα. Από τον όγκο αυτό, 10 μl είναι το συνολικό μίγμα της αντίδρασης και 2,5 μl το cDNA που χρησιμοποιείται. Το συνολικό μίγμα παρασκευάζεται υπολογίζοντας 6,25 μl μίγματος ποσοτικής PCR, 1,25 μl από κάθε έναν από τους 2 εκκινητές (1μ M ανα αντίδραση), 0.50 μl από κάθε έναν από τους 2 probe (0,33 μ M ανα αντίδραση) και 0,75 μl νερού

για κάθε δείγμα. Κάθε δείγμα cDNA εξετάζεται ως προς την έκφραση των υπό εξέταση γονιδίων καθώς και της β- ακτίνης. Επίσης εξετάζονται και τα δείγματα των calibrators και του αρνητικού μάρτυρα.

Το γονίδιο της β- ακτίνης έχει γνωστό πρότυπο έκφρασης και χρησιμοποιείται συχνά για να συγκριθούν με αυτό η έκφραση των άλλων γονιδίων. Οι calibrators αραιώνονται ώστε να έχουν συγκέντρωση 10 ng/ 2,5 μl. Κάθε δείγμα εξετάζεται για κάθε γονίδιο 3 φορές σε 3 διαφορετικές υποδοχές του ειδικού πιάτου ώστε να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα του αποτελέσματος. Το φόρτωμα πρέπει να γίνεται έτσι ώστε ν' αποτρέπεται τη τυχόν επιμόλυνση των δειγμάτων από το εξωτερικό περιβάλλον και μεταξύ τους. Μετά ακολουθεί η « πραγματικού χρόνου PCR». Ο θερμοκρασιακός κύκλος είναι 50 °C για 2 λεπτά- 95 °C για 10 λεπτά - 95 °C για 15 δευτερόλεπτα - 60 °C για 1 λεπτό. Στην συνέχεια ακολουθεί η ανάλυση των αποτελεσμάτων (της σχετικής έκφρασης του κάθε γονιδίου) με την μέθοδο της ΔΔCt στην οποία εκφράζεται ο τύπος – ποσότητα έκφρασης γονιδίου = $2^{\Delta\Delta Ct}$. Στην μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης είναι απαραίτητη πριν από την έναρξη της μελέτης, η εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των εκκινήτων και του ιχνηθέτη. Ελεγχεται η γραμμικότητα μεταξύ της ποσοτικοποίησης των γονιδίων στόχων και του γονιδίου αναφοράς της β- ακτίνης ώστε τ'αποτελέσματα που θα προκύψουν από την συγκριτική μελέτη της έκφρασης να είναι αξιόπιστα.



3.ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η μελέτη αυτή αποτελεί μια αναδρομική ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης στο επίπεδο του mRNA με στόχο την εκτίμηση των διαφορών στα προαναφερθέντα γονίδια μεταξύ πρωτοπαθούς όγκου και περιοχικών διηθημένων λεμφαδένων σε ασθενείς με πρώιμο ΜΜΚΠ καθώς και τον συσχετισμό τους με την κλινική έκβαση των ασθενών. Η επιβίωση χωρίς υποτροπή της νόσου (RFS) αξιολογήθηκε από την ημέρα της χειρουργικής επέμβασης έως την πρώτη τεκμηρίωση της υποτροπής ή του θανάτου και η μέση ολική επιβίωση (OS) αξιολογήθηκε από την ημέρα της χειρουργικής επέμβασης μέχρι την ημέρα του θανάτου από οποιαδήποτε αιτία. Οι τιμές της ποσοτικής PCR εκφράστηκαν ως αναλογίες μεταξύ δύο απόλυτων

μετρήσεων (γονίδιο ενδιαφέροντος / εσωτερικό γονίδιο αναφοράς). Τα επίπεδα έκφρασης αξιολογήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή για την έκφραση mRNA κάθε γονιδίου (**Taroni et al 2004 & Rosell et al 2003**). Οι τιμές πάνω από το διάμεσο θεωρήθηκαν ως υψηλές εκφράσεις και αυτές ισοδύναμες ή χαμηλότερες ως χαμηλές εκφράσεις.

Η πιθανή συσχέτιση μεταξύ των βασικών κλινικών χαρακτηριστικών και των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης συγκρίθηκε με τη Mann-Whitney U δοκιμασία. Η δοκιμασία του Spearman χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης του mRNA των γονιδίων. Η δοκιμασία log-rank εξέτασε την επίδραση των διαφορετικών κλινικών παραμέτρων αναφοράς με τα χρονικά διαστήματα ελεύθερης νόσου και ολικής επιβίωσης. Για την αξιολόγηση της συσχέτισης μεταξύ κάθε δυνητικού προγνωστικού παράγοντα και επιβίωσης και χρόνου υποτροπής χρησιμοποιήθηκε μία Cox παλίνδρομη ανάλυση με αναλογίες κινδύνου (HR) και 95% διάστημα εμπιστοσύνης (95% CI). Αυτοί οι παράγοντες στη συνέχεια συμπεριελήφθησαν σε ένα μοντέλο πολλαπλών μεταβλητών αναλογικού κινδύνου Cox με μια διαδικασία επιλογής προς τα πίσω για να αξιολογηθεί η ανεξάρτητη σημασία των διαφόρων μεταβλητών στην επιβίωση και στο χρόνο έως την υποτροπή. Αναλόγα μοντέλα κινδύνου προσαρμόστηκαν για να εκτιμήσουν την επίδραση των διαφόρων κλινικών παραμέτρων στα δεδομένα της RFS και OS. Η μέθοδος Kaplan-Meier χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση του διαστήματος ελεύθερου νόσου και της ολικής επιβίωσης. Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε σε $p < 0,05$. Για κάθε έκφραση mRNA γονιδίου δοκιμάστηκαν οι κύριες υποθέσεις: Είτε

υπάρχει συμφωνία ή ανακολουθία έκφρασης μεταξύ πρωτοπαθούς όγκου και περιοχικών λεμφαδένων και η επίδρασή τους στο RFS και OS.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Τα βασικά χαρακτηριστικά των ασθενών συνοψίζονται στον **Πίνακα 1**. Η μέση ηλικία ήταν 64 έτη και ο μέσος χρόνος παρακολούθησης ήταν τα 8 έτη. Η πλειοψηφία ήταν στάδιο IIIA [115 ασθενείς, 48,1%] ενώ 88 ασθενείς (37%) είχαν στάδιο II. Ο ιστολογικός τύπος των ασθενών ήταν σχεδόν εξίσου διαιρεμένος μεταξύ πλακώδους [n = 116 ασθενείς ή 48,5%] και μη πλακώδους ιστολογίας [123 ασθενείς ή 51,5%]. Δυστυχώς οι πληροφορίες σχετικά με τον τύπο της χορηγούμενης επικουρικής θεραπείας ήταν άγνωστη σε μεγάλο βαθμό (71,5%) ωστόσο οι περισσότεροι ασθενείς με διαθέσιμες πληροφορίες έλαβαν πλατινούχο διπλέτα ή μονοθεραπεία πλατίνας (22%).

Πίνακας 1- Χαρακτηριστικά Ασθενών

	Ομάδα ελέγχου (N=56)	Πειραματική Ομάδα (N=183)	Σύνολο (N=239)
	N (%)	N (%)	N (%)
Γένος			
Γυναίκες	6 (10.7)	22 (12.0)	28 (11.7)
Άνδρες	49 (87.5)	161 (88.0)	210 (87.9)
Λείπουν	1 (1.8)	0 (0.0)	1 (0.4)
TNM σταδιοποίηση (7η έκδοση)			
I	35 (62.5)	0 (0.0)	35 (14.6)
II	20 (35.7)	68 (37.2)	88 (36.8)
IIIA	1 (1.8)	114 (62.3)	115 (48.1)

Ηλικία κατά την διάγνωση (σε έτη)			
Διάμεση	66.0	63.0	64.0
Εύρος	36.0 - 87.0	39.0 - 82.0	36.0 - 87.0
<=65	26 (46.4)	107 (58.5)	133 (55.6)
>65	30 (53.6)	76 (41.5)	106 (44.4)
Πακέτα καπνίσματος κατά τη διάγνωση			
>=50 πακέτα ανά έτος	6 (10.7)	33 (18.0)	39 (16.3)
<50 πακέτα ανά έτος	1 (1.8)	12 (6.6)	13 (5.4)
Λείπουν	49 (87.5)	138 (75.4)	187 (78.2)
Τύπος επικουρικής χημειοθεραπείας			
Πλατινούχοι συνδυασμοί	8 (14.3)	44 (24.0)	52 (21.8)
Συνδυασμοί ταξανών	1 (1.8)	3 (1.6)	4 (1.7)
Πλατίνα σε συνδυασμό με ταξάνες	1 (1.8)	11 (6.0)	12 (5.0)
Άγνωστα ή μη ανήκοντα στην πιο πάνω κατηγορίες	46 (82.1)	125 (68.3)	171 (71.5)
Ιστολογικός Υπότυπος			
Πλακώδες	23 (41.1)	93 (50.8)	116 (48.5)
Μη- πλακώδες	33 (58.9)	90 (49.2)	123 (51.5)

2. ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ mRNA ΜΕΤΑΞΥ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΟΓΚΟΥ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΧΙΚΩΝ ΛΕΜΦΑΔΕΝΩΝ

Συγκριτικά αποτελέσματα μεταξύ πρωτοπαθούς όγκου και περιοχικών λεμφαδένων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2**, ο οποίος αναφέρεται στο ποσοστό συνέκφρασης κάθε γονιδίου. Αναλυτικά τα ποσοστά έχουν ως εξής: *BRCA1* (67,7%), *ERCC1* (68,4%), *PKM2* (63,4%), *RAP80* (68,8%), *RRM1* (70,9%), *RRM2* (69%), *TS* (72,9%), *TSP1* (69,8%), *TXR1* (63,7%).

Πίνακας 2- Συνέκφραση γονιδίων μεταξύ πρωτοπαθούς όγκου και περιοχικών λεμφαδένων

Γονίδιο	Αριθμός Ασθενών N	Ποσοστό συνέκφρασης N (%)
<i>BRCA1</i>	164	111 (67.7)
<i>ERCC1</i>	171	117 (68.4)
<i>PKM2</i>	175	111 (63.4)
<i>RAP80</i>	170	117 (68.8)
<i>RRM1</i>	165	117 (70.9)
<i>RRM2</i>	174	120 (69.0)
<i>TS</i>	166	121 (72.9)
<i>TSP1</i>	172	120 (69.8)
<i>TXR1</i>	171	109 (63.7)

Όσον αφορά τις διαφορές στο επίπεδο της έκφρασης των διαφορετικών γονιδίων μεταξύ πρωτοπαθούς όγκου και περιοχικών λεμφαδένων παρατηρήσαμε ότι ο μέσος όρος της διαφοράς μεταξύ των διαφόρων γονιδίων του πρωτοπαθούς όγκου και των περιοχικών λεμφαδένων είναι σημαντικά διαφορετικός από το μηδέν για τα γονίδια *BRCA1*, *RRM2*, *TS* και *TSP1* ($p = 0,001, 0,019, 0,039$ & $0,006$, αντίστοιχα) (Πίνακας 3)

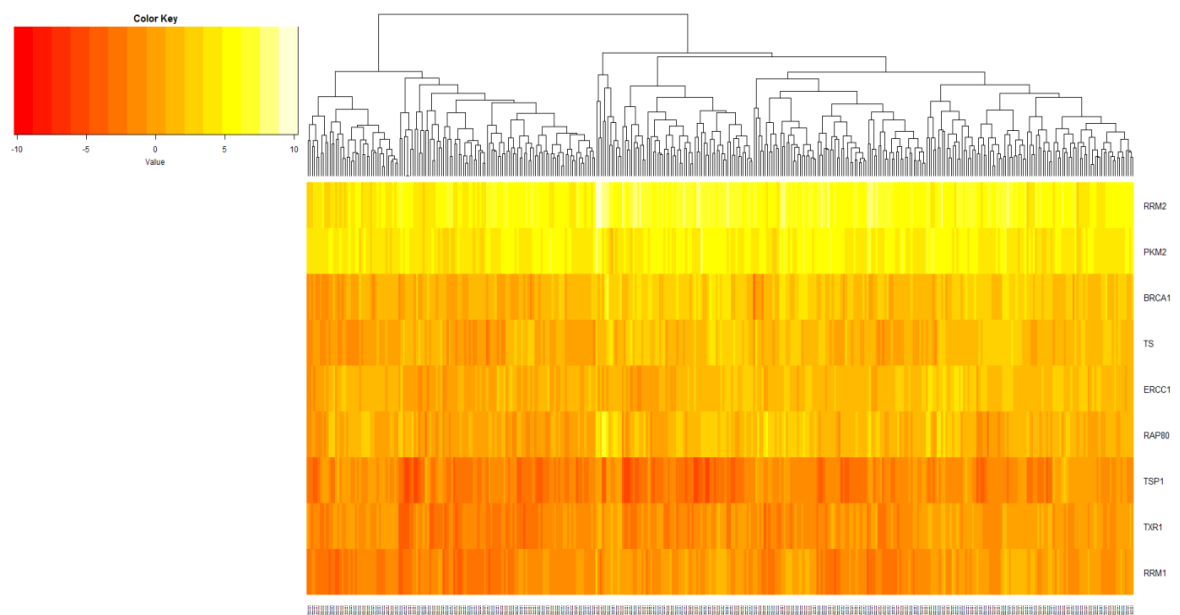
Πίνακας 3: Σύγκριση της διάμεσης τιμής της γονιδιακής έκφρασης μεταξύ του πρωτοπαθούς όγκου και των περιφερειακών λεμφαδένων

	Θέση		Σύνολο	P-Τιμή*
	Πρωτοπαθής (N=183)	Λεμφαδένας (N=176)	(N=359)	
	N (%)	N (%)	N (%)	
BRCA1 Διάμεση (Εύρος)	2.9 (0.1 - 73.0)	4.2 (0.6 - 54.7)	3.4 (0.1 - 73.0)	0.001
Χαμηλή	92 (50.3)	84 (47.7)	176 (49.0)	
Υψηλή	86 (47.0)	85 (48.3)	171 (47.6)	
Λείπουν	5 (2.7)	7 (4.0)	12 (3.3)	
ERCC1 Διάμεση (Εύρος)	2.3 (0.2 - 27.2)	2.5 (0.3 - 20.0)	2.4 (0.2 - 27.2)	0.295
Χαμηλή	86 (47.0)	86 (48.9)	172 (47.9)	
Υψηλή	95 (51.9)	87 (49.4)	182 (50.7)	
Λείπουν	2 (1.1)	3 (1.7)	5 (1.4)	
PKM2 Διάμεση (Εύρος)	25.7 (1.2 - 191.8)	25.2 (0.3 - 320.2)	25.4 (0.3 - 320.2)	0.324
Χαμηλή	92 (50.3)	87 (49.4)	179 (49.9)	
Υψηλή	90 (49.2)	89 (50.6)	179 (49.9)	
Λείπουν	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.3)	
RAP80 Διάμεση (Εύρος)	1.8 (0.2 - 87.4)	2 (0.3 - 25.5)	1.9 (0.2 - 87.4)	0.084
Χαμηλή	98 (53.6)	85 (48.3)	183 (51.0)	
Υψηλή	84 (45.9)	86 (48.9)	170 (47.4)	
Λείπουν	1 (0.5)	5 (2.8)	6 (1.7)	
RRM1 Διάμεση (Εύρος)	0.5 (0.1 - 4.6)	0.5 (0.1 - 4.7)	0.5 (0.1 - 4.7)	0.750
Χαμηλή	84 (45.9)	81 (46.0)	165 (46.0)	
Υψηλή	97 (53.0)	86 (48.9)	183 (51.0)	
Λείπουν	2 (1.1)	9 (5.1)	11 (3.1)	
RRM2 Διάμεση (Εύρος)	49.1 (4.6 - 870.8)	63.2 (8.7 - 1189.2)	58.5 (4.6 - 1189.2)	0.019
Χαμηλή	91 (49.7)	88 (50.0)	179 (49.9)	
Υψηλή	91 (49.7)	87 (49.4)	178 (49.6)	
Λείπουν	1 (0.5)	1 (0.6)	2 (0.6)	
TS Διάμεση (Εύρος)	2.3 (0.2 - 15.9)	2.5 (0.4 - 19.9)	2.4 (0.2 - 19.9)	0.039
Χαμηλή	88 (48.1)	85 (48.3)	173 (48.2)	
Υψηλή	92 (50.3)	84 (47.7)	176 (49.0)	
Λείπουν	3 (1.6)	7 (4.0)	10 (2.8)	
TSP1 Διάμεση (Εύρος)	0.3 (0.0 - 4.4)	0.3 (0.0 - 2.6)	0.3 (0.0 - 4.4)	0.006
Χαμηλή	93 (50.8)	87 (49.4)	180 (50.1)	
Υψηλή	88 (48.1)	87 (49.4)	175 (48.7)	
Λείπουν	2 (1.1)	2 (1.1)	4 (1.1)	
TXR1 Διάμεση (Εύρος)	0.6 (0.0 - 3.5)	0.6 (0.1 - 6.2)	0.6 (0.0 - 6.2)	0.538
Χαμηλή	72 (39.3)	86 (48.9)	158 (44.0)	

Υψηλή	110 (60.1)	86 (48.9)	196 (54.6)	
Λείπουν	1 (0.5)	4 (2.3)	5 (1.4)	

Η ιεραρχική συσσώρευση μεταξύ πρωτοπαθούς όγκου και περιοχικών λεμφαδένων είναι επίσης ασθενής (λιγότερο από 20%) όπως φαίνεται στο πιο κάτω διάγραμμα. Πιο συγκεκριμένα, ο πιο κάτω χάρτης δείχνει την υπολογιζόμενη ιεραρχική συσσωμάτωση στη μέση διαφορά της τιμής έκφρασης δεδομένων PCR που συγκρίνουν το προφίλ γονιδιακής έκφρασης των 9 γονιδίων σε δείγματα πρωτοπαθούς όγκου (n = 240) και των σχετικών λεμφαδένων (n = 177). Υπάρχει μέτρια σχέση μεταξύ της έκφρασης γονιδίων στον πρωτοπαθή όγκο και των περιοχικών λεμφαδένων (λιγότερο από 20% των δειγμάτων συσσωρεύονται μαζί).

Σχήμα 1: Ιεραρχική Συσσώρευση



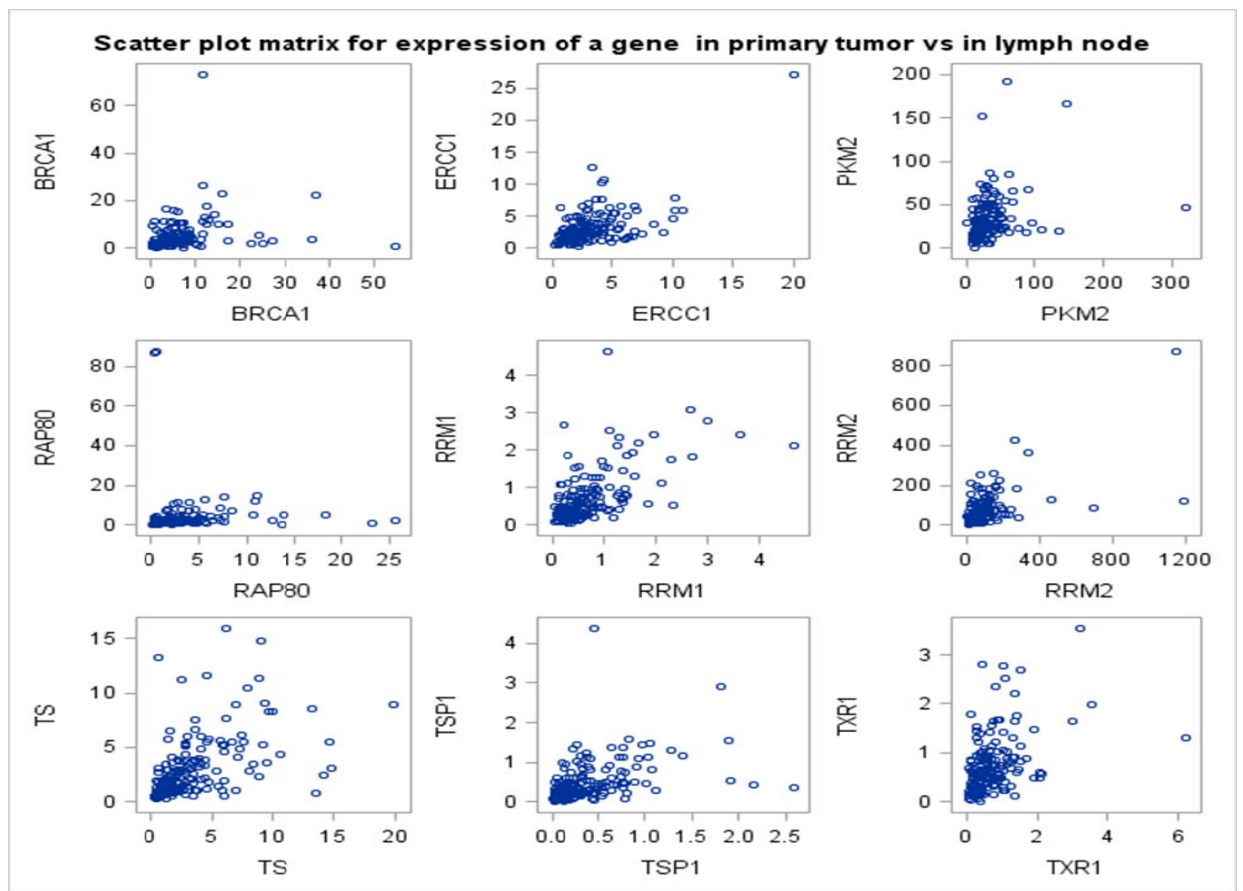
Επιπροσθέτως, η ανάλυση συσχέτισης εντόπισε μια μέτρια θετική γραμμική σχέση μεταξύ της έκφρασης κάθε γονιδίου στον πρωτοπαθή όγκο και της έκφρασής του στον αντίστοιχο λεμφαδένα για όλα τα 9 γονίδια που ελέγχθηκαν (**Πίνακας 4 και Σχήμα 2**). Ο μέσος όρος της διαφοράς μεταξύ παρόμοιων γονιδίων σε πρωτοπαθή όγκο και περιοχικούς λεμφαδένες είναι σημαντικά διαφορετικός από το μηδέν για τα *BRCA 1*, *RRM2*, *TS* και *TSP1* ($p = 0,001, 0,019, 0,039$ & $0,006$, αντίστοιχα) (**Πίνακας 2**).

Πίνακας 4: Συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης στον πρωτογενή όγκο με τα επίπεδα έκφρασης στους λεμφαδένες

Άης όγκος Λεμφαδένες	BRCA1	ERCC1	PKM2	RAP80	RRM1	RRM2	TS	TSP1	TXR1
BRCA1	0.468 ($P<.0001$)	-0.005 ($P=0.954$)	-0.0003 ($P=0.997$)	0.195 ($P=0.012$)	0.333 ($P<.0001$)	0.319 ($P<.0001$)	0.276 ($P<.0001$)	-0.005 ($P=0.947$)	-0.051 ($P=0.512$)
ERCC1	0.202 ($P=0.009$)	0.521 ($P<.0001$)	0.121 ($P=0.114$)	0.167 ($P=0.029$)	0.191 ($P=0.012$)	0.163 ($P=0.033$)	0.193 ($P=0.012$)	0.226 ($P=0.003$)	0.093 ($P=0.226$)
PKM2	0.153 ($P=0.046$)	0.162 ($P=0.032$)	0.437 ($P<.0001$)	0.253 ($P=0.001$)	0.133 ($P=0.079$)	0.326 ($P<.0001$)	0.158 ($P=0.038$)	-0.003 ($P=0.972$)	0.037 ($P=0.625$)
RAP80	0.269 ($P=0.001$)	0.09 ($P=0.245$)	0.033 ($P=0.672$)	0.453 ($P<.0001$)	0.219 ($P=0.004$)	0.253 ($P=0.001$)	0.209 ($P=0.007$)	0.059 ($P=0.444$)	-0.024 ($P=0.754$)
RRM1	0.328 ($P<.0001$)	0.107 ($P=0.171$)	0.085 ($P=0.278$)	0.082 ($P=0.294$)	0.573 ($P<.0001$)	0.161 ($P=0.038$)	0.424 ($P<.0001$)	-0.11 ($P=0.161$)	0.022 ($P=0.779$)
RRM2	0.378 ($P<.0001$)	0.109 ($P=0.154$)	0.074 ($P=0.33$)	0.301 ($P<.0001$)	0.224 ($P=0.003$)	0.512 ($P<.0001$)	0.357 ($P<.0001$)	-0.009 ($P=0.909$)	-0.005 ($P=0.944$)
TS	0.406 ($P<.0001$)	0.056 ($P=0.469$)	0.079 ($P=0.308$)	0.152 ($P=0.049$)	0.394 ($P<.0001$)	0.291 ($P=0$)	0.586 ($P<.0001$)	-0.051 ($P=0.512$)	0.055 ($P=0.477$)

TSP1	0.056 (P=0.473)	0.033 (P=0.668)	-0.105 (P=0.17)	-0.024 (P=0.756)	-0.006 (P=0.937)	-0.084 (P=0.272)	-0.022 (P=0.772)	0.533 (P=<.0001)	0.101 (P=0.187)
TXR1	0.097 (P=0.21)	0.231 (P=0.002)	0.038 (P=0.621)	0.127 (P=0.097)	0.235 (P=0.002)	-0.032 (P=0.674)	-0.026 (P=0.741)	0.255 (P=0.001)	0.41 (P=<.0001)

Σχήμα 2: ScatterPlot για τον πρωτοπαθή όγκο και τους αντίστοιχους περιφερικούς λεμφαδένες.



3. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΟΓΚΟΥ

Γονίδια	Σε όλους τους	Ομάδα ελέγχου	Πειραματική Ομάδα	P-Τιμή*
BRCA1 Διάμεση (Εύρος)	3 (0.1 - 73.0)	3.4 (0.4 - 15.0)	2.9 (0.1 - 73.0)	0.870
Χαμηλή	114 (47.7)	22 (39.3)	92 (50.3)	
Υψηλή	115 (48.1)	29 (51.8)	86 (47.0)	
Λείπουν	10 (4.2)	5 (8.9)	5 (2.7)	
ERCC1 Διάμεση (Εύρος)	2.3 (0.2 - 27.2)	2 (0.5 - 13.3)	2.3 (0.2 - 27.2)	0.218
Χαμηλή	118 (49.4)	32 (57.1)	86 (47.0)	
Υψηλή	119 (49.8)	24 (42.9)	95 (51.9)	
Λείπουν	2 (0.8)	0 (0.0)	2 (1.1)	
PKM2 Διάμεση (Εύρος)	26.1 (1.2 - 191.8)	26.9 (9.0 - 93.0)	25.7 (1.2 - 191.8)	0.986
Χαμηλή	118 (49.4)	26 (46.4)	92 (50.3)	
Υψηλή	120 (50.2)	30 (53.6)	90 (49.2)	
Λείπουν	1 (0.4)	0 (0.0)	1 (0.5)	
RAP80 Διάμεση (Εύρος)	2 (0.2 - 631.5)	3.1 (0.4 - 631.5)	1.8 (0.2 - 87.4)	0.001
Χαμηλή	118 (49.4)	20 (35.7)	98 (53.6)	
Υψηλή	118 (49.4)	34 (60.7)	84 (45.9)	
Λείπουν	3 (1.3)	2 (3.6)	1 (0.5)	
RRM1 Διάμεση (Ευρος)	0.5 (0.1 - 4.6)	0.4 (0.1 - 3.1)	0.5 (0.1 - 4.6)	0.127
Χαμηλή	114 (47.7)	30 (53.6)	84 (45.9)	
Υψηλή	121 (50.6)	24 (42.9)	97 (53.0)	
Λείπουν	4 (1.7)	2 (3.6)	2 (1.1)	
RRM2 Διάμεση (Ευρος)	49.2 (4.6 - 870.8)	49.7 (6.2 - 219.2)	49.1 (4.6 - 870.8)	0.811
Χαμηλή	119 (49.8)	28 (50.0)	91 (49.7)	
Υψηλή	119 (49.8)	28 (50.0)	91 (49.7)	
Λείπουν	1 (0.4)	0 (0.0)	1 (0.5)	
TS Διάμεση (Ευρος)	2.2 (0.2 - 15.9)	2.2 (0.3 - 8.0)	2.3 (0.2 - 15.9)	0.264
Χαμηλή	116 (48.5)	28 (50.0)	88 (48.1)	
Υψηλή	118 (49.4)	26 (46.4)	92 (50.3)	
Λείπουν	5 (2.1)	2 (3.6)	3 (1.6)	
TSP1 Διάμεση (Ευρος)	0.3 (0.0 - 4.4)	0.4 (0.0 - 1.4)	0.3 (0.0 - 4.4)	0.247
Χαμηλή	118 (49.4)	25 (44.6)	93 (50.8)	
Υψηλή	119 (49.8)	31 (55.4)	88 (48.1)	
Λείπουν	2 (0.8)	0 (0.0)	2 (1.1)	
TXR1 Διάμεση (Ευρος)	0.5 (0.0 - 3.5)	0.3 (0.1 - 1.4)	0.6 (0.0 - 3.5)	< 0.001
Χαμηλή	114 (47.7)	42 (75.0)	72 (39.3)	
Υψηλή	122 (51.0)	12 (21.4)	110 (60.1)	

Γονίδια	Σε όλους τους	Ομάδα ελέγχου	Πειραματική Ομάδα	P-Τιμή*
Λείπουν	3 (1.3)	2 (3.6)	1 (0.5)	

Πίνακας 5-Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι η έκφραση του *RAP80* και του *TXR1* διαφέρουν στατιστικά σημαντικά στον πρωτοπαθή όγκο μεταξύ της ομάδας που έχει σύστοιχους διηθημένους λεμφαδένες και της ομάδας ελέγχου.

I.Γονιδιακή έκφραση στον πρωτοπαθή όγκο σύμφωνα με την υποκείμενη ιστολογία και για τις δύο ομάδες (Πίνακας 6)

	Ιστολογικός Υπότυπος		Σύνολο (N=239)	P-τιμή*
	Πλακώδης (N=116)	Μη- πλακώδης (N=123)		
BRCA1 Διάμεση (Εύρος)	3.9 (0.1 - 26.2)	2.5 (0.4 - 73.0)	3 (0.1 - 73.0)	0.001
Χαμηλή	43 (37.1)	71 (57.7)	114 (47.7)	
Υψηλή	69 (59.5)	46 (37.4)	115 (48.1)	
Λείπουν	4 (3.4)	6 (4.9)	10 (4.2)	
ERCC1 Διάμεση (Εύρος)	2.3 (0.5 - 27.2)	2.3 (0.2 - 13.3)	2.3 (0.2 - 27.2)	0.256
Χαμηλή	55 (47.4)	63 (51.2)	118 (49.4)	
Υψηλή	60 (51.7)	59 (48.0)	119 (49.8)	
Λείπουν	1 (0.9)	1 (0.8)	2 (0.8)	
PKM2 Διάμεση (Εύρος)	3.9 (0.1 - 26.2)	3.9 (0.1 - 26.2)	3.9 (0.1 - 26.2)	0.073
Χαμηλή	49 (42.2)	69 (56.1)	118 (49.4)	
Υψηλή	66 (56.9)	54 (43.9)	120 (50.2)	
Λείπουν	1 (0.9)	0 (0.0)	1 (0.4)	
RAP80 Διάμεση (Εύρος)	2 (0.4 - 87.4)	2 (0.2 - 631.5)	2 (0.2 - 631.5)	0.761
Χαμηλή	57 (49.1)	61 (49.6)	118 (49.4)	
Υψηλή	58 (50.0)	60 (48.8)	118 (49.4)	
Λείπουν	1 (0.9)	2 (1.6)	3 (1.3)	

RRM1	Διάμεση (Εύρος)	0.6 (0.1 - 4.6)	0.4 (0.1 - 3.1)	0.5 (0.1 - 4.6)	< 0.001
	Χαμηλή	43 (37.1)	71 (57.7)	114 (47.7)	
	Υψηλή	70 (60.3)	51 (41.5)	121 (50.6)	
	Λείπουν	3 (2.6)	1 (0.8)	4 (1.7)	
RRM2	Διάμεση (Εύρος)	60 (7.7 - 870.8)	41.5 (4.6 -	49.2 (4.6 -	0.007
	Χαμηλή	49 (42.2)	70 (56.9)	119 (49.8)	
	Υψηλή	66 (56.9)	53 (43.1)	119 (49.8)	
	Λείπουν	1 (0.9)	0 (0.0)	1 (0.4)	
TS	Διάμεση (Εύρος)	2.5 (0.4 - 15.9)	2 (0.2 - 9.0)	2.2 (0.2 - 15.9)	0.050
	Χαμηλή	49 (42.2)	67 (54.5)	116 (48.5)	
	Υψηλή	64 (55.2)	54 (43.9)	118 (49.4)	
	Λείπουν	3 (2.6)	2 (1.6)	5 (2.1)	
TSP1	Διάμεση (Εύρος)	0.3 (0.0 - 4.4)	0.4 (0.0 - 2.9)	0.3 (0.0 - 4.4)	0.001
	Χαμηλή	70 (60.3)	48 (39.0)	118 (49.4)	
	Υψηλή	45 (38.8)	74 (60.2)	119 (49.8)	
	Λείπουν	1 (0.9)	1 (0.8)	2 (0.8)	
TXR1	Διάμεση (Εύρος)	0.5 (0.0 - 2.8)	0.5 (0.1 - 3.5)	0.5 (0.0 - 3.5)	0.846
	Χαμηλή	54 (46.6)	60 (48.8)	114 (47.7)	
	Υψηλή	60 (51.7)	62 (50.4)	122 (51.0)	
	Λείπουν	2 (1.7)	1 (0.8)	3 (1.3)	

II. Γονιδιακή έκφραση στον πρωτοπαθή όγκο με βάση την ιστολογία για την ομάδα χωρίς σύστοιχους διηθημένους λεμφαδένες (Πίνακας 7).

	Ιστολογικός Υπότυπος		Σύνολο	P-τιμή*	
	Πλακώδης	Μη πλακώδης	(N=56)		
	(N=23)				
	N (%)	(N=33)	N (%)		
BRCA1	Διάμεση (Εύρος)	3.6 (0.7 - 15.0)	3 (0.4 - 9.5)	3.4 (0.4 - 15.0)	0.488
	Χαμηλή	8 (34.8)	14 (42.4)	22 (39.3)	
	Υψηλή	14 (60.9)	15 (45.5)	29 (51.8)	
	Λείπουν	1 (4.3)	4 (12.1)	5 (8.9)	
ERCC1	Διάμεση (Εύρος)	2.3 (0.7 - 9.7)	1.9 (0.5 - 13.3)	2 (0.5 - 13.3)	0.117
	Χαμηλή	12 (52.2)	20 (60.6)	32 (57.1)	
	Υψηλή	11 (47.8)	13 (39.4)	24 (42.9)	
PKM2	Διάμεση (Εύρος)	21 (11.4 - 77.8)	29.4 (9.0 - 93.0)	26.9 (9.0 - 93.0)	0.200

Χαμηλή	13 (56.5)	13 (39.4)	26 (46.4)	
Υψηλή	10 (43.5)	20 (60.6)	30 (53.6)	
RAP80 Διάμεση (Εύρος)	2.6 (0.4 - 38.3)	4.2 (0.6 - 631.5)	3.1 (0.4 - 631.5)	0.264
Χαμηλή	10 (43.5)	10 (30.3)	20 (35.7)	
Υψηλή	12 (52.2)	22 (66.7)	34 (60.7)	
Λείπουν	1 (4.3)	1 (3.0)	2 (3.6)	
RRM1Διάμεση (Εύρος)	0.6 (0.1 - 2.0)	0.3 (0.1 - 3.1)	0.4 (0.1 - 3.1)	0.027
Χαμηλή	9 (39.1)	21 (63.6)	30 (53.6)	
Υψηλή	13 (56.5)	11 (33.3)	24 (42.9)	
Λείπουν	1 (4.3)	1 (3.0)	2 (3.6)	
RRM2 Διάμεση (Εύρος)	46.2 (8.9 - 219.2)	50.4 (6.2 - 215.8)	49.7 (6.2 - 219.2)	0.410
Χαμηλή	13 (56.5)	15 (45.5)	28 (50.0)	
Υψηλή	10 (43.5)	18 (54.5)	28 (50.0)	
TS Διάμεση (Εύρος)	2.2 (0.5 - 8.0)	2.2 (0.3 - 7.2)	2.2 (0.3 - 8.0)	1.000
Χαμηλή	11 (47.8)	17 (51.5)	28 (50.0)	
Υψηλή	11 (47.8)	15 (45.5)	26 (46.4)	
Λείπουν	1 (4.3)	1 (3.0)	2 (3.6)	
TSP1Διάμεση (Εύρος)	0.5 (0.1 - 1.4)	0.3 (0.0 - 1.3)	0.4 (0.0 - 1.4)	0.264
Χαμηλή	8 (34.8)	17 (51.5)	25 (44.6)	
Υψηλή	15 (65.2)	16 (48.5)	31 (55.4)	
TXR1 Διάμεση (Εύρος)	0.3 (0.1 - 0.8)	0.3 (0.1 - 1.4)	0.3 (0.1 - 1.4)	0.731
Χαμηλή	16 (69.6)	26 (78.8)	42 (75.0)	
Υψηλή	6 (26.1)	6 (18.2)	12 (21.4)	
Λείπουν	1 (4.3)	1 (3.0)	2 (3.6)	

III. Γονιδιακή έκφραση στον πρωτοπαθή όγκο με βάση την ιστολογία για την ομάδα με σύστοιχους διηθημένους λεμφαδένες (Πίνακας 8).

	Ιστολογικός Υπότυπος		Σύνολο	P-τιμή*
	Πλακώδες	Μη	(N=183)	
	(N=93)	Πλακώδες		
		(N=90)		
	N (%)	N (%)	N (%)	
BRCA1 Διάμεση (Εύρος)	4 (0.1 - 26.2)	2.3 (0.4 - 73.0)	2.9 (0.1 - 73.0)	<0.001

Χαμηλή	35 (37.6)	57 (63.3)	92 (50.3)	
Υψηλή	55 (59.1)	31 (34.4)	86 (47.0)	
Λείπουν	3 (3.2)	2 (2.2)	5 (2.7)	
ERCC1 Διάμεση (Εύρος)	2.4 (0.5 - 27.2)	2.3 (0.2 - 12.5)	2.3 (0.2 - 27.2)	0.739
Χαμηλή	43 (46.2)	43 (47.8)	86 (47.0)	
Υψηλή	49 (52.7)	46 (51.1)	95 (51.9)	
Λείπουν	1 (1.1)	1 (1.1)	2 (1.1)	
PKM2 Διάμεση (Εύρος)	29.7 (1.2 - 191.8)	21.1 (5.4 - 151.5)	25.7 (1.2 - 191.8)	0.005
Χαμηλή	36 (38.7)	56 (62.2)	92 (50.3)	
Υψηλή	56 (60.2)	34 (37.8)	90 (49.2)	
Λείπουν	1 (1.1)	0 (0.0)	1 (0.5)	
RAP80 Διάμεση (Εύρος)	1.9 (0.4 - 87.4)	1.7 (0.2 - 15.2)	1.8 (0.2 - 87.4)	0.576
Χαμηλή	47 (50.5)	51 (56.7)	98 (53.6)	
Υψηλή	46 (49.5)	38 (42.2)	84 (45.9)	
Λείπουν	0 (0.0)	1 (1.1)	1 (0.5)	
RRM1 Διάμεση (Εύρος)	0.6 (0.1 - 4.6)	0.4 (0.1 - 2.4)	0.5 (0.1 - 4.6)	0.001
Χαμηλή	34 (36.6)	50 (55.6)	84 (45.9)	
Υψηλή	57 (61.3)	40 (44.4)	97 (53.0)	
Λείπουν	2 (2.2)	0 (0.0)	2 (1.1)	
RRM2 Διάμεση (Εύρος)	64.1 (7.7 - 870.8)	39.4 (4.6 - 361.9)	49.1 (4.6 - 870.8)	<0.001
Χαμηλή	36 (38.7)	55 (61.1)	91 (49.7)	
Υψηλή	56 (60.2)	35 (38.9)	91 (49.7)	
Λείπουν	1 (1.1)	0 (0.0)	1 (0.5)	
TS Διάμεση (Εύρος)	2.7 (0.4 - 15.9)	2 (0.2 - 9.0)	2.3 (0.2 - 15.9)	0.040
Χαμηλή	38 (40.9)	50 (55.6)	88 (48.1)	
Υψηλή	53 (57.0)	39 (43.3)	92 (50.3)	
Λείπουν	2 (2.2)	1 (1.1)	3 (1.6)	
TSP1 Διάμεση (Εύρος)	0.3 (0.0 - 4.4)	0.5 (0.0 - 2.9)	0.3 (0.0 - 4.4)	<0.001
Χαμηλή	62 (66.7)	31 (34.4)	93 (50.8)	
Υψηλή	30 (32.3)	58 (64.4)	88 (48.1)	
Λείπουν	1 (1.1)	1 (1.1)	2 (1.1)	
TXR1 Διάμεση (Εύρος)	0.6 (0.0 - 2.8)	0.6 (0.1 - 3.5)	0.6 (0.0 - 3.5)	0.411
Χαμηλή	38 (40.9)	34 (37.8)	72 (39.3)	
Υψηλή	54 (58.1)	56 (62.2)	110 (60.1)	
Λείπουν	1 (1.1)	0 (0.0)	1 (0.5)	

Από τους παραπάνω πίνακες μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το επίπεδο έκφρασης ορισμένων γονιδίων στον πρωτοπαθή όγκο διαφέρει στατιστικά μεταξύ της πλακώδους και της μη- πλακώδους ιστολογίας. Περαιτέρω

ανάλυση ανά ομάδα αποκαλύπτει ότι η διαφορά μεταξύ των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης στον πρωτοπαθή όγκο μεταξύ των δύο ομάδων υπάρχουν μόνο στην περίπτωση της ομάδας των ασθενών με διηθημένους λεμφαδένες. Τα αποτελέσματα της ομάδας ελέγχου πρέπει να ερμηνευθούν με προσοχή ώστε η μη ανίχνευση της διαφοράς σημασίας μεταξύ των δύο ιστολογικών ομάδων μπορεί να οφείλεται στο μικρό μέγεθος δείγματος (N = 56).

4. ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΣΤΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΤΩΝ ΤΟΠΙΚΟΠΕΡΙΟΧΙΚΩΝ ΛΕΜΦΑΔΕΝΩΝ (ομάδα ασθενών με διηθημένους λεμφαδένες ανάλογα με την ιστολογία -Πίνακας 9).

	Ιστολογικός Υπότυπος		Σύνολο	P-τιμή*
	Πλακώδες	Μη	(N=176)	
	(N=91)	Πλακώδες		
		(N=85)		
	N (%)	N (%)	N (%)	
BRCA1 Διάμεση (Εύρος)	4.6 (0.6 - 37.1)	3.4 (0.6 - 54.7)	4.2 (0.6 - 54.7)	0.167
Χαμηλή	39 (42.9)	45 (52.9)	84 (47.7)	
Υψηλή	49 (53.8)	36 (42.4)	85 (48.3)	
Λείπουν	3 (3.3)	4 (4.7)	7 (4.0)	
ERCC1 Διάμεση (Εύρος)	2.5 (0.5 - 20.0)	2.6 (0.3 - 11.3)	2.5 (0.3 - 20.0)	0.879
Χαμηλή	46 (50.5)	40 (47.1)	86 (48.9)	
Υψηλή	45 (49.5)	42 (49.4)	87 (49.4)	
Λείπουν	0 (0.0)	3 (3.5)	3 (1.7)	
PKM2Διάμεση (Εύρος)	28.9 (0.3 - 320.2)	21.8 (8.1 - 110.9)	25.2 (0.3 - 320.2)	<0.001
Χαμηλή	33 (36.3)	54 (63.5)	87 (49.4)	
Υψηλή	58 (63.7)	31 (36.5)	89 (50.6)	
RAP80Διάμεση (Εύρος)	2 (0.3 - 25.5)	2 (0.5 - 18.4)	2 (0.3 - 25.5)	1.000
Χαμηλή	45 (49.5)	40 (47.1)	85 (48.3)	
Υψηλή	45 (49.5)	41 (48.2)	86 (48.9)	
Λείπουν	1 (1.1)	4 (4.7)	5 (2.8)	

RRM1 Διάμεση (Εύρος)	0.6 (0.1 - 4.7)	0.4 (0.1 - 3.6)	0.5 (0.1 - 4.7)	<0.001
Χαμηλή	30 (33.0)	51 (60.0)	81 (46.0)	
Υψηλή	58 (63.7)	28 (32.9)	86 (48.9)	
Λείπουν	3 (3.3)	6 (7.1)	9 (5.1)	
RRM2 Διάμεση (Εύρος)	73.5 (14.1 - 1189.2)	57.7 (8.7 - 339.8)	63.2 (8.7 - 1189.2)	0.049
Χαμηλή	39 (42.9)	49 (57.6)	88 (50.0)	
Υψηλή	52 (57.1)	35 (41.2)	87 (49.4)	
Λείπουν	0 (0.0)	1 (1.2)	1 (0.6)	
TS Διάμεση (Εύρος)	2.7 (0.5 - 14.8)	2.4 (0.4 - 19.9)	2.5 (0.4 - 19.9)	0.442
Χαμηλή	42 (46.2)	43 (50.6)	85 (48.3)	
Υψηλή	47 (51.6)	37 (43.5)	84 (47.7)	
Λείπουν	2 (2.2)	5 (5.9)	7 (4.0)	
TSP1 Διάμεση (Εύρος)	0.2 (0.0 - 1.9)	0.4 (0.0 - 2.6)	0.3 (0.0 - 2.6)	<0.001
Χαμηλή	60 (65.9)	27 (31.8)	87 (49.4)	
Υψηλή	31 (34.1)	56 (65.9)	87 (49.4)	
Λείπουν	0 (0.0)	2 (2.4)	2 (1.1)	
TXR1 Διάμεση (Εύρος)	0.5 (0.1 - 6.2)	0.6 (0.1 - 3.2)	0.6 (0.1 - 6.2)	0.541
Χαμηλή	48 (52.7)	38 (44.7)	86 (48.9)	
Υψηλή	43 (47.3)	43 (50.6)	86 (48.9)	
Λείπουν	0 (0.0)	4 (4.7)	4 (2.3)	

Το επίπεδο έκφρασης των γονιδίων *PKM2*, *RRM1*, *RRM2* και *TSP1* στους διηθημένους λεμφαδένες διαφέρει στατιστικά μεταξύ μη πλακώδους και πλακώδους ιστολογίας.

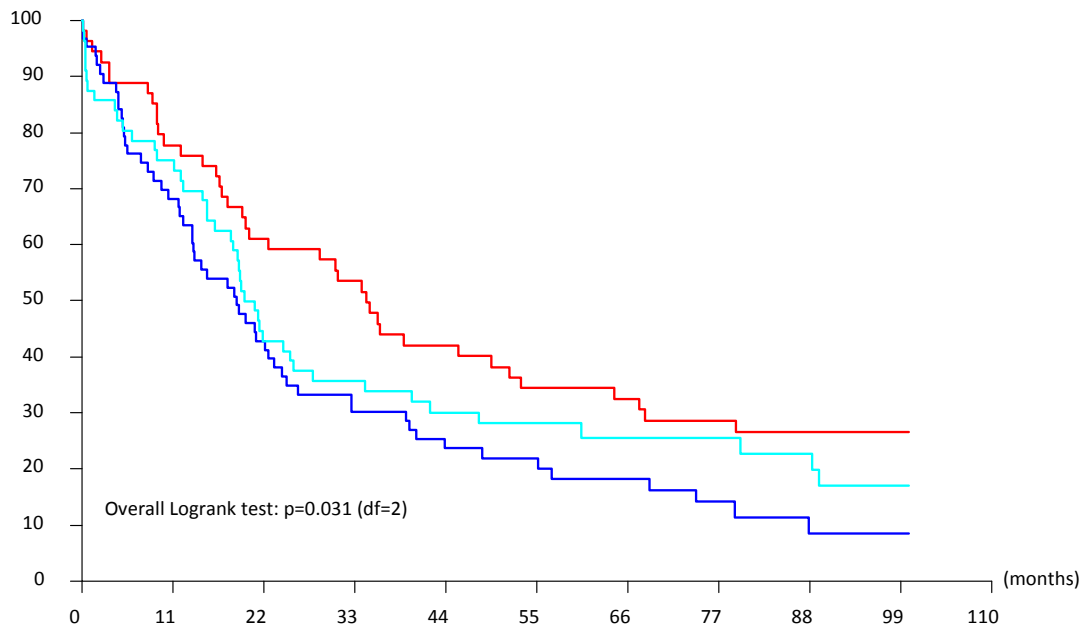
5. ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΣΤΗΝ ΕΚΒΑΣΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ

I. Εκτίμηση στο διάστημα ελεύθερο υποτροπής και στην επιβίωση της επίδρασης της διαφορετικής έκφρασης των γονιδίων μεταξύ πρωτοπαθούς και περιοχικών λεμφαδένων

Η εκτίμηση της επίδρασης στην έκβαση των ασθενών με είτε χαμηλή, είτε υψηλή έκφραση ενός γονιδίου μεταξύ πρωτοπαθούς όγκου και διηθημένων λεμφαδένων, έδειξε ότι τα χαμηλά επίπεδα *PKM2* και στις δύο περιοχές συσχετίστηκαν με καλύτερη διάμεση ολική επιβίωση (OS) (και στις

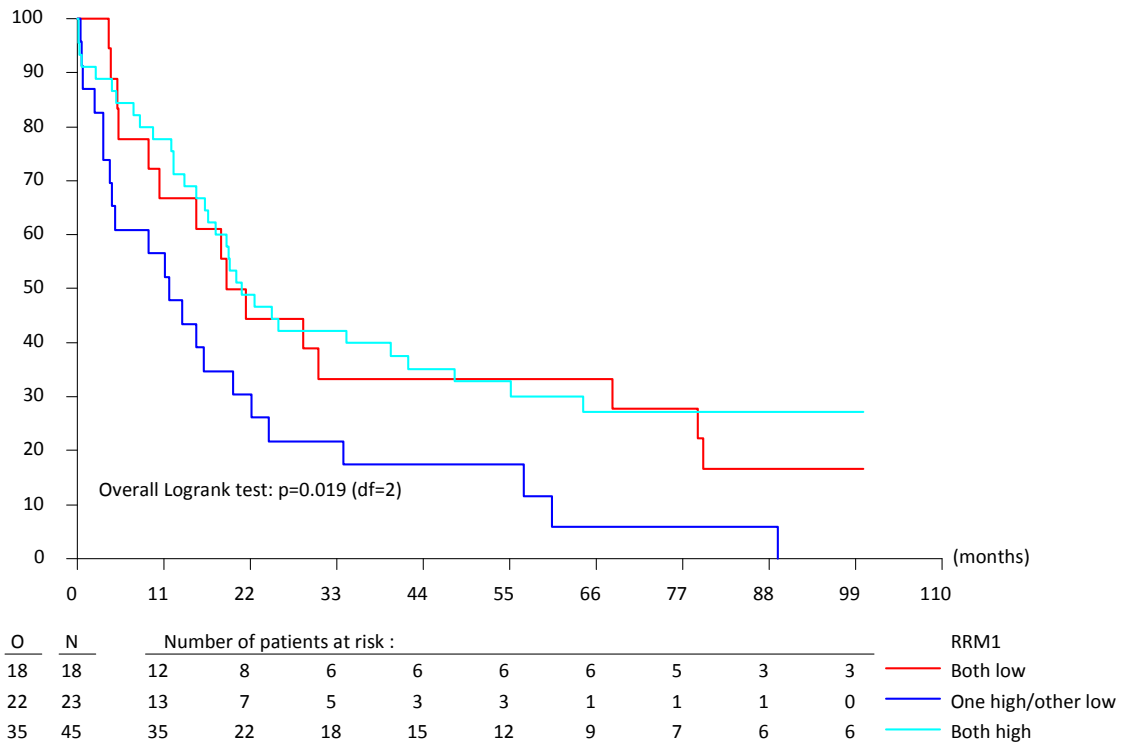
δύο περιοχές χαμηλή έκφραση: 34,4 μήνες · διαφορετική έκφραση μεταξύ των δύο περιοχών : 18.8 μήνες · και υψηλή έκφραση μεταξύ των δύο περιοχών: 20.3 μήνες, $p = 0.031$) ανεξάρτητα με την ιστολογία του πρωτοπαθούς όγκου **(Σχήμα 3)**. Ειδικά σε ασθενείς με πλακώδη ιστολογία, η έκφραση (είτε χαμηλή είτε υψηλή) για το *RRM1* συσχετίστηκε με σημαντικά μεγαλύτερο μέσο διάστημα ελεύθερο υποτροπής RFS (και οι δύο περιοχές χαμηλές: 9,8 μήνες, και οι δύο υψηλές: 9,6 μήνες, διαφορετική έκφραση : 3,9 mo, $p = 0,041$) και ολική επιβίωση (χαμηλή και στις δύο περιοχές: 20,2 μήνες, υψηλή και στις δύο περιοχές : 20,9 mo, διαφορετική έκφραση μεταξύ των δύο περιοχών: 11,7 μήνες, $p = 0,019$) **(Σχήμα 4 και Πίνακας 5)** σε σύγκριση με τους ασθενείς με διαφορετική έκφραση. Παρομοίως, σε ασθενείς με πλακώδεις όγκους και υψηλή έκφραση *TXR1* τόσο σε πρωτοπαθή όγκο όσο και σε αντίστοιχους λεμφαδένες, η ολική επιβίωση ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με εκείνους με χαμηλή έκφραση είτε στην μία, είτε και στις δύο περιοχές (χαμηλή έκφραση και στις δύο: 16,6 μήνες, υψηλή έκφραση και στις δύο: 25,6 μήνες, διαφορετική έκφραση μεταξύ των δύο: 15,2 μήνες , $p = 0.007$) **(Σχήμα 5)**.

Σχήμα 3: Ολική επιβίωση σε ασθενείς με διαφορετική έκφραση του PKM2 (ανεξάρτητα από την ιστολογία του πρωτοπαθούς όγκου)



O	N	Number of patients at risk :										PKM2
41	55	42	33	28	22	18	17	14	10	10		Both low
57	64	43	27	19	14	12	10	6	3	3		One high/other low
47	56	42	24	19	16	13	10	9	8	5		Both high

Σχήμα 4: Ολική επιβίωση σε ασθενείς με πλακώδη ιστολογία και διαφορετική έκφραση του RRM1



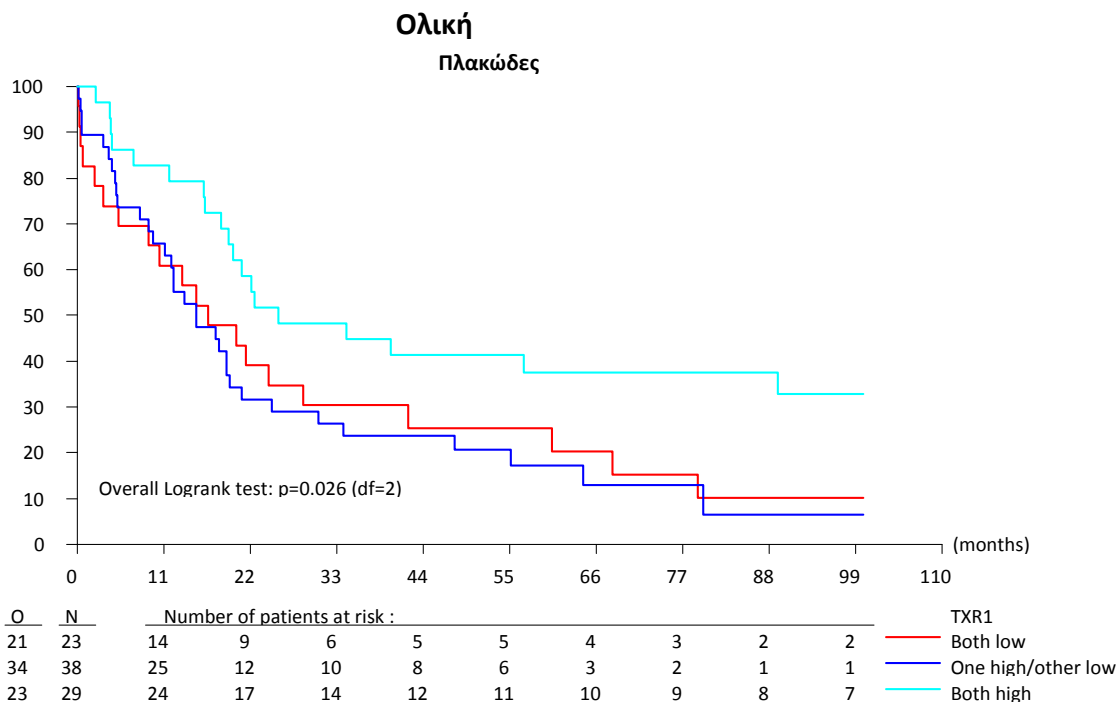
Πίνακας 10:Συσχέτιση των τιμών έκφρασης γονιδίων σε όγκους και λεμφαδένες ανά ιστολογία

Ιστολογία	Γονίδια	Ασθενείς (N)	RFS			OS		
			Διάμεση (95% CI)	P-τιμή	P-τιμή	Διάμεση (95% CI)	P-τιμή	P-τιμή
			(Μήνες)	(Log-Rank)	(interaction)	(Μήνες)	(Log-Rank)	(interaction)
Πλακώδης	BRCA1 & τα δύο χαμηλά	23	5.03 (2.27, 13.80)	0.613 (df=2)	0.830	15.11 (5.19, 22.51)	0.387 (df=2)	0.446
	BRCA1 ένα υψηλό/άλλο χαμηλό	24	4.45 (3.32, 19.42)			19.33 (9.63, 30.65)		
	BRCA1 & τα δύο υψηλά	38	7.75 (4.14, 15.18)			19.58 (12.22, 39.85)		
Μη-πλακώδης	BRCA1 & τα δύο χαμηλά	33	9.43 (1.71, 18.76)	0.974 (df=2)		31.34 (14.52, 48.39)	0.934 (df=2)	
	BRCA1 ένα υψηλό/άλλο χαμηλό	29	14.70 (1.28, 27.86)			22.72 (13.27, 45.50)		
	BRCA1 & τα δύο υψηλά	16	14.51 (2.00, 25.17)			25.17 (11.89, 67.38)		
Πλακώδης	ERCC1 & τα δύο χαμηλά	30	10.45 (3.68, 19.42)	0.879 (df=2)	0.885	18.53 (9.13, 30.65)	0.791 (df=2)	0.991
	ERCC1 ένα υψηλό/άλλο χαμηλό	28	4.60 (3.32, 12.22)			15.72 (10.45, 25.56)		
	ERCC1 & τα δύο υψηλά	32	4.42 (2.30, 16.10)			21.19 (11.73, 42.09)		
Μη-πλακώδης	ERCC1 & τα δύο χαμηλά	26	9.40 (1.77, 25.66)	0.973 (df=2)		30.92 (11.99, 45.50)	0.944 (df=2)	
	ERCC1 ένα υψηλό/άλλο χαμηλό	26	10.96 (2.33, 18.83)			27.89 (13.47, 68.57)		
	ERCC1 & τα δύο υψηλά	28	14.42 (1.54, 24.15)			24.15 (14.42, 43.89)		
Πλακώδης	PKM2 & τα δύο χαμηλά	19	15.44 (3.35, 23.13)	0.459 (df=2)	0.933	20.27 (9.03, 64.39)	0.218 (df=2)	0.390
	PKM2 ένα υψηλό/άλλο χαμηλό	30	4.70 (3.48, 13.60)			13.49 (8.02, 22.18)		
	PKM2 & τα δύο υψηλά	41	4.60 (2.73, 16.10)			20.90 (15.11, 42.09)		
Μη-πλακώδης	PKM2 & τα δύο χαμηλά	35	12.68 (1.71, 27.86)	0.498 (df=2)		38.87 (22.60, 67.38)	0.057 (df=2)	
	PKM2 ένα υψηλό/άλλο χαμηλό	34	12.06 (3.32, 18.76)			23.26 (13.47, 39.20)		
	PKM2 & τα δύο υψηλά	15	11.89 (1.12, 16.03)			19.71 (6.05, 25.17)		
Πλακώδης	RAP80 & τα δύο χαμηλά	34	4.48 (3.32, 13.60)	0.277 (df=2)	0.236	17.17 (9.63, 22.18)	0.222 (df=2)	0.241
	RAP80 ένα υψηλό/άλλο χαμηλό	23	8.51 (3.48, 51.84)			18.99 (10.45, 78.88)		
	RAP80 & τα δύο υψηλά	33	4.86 (2.83, 16.43)			24.74 (12.22, 47.31)		

Μη- πλακώδης	RAP80 & τα δύο χαμηλά	28	7.23 (1.48, 27.86)	0.608 (df=2)		32.85 (14.52, 48.39)	0.602 (df=2)	
	RAP80 ένα υψηλό/άλλο χαμηλό	30	5.26 (2.17, 19.75)			21.95 (8.80, 40.41)		
	RAP80 & τα δύο υψηλά	21	14.59 (6.05, 25.17)			25.17 (18.40, 49.54)		
Πλακώδης	RRM1 & τα δύο χαμηλά	18	9.79 (3.35, 23.13)	0.041 (df=2)	0.068	20.22 (9.13, 68.11)	0.019 (df=2)	0.086
	RRM1 ένα υψηλό/άλλο χαμηλό	23	3.88 (2.83, 4.40)			11.73 (4.14, 19.81)		
	RRM1 & τα δύο υψηλά	45	9.63 (4.34, 16.59)			20.90 (16.26, 42.09)		
Μη- πλακώδης	RRM1 & τα δύο χαμηλά	34	9.46 (1.84, 18.83)	0.435 (df=2)		26.15 (13.47, 39.59)	0.591 (df=2)	
	RRM1 ένα υψηλό/άλλο χαμηλό	24	14.51 (1.77, 25.17)			29.80 (11.89, 43.89)		
	RRM1 & τα δύο υψηλά	20	4.99 (1.48, 19.25)			21.29 (8.80, 49.54)		
Πλακώδης	RRM2 & τα δύο χαμηλά	24	5.11 (2.89, 18.50)	0.472 (df=2)	0.486	20.58 (5.19, 34.20)	0.345 (df=2)	0.105
	RRM2 ένα υψηλό/άλλο χαμηλό	26	8.82 (3.32, 17.87)			23.44 (17.54, 60.39)		
	RRM2 & τα δύο υψηλά	40	4.65 (3.35, 13.60)			12.94 (9.03, 19.81)		
Μη- πλακώδης	RRM2 & τα δύο χαμηλά	34	12.85 (1.84, 25.66)	0.540 (df=2)		39.59 (23.26, 68.57)	0.056 (df=2)	
	RRM2 ένα υψηλό/άλλο χαμηλό	28	13.80 (2.66, 19.75)			21.95 (13.47, 40.41)		
	RRM2 & τα δύο υψηλά	21	2.73 (1.54, 14.59)			17.64 (9.13, 25.17)		
Πλακώδης	TS & τα δύο χαμηλά	25	5.03 (3.35, 19.42)	0.821 (df=2)	0.230	16.10 (9.63, 30.65)	0.677 (df=2)	0.100
	TS ένα υψηλό/άλλο χαμηλό	27	4.53 (3.19, 15.18)			19.25 (9.03, 42.09)		
	TS & τα δύο υψηλά	35	8.51 (3.32, 15.44)			19.81 (13.37, 34.20)		
Μη- πλακώδης	TS & τα δύο χαμηλά	35	17.40 (3.32, 25.66)	0.128 (df=2)		36.83 (19.71, 53.03)	0.098 (df=2)	
	TS ένα υψηλό/άλλο χαμηλό	18	11.32 (1.48, 16.95)			25.87 (11.99, 43.89)		
	TS & τα δύο υψηλά	25	3.66 (1.68, 19.25)			20.52 (9.13, 39.20)		
Πλακώδης	TSP1 & τα δύο χαμηλά	45	5.03 (3.35, 15.18)	0.759 (df=2)	0.830	16.59 (12.22, 21.45)	0.385 (df=2)	0.667
	TSP1 ένα υψηλό/άλλο χαμηλό	30	11.10 (3.48, 23.13)			24.56 (18.07, 64.39)		
	TSP1 & τα δύο	15	4.86 (2.23, 9.63)			16.26 (8.02, 34.20)		

	υψηλά							
Μη- πλακώδης	TSP1 & τα δύο χαμηλά	16	10.73 (1.48, 16.95)	0.977 (df=2)		30.98 (18.40, 68.57)	0.835 (df=2)	
	TSP1 ένα υψηλό/άλλο χαμηλό	22	4.99 (1.77, 18.76)			27.89 (13.47, 67.38)		
	TSP1 & τα δύο υψηλά	43	14.93 (2.17, 20.73)			25.17 (14.42, 35.98)		
Πλακώδης	TXR1 & τα δύο χαμηλά	23	4.44 (2.30, 13.80)	0.078 (df=2)	0.004	16.59 (5.19, 28.68)	0.026 (df=2)	0.007
	TXR1 ένα υψηλό/άλλο χαμηλό	38	4.94 (3.48, 12.22)			15.15 (9.63, 19.42)		
	TXR1 & τα δύο υψηλά	29	15.44 (3.35, 89.07)			25.56 (18.27, 129.18)		
Μη- πλακώδης	TXR1 & τα δύο χαμηλά	21	19.75 (1.84, 32.00)	0.059 (df=2)		22.60 (11.99, N)	0.197 (df=2)	
	TXR1 ένα υψηλό/άλλο χαμηλό	24	13.40 (2.00, 20.73)			37.34 (18.79, 53.03)		
	TXR1 & τα δύο υψηλά	35	4.99 (1.68, 14.59)			21.29 (11.89, 35.98)		

Σχήμα 5: Ολική επιβίωση σε ασθενείς με πλακώδη ιστολογία και διαφορετική έκφραση του TXR1



Μοντέλο πολυπαραγοντικής ανάλυσης για την ολική επιβίωση και το διάστημα ελεύθερο νόσου.

A. Ολική Επιβίωση

Παράμετρος	Επίπεδο	Τύπος	Εκτίμηση Παραμέτρου	Τυπικό Σφάλμα	P-τιμή
PKM2	Ένα υψηλο/Άλλο χαμηλο		0.523	0.223	0.063 (df=2)
	Και τα δύο υψηλά		0.346	0.241	
TNMσταδιοποίηση (βαση 7ης έκδοσης)	III A		0.388	0.194	0.046 (df=1)
Ιστολογικός Υπότυπος	Μη- πλακώδης		-0.535	0.380	0.159 (df=1)
TXR1	Ένα υψηλο/Άλλο χαμηλο		0.074	0.290	0.040 (df=2)
	Και τα δύο υψηλά		-0.635	0.322	
TXR1*Ιστολογικός Υπότυπος	Ένα υψηλο/Άλλο χαμηλο	Μη- πλακώδης	-0.178	0.476	0.043 (df=2)
	Και τα δύο υψηλά	Μη- πλακώδης	0.845	0.487	

B. Διάστημα ελεύθερο της νόσου

Παράμετρος	Επίπεδο	Τύπος	Εκτίμηση Παραμέτρου	Τυπικό Σφάλμα	P-τιμή
TXR1	Ένα υψηλο/Άλλο χαμηλο		-0.132	0.282	0.126 (df=2)
	Και τα δύο υψηλά		-0.605	0.313	
TNMσταδιοποίηση (βαση 7ης έκδοσης)	IIIΑ		0.535	0.191	0.005 (df=1)
Ιστολογικός Υπότυπος	Μη- πλακώδης		-0.798	0.366	0.029 (df=1)
TXR1* Ιστολογικός Υπότυπος	Ένα υψηλο/Άλλο χαμηλο	Μη- πλακώδης	0.334	0.468	0.019 (df=2)
	Και τα δύο υψηλά	Μη- πλακώδης	1.243	0.475	

II. Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στον πρωτοπαθή όγκο με το διάστημα ελεύθερο υποτροπής και την ολική επιβίωση (Πίνακας 11).

Γονίδια	Έκφραση	RFS (διάστημα ελεύθερο υποτροπής)			OS (Ολική επιβίωση)	
		Ασθενείς	Διάμεση(95% CI)	P-τιμή	Διάμεση(95% CI)	P-τιμή
		(N)	(Μήνες)	(Log-Rank)	(Μήνες)	(Log-Rank)
<i>BRCA1</i>	Χαμηλή	114	12.52 (6.05, 16.95)	0.567	26.64 (19.81, 38.05)	0.737
	Υψηλή	115	12.22 (5.42, 17.51)		24.74 (19.42, 35.98)	
<i>ERCC1</i>	Χαμηλή	118	9.63 (5.42, 16.95)	0.844	25.03 (16.59, 32.62)	0.213
	Υψηλή	119	13.72 (6.05, 17.51)		25.82 (20.93, 39.85)	
<i>PKM2</i>	Χαμηλή	118	12.52 (5.52, 18.83)	0.876	28.68 (19.78, 35.98)	0.987

	Υψηλή	120	12.02 (7.43, 15.28)		25.72 (19.25, 32.62)	
<i>RAP80</i>	Χαμηλή	118	10.45 (4.37, 16.59)	0.293	24.15 (17.64, 33.91)	0.134
	Υψηλή	118	13.40 (7.43, 17.87)		27.24 (21.45, 42.09)	
<i>RRM1</i>	Χαμηλή	114	12.85 (8.41, 18.99)	0.295	30.65 (21.45, 39.20)	0.193
	Υψηλή	121	11.47 (4.86, 15.28)		22.60 (18.79, 32.59)	
<i>RRM2</i>	Χαμηλή	119	15.18 (9.40, 20.70)	0.534	30.65 (24.15, 38.44)	0.44
	Υψηλή	119	8.08 (4.44, 13.60)		19.81 (14.95, 32.62)	
<i>TS</i>	Χαμηλή	116	16.03 (9.40, 20.73)	0.077	31.31 (22.51, 39.59)	0.386
	Υψηλή	118	8.77 (4.60, 13.60)		21.45 (18.40, 28.32)	
<i>TSP1</i>	Χαμηλή	118	8.51 (4.44, 12.45)	0.016	20.93 (17.54, 25.99)	0.034
	Υψηλή	119	17.68 (9.63, 25.03)		34.20 (25.17, 46.39)	
<i>TXR1</i>	Χαμηλή	114	14.49 (8.41, 23.13)	0.062	28.50 (21.45, 38.87)	0.194
	Υψηλή	122	10.55 (4.53, 14.42)		22.88 (18.76, 32.62)	

Τα πιο πάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι μόνο η χαμηλή έκφραση του *TSP1* συσχετίζεται με μικρότερο διάστημα ελεύθερο νόσου και μικρότερη επιβίωση.

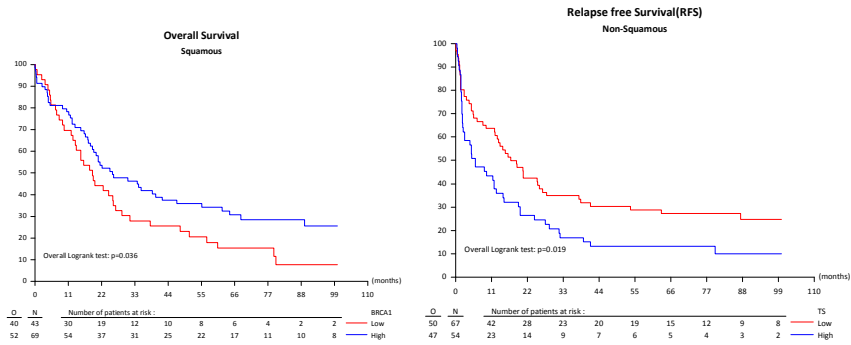
III. Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στον πρωτοπαθή όγκο και της έκβασης ανάλογα με την ιστολογία (Πίνακας 12).

Ιστολογία	Γονίδια	Ασθενείς (N)	RFS (Διάστημα ελεύθερο υποτροπής)			OS (Ολική Επιβίωση)		
			Διάμεση (95% CI) (Μήνες)	P-τιμή (Log-Rank)	P-τιμή* (interaction)	Διάμεση (95% CI) (Μήνες)	P-τιμή (Log-Rank)	P-τιμή* (interaction)
Πλακώδης	BRCA1 Χαμηλή	43	9.13 (3.75, 16.10)	0.092	0.117	18.99 (12.52, 25.82)	0.036	0.040
Μη-πλακώδης	BRCA1 Υψηλή	69	12.22 (4.44, 19.42)	0.562		25.56 (18.27, 42.09)	0.335	
	BRCA1 Χαμηλή	71	13.40 (6.64, 20.73)			37.13 (25.03, 51.65)		
	BRCA1 Υψηλή	46	11.89 (4.83, 19.25)			21.29 (16.85, 39.20)		
Πλακώδης	ERCC1 Χαμηλή	55	11.76 (5.03, 19.42)	0.649	0.442	18.07 (12.52, 30.65)	0.526	0.603
Μη-πλακώδης	ERCC1 Υψηλή	60	10.15 (4.27, 17.87)	0.578		25.64 (19.25, 39.85)	0.225	
	ERCC1 Χαμηλή	63	9.08 (3.32, 20.73)			31.06 (21.03, 38.87)		
	ERCC1 Υψηλή	59	14.51 (8.41, 19.78)			32.59 (19.71, 68.57)		
Πλακώδης	PKM2 Χαμηλή	49	9.63 (4.34, 17.51)	0.565	0.555	20.93 (16.26, 31.31)	0.473	0.398
Μη-πλακώδης	PKM2 Υψηλή	66	12.68 (4.60, 18.99)	0.758		24.97 (16.10, 42.09)	0.568	
	PKM2 Χαμηλή	69	15.92 (5.42, 20.73)			34.79 (19.78, 48.39)		
	PKM2 Υψηλή	54	12.02 (4.86, 15.28)			27.89 (19.15, 39.20)		
Πλακώδης	RAP80 Χαμηλή	57	9.63 (4.27, 16.10)	0.437	0.990	19.42 (15.11, 26.64)	0.252	0.948
Μη-πλακώδης	RAP80 Υψηλή	58	14.75 (4.53, 25.72)	0.55		25.91 (17.54, 46.92)	0.386	
	RAP80 Χαμηλή	61	11.83 (2.17, 20.73)			33.91 (16.85, 40.41)		
	RAP80 Υψηλή	60	13.01 (6.05, 19.25)			30.46 (21.03, 53.03)		
Πλακώδης	RRM1 Χαμηλή	43	12.52 (4.40, 20.90)	0.999	0.275	24.38 (15.11, 51.06)	0.923	0.347
Μη-πλακώδης	RRM1 Υψηλή	70	9.23 (4.44, 16.59)	0.165		21.55 (16.59, 31.31)	0.166	
	RRM1 Χαμηλή	71	13.24 (6.64, 20.73)			34.17 (23.13, 48.39)		
	RRM1 Υψηλή	51	11.68 (4.76, 18.76)			24.59 (18.40, 40.41)		
Πλακώδης	RRM2 Χαμηλή	49	14.06 (5.82, 21.06)	0.723	0.906	25.82 (19.25, 35.09)	0.731	0.845
Μη-πλακώδης	RRM2 Υψηλή	66	7.75 (3.88, 16.43)	0.611		19.20 (12.29, 33.84)	0.539	
	RRM2 Χαμηλή	70	17.40 (8.41, 20.73)			33.91 (24.15, 48.39)		
	RRM2 Υψηλή	53	9.46 (4.17, 14.59)			21.29 (14.42, 38.93)		
Πλακώδης	TS Χαμηλή	49	11.76 (4.14, 20.90)	0.975	0.085	19.42 (15.11, 31.31)	0.505	0.103
Μη-πλακώδης	TS Υψηλή	64	9.38 (4.44, 15.90)	0.019		23.28 (16.59, 34.20)	0.087	
	TS Χαμηλή	67	17.86 (12.02, 25.66)			38.65 (26.15, 53.03)		

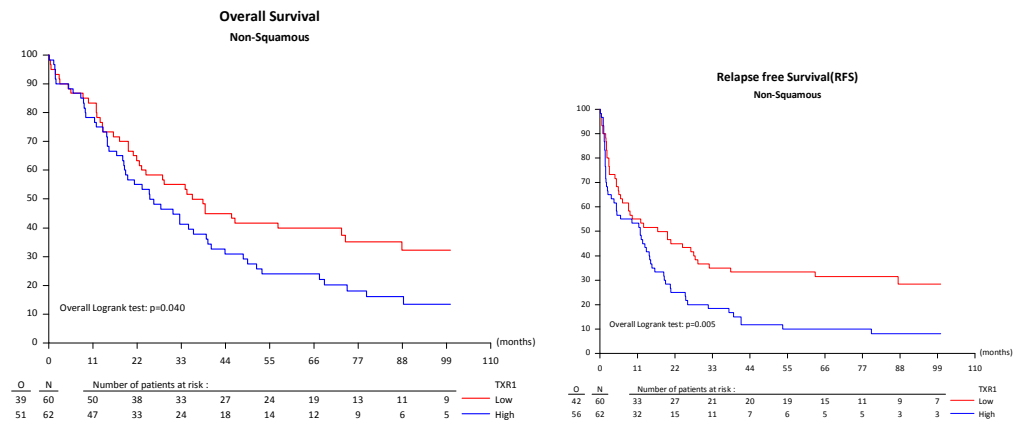
	TS Υψηλή	54	6.01 (2.17, 12.45)			21.03 (14.59, 35.98)		
Πλακώδης	TSP1 Χαμηλή	70	7.97 (4.27, 15.44)	0.142	0.855	19.61 (15.11, 24.38)	0.105	0.571
Μη-πλακώδης	TSP1 Υψηλή	45	16.59 (7.16, 31.31)	0.082		34.20 (18.99, 61.83)	0.336	
	TSP1 Χαμηλή	48	8.77 (2.76, 12.45)			23.26 (17.64, 38.93)		
	TSP1 Υψηλή	74	18.76 (8.41, 25.17)			34.43 (22.60, 48.39)		
Πλακώδης	TXR1 Χαμηλή	54	13.16 (5.82, 20.90)	0.709	0.022	25.05 (15.18, 38.05)	0.728	0.105
Μη-πλακώδης	TXR1 Υψηλή	60	7.97 (4.27, 16.43)	0.005		20.91 (16.10, 34.20)	0.04	
	TXR1 Χαμηλή	60	18.35 (6.01, 28.68)			37.13 (21.88, 72.94)		
	TXR1 Υψηλή	62	11.86 (3.32, 14.88)			25.17 (18.40, 35.98)		

Υψηλή έκφραση του *BRCA1* σχετίζεται με καλύτερη επιβίωση σε ασθενείς με πλακώδη ιστολογία, αλλά δεν υπάρχει τέτοια συσχέτιση με το διάστημα ελεύθερο υποτροπής. Χαμηλή *TS* έκφραση συσχετίζεται με καλύτερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής σε ασθενείς με μη πλακώδη ιστολογία αλλά δεν σχετίζεται με καλύτερη επιβίωση. Χαμηλή *TXR1* έκφραση σχετίζεται με καλύτερο διάστημα σε ασθενείς με μη πλακώδη ιστολογία αλλά όχι σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα και ο βαθμός επίδρασης είναι σημαντικός (σχήμα 6).

Σχήμα 6- Ολική επιβίωση ανάλογα με την έκφραση του BRCA1 στην πλακώδη και διάστημα ελεύθερο υποτροπής της νόσου ανάλογα με την έκφραση του TS στην μη- πλακώδη ιστολογία (πρωτοπαθής όγκος).



Σχήμα 7- Ολική επιβίωση και διάστημα ελεύθερο υποτροπής στην μη-πλακώδη ιστολογία ανάλογα με την έκφραση του TXR1

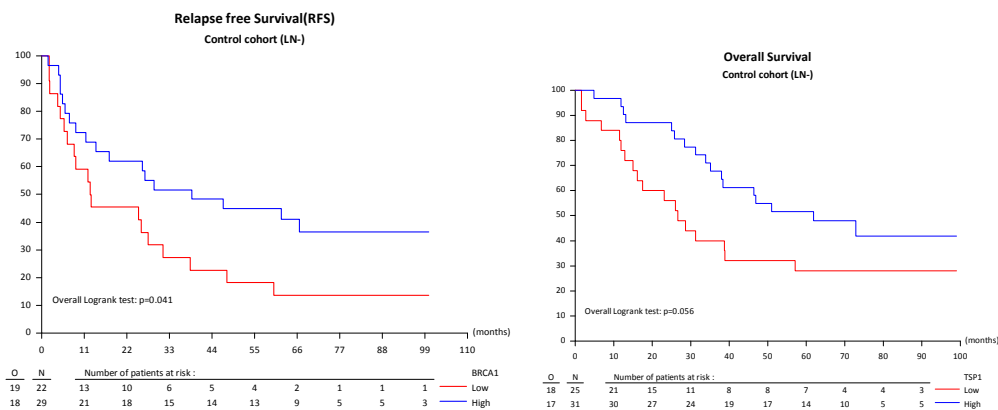


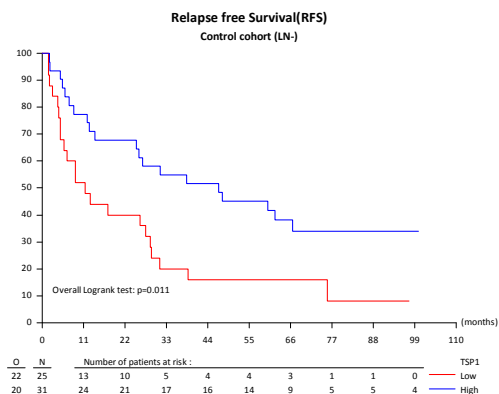
IV. Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στον πρωτοπαθή όγκο ανάλογα με την ύπαρξη διηθημένων λεμφαδένων (Πίνακας 13).

	Γονίδια	Ασθενείς (N)	Διάμεση (95% CI) (Μήνες)	P-τιμή (Log-Rank)	P-τιμή* (interaction)	Διάμεση (95% CI) (Μήνες)	P-τιμή (Log-Rank)	P-τιμή* (interaction)
N- (ελέγχου) N+	BRCA1 Χαμηλή	22	12.68 (5.82, 31.31)	0.041	0.048	32.61 (23.13, 57.07)	0.055	0.034
	BRCA1 Υψηλή	29	38.74 (11.47, N)			Not reached		
	BRCA1 Χαμηλή	92	12.06 (4.76, 16.95)	0.484	24.38 (18.40, 38.87)	0.358		
	BRCA1 Υψηλή	86	7.43 (3.68, 14.59)		20.27 (16.85, 25.56)			
N- (ελέγχου) N+	ERCC1 Χαμηλή	32	27.70 (6.64, 38.74)	0.515	0.587	32.61 (23.13, N)	0.356	0.658
	ERCC1 Υψηλή	24	25.86 (11.47, 36.60)			59.45 (25.99, N)		
	ERCC1 Χαμηλή	86	9.13 (3.48, 15.18)	0.918	19.42 (13.47, 30.92)	0.261		
	ERCC1 Υψηλή	95	12.34 (4.40, 16.03)		23.38 (19.25, 33.84)			
N- (ελέγχου) N+	PKM2 Χαμηλή	26	21.27 (6.64, 47.87)	0.775	0.651	36.57 (17.51, N)	0.482	0.273
	PKM2 Υψηλή	30	27.10 (11.47, 41.83)			51.99 (28.32, N)		
	PKM2 Χαμηλή	92	9.63 (3.68, 18.76)	0.822	22.51 (18.40, 35.81)	0.461		
	PKM2 Υψηλή	90	9.40 (4.53, 13.63)		20.90 (15.18, 25.82)			
N- (ελέγχου) N+	RAP80 Χαμηλή	20	27.10 (8.41, 59.96)	0.778	0.938	35.98 (14.95, N)	0.461	0.760
	RAP80 Υψηλή	34	21.27 (6.64, 47.87)			48.99 (25.03, N)		
	RAP80 Χαμηλή	98	5.52 (3.48, 14.88)	0.498	19.42 (15.18, 30.65)	0.356		
	RAP80 Υψηλή	84	12.14 (4.76, 16.03)		24.00 (19.71, 34.20)			
N- (ελέγχου) N+	RRM1 Χαμηλή	30	19.78 (6.64, 59.96)	0.885	0.509	48.72 (23.13, N)	0.996	0.495
	RRM1 Υψηλή	24	25.86 (8.84, 46.92)			38.59 (25.72, N)		
	RRM1 Χαμηλή	84	12.06 (5.03, 18.83)	0.268	26.15 (19.71, 35.81)	0.162		
	RRM1 Υψηλή	97	7.43 (4.14, 13.60)		19.78 (16.26, 24.74)			
N- (ελέγχου) N+	RRM2 Χαμηλή	28	25.38 (8.41, 38.44)	0.362	0.141	32.61 (25.72, 51.06)	0.144	0.032
	RRM2 Υψηλή	28	27.10 (11.47, 36.60)			65.00 (25.99, N)		
	RRM2 Χαμηλή	91	14.88 (8.41, 19.75)	0.165	27.89 (20.90, 43.89)	0.057		
	RRM2 Υψηλή	91	4.44 (3.32, 10.45)		17.64 (12.22, 21.45)			
N- (ελέγχου) N+	TS Χαμηλή	28	34.87 (12.02, 41.83)	0.156	0.673	42.56 (25.03, N)	0.889	0.567
	TS Υψηλή	26	15.79 (4.86, 28.68)			37.01 (25.72, N)		
	TS Χαμηλή	88	13.63 (4.37, 18.99)	0.192	26.15 (18.76, 38.87)	0.292		
	TS Υψηλή	92	6.05 (3.48, 12.22)		19.78 (16.26, 24.15)			
N- (ελέγχου) N+	TSP1 Χαμηλή	25	11.47 (4.86, 28.68)	0.011	0.169	26.64 (14.95, 57.07)	0.056	0.330
	TSP1 Υψηλή	31	46.92 (14.06, N)			61.83 (35.09, N)		
	TSP1 Χαμηλή	93	5.19 (3.75, 12.45)	0.214	20.27 (16.59, 24.38)	0.242		
	TSP1 Υψηλή	88	14.42 (4.86, 19.75)		25.82 (18.76, 35.98)			
N- (ελέγχου) N+	TXR1 Χαμηλή	42	26.35 (8.77, 38.44)	0.947	0.745	38.83 (28.32, 72.94)	0.959	0.735
	TXR1 Υψηλή	12	21.27 (4.17, 66.60)			41.00 (11.47, N)		
	TXR1 Χαμηλή	72	11.10 (3.88, 19.42)	0.282	21.24 (16.59, 34.43)	0.644		
	TXR1 Υψηλή	110	7.97 (4.34, 13.60)		21.73 (18.40, 30.92)			

Υψηλή έκφραση του *BRCA1* στον πρωτοπαθή όγκο σχετίζεται με καλύτερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής και επιβίωση σε ασθενείς χωρίς διηθημένους λεμφαδένες, αλλά δεν υπάρχει τέτοια συσχέτιση με τους ασθενείς στην ομάδα ασθενών με διήθηση λεμφαδένων. Υψηλή έκφραση *TSP1* στον πρωτοπαθή όγκο σχετίζεται με καλύτερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής και επιβίωση (οριακά) σε ασθενείς χωρίς διηθημένους λεμφαδένες, δεν υπάρχει τέτοια συσχέτιση στην ομάδα των ασθενών με διήθηση λεμφαδένων.

Σχήμα-8, Διάστημα ελεύθερο υποτροπής σε ασθενείς χωρίς διηθημένους λεμφαδένες ανάλογα με την έκφραση του *BRCA1* στον πρωτοπαθή όγκο και ολική επιβίωση και διάστημα ελεύθερο υποτροπής ασθενών χωρίς διηθημένους λεμφαδένες ανάλογα με την έκφραση του *TSP1* στον πρωτοπαθή όγκο.





V. Συσχέτιση της γονιδιακής έκφρασης στους διηθημένους λεμφαδένες με το διάστημα ελεύθερο νόσου και την ολική επιβίωση (Πίνακας 14)

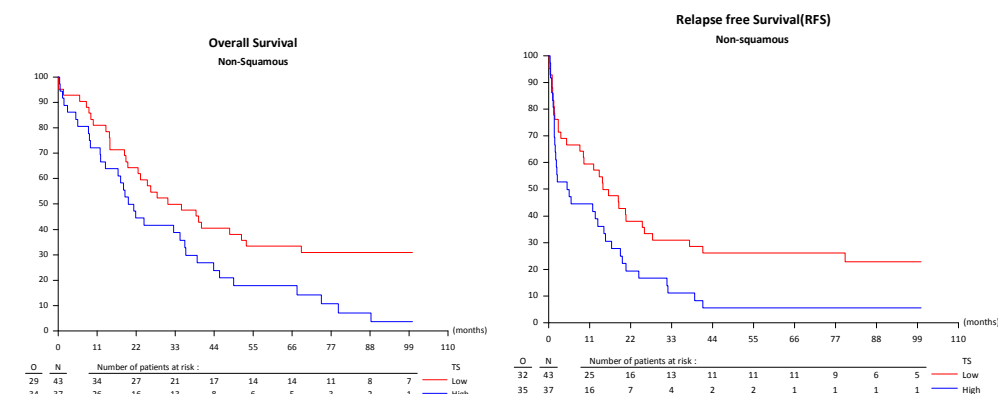
Ιστολογία	Γονίδια	Ασθενείς (N)	RFS(Διάστημα ελεύθερο υποτροπής)			OS (Ολική επιβίωση)		
			Διάρκεια (95% CI) (Μήνες)	P-τιμή (Log-Rank)	P-τιμή* (interaction)	Median (95% CI) (Μηνές)	P-τιμή (Log-Rank)	P-τιμή* (interaction)
Πλακώδης Μη-Πλακώδης	BRCA1 Χαμηλή	39	4.37 (3.29, 15.44)	0.406	0.690	18.99 (11.17, 22.51)	0.269	0.980
	BRCA1 Υψηλή	49	8.08 (4.34, 15.18)			18.99 (12.29, 34.20)		
	BRCA1 Χαμηλή	45	8.41 (1.77, 13.17)	0.185		21.88 (14.52, 38.87)		
	BRCA1 Υψηλή	36	16.11 (4.99, 27.86)			34.43 (16.85, 74.25)		
Πλακώδης Μη-Πλακώδης	ERCC1 Χαμηλή	46	8.82 (3.68, 17.87)	0.53	0.623	19.84 (13.37, 30.65)	0.855	0.913
	ERCC1 Υψηλή	45	4.40 (3.48, 13.80)			18.99 (11.17, 24.38)		
	ERCC1 Χαμηλή	40	12.06 (1.97, 19.75)	0.897		27.89 (18.76, 39.20)		
	ERCC1 Υψηλή	42	13.17 (2.33, 19.25)			24.15 (14.59, 40.41)		
Πλακώδης	PKM2 Χαμηλή	33	13.60 (4.40, 18.50)	0.148	0.652	18.99 (10.45, 30.65)	0.715	0.334
	PKM2 Υψηλή	58	4.40 (3.19, 11.76)			20.07 (15.11, 25.56)		

Μη-Πλακώδης	PKM2 Χαμηλή	54	10.76 (2.56, 19.25)	0.496		34.79 (23.26, 49.54)	0.093	
	PKM2 Υψηλή	31	12.45 (1.84, 18.83)			19.71 (14.42, 25.17)		
Πλακώδης	RAP80 Χαμηλή	45	4.37 (3.32, 9.63)	0.147	0.300	16.26 (11.96, 20.90)	0.086	0.189
Μη-Πλακώδης	RAP80 Υψηλή	45	10.45 (4.34, 17.87)			21.45 (15.11, 47.31)		
	RAP80 Χαμηλή	40	12.81 (1.71, 18.76)	0.987	27.02 (16.85, 43.89)	0.879		
	RAP80 Υψηλή	41	11.89 (2.56, 19.25)		24.15 (14.59, 39.59)			
Πλακώδης	RRM1 Χαμηλή	30	4.62 (3.32, 18.50)	0.5	0.370	13.14 (5.03, 28.68)	0.194	0.257
Μη-Πλακώδης	RRM1 Υψηλή	58	8.30 (3.88, 15.90)			20.04 (16.10, 34.20)		
	RRM1 Χαμηλή	51	10.76 (2.56, 16.95)	0.691	22.93 (14.42, 38.87)	0.859		
	RRM1 Υψηλή	28	11.89 (1.77, 24.15)		34.43 (17.64, 45.50)			
Πλακώδης	RRM2 Χαμηλή	39	4.60 (3.32, 16.10)	0.826	0.490	22.18 (13.37, 34.20)	0.936	0.187
Μη-Πλακώδης	RRM2 Υψηλή	52	8.30 (3.88, 15.44)			18.63 (12.22, 21.45)		
	RRM2 Χαμηλή	49	12.45 (2.56, 18.83)	0.413	34.79 (22.60, 53.03)	0.06		
	RRM2 Υψηλή	35	5.52 (1.97, 18.76)		19.15 (11.99, 25.17)			
Πλακώδης	TS Χαμηλή	42	4.94 (3.75, 16.10)	0.635	0.026	17.54 (11.17, 25.56)	0.356	0.010
Μη-πλακώδης	TS Υψηλή	47	8.08 (3.48, 15.44)			19.81 (13.60, 34.20)		
	TS Χαμηλή	43	15.31 (8.41, 25.17)	0.012	32.85 (19.71, 51.65)	0.009		
	TS Υψηλή	37	5.26 (1.68, 14.88)		20.52 (11.99, 35.81)			
Πλακώδης	TSP1 Χαμηλή	60	6.31 (3.88, 15.90)	0.754	0.949	19.12 (13.37, 24.74)	0.676	0.597
Μη-Πλακώδης	TSP1 Υψηλή	31	4.86 (3.35, 13.80)			20.90 (11.17, 34.20)		
	TSP1 Χαμηλή	27	9.40 (1.84, 18.76)	0.896	26.15 (18.76, 51.65)	0.727		
	TSP1 Υψηλή	56	13.80 (2.33, 19.25)		25.17 (14.59, 38.87)			
Πλακώδης	TXR1 Χαμηλή	48	4.42 (2.89, 8.51)	0.005	<0.001	14.36 (9.13, 20.90)	0.002	0.001
Μη-πλακώδης	TXR1 Υψηλή	43	15.44 (4.27, 21.06)			22.51 (18.27, 56.84)		
	TXR1 Χαμηλή	38	14.83 (5.52, 24.15)	0.038	29.40 (19.71, 51.65)	0.088		
	TXR1 Υψηλή	43	4.99 (1.77, 14.88)		21.29 (14.42, 35.98)			

Η ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων σύμφωνα με τον ιστολογικό υπότυπο έδειξε ότι η χαμηλή έκφραση *TS* σχετίζεται με σημαντικά καλύτερο διάστημα ελεύθερο νόσου και επιβίωση σε ασθενείς με μη-πλακώδη ιστολογία, αλλά όχι σε ασθενείς με πλακώδη ιστολογία

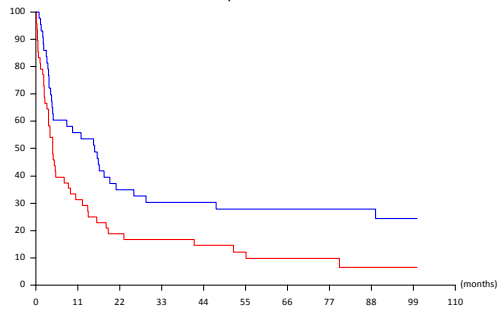
Παρόμοια, η χαμηλή έκφραση *TXR1* σχετίζεται με καλύτερο διάστημα ελεύθερο νόσου και επιβίωση σε ασθενείς με μη-πλακώδη ιστολογία, αντίθετα η υψηλή έκφραση του σχετίζεται με καλύτερο διάστημα ελεύθερο νόσου, αλλά η συσχέτιση με την επιβίωση δεν είναι σημαντική ($p = 0,088$) σε ασθενείς με πλακώδη ιστολογία (Σχήμα 9 και 10).

Σχήμα 9- Ολική επιβίωση και διάστημα ελεύθερο νόσου για τους ασθενείς με διηθημένους λεμφαδένες και μη-πλακώδη ιστολογία ανάλογα με την έκφραση του *TS* στο επίπεδο των λεμφαδένων



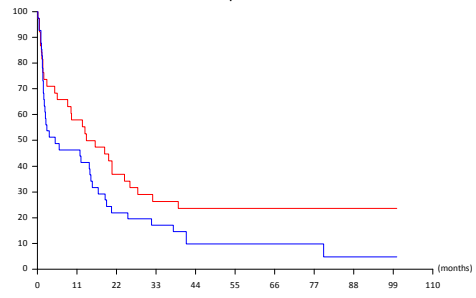
Σχήμα 10- Έκφραση του *TXR1* σε διηθημένους λεμφαδένες και συσχέτιση με το διάστημα ελεύθερο υποτροπής σε πλακώδη και μη πλακώδη ιστολογία. Συσχέτιση του *TXR1* σε διηθημένους λεμφαδένες με την επιβίωση σε ασθενείς με πλακώδη ιστολογία.

Relapse free Survival(RFS)
Squamous



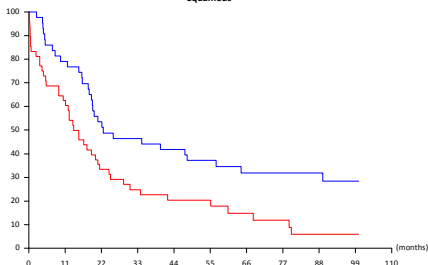
O	N	Number of patients at risk :										TXR1
45	48	15	9	8	6	5	3	3	2	2		Low
36	43	24	15	13	13	11	11	9	8	7		High

Relapse free Survival(RFS)
Non-squamous



O	N	Number of patients at risk :										TXR1
29	38	22	14	10	9	9	8	7	6	5		Low
39	43	19	9	7	4	4	4	3	1	1		High

Overall Survival
Squamous



O	N	Number of patients at risk :										TXR1
44	48	30	16	11	8	8	5	4	2	2		Low
35	43	34	23	20	18	14	12	10	9	8		High

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα επίπεδα έκφρασης διαφόρων γονιδίων στον πρωτοπαθή όγκο, τα οποία χαρακτηρίζουν τη βιολογική συμπεριφορά του ΜΜΚΠ, μπορεί να ποικίλουν σε σύγκριση με τα επίπεδα έκφρασης των ίδιων γονιδίων στους αντίστοιχους περιφερειακά διηθημένους λεμφαδένες. Πολλά από αυτά τα γονίδια έχουν αναφερθεί ότι έχουν σημαντική προγνωστική και προβλεπτική αξία όσον αφορά την ανταπόκριση σε αρκετά κλασσικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα για τη θεραπεία του ΜΜΚΠ, κυρίως την πλατίνα, τις ταξάνες, τη γεμισιταβίνη και τη πεμετρεξίδη. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται συμφωνούν με τα προηγούμενα δημοσιευμένα αποτελέσματα, τα οποία ανέφεραν ότι η υψηλή έκφραση του *BRCA1* στον πρωτογενή όγκο συσχετίζεται με καλύτερη έκβαση της νόσου ανεξαρτήτως της θεραπείας που λαμβάνεται και της ιστολογίας του όγκου (πλακώδης ή μη πλακώδης) (**Papadaki C et al 2011**). Παρομοίως, η υψηλή έκφραση του *TSP1* στον πρωτογενή όγκο συσχετίστηκε με βελτιωμένη μακροπρόθεσμη έκβαση ανεξάρτητα από την ιστολογία και το στάδιο της νόσου. Η χαμηλή έκφραση του *TXR1* στον πρωτοπαθή όγκο συσχετίστηκε με μακροπρόθεσμη έκβαση σε ασθενείς με μη πλακώδη ιστολογία. Οι ίδιοι συσχετισμοί παρατηρήθηκαν επίσης όταν το επίπεδο έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν αξιολογήθηκε στο επίπεδο των περιφερειακών διηθημένων λεμφαδένων. Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν έντονα τη σημαντική προγνωστική αξία των γονιδίων που μελετήθηκαν ανεξάρτητα από τον ιστό που χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγησή τους. Αν και αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τις προηγούμενες δημοσιευμένες

αναφορές της ομάδας μας, θα πρέπει να ερμηνεύονται προσεκτικά κυρίως λόγω του αναδρομικού χαρακτήρα της μελέτης.

Επίσης δείξαμε ότι τα διαφορετικά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων (υψηλής έναντι χαμηλής) μεταξύ του πρωτοπαθούς και των περιοχικών λεμφαδένων μπορεί να σχετίζονται με την κλινική έκβαση των ασθενών με ΜΜΚΠ και διηθημένους λεμφαδένες (στάδιο II και III) . Το γονίδιο *PKM2* συσχετίστηκε με ένα μακροπρόθεσμο όφελος επιβίωσης ανεξάρτητα από την υποκείμενη ιστολογία. Πράγματι, οι ασθενείς με χαμηλή έκφραση *PKM2* τόσο στον πρωτοπαθή όγκο όσο και σε επίπεδο των λεμφαδένων παρουσίασαν μεγαλύτερο όφελος στην επιβίωση σε σύγκριση με τους ασθενείς με διαφορετική έκφραση μεταξύ του πρωτοπαθούς όγκου/ λεμφαδένων ή με τους ασθενείς με υψηλή έκφραση και στις δύο περιοχές. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι ασθενείς με πλακώδεις όγκους και όμοια επίπεδα (υψηλή ή χαμηλή) *RRM1* είχαν καλύτερη έκβαση είτε στο διάστημα ελεύθερο υποτροπής και διάμεσης ολικής επιβίωσης (RFS και OS) σε σύγκριση με τις περιπτώσεις με διαφορετική έκφραση σε πρωτοπαθή όγκο και λεμφαδένες , με τους όγκους που είχαν χαμηλή έκφραση και στις δύο περιοχές να έχουν καλύτερη έκβαση (αυξημένο RFS και OS) σε σύγκριση με τις άλλες δύο κατηγορίες έκφρασης (αντίστοιχη υψηλή και στις δύο περιοχές και διαφορετική).

Αυτή η παρατήρηση υποστηρίζει περαιτέρω τις προηγούμενες μελέτες σε ασθενείς με μεταστατικό ΜΜΚΠ που δείχνουν ότι η χαμηλή έκφραση του *RRM1* όσο και του *RRM2* σχετίζεται με σημαντικά υψηλότερο ποσοστό ανταπόκρισης, χρόνο έως πρόοδο και συνολική επιβίωση, ενώ τα αυξημένα επίπεδα των *RRM1* και *RRM2* σχετίζονται με μικρότερη απόκριση

στη χημειοθεραπεία δοσεταξέλης πρώτης γραμμής και χημειοθεραπεία με γεμισιταβίνη (14), (29)(**Boukovinas I, et al 2008 & Souglakos Jetal 2008**). Παρομοίως, οι ασθενείς που παρουσιάζουν υψηλό επίπεδο έκφρασης για το *TXR1* έχουν δείξει ότι έχουν καλύτερο RFS και OS σε σύγκριση με τους ασθενείς με αντίθετη έκφραση και αυτούς με χαμηλή έκφραση σε πρωτοπαθή όγκο και περιοχικούς λεμφαδένες σε όγκους με πλακώδη ιστολογία.

Αν και αυτά τα αποτελέσματα πρέπει να ερμηνευθούν προσεκτικά λόγω του μικρού αριθμού των ασθενών που περιλαμβάνονται στην ανάλυση αυτή, έρχονται σε αντίθεση με την παρατήρηση ότι όγκοι με χαμηλή έκφραση *TXR1* στον πρωτογενή όγκο και μη διηθημένους λεμφαδένες φαίνεται να έχουν καλύτερο βιολογικό προφίλ. Ίσως είναι πιθανό ότι η εξέλιξη σε υψηλότερο στάδιο νόσου συνοδεύεται επίσης με μια αλλαγή στη βιολογική συμπεριφορά του συγκεκριμένου γονιδίου (**Gerlinger M, Swanton C. 2010**).

Περιορισμοί της τρέχουσας μελέτης περιλαμβάνουν την αναδρομική φύση των δεδομένων που αναλύθηκαν καθώς και τον υψηλό αριθμό μη διαθέσιμων πληροφοριών σχετικά με το είδος της επικουρικής θεραπείας, που προκύπτει από το γεγονός ότι η πλειοψηφία των ασθενών υπεβλήθη σε θεραπεία αλλού μετά την αρχική χειρουργική επέμβαση, καθιστώντας έτσι δύσκολη την ανάκτηση σημαντικών ιατρικών πληροφοριών. Κατά συνέπεια, δεν μπορούσαμε να αξιολογήσουμε οποιαδήποτε απόκριση στη θεραπεία σε σχέση με τα εκφρασμένα γονίδια σε αρκετούς ασθενείς, αφού η υψηλή συν-έκφραση του *BRCA1* στον πρωτοπαθή όγκο και του *RRM1* ή *TS* μπορεί να υποδηλώνει ευαισθησία πλατίνας σε συνδυασμό με

γεμισταβίνη ή ταξάνη, αντίστοιχα . Ως εκ τούτου, η μελέτη είναι διερευνητική και εξ ορισμού αυτά τα ευρήματα δεν είναι έτοιμα για κλινική εφαρμογή.

Ένας άλλος περιορισμός θα μπορούσε να θεωρηθεί το γεγονός ότι συμπεριελήφθησαν ασθενείς που έλαβαν θεραπεία σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μια μεγάλη περιόδου του παρελθόντος, κάτι που αναπόφευκτα οδήγησε σε μια ανάλυση μη προσαρμοσμένη για τις αλλαγές στις πρακτικές, τις θεραπευτικές προσεγγίσεις και την πρόγνωση καθ 'όλη τη διάρκεια των ετών, κυρίως λόγω της περαιτέρω εξέλιξης της διαχείρισης του ΜΜΚΠ και διαθεσιμότητας νέων στοχευμένων προσεγγίσεων θεραπείας κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών. Σε αυτή τη μελέτη επίσης δεν μπορούσαμε να λάβουμε υπόψη την ετερογένεια που συχνά υπήρχε μεταξύ διαφορετικών περιοχών του ίδιου δείγματος όγκου ή μεταξύ διαφορετικών λεμφαδένων, όταν αφαιρέθηκαν περισσότεροι από ένα. Στον καρκίνο του μαστού για παράδειγμα, οι διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των απλών βιοδεικτών όπως οι υποδοχείς ορμονών και του HER2 έχουν αναφερθεί ήδη στους ίδιους ασθενείς μεταξύ του πρωτοπαθούς και των μεταστατικών εστιών, κάτι που αποδεικνύει την μοριακή εξέλιξη της κακοήθους νόσου κατά την πρόοδο του καρκίνου (**Hammond ME et al 2010 & Aurilio Getal 2014**). Η σημασία της ετερογένειας αυτής στην κλινική πρακτική βασίζεται στο γεγονός ότι μέχρι σήμερα οι αποφάσεις θεραπείας για ασθενείς με μεταστατική νόσο λαμβάνονται πάντα με βάση τα παθολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά του πρωτεύοντος όγκου. Είναι αναμφισβήτητα μια πρακτική που η σύγχρονη ογκολογία προσπαθεί να αλλάξει με την εφαρμογή βιοψίας της

πρώτης μετάστασης μετά την αρχική εκτομή και θεραπεία του πρωτοπαθούς όγκου. Αν και είναι προφανές ότι η πρακτική αυτή μπορεί να έχει περιορισμούς λόγω του επεμβατικού χαρακτήρα της, θα μπορούσε ακόμα να θεωρηθεί λογική προσέγγιση στην συνεχιζόμενη προσπάθεια αντιμετώπισης της ανομοιογένειας της νόσου. Ωστόσο, δεν έχουμε εξηγήσει ακόμα την αιτιολογία της ετερογένειας του όγκου. Πολλές θεωρίες υπάρχουν, οι πιο διαδεδομένες είναι είτε η αποδιαφοροποίηση των καρκινικών στελεχειαίων κυττάρων (CSCs), τα οποία κατά συνέπεια μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μία ετερογενή ομάδα κακοήθων κυττάρων ή στη θεωρία της κλωνικής εξέλιξης, γεγονός που υποδηλώνει ότι μόλις δημιουργηθεί ένας καρκίνος από ένα μόνο κύτταρο, η περαιτέρω γενετική αστάθεια μπορούν να οδηγήσουν στη δημιουργία πιο επιθετικών υποκλώνων (**Zardavas D, et al 2015**). Μια πρόσθετη θεωρία περιλαμβάνει το ρόλο του μικροπεριβάλλοντος του όγκου για τον προσδιορισμό της ετερογένειας και της άμεσης γονιδιακής έκφρασης. Παρόλο που πρόκειται για τρεις διαφορετικές θεωρίες, δεν θεωρούνται αμοιβαία αποκλειόμενες και προκλινικά στοιχεία υποδηλώνουν ότι όλοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ποικιλομορφία της κακοήθους νόσου. Η εντατική έρευνα που βρίσκεται επί του παρόντος σε εξέλιξη θα προστεθεί σε πιο ακριβή προσέγγιση της θεραπείας του καρκίνου, δεδομένης της αφθονίας των νεότερων αντικαρκινικών θεραπειών.

E. ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Σήμερα, η εισαγωγή εξελιγμένων τεχνολογιών, όπως η αλληλουχία επόμενης γενιάς (NGS), επέτρεψε πιο λεπτομερή εξερεύνηση της βιολογίας αρκετών τύπων όγκων. Επειδή η ετερογένεια έχει συνέπειες στο επίπεδο της λήψης της θεραπείας, απαιτεί την εφαρμογή καινοτόμων εννοιών για καλύτερη βελτιστοποίηση της διαχείρισης του καρκίνου. Σε αυτό το πλαίσιο το πρόγραμμα SPECTA που αναπτύχθηκε από τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Έρευνας και Θεραπείας του Καρκίνου (EORTC) συλλέγει μελλοντικά κλινικές πληροφορίες και βιολογικό υλικό για την περαιτέρω αξιολόγηση της βιολογίας των κακοήθων ασθενειών (**Lacombe D et al 2014**). Το SPECTA-LUNG project αποτελεί μέρος του συνολικού προγράμματος και έχει ήδη προχωρήσει στην Ευρώπη, περιλαμβάνοντας ασθενείς με διαφορετικές θωρακικές κακοήθειες, προκειμένου να γίνει ανάλυση του όγκου με NGS μιας συγκεκριμένης ομάδας γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο . Παρόμοιες ερευνητικές πρωτοβουλίες βρίσκονται σε εξέλιξη και σε άλλους τύπους όγκων (**Zardavas D et al, 2014**). Μια σημαντική πτυχή αυτής της ερευνητικής εξέλιξης είναι η λεγόμενη υγρή βιοψία, καθώς η έκφραση γονιδίων ενός δείγματος ενός όγκου είναι στην πραγματικότητα ένα στιγμιότυπο μιας ενεργού νόσου που εξελίσσεται συνεχώς. Μια διαδοχική εκτίμηση των βιοδεικτών του πλάσματος θα μπορούσε ενδεχομένως να αντιπροσωπεύσει μια εναλλακτική λύση που να επιτρέπει τη σειριακή ανάλυση του μοριακού τοπίου του καρκίνου με το χαρακτηρισμό είτε του κυκλοφορούντος DNA των καρκινικών κυττάρων, είτε των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs), αποφεύγοντας έτσι τις πολλαπλές βιοψίες (**Zardavas D et al, 2015**

Ignatiadis M, et al. 2016). Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας θα μπορούσαν να εξηγηθούν ως μια πραγματική αντανάκλαση της ετερογένειας του όγκου ή των αλλαγών στη βιολογία της νόσου κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της νόσου, εντούτοις απαιτούνται πρόσθετες προοπτικές μελέτες για την περαιτέρω επικύρωση αυτών των ευρημάτων.

**ΣΤ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ- ΠΡΩΤΟΤΥΠΟ ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΟ ΑΡΘΡΟ ΤΗΣ
ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ**

Tryfonidis K, et al, Pharmacogenomics J. 2018 Feb 22, doi: 10.1038/s41397- 018-0013-9

**Association of *BRCA1, ERCC1, RAP80, PKM2, RRM1, RRM2, TS, TSP1* and *TXR1* m RNA
expression levels between primary tumors and infiltrated regional lymph nodes in patients
with resectable non- small cell lung cancer**

**Tryfonidis K^{1,2}, Papadaki C², Assele S¹, Lagoudaki E³, Menis J⁴, Koutsopoulos A³, Trypaki M²,
Tsakalaki E², Sfakianaki M², Hasan B¹, Stathopoulos E³, Georgoulas V^{2,5}, Souglakos J^{2,6}**

1. EORTC- Headquarters 2. Laboratory of Translational Oncology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece, 3. Department of Pathology, University of Crete, Heraklion 4. Institute Gustave Roussy, Paris, France and EORTC- Lung Cancer Group 5. School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete, 6. Department of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, Crete, Greece

Abstract

Differences in gene expression levels between the primary tumors (PTs) and matched regional lymph nodal metastases (LNs) in patients with totally excised non- small cell lung cancer (NSCLC) were explored. Microdissected formalin- fixed paraffin- embedded (FFPE) samples from (PT) and their matched infiltrated LNs, from 239 patients [183 (with matched PT and LNs samples)- case& 56 PT only samples- control cohorts] were analyzed for *BRCA1, ERCC1, RAP80, PKM2, RRM1,*

RRM2, *TS*, *TSP1* and *TXR1* mRNA expression by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR). Moderately positive correlation between the expression of each gene in the PT and the matched LNs was observed. Concordance rates between the PT and the LNs were: *BRCA1* (67.7%), *ERCC1* (68.4%), *PKM2* (63.4%), *RAP80* (68.8%), *RRM1* (70.9%), *RRM2* (69%), *TS* (72.9%), *TSP1* (69.8%), *TXR1* (63.7%). Expression levels and their differences were correlated with Relapse-Free Survival (RFS) and Overall Survival (OS). High *BRCA1* PT in patients with squamous histology was associated with increased OS ($p=0.036$). High *TSP1* PT levels were shown to be the only independent prognostic factor for OS and RFS ($p=0.023$ and $p=0.007$). *PKM2* low levels in both PT and matched LNs were associated with better OS irrespective of the underlying histology ($p=0.031$). *RRM1* discordant levels between PT and matched LNs were associated with worse OS in squamous tumors ($p=0.019$) compared to patients with both low expression in PT and LN. *TXR1* high levels in both PT and matched LNs were associated with better OS in patients with squamous tumors ($p=0.007$). These findings indicate that there is different gene expression between PT and matched LNs which may affect the outcome in early NSCLC and therefore PT's molecular biology should not be the sole determinant for prognostication.

Key Words: NSCLC, gene expression, primary tumor, lymph nodes, adjuvant chemotherapy, tumor heterogeneity

Introduction

Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) is the leading cause of cancer death worldwide(1). Generally, the 5-year survival rate is low (about 10-15%) and has not improved substantially in the last decade (2). Surgery and chemoradiotherapy are the only curative treatment modalities for patients with stage I- III, disease. The most common failure following a curative surgery is the development of distant metastases and thus a number of randomized trials have evaluated the role of adjuvant chemotherapy following surgical resection; a pooled analysis of these trials demonstrated a 5.4% absolute survival benefit at 5- years (3-7)(8).

In the past years, a growing body of evidence has been generated regarding the role of tumoral molecular genomic profiling to the prognostication and activity of various drugs in

several tumor types including NSCLC(9)(10). Expression of several genes has been shown to interfere with the metabolism of the main drug categories used in adjuvant therapy of NSCLC like *breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1)*, *excision repair complementation group 1(ERCC1)*, *receptor-associated protein 80(RAP80)* and *pyruvate kinase M2(PKM2)* for platinum compounds(11)(12) ; *taxol resistance gene 1 (TXR1)*, *thymidylate synthase (TS)* and *thrombospondin 1 (TSP1)* for taxanes(13) and *ribonucleotide reductase subunits M1/M2 (RRM1 /RRM2)* for gemcitabine(14). Notably, *BRCA1* gene has an important role in DNA repair via the homologous recombination repair pathway and is involved in platinum adducts removal. Studies have revealed that low mRNA (messenger RNA) *BRCA 1* levels are associated with cisplatin sensitivity and taxane resistance (15-17). *ERCC1* gene also removes platinum adducts and its down -regulation sensitizes cells to cisplatin (18;19). Similarly, the *RAP80* gene is required for the accumulation of *BRCA1* to the break points of DNA strands. Taxane resistance has been suggested by the *TXR1*, a proapoptotic factor, which seems to impede taxane- induced apoptosis by down- regulation of the glycoprotein *TSP1(20)(21)*. Resistance to gemcitabine has been associated with both *RRM1* and *RRM2* gene overexpression and reduced expression of let-7 microRNA (miRNA) is frequently observed in NSCLC and often leads to overexpression of *RRM1* and *RRM2(22-25)*.

Intratumor heterogeneity refers to differences either between different regions of a primary tumor, between two different metastatic lesions or between the primary tumor and the metastatic lesion and have profound clinical consequences(26). Tackling the tumor heterogeneity can help clinicians to delineate the molecular background of cancer towards an advanced personalized therapy(26). We investigated the potential differences of mRNA expression of the aforementioned genes between the primary tumor (PT) and their matched infiltrated regional lymph nodes (LNs) and we correlated these findings with the outcome of patients with operable NSCLC.

Materials and Methods

Patients: A total of 239 consecutive patients with operable NSCLC diagnosed during the past 20 years (1993-2013) at the University General Hospital of Heraklion, Crete were included in the study. All patients underwent surgery with curative intent (total excision of the PT and regional LNs) according standard surgical approaches. Thereafter, patients with stage IB-IIIa received adjuvant chemotherapy with a platinum-based doublet (4 cycles vinorelbine or paclitaxel in

combination with cisplatin or carboplatin) whereas adjuvant radiotherapy was administered in patients with stage IIIA disease. A total of 183 PT samples with their matched infiltrated regional LNs and 56 PT samples without infiltrated LNs were used as experimental (case cohort) and validation (control cohort) sets respectively (**Figure 1**). Medical records in the University General Hospital of Heraklion, Crete were used for collection of the patients' clinical characteristics. The institutional scientific and ethical committees approved the study. All patients gave their informed consent for the use of their biologic material for translational research.

Specimen's characteristics and assay methods: Tissue slides from formalin- fixed paraffin- embedded (FFPE) archived blocks of surgically resected primary NSCLCs and of their metastatic regional and/ or mediastinal LNs paraffin embedded tumors were reviewed by an independent pathologist (EL) to select the block with the most appropriate tumoral area for microdissection. From each selected representative paraffin block, serial sections with 5 μ m thickness (for RNA isolation) were prepared and, then, stained with modified haematoxylin- eosin stain (i.e. without the step of differentiation). Malignant cells were procured using a piezoelectric micro dissector (Eppendorf, Germany)(27).

The pellet of microdissected cells was subsequently submitted for RNA extraction with Trizol LS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and the SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) was used to prepare cDNA from 50 ng of total RNA for each gene as previously described (13). The quality of the extracted RNA was evaluated with amplification of *β -actin* before RT-qPCR. Only samples with cycle quantification (Cq) < 30 were considered suitable for further analysis based on the validation experiments for the performance of the set of primers and probes. The primers and probes sets were designed using Primer Express Software (AB, Foster City, CA, USA). All primers and probes were previously reported (13;14). Relative cDNA quantification was performed using the ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (AB). Comparative Ct method was used for gene expression quantification using *β -actin* and *PGK1* as internal reference genes and commercial RNA controls (mRNA from lung and liver; Stratagene, La Jolla, CA, USA) as calibrators. Final expression values were determined as follows: $2^{-(\Delta\text{Ct sample}-\Delta\text{Ct calibrator})}$, where ΔCt values of the sample and the calibrators are estimated by subtracting the Ct value of the target gene from the median of the reference genes values. In all experiments, only triplicates with a standard deviation of the Ct value <0.25 were accepted, according to the manufacturer suggestions (AB 7900 and SDS 2.3 User guide; AB). In addition, genomic DNA contamination was excluded by including non-reverse transcribed RNA.

Statistical design: The study was a retrospective analysis of the tumoral gene expression at the mRNA level from archival formalin fixed paraffin embedded aiming to assess differences in the aforementioned genes between PT and regional infiltrated LNs in patients with early NSCLC and their correlation with the patients' clinical outcome. All efficacy parameters were assessed on an intention to treat basis. Relapse free survival (RFS) was measured from the day of primary surgery to the first documentation of relapse or death (whichever occurs first) and median overall survival (OS) was measured from the day of surgery to the day of death from any cause. Quantitative PCR analyses yielded values that were expressed as ratios between two absolute measurements (gene of interest/ internal reference gene). Cutoff points were evaluated based on the median value for the mRNA expression of each gene (12;28). Values above to the median were considered as high expressed and these equal or below as low expressed. All laboratory analyses were performed blinded to the clinical data.

The potential association between baseline characteristics and continuous gene expression levels were compared with Mann-Whitney U test. Spearman's correlation test was used to evaluate the correlation between genes' mRNA expression. The association of risk factors with time-to-event end points was analyzed with the log-rank test, and the Kaplan-Meier method was used to plot the corresponding time to relapse and survival curves. A univariate Cox regression analysis, with hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (95% CI), was used to assess the association between each potential prognostic factor and survival and time to relapse. These factors were then included in a multivariate Cox proportional hazards regression model with a backward model selection procedure to evaluate the independent significance of different variables on survival and time to progression. Finally, interactions of genomic variables with histology and Lymph node status were included one at a time to determine if any should be added. Statistical significance was set at $p < 0.05$ (two-sided test). For each gene mRNA expression a main hypotheses was tested: Whether there is concordance or discordance of expression between PT and regional LN and its effect on RFS and OS.

Results

Patients' characteristics: Patients' baseline characteristics are summarized in **Table 1**. The median age was 64 years old and the median follow-up was 8- years; the majority was stage IIIA [n=115 patients; 48.1%] whereas 88 patients (37%) had stage II disease. Patients histological

type was almost equally divided, squamous [n=116 patients; 48.5%] and non- squamous histology [n=123 patients; 51.5%]. Information on adjuvant treatment administration was largely missing (71.5%), most patients with available information received platinum containing doublets or platinum monotherapy (22%).

Genes' mRNA expression levels in the PTs of all patients (case/ control cohorts): The median values of genes' expression in the primary tumors of both cohorts and overall patients' population are shown in **Table S1**. Significantly higher *TXR1* median levels in the PT of patients with involved LNs compared to patients with no LNs ($p < 0.001$) were observed. Similarly, there was a significant difference in the median levels expression of the *RAP80* ($p = 0.001$) (**Table S1**). The expression of *BRCA1* in PT was associated with higher levels of co- expression for *RRM1* ($p < 0.001$), *RRM2* ($p < 0.001$) and *TS* ($p < 0.0001$) (**Table S2**). The median expression levels of *BRCA1* ($p = 0.001$), *PKM2* ($p = 0.005$), *RRM1* ($p = 0.001$), *RRM2* ($p < 0.001$) and *TS* ($p = 0.040$) was greater in PT of case cohort patients with squamous histology; conversely, the median PT expression of *TSP1* was significantly higher ($p = 0.001$) in the same cohort of patients with non- squamous histology. In patients with no LN involvement (control cohort) there were no significant differences in the median expression levels between the two histologies (squamous vs non-squamous) in all genes except the *RRM1* ($p = 0.027$), which was higher in squamous histology (**Tables S3 and S4 & Figure S1**). Patients with squamous PT presenting high *BRCA1* tumoral expression experienced a significantly better median overall survival (OS) compared to patients with low tumoral *BRCA1* expression levels irrespectively of their LN status (25.6 mo, vs 19.0 mo, $p = 0.036$) (**Figure S4a and Table S5**). The significance remained in the interaction test between squamous and non- squamous tumors ($p = 0.04$). In addition, there was a trend that median RFS was also better in patients with high tumoral *BRCA1* expression levels compared with those with low *BRCA1* levels (12.2 mo vs 9.1 mo, $p = 0.092$) (**Figure S4a and Table S5**). Similarly, better median OS (37.1 mo vs 25.2 mo, $p = 0.04$) and RFS (18.4 mo vs 11.9 mo, $p = 0.005$) were observed in patients with non- squamous PT histology and low versus high *TXR1* levels irrespectively of LN status (**Figure S4b and Table S5**). Comparing the different expression levels (high versus low) between the case and the control cohorts, it appears that patients with high *BRCA1* and high *TSP1* but without nodal involvement have better OS compared to their counterparts with low levels of the aforementioned two genes (not reached vs 32.6 mo; $p = 0.055$ and 61.8 mo, vs 26.6 mo, $p = 0.056$). Similarly, the RFS remained significantly longer for patients with high tumoral

expression of *BRCA1* compared to those with low *BRCA1* expression in the control group (median 38.7 mo vs 12.7 mo, $p= 0.041$) as well as in patients with high tumoral expression of *TSP1* compared to those with low expression of *TSP1* in the same group (median 46.9 mo vs 11.5, $p= 0.011$) (**Table S6**).

Univariate and Multivariate analysis:

Univariate analysis revealed that high levels of *TSP1* were associated with increased RFS (Hazard Ratio [HR]: 0.71, 95% CI, 0.54-0.94, $p= 0.016$) and better OS (HR: 0.73, 95% CI: 0.55- 0.98, $p= 0.034$). Additionally, stage IIIA was associated with significantly decreased RFS (HR: 2.18, 95% CI, 1.4- 3.39, $p< 0.001$) and OS (HR: 2.55, 95% CI, 1.56- 4.18, $P< 0.001$) and similarly in patients with lymph nodal involvement for RFS (HR: 1.58, 95% CI, 1.12- 2.22, $p= 0.009$) and OS (HR: 1.71, 95% CI, 1.18- 2.47, $p= 0.004$) (**Table S7 a & b**). Multivariate Cox regression analyses revealed that high expression of *TSP1* in the primary tumor remained independent prognostic factor for better OS ($p=0.023$) and prolonged RFS ($p=0.007$). The Interaction between expression of *BRCA1* and expression of *TXR1* with histology appeared to be significant OS (0.016) and for RFS (0.035), respectively (**Tables S7 d & e**).

Genes' mRNA expression levels in the LNs:

The median expression of *RRM1*, *RRM2* and *PKM2* was significantly higher in the LNs of patients with squamous-cell compared to patients with non-squamous cell tumors ($p< 0.001$, $p< 0.049$ and $p< 0.001$, respectively) and *TSP1* had significantly higher median expression in patients with non- squamous histology, a finding also observed in the PT of the case cohort patients (**Table S8**). The correlation pattern between the expression of different genes in the regional LNs is similar to the one observed in the PTs (**Table S9 & Figure S2**).

Low *TS* expression was associated with high RFS (median 15.3 mo, vs 5.3 mo, $p= 0.012$) and OS (median 32.9 mo, vs 20.5 mo, $p= 0.009$) in patients with non- squamous histology compared to those with squamous-cell histology (interaction test: $p=0.026$). Similarly, low expression of *TXR1* was associated with significantly higher RFS (median 14.8 mo, vs 5.0 mo, $p= 0.038$) but not with higher OS ($p=0.088$) in the same group of patients (**Figures S4c-S4d and Table S10**). Conversely, in patients with squamous histology, low *TXR1* expression in lymph nodes conferred a lower RFS (4.4 mo, vs 15.4 mo, $p= 0.005$) and OS (median 14.4 mo, vs 22.5 mo, $p= 0.002$) (**Figure S4e**).

Univariate and Multivariate analysis:

In the univariate analysis none of the genes' expression in LNs was significantly associated with RFS and OS. However in the multivariate analysis the interaction between expression levels of *TS* and *TXR1* in the regional LNs and the histology appears to be significant for OS ($p= 0.046$ and $p= 0.023$, respectively) and RFS ($p= 0.49$ and $p= 0.009$, respectively) (**Tables S11 a- d**).

mRNA expression of various genes in both PTs and involved LNs

Assessing the association of the gene expression levels with baseline disease characteristics revealed a significant interaction between *TXR1* and the underlying histology of the tumor for both OS ($p= 0.043$) and RFS ($p= 0.019$) (**Tables 2a & b**). Importantly, the correlative analysis identified a moderate positive linear relationship between the expression of each gene in the PT and its expression in the matched LN for all 9 tested genes (**Table 3 and Figure S3**). The median of the difference between similar genes in PTs and LNs is significantly different from zero for *BRCA 1*, *RRM2*, *TS*, and *TSP1* ($p= 0.001$, 0.019 , 0.039 & 0.006 , respectively) (**Table 4**). Hierarchical clustering between PT and LN is also weak (less than 20%) (**Figure S5**). The concordance rates between the PT and the LNs is shown in table S14, which refers to the following for the expression rates of each gene: *BRCA1* (67.7%), *ERCC1* (68.4%), *PKM2* (63.4%), *RAP80* (68.8%), *RRM1* (70.9%), *RRM2* (69%), *TS* (72.9%), *TSP1* (69.8%), *TXR1* (63.7%). The assessment of the effect in the outcome of patients with concordant (either low or high) versus discordant cases (between the PT and the LNs) showed that low levels of *PKM2* in both were associated with a better median OS (*both low*: 34.4 mo; *discordant*: 18.8 mo; *both high*: 20.3 mo, $p= 0.031$) (**Figure 2a**). Additionally, in patients with squamous histology, concordance (either low or high) for *RRM1* was associated with significantly longer median RFS (*both low*: 9.8mo; *both high*: 9.6 mo; *discordant*: 3.9 mo, $p= 0.041$) and OS (*both low*: 20.2 mo; *both high*: 20.9 mo, *discordant*: 11.7 mo, $p=0.019$) (**Figure 2b and Table S12**) compared to discordant patients. Similarly, in patients with squamous tumors and high *TXR1* expression in both the PT and the matched LNs, the OS was significantly higher compared with those with either one or both low (*both low*: 16.6 mo; *both high*: 25.6 mo; *discordant*: 15.2 mo, $p= 0.007$) (**Figure 2c and Table S11**).

Discussion

These results indicate that the expression levels of various genes in the PT, which characterize the biologic behavior of the NSCLC, may vary when compared with the expression levels of the same genes in the respective regional infiltrated LNs. Many of these genes have

been reported to be of significant prognostic and predictive value in the response to several classical chemotherapeutics used for NSCLC treatment, mainly platinum, taxanes, gemcitabine and pemetrexed. The presented data are consistent with our previous published results which reported that high *BRCA1* mRNA expression in the primary tumor is associated with better outcome of the disease irrespective of the treatment received and the tumor histology (squamous or non- squamous)(10). Similarly, high *TSP1* mRNA expression in the primary tumor was associated with improved long-term outcome irrespective the histology and disease stage. Low mRNA expression of *TXR1* in the PT was correlated with longer-term outcome in patients with non- squamous histology. The same correlations were also observed when the expression level of the studied genes was evaluated at the level of regional infiltrated LNs. These findings strongly support the important prognostic value of the studied genes irrespectively of the tissue used for their evaluation. Although these results are confirming previous published reports of our group, they should be cautiously interpreted mainly due to the retrospective nature of the study (10).

We also showed that different levels of genes' expression (high vs low) between the PT and the involved LNs (concordant low vs concordant high vs discordant) might be associated with the clinical outcome in those patients with LNs metastasis (stages II and III). *PKM2* was associated with a long- term survival benefit irrespective of the underlying histology. Indeed, patients with concordant low *PKM2* mRNA expression in both the PTs and the LNs presented longer OS compared with the patients with discordant or concordantly high results. Interestingly, patients with squamous tumors and *RRM1* concordant levels were having better RFS and OS compared to the discordant cases; with low expression in both showing increased RFS and OS compared to the other two categories of expression (concordant high and discordant). This observation further supports the previous studies in metastatic NSCLC patients indicating that low tumoral mRNA expression of both *RRM1* and *RRM2* are associated with a significantly higher response rate, time to progression and overall survival whereas increased mRNA levels of *RRM1* and *RRM2* are inversely correlated with the response to first- line docetaxel and gemcitabine chemotherapy (14), (29). Similarly, patients presenting concordantly high level of mRNA expression for *TXR1* have shown to have a better RFS and OS compared with discordant and concordantly low cases in squamous histology. Although these results should be cautiously interpreted due to low number of patients included in this analysis, it contradicts with the observation that tumors with low mRNA *TXR1* expression in the primary tumor seem to

have a better biologic profile in the absence of lymph node involvement; it is probable that at progression to a higher disease stage there is also a change in the behavior of the respected gene (30).

Limitations of the current study include the retrospective nature of the data analyzed, as well as the high number of missing information in the medical records regarding the treatment administered in the adjuvant setting, which is a result of patients having been treated elsewhere after primary surgery, hence making retrieval of important medical information difficult. As a consequence, we could not assess any response to treatment in relation of the expressed genes' in various patients since high co- expression of *BRCA1* in primary tumor and of *RRM1* or *TS* might suggest sensitivity of platinum combined with gemcitabine or with taxane, respectively. In addition, despite rigorous statistical analysis plan, there were quite a number of conducted comparisons and no – adjustments made for multiplicity. Hence, the study is exploratory in nature. Given the lack of info about the type of adjuvant systemic treatment administered to most of these patients, by definition these findings are not ready for clinical implementation.

Another limitation could be considered the inclusion of patients over a large period of past time which unavoidably resulted in an analysis unadjusted for the changes in the practices, treatment approaches and prognosis throughout the years, mainly due to further evolution of NSCLC management and the abundant availability of new targeted treatment approaches during the last years. In this study also we could not take into consideration the heterogeneity often existing between different areas of the same tumor sample or between different LNs, when more than one were removed. In breast cancer, differences in the expression levels of simple biomarkers like hormone receptors and HER2 has been reported already within the same patients between their primaries and matched metastatic lesions indicating the extensive molecular evolution of the malignant disease during cancer progression (31;32). The importance of such heterogeneity in clinical practice relies on the fact that till today treatment decisions for patients with metastatic disease are taken always based on the pathological and molecular characteristics of the primary tumor. It is undoubtedly a practice which modern oncology is trying to argue against by implementing biopsy of the first metastasis after initial resection and treatment of the primary tumor. Although it is obvious that such practice might have limitations due to its invasive nature, it still could be considered a reasonable approach in the ongoing effort to tackle the heterogeneity of the disease. However, we have not yet

explained the etiology of tumor heterogeneity. Many theories exist, the most prevalent ones being either the theory of cancer stem cells (CSCs) dedifferentiation which consequently can aberrantly differentiate into a heterogeneous group of malignant cells or the theory of clonal evolution which suggests that once a cancer has been generated from a single cell of origin further genetic instability can lead to the creation of more aggressive subclones (26). An additional theory involves the role of tumor microenvironment to determine heterogeneity and direct gene expression. Although these are three different theories they are not considered as mutually exclusive and preclinical evidence has suggested that all play an important critical role in the diversity of the malignant disease (26). The intensive research currently ongoing will add on more precise approach of cancer treatment given the abundance of newer anticancer therapies.

Nowadays, the introduction of high- throughput technologies such as next generation sequencing (NGS) has enabled more detailed exploration of the biology of several tumor types. As heterogeneity has consequences at treatment decision level, it requires implementation of innovative concepts to better optimize the management of cancer (26). In this context the SPECTA program developed by European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) is prospectively collecting clinical information and biologic material to further evaluate the biology of the malignant diseases (33). SPECTA- lung constitutes a part of the whole program and is already advanced in development with 7 countries and 12 sites across Europe currently open, including patients with different thoracic malignancies in order to analyze tumor material with NGS using an extended panel of cancer – related genes. Similar initiatives are currently ongoing in other tumor types (34). An important aspect in this research evolution is the so-called liquid biopsy, as the gene expression of a single tumor sample is in fact a snapshot of an active disease continuously evolving. A sequential assessment of plasma biomarkers could eventually represent an alternative solution enabling serial analysis of the molecular landscape of cancer by characterization of either the circulating DNA shed by tumor cells or the circulating tumor cells (CTCs) hence avoiding the burden of the multiple biopsies for the patients(26;35). In conclusion, our results could be explained as an actual reflection of tumor heterogeneity or changes in the biology of the disease during the process of disease progression, however additional prospective studies are needed to further validate these findings.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by Cretan Association for Biomedical Research (CABR), the Hellenic Society of Medical Oncology (HESMO) and the EORTC- Cancer Research Fund.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest

Supplementary information is available at The Pharmacogenomics Journal website.

TABLES AND FIGURES

Figure 1: CONSORT diagram

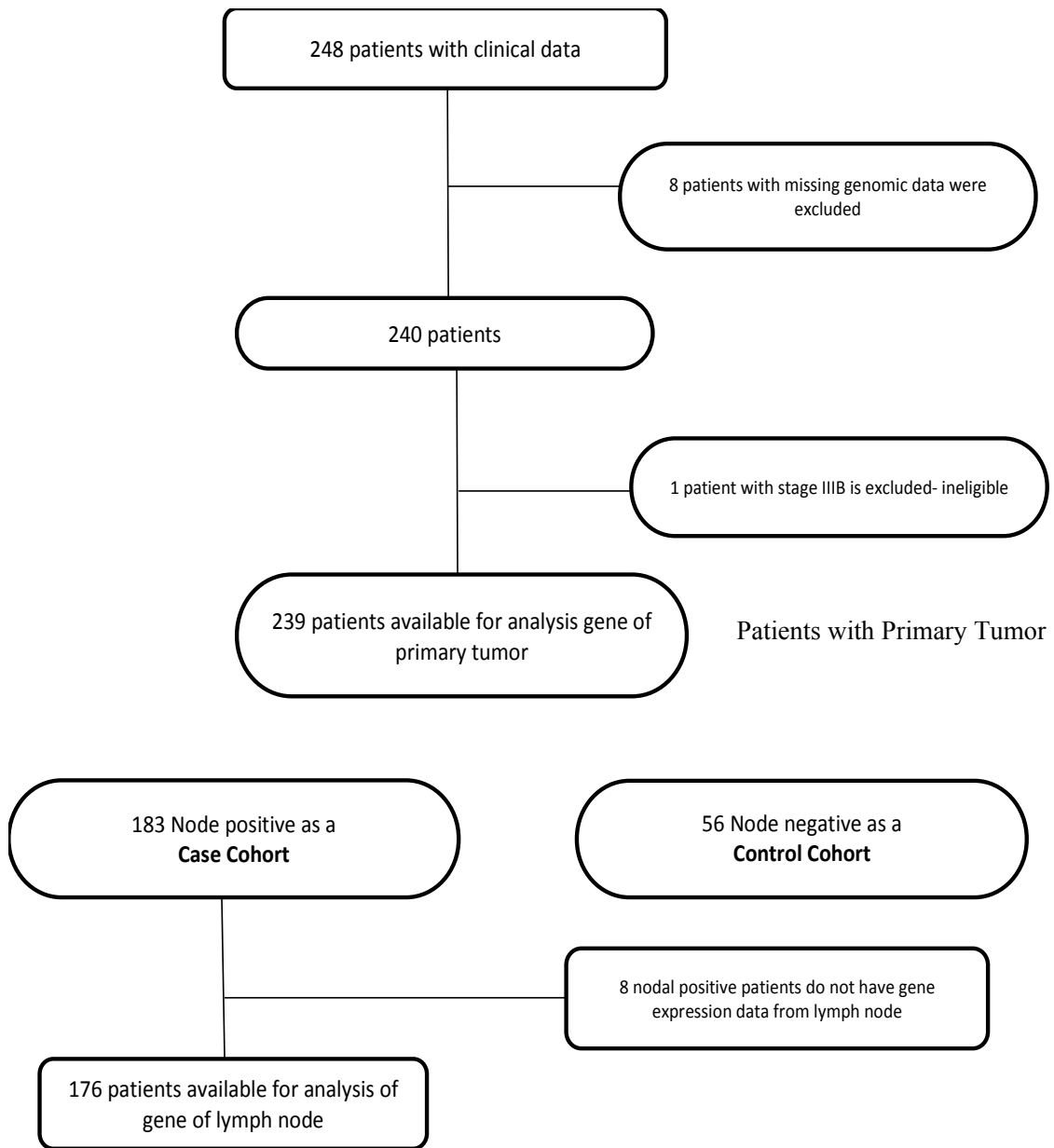


Table 1: Patients' characteristics

	Control cohort (N=56)	Case cohort (N=183)	Total (N=239)
	N (%)	N (%)	N (%)
Gender			
Female	6 (10.7)	22 (12.0)	28 (11.7)
Male	49 (87.5)	161 (88.0)	210 (87.9)
Missing	1 (1.8)	0 (0.0)	1 (0.4)
TNM staging per 7th edition			
I	35 (62.5)	0 (0.0)	35 (14.6)
II	20 (35.7)	68 (37.2)	88 (36.8)
IIIA	1 (1.8)	114 (62.3)	115 (48.1)
Age at diagnosis (in years)			
Median	66.0	63.0	64.0
Range	36.0 - 87.0	39.0 - 82.0	36.0 - 87.0
<=65	26 (46.4)	107 (58.5)	133 (55.6)
>65	30 (53.6)	76 (41.5)	106 (44.4)
Packs_diagc			
>=50 p.y	6 (10.7)	33 (18.0)	39 (16.3)
<50 p.y	1 (1.8)	12 (6.6)	13 (5.4)
Missing	49 (87.5)	138 (75.4)	187 (78.2)
Adjuvant Regimen type			
Platinum containing regimens	8 (14.3)	44 (24.0)	52 (21.8)
Taxane containing combinations	1 (1.8)	3 (1.6)	4 (1.7)
Platinum plus taxane	1 (1.8)	11 (6.0)	12 (5.0)
Unknown/others	46 (82.1)	125 (68.3)	171 (71.5)
Histologic Subtype			
Squamous	23 (41.1)	93 (50.8)	116 (48.5)
non- squamous	33 (58.9)	90 (49.2)	123 (51.5)

Table 2: a. Multivariate analysis for OS (both LNs and PTs)

Parameter	Levels	Parameter Estimate (SE)	P-value
PKM2	both low	reference	0.063 (df=2)
	high/low	0.523 (0.223)	
	Both high	0.346 (0.241)	
TNM staging per 7th edition	II	reference	0.046 (df=1)
	IIIA	0.388 (0.194)	
Histologic Subtype	squamous	reference	0.159 (df=1)
	non- squamous	-0.535 (0.380)	
TXR1	both low	reference	0.040 (df=2)
	high/low	0.074 (0.290)	
	Both high	-0.635 (0.322)	
TXR1* Histologic Subtype	both low*non- squamous	reference	0.043 (df=2)
	high/low * non- squamous	-0.178 (0.476)	
	Both high* non- squamous	0.845 (0.487)	

SE= Standard Error

b. Multivariate analysis for RFS (both LNs and PTs)

Parameter	Levels	Parameter Estimate	P-value
TXR1	Both low	reference	0.126 (df=2)
	high/low	-0.132 (0.282)	
	Both high	-0.605 (0.313)	
TNM staging per 7th edition	II	reference	0.005 (df=1)
	IIIA	0.535 (0.191)	
Histologic Subtype	squamous	reference	0.029 (df=1)
	non- squamous	-0.798 (0.366)	
TXR1* Histologic Subtype	both low*non- squamous	reference	0.019 (df=2)
	high/low*non- squamous	0.334 (0.468)	
	Both high*non- squamous	1.243 (0.475)	

SE =Standard Error

Table 3 : Correlation between gene expression levels in the primary tumor with genes in the lymph nodes

Primary Tumor / Lymph Node	BRCA1	ERCC1	PKM2	RAP80	RRM1	RRM2	TS	TSP1	TXR1
BRCA1	0.468 (P<.0001)	-0.005 (P=0.954)	-0.0003 (P=0.997)	0.195 (P=0.012)	0.333 (P<.0001)	0.319 (P<.0001)	0.276 (P<.0001)	-0.005 (P=0.947)	-0.051 (P=0.512)
ERCC1	0.202 (P=0.009)	0.521 (P<.0001)	0.121 (P=0.114)	0.167 (P=0.029)	0.191 (P=0.012)	0.163 (P=0.033)	0.193 (P=0.012)	0.226 (P=0.003)	0.093 (P=0.226)
PKM2	0.153 (P=0.046)	0.162 (P=0.032)	0.437 (P<.0001)	0.253 (P=0.001)	0.133 (P=0.079)	0.326 (P<.0001)	0.158 (P=0.038)	-0.003 (P=0.972)	0.037 (P=0.625)
RAP80	0.269 (P=0.001)	0.09 (P=0.245)	0.033 (P=0.672)	0.453 (P<.0001)	0.219 (P=0.004)	0.253 (P=0.001)	0.209 (P=0.007)	0.059 (P=0.444)	-0.024 (P=0.754)
RRM1	0.328 (P<.0001)	0.107 (P=0.171)	0.085 (P=0.278)	0.082 (P=0.294)	0.573 (P<.0001)	0.161 (P=0.038)	0.424 (P<.0001)	-0.11 (P=0.161)	0.022 (P=0.779)
RRM2	0.378 (P<.0001)	0.109 (P=0.154)	0.074 (P=0.33)	0.301 (P<.0001)	0.224 (P=0.003)	0.512 (P<.0001)	0.357 (P<.0001)	-0.009 (P=0.909)	-0.005 (P=0.944)
TS	0.406 (P<.0001)	0.056 (P=0.469)	0.079 (P=0.308)	0.152 (P=0.049)	0.394 (P<.0001)	0.291 (P=0)	0.586 (P<.0001)	-0.051 (P=0.512)	0.055 (P=0.477)
TSP1	0.056 (P=0.473)	0.033 (P=0.668)	-0.105 (P=0.17)	-0.024 (P=0.756)	-0.006 (P=0.937)	-0.084 (P=0.272)	-0.022 (P=0.772)	0.533 (P<.0001)	0.101 (P=0.187)
TXR1	0.097 (P=0.21)	0.231 (P=0.002)	0.038 (P=0.621)	0.127 (P=0.097)	0.235 (P=0.002)	-0.032 (P=0.674)	-0.026 (P=0.741)	0.255 (P=0.001)	0.41 (P<.0001)

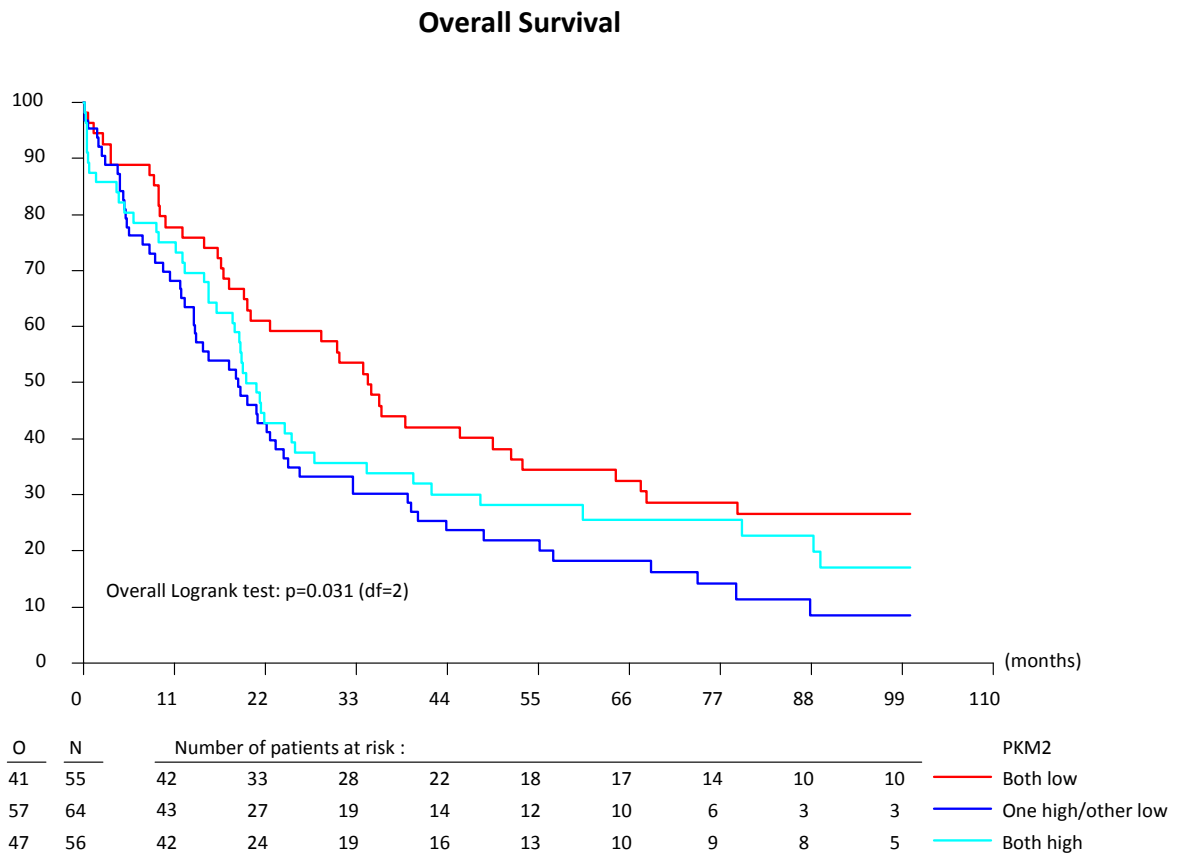
Note: Values closer to 1 in absolute value denotes stronger relationship between the gene expression levels in PT and LN. Numbers in bold are referring to the correlation between gene expression of the PT and matched gene expression of the LN.

Table 4: Comparison of gene expression median value between primary tumor and regional lymph node (case cohort)

	Site		Total	P-Value*
	Primary tumor (N=183)	Lymph node (N=176)	(N=359)	
	N (%)	N (%)	N (%)	
BRCA1 Median (Range)	2.9 (0.1 - 73.0)	4.2 (0.6 - 54.7)	3.4 (0.1 - 73.0)	0.001
Low	92 (50.3)	84 (47.7)	176 (49.0)	
High	86 (47.0)	85 (48.3)	171 (47.6)	
Missing	5 (2.7)	7 (4.0)	12 (3.3)	
ERCC1 Median (Range)	2.3 (0.2 - 27.2)	2.5 (0.3 - 20.0)	2.4 (0.2 - 27.2)	0.295
Low	86 (47.0)	86 (48.9)	172 (47.9)	
High	95 (51.9)	87 (49.4)	182 (50.7)	
Missing	2 (1.1)	3 (1.7)	5 (1.4)	
PKM2 Median (Range)	25.7 (1.2 - 191.8)	25.2 (0.3 - 320.2)	25.4 (0.3 - 320.2)	0.324
Low	92 (50.3)	87 (49.4)	179 (49.9)	
High	90 (49.2)	89 (50.6)	179 (49.9)	
Missing	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.3)	
RAP80 Median (Range)	1.8 (0.2 - 87.4)	2 (0.3 - 25.5)	1.9 (0.2 - 87.4)	0.084
Low	98 (53.6)	85 (48.3)	183 (51.0)	
High	84 (45.9)	86 (48.9)	170 (47.4)	
Missing	1 (0.5)	5 (2.8)	6 (1.7)	
RRM1 Median (Range)	0.5 (0.1 - 4.6)	0.5 (0.1 - 4.7)	0.5 (0.1 - 4.7)	0.750
Low	84 (45.9)	81 (46.0)	165 (46.0)	
High	97 (53.0)	86 (48.9)	183 (51.0)	
Missing	2 (1.1)	9 (5.1)	11 (3.1)	
RRM2 Median (Range)	49.1 (4.6 - 870.8)	63.2 (8.7 - 1189.2)	58.5 (4.6 - 1189.2)	0.019
Low	91 (49.7)	88 (50.0)	179 (49.9)	
High	91 (49.7)	87 (49.4)	178 (49.6)	
Missing	1 (0.5)	1 (0.6)	2 (0.6)	
TS Median (Range)	2.3 (0.2 - 15.9)	2.5 (0.4 - 19.9)	2.4 (0.2 - 19.9)	0.039
Low	88 (48.1)	85 (48.3)	173 (48.2)	
High	92 (50.3)	84 (47.7)	176 (49.0)	
Missing	3 (1.6)	7 (4.0)	10 (2.8)	
TSP1 Median (Range)	0.3 (0.0 - 4.4)	0.3 (0.0 - 2.6)	0.3 (0.0 - 4.4)	0.006
Low	93 (50.8)	87 (49.4)	180 (50.1)	
High	88 (48.1)	87 (49.4)	175 (48.7)	
Missing	2 (1.1)	2 (1.1)	4 (1.1)	
TXR1 Median (Range)	0.6 (0.0 - 3.5)	0.6 (0.1 - 6.2)	0.6 (0.0 - 6.2)	0.538
Low	72 (39.3)	86 (48.9)	158 (44.0)	

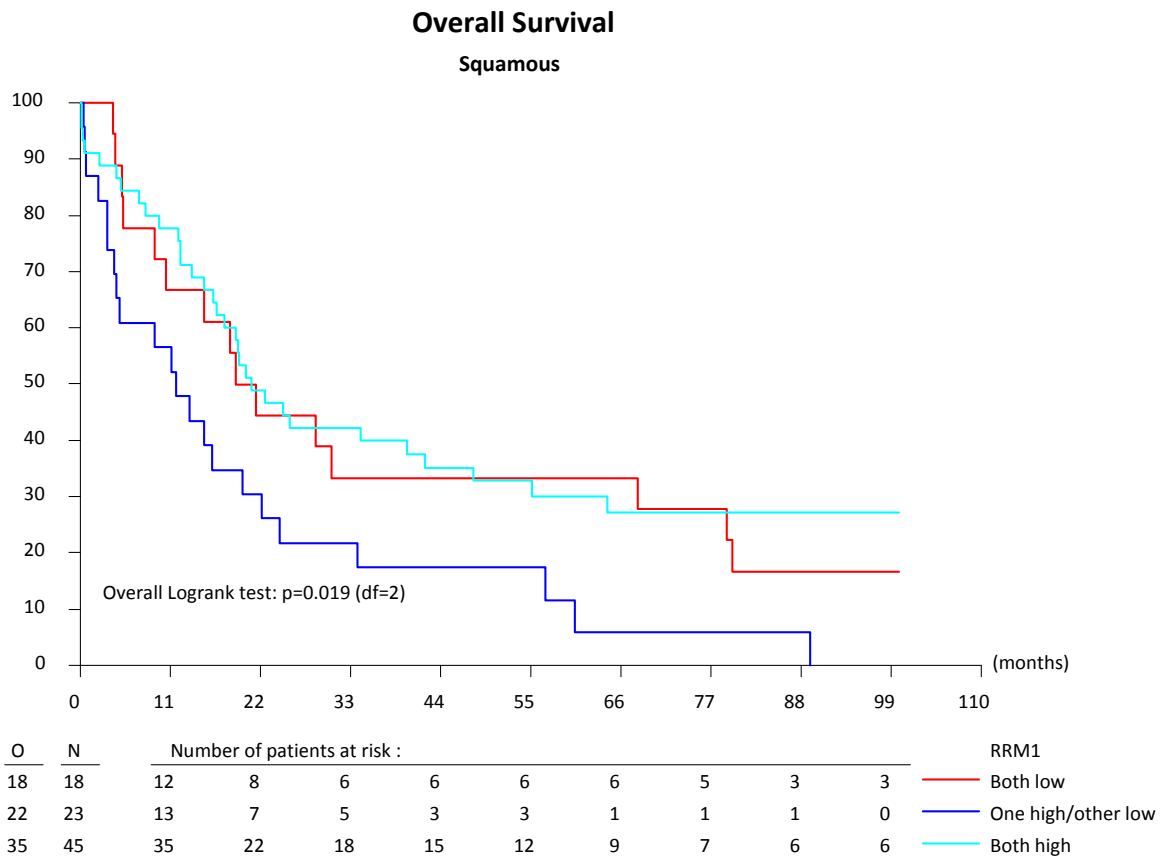
High	110 (60.1)	86 (48.9)	196 (54.6)	
Missing	1 (0.5)	4 (2.3)	5 (1.4)	

Figure 2a: OS in patients with different expression of *PKM2* (irrespective of histology)



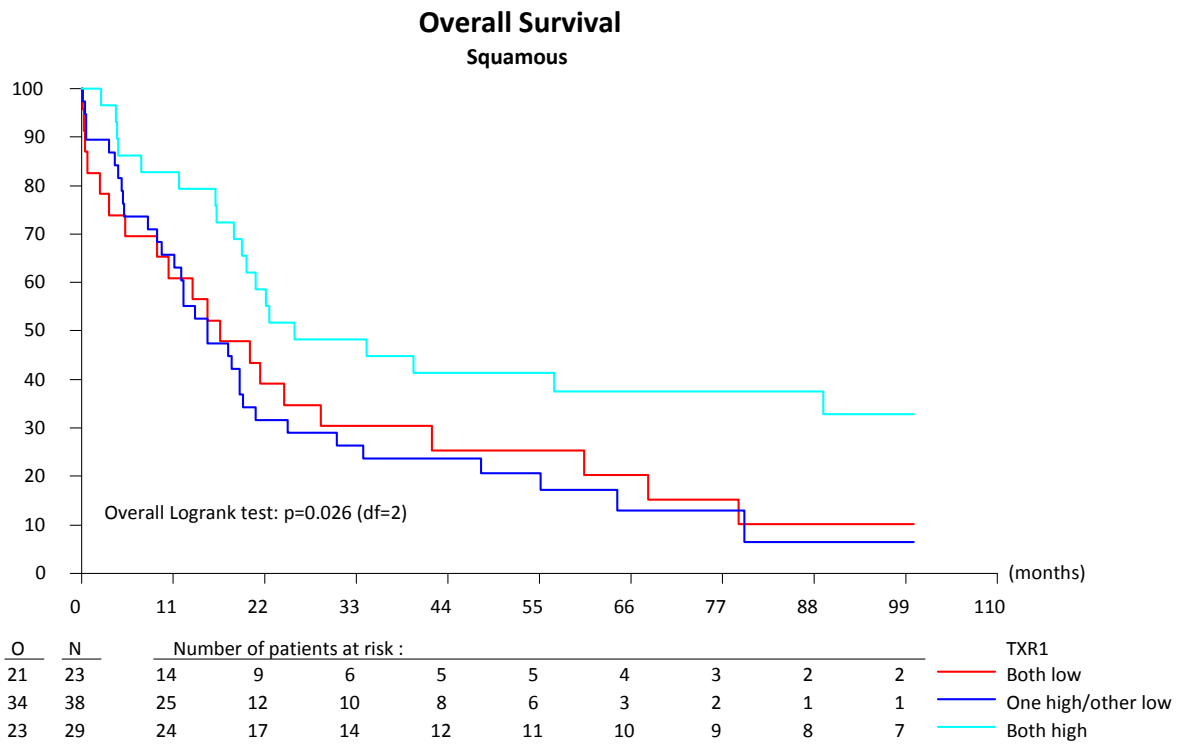
***PKM2*: Gene associated with the response of platinum agents.**

Figure 2b: OS in patients with squamous histology and different expression of *RRM1*



***RRM1*: Gene associated with gemcitabine response**

Figure 2c: OS in patients with squamous histology and different expression of *TXR1*



***TXR1*: Gene associated with the taxane response**

Reference List

- (1) Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013 Jan;63(1):11-30.
- (2) Spiro SG, Silvestri GA. One hundred years of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2005 Sep 1;172(5):523-9.
- (3) Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV, Douillard JY, Shepherd FA, Stephens RJ, et al. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol* 2008 Jul 20;26(21):3552-9.
- (4) Strauss GM, Herndon JE, Maddaus MA, Johnstone DW, Johnson EA, Harpole DH, et al. Adjuvant paclitaxel plus carboplatin compared with observation in stage IB non-small-cell lung cancer: CALGB 9633 with the Cancer and Leukemia Group B, Radiation Therapy Oncology Group, and North Central Cancer Treatment Group Study Groups. *J Clin Oncol* 2008 Nov 1;26(31):5043-51.
- (5) Douillard JY, Rosell R, De LM, Carpagnano F, Ramlau R, Gonzales-Larriba JL, et al. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2006 Sep;7(9):719-27.
- (6) Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le CT, Pignon JP, Vansteenkiste J. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2004 Jan 22;350(4):351-60.
- (7) Winton T, Livingston R, Johnson D, Rigas J, Johnston M, Butts C, et al. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005 Jun 23;352(25):2589-97.
- (8) Goss GD, O'Callaghan C, Lorimer I, Tsao MS, Masters GA, Jett J, et al. Gefitinib versus placebo in completely resected non-small-cell lung cancer: results of the NCIC CTG BR19 study. *J Clin Oncol* 2013 Sep 20;31(27):3320-6.
- (9) Papadaki C, Sfakianaki M, Ioannidis G, Lagoudaki E, Trypaki M, Tryfonidis K, et al. ERCC1 and BRAC1 mRNA expression levels in the primary tumor could predict the effectiveness of the second-line cisplatin-based chemotherapy in pretreated patients with metastatic non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2012 Apr;7(4):663-71.
- (10) Papadaki C, Tsaroucha E, Kaklamanis L, Lagoudaki E, Trypaki M, Tryfonidis K, et al. Correlation of BRCA1, TXR1 and TSP1 mRNA expression with treatment outcome to docetaxel-based first-line chemotherapy in patients with advanced/metastatic non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2011 Jan 18;104(2):316-23.
- (11) Rosell R, Skrzypski M, Jassem E, Taron M, Bartolucci R, Sanchez JJ, et al. BRCA1: a novel prognostic factor in resected non-small-cell lung cancer. *PLoS One* 2007 Nov 7;2(11):e1129.

- (12) Taron M, Rosell R, Felip E, Mendez P, Souglakos J, Ronco MS, et al. BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Hum Mol Genet* 2004 Oct 15;13(20):2443-9.
- (13) Papadaki C, Mavroudis D, Trypaki M, Koutsopoulos A, Stathopoulos E, Hatzidaki D, et al. Tumoral expression of TXR1 and TSP1 predicts overall survival of patients with lung adenocarcinoma treated with first-line docetaxel-gemcitabine regimen. *Clin Cancer Res* 2009 Jun 1;15(11):3827-33.
- (14) Boukovinas I, Papadaki C, Mendez P, Taron M, Mavroudis D, Koutsopoulos A, et al. Tumor BRCA1, RRM1 and RRM2 mRNA expression levels and clinical response to first-line gemcitabine plus docetaxel in non-small-cell lung cancer patients. *PLoS One* 2008;3(11):e3695.
- (15) Kennedy RD, Quinn JE, Johnston PG, Harkin DP. BRCA1: mechanisms of inactivation and implications for management of patients. *Lancet* 2002 Sep 28;360(9338):1007-14.
- (16) Reguart N, Cardona AF, Carrasco E, Gomez P, Taron M, Rosell R. BRCA1: a new genomic marker for non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2008 Nov;9(6):331-9.
- (17) Yarden RI, Papa MZ. BRCA1 at the crossroad of multiple cellular pathways: approaches for therapeutic interventions. *Mol Cancer Ther* 2006 Jun;5(6):1396-404.
- (18) Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007 Aug;7(8):573-84.
- (19) Martin LP, Hamilton TC, Schilder RJ. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res* 2008 Mar 1;14(5):1291-5.
- (20) Lih CJ, Wei W, Cohen SN. Txr1: a transcriptional regulator of thrombospondin-1 that modulates cellular sensitivity to taxanes. *Genes Dev* 2006 Aug 1;20(15):2082-95.
- (21) Lawler J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Cell Mol Med* 2002 Jan;6(1):1-12.
- (22) Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004 Jun 1;64(11):3753-6.
- (23) Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, Byrom M, Kelnar K, Ovcharenko D, et al. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res* 2007 Aug 15;67(16):7713-22.
- (24) Davidson JD, Ma L, Flagella M, Geeganage S, Gelbert LM, Slapak CA. An increase in the expression of ribonucleotide reductase large subunit 1 is associated with gemcitabine resistance in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* 2004 Jun 1;64(11):3761-6.

- (25) Goan YG, Zhou B, Hu E, Mi S, Yen Y. Overexpression of ribonucleotide reductase as a mechanism of resistance to 2,2-difluorodeoxycytidine in the human KB cancer cell line. *Cancer Res* 1999 Sep 1;59(17):4204-7.
- (26) Zardavas D, Irrthum A, Swanton C, Piccart M. Clinical management of breast cancer heterogeneity. *Nat Rev Clin Oncol* 2015 Jul;12(7):381-94.
- (27) Harsch M, Bendrat K, Hofmeier G, Branscheid D, Niendorf A. A new method for histological microdissection utilizing an ultrasonically oscillating needle: demonstrated by differential mRNA expression in human lung carcinoma tissue. *Am J Pathol* 2001 Jun;158(6):1985-90.
- (28) Rosell R, Scagliotti G, Danenberg KD, Lord RV, Bepler G, Novello S, et al. Transcripts in pretreatment biopsies from a three-arm randomized trial in metastatic non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 2003 Jun 5;22(23):3548-53.
- (29) Souglakos J, Boukovinas I, Taron M, Mendez P, Mavroudis D, Tripaki M, et al. Ribonucleotide reductase subunits M1 and M2 mRNA expression levels and clinical outcome of lung adenocarcinoma patients treated with docetaxel/gemcitabine. *Br J Cancer* 2008 May 20;98(10):1710-5.
- (30) Gerlinger M, Swanton C. How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. *Br J Cancer* 2010 Oct 12;103(8):1139-43.
- (31) Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010 Jun 1;28(16):2784-95.
- (32) Aurilio G, Disalvatore D, Pruneri G, Bagnardi V, Viale G, Curigliano G, et al. A meta-analysis of oestrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 discordance between primary breast cancer and metastases. *Eur J Cancer* 2014 Jan;50(2):277-89.
- (33) Lacombe D, Tejpar S, Salgado R, Cardoso F, Golfopoulos V, Aust D, et al. European perspective for effective cancer drug development. *Nat Rev Clin Oncol* 2014 Aug;11(8):492-8.
- (34) Zardavas D, Maetens M, Irrthum A, Goulioti T, Engelen K, Fumagalli D, et al. The AURORA initiative for metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 2014 Nov 11;111(10):1881-7.
- (35) Ignatiadis M, Rack B, Rothe F, Riethdorf S, Decraene C, Bonnefoi H, et al. Liquid biopsy-based clinical research in early breast cancer: The EORTC 90091-10093 Treat CTC trial. *Eur J Cancer* 2016 Aug;63:97-104.

Z. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ: ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΤΟΥ ΥΠΟΨΗΦΙΟΥ ΔΙΔΑΚΤΟΡΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΚΑΙ ΣΥΝΑΦΩΝ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΩΝ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΩΝ.

Journal Publications

1. Ignatiadis M, Litiere S, Rothe F, Riethdorf S, Proudhon C, Fehm T, Aalders K, Forstbauer H, Fasching P, Brain E, Vuylsteke P, Guardiola E, Lorenz R, Pantel K, **Tryfonidis K**, Janni W, Piccart M, Sotiriou C, Rack B, Pierga JY: Trastuzumab versus observation for HER2 non amplified early breast cancer with Circulating Tumor Cells (EORTC 90091- 10093, BIG 1-12, Treat CTC): A randomized phase II study(**Ann Oncol. 2018 Jun 11, doi: 10.1093/annonc/mdy211. Epub ahead of print**)
2. Hans Wildiers, **Konstantinos Tryfonidis**, Lissandra Dal Lago, Peter Vuylsteke, Giuseppe Curigliano, Simon Waters, Barbara Brouwers, Sevily Altintas, Nathan Touati, Fatima Cardoso and Etienne Brain: Pertuzumab and trastuzumab with or without metronomic chemotherapy for older patients with HER2-positive metastatic breast cancer: results from the EORTC 75111-10114 Elderly Task Force (ETF)/ Breast Cancer Group (BCG) randomized phase II study (**Lancet Oncol. 2018 Mar;19(3):323-336. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30083-4. Epub 2018 Feb 9**)
3. **Tryfonidis K**, Papadaki C, Assele S, Lagoudaki E, Menis J, Koutsopoulos A, Trypaki M, Tsakalaki E, Sfakianaki M, Hasan B, Stathopoulos E, Georgoulas V, Souglakos J: Association of BRCA1, ERCC1, RAP80, PKM2, RRM1, RRM2, TS, TSP1, and TXR1 mRNA expression levels between primary tumors and infiltrated regional lymph nodes in patients with resectable non-small cell lung cancer(**Pharmacogenomics J. 2018 Feb 22. doi: 10.1038/s41397-018-0013-9. [Epub ahead of print]**).
4. Aalders KC, Touati N, **Tryfonidis K**, Annonay M, Litiere S, Bergh J, Bodmer A, Cameron DA, Bonnefoi HR; EORTC 10994/BIG 1-00 Study Investigators. Do patients whose tumor achieved a pathological response relapse at specific sites? A substudy

- of the EORTC 10994/BIG-1-00 trial. **Breast Cancer Res Treat. 2018 Feb 12. doi: 10.1007/s10549-018-4698-x. [Epub ahead of print]**
5. Fatima Cardoso, John M.S. Bartlett, Leen Slaets, Carolien H.M. van Deurzen, Elise van Leeuwen-Stok, Peggy Porter, Barbro Linderholm, Ingrid Hedenfalk, Carolien Schröder, John Martens, Jane Bayani, Christi van Asperen, Melissa Murray, Clifford Hudis, Lavinia Middleton, Joanna Vermeij, Kevin Punie, Judith Fraser, Monika Nowaczyk, Isabel T. Rubio, Stefan Aebi, Catherine Kelly, Kathryn J. Ruddy, Eric Winer, Cecilia Nilsson, Lissandra Dal Lago, Larissa Korde, Kim Benstead, Oliver Bogler, Theodora Goulioti, Aleksandra Peric, Saskia Litière, Kim C. Aalders, Coralie Poncet, **Konstantinos Tryfonidis**, and Sharon H. Giordano (**Ann Oncol. 2017 Oct 28. doi: 10.1093/annonc/mdx651**)
 6. **K. Tryfonidis**, K. Hartmann, M. Morfouace, D. Lacombe, *From bench to clinical trials The EORTC experience in biology-based clinical cancer research*, (**J Egypt Natl Canc Inst. 2017 Nov 6. pii: S1110-0362(17)30071-7. doi: 10.1016/j.jnci.2017.09.001. [Epub ahead of print]**)
 7. Zardavas D, **Tryfonidis K**, *CDK4/6 blockade in breast cancer: tailoring treatment for luminal disease and further therapeutic opportunities* (**Expert Opin Investig Drugs. 2017 Dec;26(12):1357-1372. doi: 10.1080/13543784.2017.1389896. Epub 2017 Oct 23**)
 8. GiuseppeViale; FemkedeSnoo, MDPHD; LeenSlaets; JanBogaerts; Lauravan 'tVeer; EmielRutgers; MartinePiccart-Gebhart; LisetteStork-SLoots; AnnuskaGlas; LeilaRusso; PatriziaDell'Orto; **KonstantinosTryfonidis**; SaskiaLitiere; FatimaCardoso, *ImmunohistochemicalversusMolecular (BlueprintandMammaPrint) SubtypingofBreastCarcinoma. Outcome Results from the EORTC 10041/BIG 3-04 MINDACT Trial"* (**Breast Cancer Research and Treatment 2017 Sep 19**)
 9. Aalders KC, Kuijer A, Straver ME, Slaets L, Litiere S, Viale G, Van't Veer LJ, Glas AM, Delorenzi M, van Dalen T, **Tryfonidis K**, Piccart MJ, Cardoso F, Rutgers EJ; TRANSBIG Consortium and the MINDACT Investigators. *Characterization of*

- multifocal breast cancer using the 70-gene signature in clinical low-risk patients enrolled in the EORTC 10041/BIG 03-04 MINDACT trial.* **Eur J Cancer. 2017 Jul; 79:98-105. doi: 10.1016/j.ejca.2017.03.034. Epub 2017 May 3.**
10. Ades F, **Tryfonidis K**, Zardavas D. The past and future of breast cancer treatment- from the papyrus to individualised treatment approaches. **Ecancermedalscience. 2017 Jun 8;11:746. doi: 10.3332/ecancer.2017.746. eCollection 2017.** Review.
 11. **Tryfonidis K**, Marreaud S, Khaled H, De Valk B, Vermorken J, Welnicka-Jaskiewicz M, Aalders K, Bartlett JMS, Biganzoli L, Bogaerts J, Cameron D; EORTC- Breast Cancer Group. *Cardiac safety, efficacy, and correlation of serial serum HER2-extracellular domain shed antigen measurement with the outcome of the combined trastuzumab plus CMF in women with HER2-positive metastatic breast cancer: results from the EORTC 10995 phase II study.* **Breast Cancer Res Treat. 2017 Jun;163(3):507-515. doi: 10.1007/s10549-017-4203-y. Epub 2017 Mar 21.**
 12. Vermeulen MA, Slaets L, Cardoso F, Giordano SH, **Tryfonidis K**, van Diest PJ, Dijkstra NH, Schröder CP, van Asperen CJ, Linderholm B, Benstead K, Foekens R, Martens JWM, Bartlett JMS, van Deurzen CHM. *Pathological characterisation of male breast cancer: Results of the EORTC 10085/TBCRC/BIG/NABCG International Male Breast Cancer Program.* **Eur J Cancer. 2017 Sep;82:219-227,doi:10.1016/j.ejca.2017.01.034. Epub 2017 Mar 11.**
 13. M. Makama, C.A. Drukker, E.J.Th. Rutgers , L. Slaets ,F. Cardoso , M.A. Rookus , **K. Tryfonidis** , L.J. Van't Veer M.K. Schmidt. *An association study of established breast cancer reproductive and lifestyle risk factors with tumour subtype defined by the prognostic 70-gene expression signature (MammaPrint®)* **Eur J Cancer, 2017 February,doi:10.1016/j.ejca.2016.12.024**
 14. Aalders KC, **Tryfonidis K**, Senkus E, Cardoso F. *Anti-angiogenic treatment in breast cancer: Facts, successes, failures and future perspectives.***Cancer Treat Rev. 2017 Jan 3;53:98-110. doi: 10.1016/j.ctrv.2016.12.009.**

15. Doebar SC, Slaets L, Cardoso F, Giordano SH, Bartlett JM, **Tryfonidis K**, Dijkstra NH, Schröder CP, van Asperen CJ, Linderholm B, Benstead K, Dinjens WN, van Marion R, van Diest PJ, Martens JW, van Deurzen CH. *Male breast cancer precursor lesions: analysis of the EORTC 10085/TBCRC/BIG/NABCG International Male Breast Cancer Program*. **Mod Pathol.** 2017 Jan 13. doi: **10.1038/modpathol.2016.229**.
16. Touati N, **Tryfonidis K**, Caramia F, Bonnefoi H, Cameron D, Slaets L, Parker BS, Loi S. *Correlation between severe infection and breast cancer metastases in the EORTC 10994/BIG 1-00 trial: Investigating innate immunity as a tumour suppressor in breast cancer*. **Eur J Cancer.** 2016 Dec 24;**72:95-102**. doi: **10.1016/j.ejca.2016.11.015**.
17. Zardavas D, **Tryfonidis K**, Goulioti T, Piccart M: *Targeted adjuvant therapy in breast cancer*: **Expert Rev Anticancer Ther.** 2016 Dec;**16(12):1263-1275**.
18. **Tryfonidis K**, Zardavas D, Katzenellenbogen B, Piccart M: *Endocrine Treatment in breast cancer: Cure, resistance and beyond*, **Cancer Treat Rev.** 2016 Nov;**50:68-81**. doi: **10.1016/j.ctrv.2016.08.008**
19. Menis J, Litière S, **Tryfonidis K**, Golfinopoulos V. *The European Organization for Research and Treatment of Cancer perspective on designing clinical trials with immune therapeutics*. **Ann Transl Med.** 2016 Jul;**4(14):267**. doi: **10.21037/atm.2016.06.19**.
20. Cardoso F, van't Veer LJ, Bogaerts J, Slaets L, Viale G, Delaloge S, Pierga JY, Brain E, Causeret S, DeLorenzi M, Glas AM, Golfinopoulos V, Goulioti T, Knox S, Matos E, Meulemans B, Neijenhuis PA, Nitz U, Passalacqua R, Ravdin P, Rubio IT, Saghatchian M, Smilde TJ, Sotiriou C, Stork L, Straehle C, Thomas G, Thompson AM, van der Hoeven JM, Vuylsteke P, Bernardis R, **Tryfonidis K**, Rutgers E, Piccart M; MINDACT Investigators. *70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer*. **N Engl J Med.** 2016 Aug 25;**375(8):717-29**. doi: **10.1056/NEJMoa1602253**.

21. Michail Ignatiadis, Brigitte Rack, Françoise Rothé, Sabine Riethdorf, Charles Decraene, Hervé Bonnefoi, Christian Dittrich, Carlo Messina, Melanie Beauvois, Elisabeth Trapp, Theodora Goulioti, **Konstantinos Tryfonidis**, Klaus Pantel, Madeline Repollet, Wolfgang Janni, Martine Piccart, Christos Sotiriou, Saskia Litiere, Jean-Yves Pierga: *Liquid biopsy-based clinical research in early breast cancer: The EORTC 90091-10093 Treat CTC trial*. **European journal of cancer (Oxford, England: 1990) 08/2016; 63. DOI:10.1016/j.ejca.2016.04.024**
22. Irina Ghislain, Efsthios Zikos, Corneel Coens, Chantal Quinten, Vasiliki Balta, **Konstantinos Tryfonidis**, Martine Piccart, Dimitrios Zardavas, Eva Nagele, Vesna Bjelic-Radusic, Fatima Cardoso, Mirjam A G Sprangers, Galina Velikova, Andrew Bottomley: *Health-related quality of life in locally advanced and metastatic breast cancer: methodological and clinical issues in randomised controlled trials*. **The Lancet Oncology 07/2016; 17(7). DOI:10.1016/S1470-2045(16)30099-7**
23. **Konstantinos Tryfonidis**, Gul Basaran, Jan Bogaerts, Marc Debled, Luc Dirix, Jean-Christophe Thery, Vivianne C.G. Tjan-Heijnen, Danielle Van den Weyngaert, Tanja Cufer, Martine Piccart, David Cameron: *A European Organisation for Research and Treatment of Cancer randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre phase II trial of anastrozole in combination with gefitinib or placebo in hormone receptor-positive advanced breast cancer (NCT00066378)*. **European journal of cancer (Oxford, England: 1990) 01/2016; 53. DOI:10.1016/j.ejca.2015.10.012**
24. **Konstantinos Tryfonidis**, Elzbieta Senkus, Maria J. Cardoso, Fatima Cardoso: *Management of locally advanced breast cancer-perspectives and future directions (vol 12, pg 147, 2015)*. **Nature Reviews Clinical Oncology 06/2015; 12(6). DOI:10.1038/nrclinonc.2015.74**
25. Lotte E. Elshof, **Konstantinos Tryfonidis**, Leen Slaets, A. Elise van Leeuwen-Stok, Victoria P. Skinner, Nicolas Dif, Ruud M. Pijnappel, Nina Bijker, Emiel J.Th. Rutgers, Jelle Wesseling: *Feasibility of a prospective, randomised, open-label, international multicentre, phase III, non-inferiority trial to assess the safety of*

- active surveillance for low risk ductal carcinoma in situ – The LORD study. European journal of cancer (Oxford, England: 1990) 05/2015; 94(12). DOI:10.1016/j.ejca.2015.05.008*
26. **Konstantinos Tryfonidis**, Elzbieta Senkus, Maria J Cardoso, Fatima Cardoso: *The need for post-mastectomy radiotherapy in patients with IBC. Nature Reviews Clinical Oncology 04/2015; 12(6). DOI:10.1038/nrclinonc.2015.13-c2*
27. **Konstantinos Tryfonidis**, Elzbieta Senkus, Maria J Cardoso, Fatima Cardoso: *Corrigendum: Management of locally advanced breast cancer--perspectives and future directions. Nature Reviews Clinical Oncology 02/2015; 12(3). DOI:10.1038/nrclinonc.2015.13*
28. **Konstantinos Tryfonidis**, Maria Kafousi, Maria Perraki, Stella Apostolaki, Sofia Agelaki, Vassilis Georgoulas, Efstathios Stathopoulos, Dimitris Mavroudis: *P5-01-16: The Detection of Circulating CK19 mRNA-Positive Cells in the Blood and the Mitotic Index of the Primary Tumor Have Independent Prognostic Value in Early Breast Cancer. Clinical Breast Cancer 12/2014; 14(6). DOI:10.1016/j.clbc.2014.04.001*
29. **K. Tryfonidis**, D. Zardavas, F. Cardoso: *Small breast cancers: When and how to treat. Cancer Treatment Reviews 10/2014; 40(10). DOI:10.1016/j.ctrv.2014.09.004*
30. Francis PA, Regan MM, Fleming GF, Láng I, Ciruelos E, Bellet M, Bonnefoi HR, Climent MA, Da Prada GA, Burstein HJ, Martino S, Davidson NE, Geyer CE Jr, Walley BA, Coleman R, Kerbrat P, Buchholz S, Ingle JN, Winer EP, Rabaglio-Poretti M, Maibach R, Ruepp B, Giobbie-Hurder A, Price KN, Colleoni M, Viale G, Coates AS, Goldhirsch A, Gelber RD; Adjuvant ovarian suppression in premenopausal breast cancer. SOFT Investigators; International Breast Cancer Study Group (Steering Committee Member) **N Engl J Med.2015 Jan 29;372(5):436-46. doi: 10.1056/NEJMoa1412379. Epub 2014 Dec 11.**

31. **K Tryfonidis**, I Boukovinas, N Xenidis, C Christophyllakis, P Papakotoulas, E Politaki, N Malamos, A Polyzos, S Kakolyris, V Georgoulas, D Mavroudis: *A multicenter phase I-II study of docetaxel plus epirubicin plus bevacizumab as first-line treatment in women with HER2-negative metastatic breast cancer. Breast (Edinburgh, Scotland) 09/2013; 22(6). DOI:10.1016/j.breast.2013.08.017*
32. N Karachaliou, N Ziras, K Syrigos, **K Tryfonidis**, E Papadimitraki, E Kontopodis, V Bozionelou, A Kalykaki, V Georgoulas, D Mavroudis: *A multicenter phase II trial of docetaxel and capecitabine as salvage treatment in anthracycline- and taxane-pretreated patients with metastatic breast cancer. Cancer Chemotherapy and Pharmacology 06/2012; 70(1). DOI:10.1007/s00280-012-1901-3*
33. **K. Tryfonidis**, M. Rovithi, J. Souglakos, D. Mavroudis, V. Georgoulas: *Thrombotic thrombocytopenic purpura in a patient with lung adenocarcinoma: A case report and literature review. Forum of Clinical Oncology 03/2012; 3(1).*
34. N Karachaliou, Ch Kouroussis, P Papakotoulas, K Kalbakis, **K Tryfonidis**, N Vardakis, E Poppis, V Georgoulas, D Mavroudis: *A multicenter phase II trial of docetaxel plus gemcitabine as salvage treatment in anthracycline- and taxane-pretreated patients with metastatic breast cancer. Cancer Chemotherapy and Pharmacology 02/2012; 69(5). DOI:10.1007/s00280-012-1824-z*
35. **K. Tryfonidis**, D. Mavroudis: *Bisphosphonates: Future perspectives and anti-tumor activity in malignant diseases. Forum of Clinical Oncology 01/2012; 3(4).*
36. **Konstantinos Tryfonidis**, Dimitrios Mavroudis: *Changing the natural history of women with HER2 positive breast cancer: The trastuzumab case, FCO, 2011*
37. Papadaki C, Sfakianaki M, Ioannidis G, Lagoudaki E, Trypaki M, **Tryfonidis K**, Mavroudis D, Stathopoulos E, Georgoulas V, Souglakos J *ERCC1 and BRAC1 mRNA expression levels in the primary tumor could predict the effectiveness of the second-line cisplatin-based chemotherapy in pretreated patients with metastatic non-small cell lung cancer. J Thorac Oncol. 2012 Apr;7(4):663-71.*

38. Pallis AG, Voutsina A, Kentepozidis N, Giassas S, Papakotoulas P, Agelaki S, **Tryfonidis K**, Kotsakis A, Vamvakas L, Vardakis N, Georgoulas V. *A phase II trial of erlotinib as front-line treatment in clinically selected patients with non-small-cell lung cancer*. *Clin Lung Cancer*. 2012 Mar;**13(2):129-35**. doi: **10.1016/j.clcc.2011.08.004**. Epub 2011 Oct 14.
39. C Papadaki, E Tsaroucha, L Kaklamanis, E Lagoudaki, M Trypaki, **K Tryfonidis**, D Mavroudis, E Stathopoulos, V Georgoulas, J Souglakos: *Correlation of BRCA1, TXR1 and TSP1 mRNA expression with treatment outcome to docetaxel-based first-line chemotherapy in patients with advanced/metastatic non-small-cell lung cancer*. *British Journal of Cancer* 01/2011; **104(2)**. DOI:10.1038/sj.bjc.6606027
40. Saloustros E, **Tryfonidis K**, Georgoulas V. *Prophylactic and therapeutic strategies in chemotherapy-induced neutropenia*. *Expert Opin Pharmacother*. 2011 Apr;**12(6):851-63**. doi: **10.1517/14656566.2011.541155**. Epub 2011 Jan 22. **Review**.

Conference Presentations

1. Hans Wildiers, **Konstantinos Tryfonidis**, Lissandra Dal Lago, Peter Vuylsteke, Giuseppe Curigliano, Simon Waters, Barbara Brouwers, Sevily Altintas, Nathan Touati, Fatima Cardoso and Etienne Brain, Pertuzumab and trastuzumab with or without metronomic chemotherapy for older patients with HER2- positive metastatic breast cancer: Results from the EORTC 75111- 10114 ETF/BCG randomized phase II study (PD3-09 SABCS 2017)
2. Carolien Schröder, Fatima Cardoso, Nizet Dijkstra, Elise van Leeuwen-Stok, Barbro Linderholm, Dan Morganstern, Catherine Van Poznak, Antonio C. Wolff, Coralie Poncet, Henry L. Gomez, Kim Aalders, Vesna Bjelic-Radisic, Gustavo Werutsky, **Konstantinos Tryfonidis**, Corneel Coens, Sharon H. Giordano, Kathryn J. Ruddy. Quality of life (QoL) in male breast cancer (BC): Prospective study of the EORTC10085/TBCRC029/BIG2-07/NABCG International Male BC Program (Poster P5-23-02, SABCS 2017)

3. K. Aalders, E. Genbrugge, C. Poncet, A. Kuijter, B. Pistilli, M. Piccart, **K. Tryfonidis**, T. van Dalen, F. Cardoso, L. van 't Veer, E. Rutgers for the MINDACT investigators. Young age and the risk of disease recurrence as assessed by the 70-gene signature – an analysis from the EORTC 10041/BIG 03-04 MINDACT trial (Poster P1-07-08 SABCS 2017)
4. John M Martens, Anieta M Sieuwerts, Coralie Poncet, Marcel Smid, Vanja de Weerd, Leen Slaets Tammy Piper, Carolien HM van Deurzen, Carolien P Schroder, Christina Stangle, Wigard Kloosterman, Elise van Leeuwen-Stok ,Cecilia Nilsson, Joanna Vermeij, Stephanie Peeters, Theodora Goulioti, Monika Nowaczyk, Stefan Aebi, Isabel T Rubio, Catherine Kelly, Jane Bayani, Peggy Porter, Melissa Murray, Clifford Hudis, Lavinia Middleton, Larissa Korde, Kathryn Ruddy, Eric Winer, Oliver Bogler, Danielle van den Weyngaert, Lissandra dal Lago, Judith Fraser, Kim Benstead, Christi van Asperen, Barbro Linderholm, Ingrid Hedenfalk, **Konstantinos Tryfonidis**, Sharon Giordano, John Bartlett and Fatima Cardoso : Molecular subtyping of male breast cancer: By the EORTC/TBCRC/BIG/NABCG International Male Breast Cancer (IMBC) Program (PD7-12, SABCS 2017)
5. Jelle Wesseling, Sena Alaeikhaneshir, **Konstantinos Tryfonidis**, Aleksandra Peric, Elise van Leeuwen-Stok, Lindy Visser, Nina Bijker, Lotte Elshof, Emiel Rutgers, Frederieke van Duijnhoven:LOW Risk DCIS: Prevent overtreatment of DCIS: Do the LORD-trial (POSTER TIP, SABCS 2017)
6. **Konstantinos Tryfonidis**, Coralie Poncet, Leen Slaets, Giuseppe Viale, Femke Snoo, Kim Aalders, Laura van 't Veer, Emiel Rutgers, Martine Piccart, Jan Bogaerts and Fatima Cardoso, on behalf of the TRANSBIG Consortium and MINDACT investigators. Not all small node negative (pT1abN0) breast cancers are similar: Outcome results from the EORTC 10041/BIG 3-04 (MINDACT) trial- **ORAL PRESENTATION AT ESMO CONGRESS 2017**

7. M. Giaj Levra, J. Menis, A. Luciani, E. De Maio, B. Hasan, T. Berghmans, M.A. Massiani, M. De Waele, A.-M. Dingemans, J. Donckele, C. Faivre-Finn, N. Girard, L. Greillier, S. Lantuéjoul, M. O'Brien, M. Reck, **K. Tryfonidis**, H. Wildiers, B. Besse, S. Novello, Diagnostic and therapeutic strategies for elderly patients with advanced Non-Small cell lung cancer (NSCLC): results from an EORTC pan-european survey-ESMO 2017 POSTER
8. K. Aalders, A. Kuijter, M. Straver, L. Slaets, G. Viale, L. Van 't Veer, A. Glas, M. Delorenzi, **K. Tryfonidis**, M. Piccart, F. Cardoso, E. Rutgers: *Association between multifocal disease and the risk of distant metastasis as assessed by the 70-gene signature in clinical low-risk breast cancer patients - results from the EORTC 10041/BIG 03-04 MINDACT trial*. European Journal of Cancer; 04/2016
9. M. A. Vermeulen, L. Slaets, F. Cardoso, S. Giordano, S. Aebi, J. Bayani, P. J. Van Diest, J. Fraser, T. Goulioti, C. Kelly, E. Van Leeuwen-Stok, B. Linderholm, J. Martens, S. Peeters, P. Porter, I. Rubio, C. Schroder, **K. Tryfonidis**, J. M. S. Bartlett, C. H. M. Van Deurzen: *Pathologic prognostic factors of male breast cancer: results of the EORTC 10085/TBCRC/BIG/NABG International Male Breast Cancer Program*. European Journal of Cancer 04/2016; 57.
10. J Balmana, **K Tryfonidis**, W Audeh, T Goulioti, L Slaets, S Agarwal, N Lema, D Cameron, N Turner: *Abstract OT1-03-05: A phase III, randomized, open label, multicenter, controlled trial of niraparib versus physician's choice in previously-treated, HER2 negative, germline BRCA mutation-positive breast cancer patients. An EORTC-BIG intergroup study (BRAVO study)*. Cancer Research 02/2016; 76(4 Supplement). DOI:10.1158/1538-7445.SABCS15-OT1-03-05
11. E. Zikos, I. Ghislain, C. Coens, C. Quinten, V. Balta, **K. Tryfonidis**, M. Piccart, D. Zardavas, G. Velikova, E. Nagele, V. Bjelic-Radisic, F. Cardoso, M. Sprangers, A. Bottomley: *1835 Health-related quality of life in advanced breast cancer: A systematic review on reporting of methodological and clinical issues in randomized controlled trials*. ESMO, Vienna 2015

12. Fatima Cardoso, John Bartlett, Leen Slaets, Carolien van Deurzen, Elise van Leewen-Stok, Peggy Porter, Barbro Linderholm, Ingrid Hedenfalk, Carolien Schroder, John Martens, Jane Bayani, Christi van Asperen, Melissa Murray, Clifford Hudis, Lavinia Middleton, Joanna Vermeij, Stephanie Peeters, Judith Fraser, Monica Nowaczyk, Isabel Rubio, Stefan Aebi, Catherine Kelly, Kathryn Ruddy, Eric Winer, Cecilia Nilsson, Lissandra Dal Lago, Larissa Korde, Kim Benstead, Danielle Van Den Weyngaert, Oliver Bogler, Theodora Goulioti, Nicolas Dif, Carlo Messina, **Konstantinos Tryfonidis**, Jan Bogaerts, Sharon Giordano: *Abstract S6-05: Characterization of male breast cancer: First results of the EORTC10085/TBCRC/BIG/NABCG International Male BC Program*. Cancer Research 05/2015; 75(9 Supplement). DOI:10.1158/1538-7445.SABCS14-S6-05

13. **Tryfonidis K**, Slaets L, Viale G, Snoo F, Van 't Veer L, Rutgers E, Piccart M, Bogaerts J, Cardoso F: *Abstract P2-03-01: Are all small tumors low risk? Characterization of small invasive node negative breast cancers (BC) enrolled in the EORTC 10041/BIG 3-04 (MINDACT) trial*. Cancer Research 05/2015; 75(9 Supplement). DOI:10.1158/1538-7445.SABCS14-P2-03-01

14. Lotte E Elshof, **Konstantinos Tryfonidis**, Leen Slaets, A Elise van Leeuwen-Stok, Nicolas Dif, Victoria P Skinner, Claudette E Loo, Gonneke Warnars, Eveline Bleiker, Ruud M Pijnappel, Nina Bijker, Emiel JTh Rutgers, Jelle Wesseling: *Abstract OT3-6-01: The LORD trial: A randomized, non-inferiority trial, between active surveillance versus standard treatment in patients with low risk ductal carcinoma in situ*. Cancer Research 05/2015; 75(9 Supplement). DOI:10.1158/1538-7445.SABCS14-OT3-6-01

15. **Tryfonidis K**, Bogaerts J., Martell R., Sledge G., Balmana J., Audeh W., Deleersnijder A., Favorito F., Agarwal S., Rizzetto G., Messina C., Slaets L., Goulioti T., Tutt A., Cameron D., Turner N: *A phase III randomized trial of niraparib versus physician's choice in previously-treated, HER2 negative, germline-BRCA mutated breast cancer patients: Intergroup study EORTC-1307-BCG and BIG5-13* [J Clin Oncol 32:5s, 2014 (suppl; abstr TPS659)].

16. Karampeazis, A. Ardavanis, N. Kentepozidis, Ch. Nikolaou, V. Bozionelou, P. Papakotoulas, **K. Tryfonidis**, E. Saloustros, D. Mavroudis, V. Georgoulas, L. Vamvakas: *Cyclophosphamide and liposomal-encapsulated doxorubicin (MYOCET®) in elderly women with HER-2 negative locally advanced or metastatic breast cancer: Preliminary results of a multicenter phase II trial from the Hellenic Oncology Research Group*. *Journal of Geriatric Oncology* 10/2012; 3. DOI:10.1016/j.jgo.2012.10.011

Other publications (WEB)

1. Fatima Cardoso & **Konstantinos Tryfonidis**: ESMO spotlights for advanced breast cancer in 2013
2. Fatima Cardoso & **Konstantinos Tryfonidis**: ESMO spotlights for advanced breast cancer in 2014

H. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Siegel RL, Miller KD, Jemal A, Cancer Statistics 2017, CA Cancer J Clin 2017
- Jemal A, Bray F, Center MM, Global Cancer Statistics, CA Cancer J Clin, 2011
- Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA, Lung Cancer: Epidemiology, etiology and prevention, Clin Chest Med, 2011
- Jackman DM, Johnson BE, Small Cell Lung Cancer, Lancet 2005
- Beadsmoore CJ, Screaton NJ, Classification, staging and prognosis of lung cancer, Eur J Radiol, 2003
- Subramanian J, Velcheti V, Cao F, Govindan R, Presentation and stage- specific outcomes of lifelong never- smokers with non- small cell lung cancer (NSCLC), J Thorac Oncol. 2007
- Jemal A, Ward E, Hao Y, Thun M, Trends in the leading causes of death in the United States, 1970- 2002, JAMA 2005.
- Mattson ME, Pollack ES, Cullen JW, What are the odds that smoking will kill you? Am J Public Health 1987.
- Shapiro JA, Jacobs EJ, Thun MJ, Cigar smoking men and risk of death from tobacco-related cancers, J Natl Cancer Inst, 2000.
- Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. Int J Cancer. 2002.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin. 2005
- Rudin CM, Avila-Tang E, Samet JM. Lung cancer in never smokers: a call to action. Clin Cancer Res. 2009
- Bell DW, Gore I, Okimoto RA, et al. Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR. Nat Genet. 2005
- Wenzlaff AS, Cote ML, Bock CH, et al. CYP1A1 and CYP1B1 polymorphisms and risk of lung cancer among never smokers: a population-based study. Carcinogenesis. 2005.
- Wenzlaff AS, Cote ML, Bock CH, et al. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms, environmental tobacco smoke exposure and risk of lung cancer among never smokers: a population-based study. Carcinogenesis. 2005.

Jung CY, Choi JE, Park JM, et al. Polymorphisms in the hMSH2 gene and the risk of primary lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006.

Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004.

Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *JNatlCancerInst.* 2005.

Wakelee HA, Chang ET, Gomez SL, Lung cancer incidence in never smokers, *J Clin Oncol*, 2007.

Billello KS, Murin S, Matthay RA, Epidemiology, etiology and prevention of lung cancer, *Clin Chest Med*, 2002.

Koyi H, Hillerdal G, Branden E, Patient’s and doctor’s delays in the diagnosis of chest tumors, *Lung Cancer* 2002.

Salomaa ER, Sallinen S, Hiekkanen H, Lippo K, Delays in the diagnosis and treatment of lung cancer, *Chest* 2005.

Ginsberg RJ, Rubinstein LV, Randomized trial of lobectomy versus limited resection for T1N0 non- small cell lung cancer. Lung Cancer Study Group, *Ann Thorac Surgery* 1995.

Warren WH, Faber LP, Segmentectomy versus lobectomy in patients with stage I pulmonary carcinoma. Five- year survival and patterns of intrathoracic recurrence, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1994.

Keller SM, Adak S, Wagner H, A randomized trial of postoperative adjuvant therapy in patients with completely resected stage II or IIIA non- small- cell lung cancer. Eastern Cooperative Oncology Group.

Vlastos F, *Pneumon* 2004, *article in Greek*

Sause WT, Scott C, Taylor S, et al. Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) 88-08 and Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 4588: preliminary results of a phase III trial in regionally advanced, unresectable non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1995.

Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a metaanalysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. *BMJ* 1995.

Rosell R, Gómez-Codina J, Camps C, et al. A randomized trial comparing preoperative chemotherapy plus surgery with surgery alone in patients with non-smallcell lung cancer. *N Engl J Med* 1994.

Roth JA, Fossella F, Komaki R, et al. A randomized trial comparing perioperative chemotherapy and surgery with surgery alone in resectable stage IIIA non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1994.

Emami B, Kaiser L, Simpson J, et al. Postoperative radiation therapy in non-small cell lung cancer. *Am J Clin Oncol* 1997.

Sawyer TE, Bonner JA, Gould PM, et al. Effectiveness of postoperative irradiation in stage IIIA non-small cell lung cancer according to regression tree analyses of recurrence risks. *AnnThoracSurg* 1997.

Rusch VW, Giroux DJ, Kraut MJ, et al. Induction chemoradiation and surgical resection for non-small cell lung carcinomas of the superior sulcus: Initial results of Southwest Oncology Group Trial 9416 (Intergroup Trial 0160). *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001.

Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV et al. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *JClinOncol* 2008.

Douillard JY, Rosell R, De LM et al. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2006.

Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small cell lung cancer, *NEJM* 2010.

Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer, *NEJM* 2013.

Peters S, Camidge DR, Shaw AT, et al. Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non- Small- Cell Lung Cancer, *NEJM* 2017.

Thatcher, N, Chang A, Parikh P, et al. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer), Lancet 2005.

Rikova K, Guo A, Zeng Q et al, Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer, Cell 2007.

Kim ES, Herbst RS, Wistuba II, et al. The BATTLE trial: personalizing therapy for lung cancer, Cancer Discovery 2011.

Wu SG, Chang YL, Hsu YC, et al. Good response to gefitinib in lung adenocarcinoma of complex epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations with the classical mutation pattern, Oncologist 2008.

Papadaki C, Sfakianaki M, Ioannidis G, et al. ERCC1 and BRCA1 mRNA expression levels in the primary tumor could predict the effectiveness of the second line cisplatin-based chemotherapy in pretreated patients with NSCLC, J Thorac Oncol. 2012.

Quinn JE, Kennedy RD, Mullan PB, BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy induced apoptosis, Cancer Res 2003.

Lafarge S, Sylvain V, Ferrara M, Bignon YJ et al, Inhibition of BRCA1 leads to increased chemoresistance to microtubule-interfering agents, an effect that involves the JNK pathway, Oncogene 2001.

Chabaliere C, Lamare C, Racca C ET, et al, BRCA1 downregulation leads to premature inactivation of spindle checkpoint and confers paclitaxel resistance, Cell Cycle 2006.

Zheng Z, Chen T, Li X et al, DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer, NEJM, 2007

Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. Cancer Res 2004

Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, et al. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. Cancer Res 2007.

Davidson JD, Ma L, Flagella M, et al. An increase in the expression of ribonucleotide reductase large subunit 1 is associated with gemcitabine resistance in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* 2004

Goan YG, Zhou B, Hu E, et al. Overexpression of ribonucleotide reductase as a mechanism of resistance to 2,2-difluorodeoxycytidine in the human KB cancer cell line. *Cancer Res* 1999.

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

Lawler J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Cell Mol Med* 2002.

Charlotte KY Ng, Helen N Pemberton, Jorge S Reis- Filho, *Expert Rev Anticancer Ther.* 2012.

Zardavas D, Irrthum A, Swanton C, Piccart M. Clinical management of breast cancer heterogeneity. *NatRevClinOncol* 2015.

Taron M, Rosell R, Felip E, et al. BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Hum Mol Genet* 2004

Rosell R, Scagliotti G, Danenberg KD, et al. Transcripts in pretreatment biopsies from a three-arm randomized trial in metastatic non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 2003.

Papadaki C, Tsaroucha E, Kaklamanis L, et al. Correlation of BRCA1, TXR1 and TSP1 mRNA expression with treatment outcome to docetaxel-based first-line chemotherapy in patients with advanced/metastatic non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2011.

Boukovinas I, Papadaki C, Mendez P, et al. Tumor BRCA1, RRM1 and RRM2 mRNA expression levels and clinical response to first-line gemcitabine plus docetaxel in non-small-cell lung cancer patients. *PLoS One* 2008.

Souglakos J, Boukovinas I, Taron M, et al. Ribonucleotide reductase subunits M1 and M2 mRNA expression levels and clinical outcome of lung adenocarcinoma patients treated with docetaxel/gemcitabine. *BrJCancer* 2008.

Gerlinger M, Swanton C. How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. *Br J Cancer* 2010.

Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010.

Aurilio G, Disalvatore D, Pruneri G, et al. A meta-analysis of oestrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 discordance between primary breast cancer and metastases. *Eur J Cancer* 2014.

Lacombe D, Tejpar S, Salgado R, Cardoso F, Golfopoulos V, Aust D, et al. European perspective for effective cancer drug development. *Nat Rev Clin Oncol* 2014.

Zardavas D, Maetens M, Irrthum A, et al. The AURORA initiative for metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 2014.

Ignatiadis M, Rack B, Rothe F, et al. Liquid biopsy-based clinical research in early breast cancer: The EORTC 90091-10093 Treat CTC trial. *Eur J Cancer* 2016.