



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

UNIVERSITY OF CRETE

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

FACULTY OF MEDICINE



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Β. ΓΕΩΡΓΟΥΛΙΑΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΟΒΛΕΠΤΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ
BRCA1, ERCC1, ATR7B, PKM2, TOPO-I, TOPO-IIA, TOPO-IIB ΚΑΙ
C-MYC ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ
ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΠΟΥ ΕΛΑΒΑΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΠΡΩΤΗΣ ΓΡΑΜΜΗΣ
ΜΕ ΣΙΣΠΛΑΤΙΝΗ ΚΑΙ ΕΤΟΠΟΣΙΔΗ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Νίκη Καραχάλιου

Παθολόγος- Ογκολόγος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2014



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

UNIVERSITY OF CRETE

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

FACULTY OF MEDICINE



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Β. ΓΕΩΡΓΟΥΛΙΑΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΟΒΛΕΠΤΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ
BRCA1, ERCC1, ATR7B, PKM2, TOPO-I, TOPO-IIA, TOPO-IIB ΚΑΙ
C-MYC ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ
ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΠΟΥ ΕΛΑΒΑΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΠΡΩΤΗΣ ΓΡΑΜΜΗΣ
ΜΕ ΣΙΣΠΛΑΤΙΝΗ ΚΑΙ ΕΤΟΠΟΣΙΔΗ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Νίκη Καραχάλιου

Παθολόγος- Ογκολόγος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2014

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΟΒΛΕΠΤΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ
BRCA1, ERCC1, ATR7B, PKM2, TOPO-I, TOPO-IIA, TOPO-IIB ΚΑΙ
C-MYC ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ
ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΠΟΥ ΕΛΑΒΑΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΠΡΩΤΗΣ ΓΡΑΜΜΗΣ
ΜΕ ΣΙΣΠΛΑΤΙΝΗ ΚΑΙ ΕΤΟΠΟΣΙΔΗ**

Επιβλέπων Καθηγητής:

Βασίλειος Γεωργούλιας, Καθηγητής Παθολογίας- Ογκολογίας
Δ/ντης Παθολογικής- Ογκολογικής Κλινικής
Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Βασίλειος Γεωργούλιας, Καθηγητής Παθολογίας- Ογκολογίας
Ευστάθιος Σταθόπουλος, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής
Ιωάννης Σουγκλάκος, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας
Δημήτριος Μαυρουδής, Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας
Αναστάσιος Κουτσόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογικής
Ανατομικής
Σοφία Αγγελάκη, Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ογκολογίας
Γεώργιος Σαμώνης, Καθηγητής Παθολογίας με έμφαση στις Λοιμώξεις

Στους γονείς μου..

.. ελάχιστο δείγμα σεβασμού και αγάπης

Στους δασκάλους μου..

*Καθηγητή, Β. Γεωργούλια
Επ. Καθηγητή, Ι. Σουγκλάκο
Καθηγητή, R. Rosell*

.. με απεριόριστο σεβασμό και ευγνωμοσύνη..

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή και δάσκαλό μου κ. Β. Γεωργούλια τόσο για την τιμή να μου αναθέσει την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής, όσο και για τις γνώσεις που μου έδωσε αλλά και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε τα χρόνια που συνεργάστηκα μαζί του στην Παθολογική- Ογκολογική Κλινική ΠΑΓΝΗ. Τον ευχαριστώ γιατί μου έμαθε πώς να προσεγγίζω τον Ογκολογικό άρρωστο και να του προσφέρω τις υπηρεσίες μου. Ιδιαίτερα επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Παθολογικής- Ογκολογίας, κ. Ι. Σουγκλάκο, ο οποίος ήταν και ο επιβλέπων της διατριβής μου, γιατί χωρίς τη συνεχή βοήθειά του δεν θα ήταν δυνατή η πραγματοποίησή της.

Ευχαριστώ τις βιολόγους Χ. Παπαδάκη και Μ. Σφακιανάκη και τον βιολόγο Ι. Μεσσαριτάκη για τις πολύτιμες υποδείξεις τους και την βοήθειά τους στην εκτέλεση των πειραμάτων. Ευχαριστώ την Data Manager Κα Δώρα Χατζηδάκη και τον Επίκουρο Καθηγητή Παθολογίας Ογκολογίας κ. Ι. Σουγκλάκο για την βοήθειά τους σε θέματα Βιοστατιστικής.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κα Βασιλική Αθανασάκη, από τη γραμματεία της Παθολογικής- Ογκολογικής Κλινικής ΠΑΓΝΗ, για την πολύτιμη βοήθειά της κατά τη συγγραφή της διατριβής μου.

Επίσης, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς επιτροπής, τους Καθηγητές κ. Σταθόπουλο, κ. Μαυρουδή και κ. Σαμώνη, την Επίκουρο Καθηγήτρια Κα Αγγελάκη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Κουτσόπουλο για τις παρατηρήσεις τους σχετικά με την διατριβή μου.

Ευχαριστώ όλους τους ιατρούς, τις νοσηλεύτριες, τις γραμματείς της Παθολογικής- Ογκολογικής Κλινικής ΠΑΓΝΗ, τα μέλη της ομάδας των κλινικών μελετών και όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου της Βιολογίας του Καρκίνου για την βοήθειά τους

καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου. Τέλος, ευχαριστώ όλους τους ασθενείς που πρόθυμα δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην μελέτη.

Πίνακας Περιεχομένων

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	1
2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
2.1 Επιδημιολογία του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (ΜΚΠ)	8
2.2 Κλινική εικόνα-Διάγνωση-Σταδιοποίηση ΜΚΠ.....	14
2.2.1 Κλινική εικόνα ΜΚΠ	14
2.2.2 Διάγνωση ΜΚΠ	19
2.2.3 Σταδιοποίηση ΜΚΠ	23
2.3 Θεραπεία ΜΚΠ.....	26
2.3.1 1ης γραμμής Χημειοθεραπεία	26
2.3.2 Ηλικιωμένοι ασθενείς	31
2.3.3 2ης γραμμής Χημειοθεραπεία	32
2.3.4 Ακτινοθεραπεία.....	34
2.3.4.1 Ακτινοθεραπεία στον θώρακα	34
2.3.4.2 Προφυλακτική ακτινοθεραπεία εγκεφάλου	35
2.4 Φαρμακογενομική ανάλυση στο ΜΚΠ-Πιθανοί βιοδείκτες-Συσχέτιση με θεραπεία ΜΚΠ-Στόχοι της διατριβής.....	36
2.4.1 Ο ρόλος των γονιδίων ERCC1 και BRCA1	36
2.4.2 Αντλίες εκροής φαρμάκων-ATP7B	41
2.4.3 MYC: Προγνωστικός παράγοντας για τον ΜΚΠ	42
2.4.4 Το μονοπάτι της γλυκόλυσης- PKM2	44
2.4.5 Τοποϊσομεράσες I και II (TOPO-I και II-A, II-B): Μηχανισμός δράσης – Στόχος χημειοθεραπευτικών φαρμάκων.....	45
2.5 Στόχοι της Μελέτης.....	48
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	50
3.1 Υπο μελέτη πληθυσμός.....	50
3.2 Μεθοδολογία	53
3.2.1 Υλικά και μέθοδοι.....	53

3.2.2	Ιστολογική χρώση αιματοξυλίνης- ηωσίνης.....	53
3.2.3	Απομόνωση καρκινικών κυττάρων	57
3.2.4	Αποπαραφινοποίηση	58
3.2.5	Κυτταρική λύση- πρωτεϊνική πέψη	59
3.2.6	Εκχύλιση και καθαρισμός του RNA (RNA extraction)	60
3.2.7	Χρήση DNAase για την διάσπαση του DNA	63
3.2.8	Μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA και προσδιορισμός της καθαρότητας του με χρήση ειδικού φασματοφωτόμετρου (nanodrop).....	64
3.2.9	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR (Polymerase Chain Reaction).....	67
3.3	Στατιστική ανάλυση.....	76
3.4	Αποτελέσματα.....	77
3.4.1	Αποτελέσματα mRNA έκφρασης των υπό εξέταση γονιδίων και συσχετίσεις μεταξύ αυτών	77
3.4.2	Τιμές έκφρασης γονιδίων και έκβαση ασθενών.....	79
3.4.3	Μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση για το διάστημα έως την υποτροπή και για την συνολική επιβίωση.....	88
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	92
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	99
6.	ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΨΗΦΙΟΥ ΔΙΔΑΚΤΟΡΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	109
7.	ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	118

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (ΜΚΠ) είναι η πιο επιθετική μορφή καρκίνου του πνεύμονα με δυσμενή πρόγνωση. Η συνδυασμένη χημειοθεραπεία παραμένει ο ακρογωνιαίος λίθος στη θεραπεία τόσο της περιορισμένης όσο και της εκτεταμένης νόσου. Η ακτινοθεραπεία έχει καθιερωθεί ως συμπλήρωμα στη χημειοθεραπεία στα περιορισμένα στάδια της νόσου, ενώ στην εκτεταμένη νόσο προορίζεται κυρίως για τη θεραπεία των εγκεφαλικών μεταστάσεων. Μιας και ο ΜΚΠ γίνεται εύκολα ανθεκτικός στη χημειοθεραπεία, δεύτερης γραμμής χημειοθεραπευτικά σχήματα χρησιμοποιούνται όταν υπάρχει εξέλιξη της νόσου, με την τοποτεκάνη να αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα. Πριν από 25 χρόνια περίπου, είχαμε αρχίσει να πιστεύουμε ότι ο ΜΚΠ θα μπορούσε να συμπεριληφθεί σε αυτά που ονομάζουμε ιάσιμα νεοπλάσματα. Είχαμε ένα ξεχωριστό σύστημα σταδιοποίησης, αποτελεσματικά φάρμακα καθώς και την ακτινοβολία του θώρακος για μια ιδιαίτερα χημειο- και ακτινο-ευαίσθητη νόσο. Βρισκόμαστε όμως 25 χρόνια αργότερα και οι ασθενείς φαίνεται να έχουν την ίδια φτωχή πρόγνωση. Ίσως η λύση στα αινίγματα αυτής της νόσου μπορούν να βρεθούν μέσα από τη καλύτερη κατανόηση της βιολογίας της. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται ευρέως στη θεραπεία του ΜΚΠ, όπως η σισπλατίνη και η καρβοπλατίνη, προκαλούν βλάβες στο DNA που αν το κύτταρο αδυνατεί να επιδιορθώσει αναπόφευκτα οδηγείται στον κυτταρικό θάνατο. Η ικανότητα των κυττάρων να επιδιορθώνουν τις βλάβες του γενετικού τους υλικού εξαρτάται από πολύπλοκους μηχανισμούς που αλληλεπιδρούν με τους μηχανισμούς ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου καθώς και αυτούς που ελέγχουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Γονίδια, όπως τα *ERCC1* και *BRCA1* εμπλέκονται στη επιδιόρθωση του DNA και η έκφρασή τους έχει συσχετιστεί με αντίσταση στα ανάλογα της πλατίνης. Μεταφορείς εκροής, όπως η *ATP7B*,

ευθύνονται για τη μεταφορά των αναλόγων της πλατίνης και η υπερέκφραση του γονιδίου *ATP7B* μπορεί να σχετίζεται με μειωμένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση και επομένως αντίσταση στη πλατίνη και τη καρβοπλατίνη. Υπερέκφραση ή ενίσχυση του γονιδίου *MYC* υφίσταται στο 18-31% του ΜΚΠ και ιδιαίτερος στη χημειοανθεκτική νόσο και η χαμηλή του έκφραση έχει περιγραφεί να σχετίζεται με ευαισθησία σε αλκυλιωτικούς παράγοντες όπως η πλατίνη. Από τις τέσσερις ισομορφές της πυροσταφυλικής κινάσης, η πρωτεΐνη PKM2 είναι αυτή που εκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα και είναι σημαντική για τον μεταβολισμό και την αύξηση του όγκου. Τέλος Οι DNA τοποϊσομεράσες I και II (TOPO-I και II-A, II-B), φαίνεται επίσης να εμπλέκονται στους μηχανισμούς αντίστασης σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τον ΜΚΠ. Στη μελέτη αυτή αναλύσαμε αναδρομικά τη προβλεπτική αξία, τόσο για την ανταπόκριση στη θεραπεία όσο και για την επιβίωση των ασθενών, της mRNA έκφρασης των γονιδίων *BRCA1*, *ERCC1*, *ATP7B*, *PKM2*, *TOPO-I*, *TOPO-IIA*, *TOPO-IIB* και *C-MYC* χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου σε κύβους παραφίνης 184 ασθενών με ΜΚΠ που έλαβαν συνδυασμένη χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση τη πλατίνη με ή χωρίς ακτινοθεραπεία θώρακος. Στην ομάδα των ασθενών με περιορισμένη νόσο, μικρότερο μέσο ελεύθερο νόσου διάστημα διαπιστώθηκε για όσους είχαν υψηλή mRNA έκφραση των γονιδίων *ERCC*, *PKM2*, *TOPO-I*, *TOPO-IIA* και *TOPO-IIB* σε σύγκριση με τους ασθενείς με χαμηλή mRNA έκφραση των ίδιων γονιδίων. Επιπλέον, η μέση συνολική επιβίωση ήταν σημαντικά μειωμένη στους ασθενείς που είχαν υψηλή mRNA έκφραση των γονιδίων *ERCC*, *PKM2*, *TOPO-IIA* και *TOPO-IIB* σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν χαμηλή έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων. Για τους ασθενείς με εκτεταμένο στάδιο νόσο, η μοναδική στατιστικά

σημαντική συσχέτιση που βρέθηκε ήταν ανάμεσα στη mRNA έκφραση του γονιδίου *TOPO-IIB*, και τη συνολική επιβίωση. Επιπλέον για το περιορισμένο στάδιο MKΠ, οι 26 ασθενείς που είχαν υψηλή mRNA έκφραση και των τεσσάρων γονιδίων *ERCC1*, *PKM2*, *TOPO-IIA* και *TOPO-IIB* είχαν στατιστικά σημαντικό μικρότερο διάστημα ελεύθερο νόσου σε σύγκριση με τους 25 ασθενείς με χαμηλή mRNA των ίδιων γονιδίων. Η ίδια ομάδα ασθενών είχε επίσης σημαντικά μειωμένη επιβίωση συγκρινόμενη με τους ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *ERCC1*, *PKM2*, *TOPO-IIA* και *TOPO-IIB*. Παρόμοια αποτελέσματα βρήκαμε και για τους ασθενείς με εκτεταμένο στάδιο νόσου. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά μπορούμε να χαρακτηρίσουμε την υψηλή έκφραση mRNA των γονιδίων *ERCC1*, *PKM2*, *TOPO-IIA* και *TOPO-IIB* ως δυσμενή γονιδιακή υπογραφή και τη χαμηλή mRNA έκφρασή τους ως ευνοϊκή γονιδιακή υπογραφή για το διάστημα έως την υποτροπή αλλά και για τη συνολική επιβίωση των ασθενών με MKΠ ανεξάρτητα από το στάδιο της νόσου. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, η δυσμενής γονιδιακή υπογραφή ήταν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μικρότερο διάστημα ελεύθερο νόσου και μικρότερη συνολική επιβίωση και για τα δυο στάδια της νόσου. Μέσα από την μελέτη αυτή, αν και αναδρομική, χωρίς ομάδα ελέγχου, φάνηκε ότι με τη χρήση της φαρμακογενομικής ανάλυσης μπορούμε να εντοπίσουμε υποομάδες ασθενών με MKΠ, που έχουν μεγαλύτερες ή μικρότερες πιθανότητες να ωφεληθούν σημαντικά από τη χημειοθεραπεία με πλατίνη/ετοποσίδη.

Summary

Small cell lung cancer (SCLC) is the most aggressive form of lung cancer with poor prognosis. Combination chemotherapy remains the cornerstone in the treatment of both limited and extensive disease. Radiation therapy has been established as an adjunct to chemotherapy for limited stage disease, while in extensive disease is mainly used for the treatment of brain metastases. SCLC is trajectory with an initial good clinical response followed by rapid relapse of chemoresistant tumour and death. Since the SCLC is easily resistant to chemotherapy, second-line chemotherapy regimens are used when there is disease progression, with topotecan being the most important agent. Twenty-five years ago, we started to believe that SCLC could be included in what we call curable tumours; we had a unique staging system and effective drugs and radiation of the chest for a highly chemo - and radiation - sensitive disease . But we are 25 years later and patients seem to have the same poor prognosis. Perhaps the solution to the enigmas of this disease can be found through a better understanding of SCLC biology. Because surgical resection is not part of standard care, SCLC research using primary tumour tissue is limited to small diagnostic samples and, thus, the therapeutic benefits from the molecular analysis of these tumours are limited during the last 30 years. Drugs that are widely used in the treatment of SCLC, such as cisplatin and carboplatin, cause damage to the DNA that if the cell is unable to repair inevitably is lead to death . The ability of cells to repair the DNA damage depends on complex mechanisms that interact with the mechanisms regulating the cell cycle as well as those that control programmed cell death. ERCC1 is an enzyme which plays a key role in the GG-Nucleotide Excision Repair (GG-NER) pathway which repairs DNA adducts and other DNA helix-distorting lesions including those associated with cisplatin administration. The majority of studies on

ERCC1 and cisplatin, in Non Small Cell Lung Cancer as well as in other solid tumours, share in common the finding that low-*ERCC1* expression is associated with a better response to platinum-based chemotherapy. On the other hand, the results of *in vitro* studies have suggested the superiority of TC-NER pathway, in which BRCA1 protein is involved, to GG-NER pathway in predicting platinum resistance. Modulation of *BRCA1* expression leads to modification of TC-NER and, hence, to radio- and chemo-resistance. *BRCA1* is also involved in homologous recombination repair and non-homologous end joining, in response to DNA damage and may be a regulator of mitotic spindle assembly, as *BRCA1* and β -tubulin co-localize to the microtubules of the mitotic spindle and to the centrosomes. In addition, recent data have shown that import and export transporters involved in maintenance of copper homeostasis are also involved in the transport of cisplatin. Especially, overexpression of the P-type transporter *ATP7B* conferred cisplatin resistance associated with decreased intracellular accumulation of cisplatin and carboplatin. Also, the role of *PKM2* in resistance to platinum analogs is recently under extensive investigation; *PKM2* replaces the specific isoforms (type L, R, and M1) during tumourigenesis and substitution is under the control of the transcription factor C-MYC. The overexpression of MYC proteins in SCLC is largely a result of gene amplification and leads to more rapid proliferation and loss of terminal differentiation. *C-MYC* overexpression occurs in 16–32% of SCLC and in 40% of cell lines established from patients whose disease progressed after chemotherapy. Finally, several mechanisms of resistance have been suggested to involve DNA topoisomerase I and II, which are the target of several compounds, including topoisomerase-I inhibitors (such as irinotecan and topotecan) as well as topoisomerase-II inhibitors (such as etoposide and doxorubicin). This study retrospectively analyzes the predictive value on both

response to treatment and survival of *BRCA1*, *ERCC1*, *ATP7B*, *PKM2*, *TOPO1*, *TOPO-IIA*, *TOPOIIB* and *C-MYC* mRNA levels, as they are detected by real-time PCR in SCLC patients treated with platinum-based combination chemotherapy with or without chest radiotherapy. In the group of patients with limited disease, shorter progression free survival was found for those who had high mRNA expression of *ERCC*, *PKM2*, *TOPO-I*, *TOPO- IIA* and *TOPO-IIB* compared to patients with low mRNA expression of the same genes . Furthermore, the median overall survival was significantly reduced in patients who had high mRNA expression of *ERCC*, *PKM2*, *TOPO- IIA* and *TOPO-IIB* compared to patients who had low expression of the same genes. For patients with extensive disease, the only statistically significant correlation was found between mRNA expression of *TOPO- IIB* and overall survival. Moreover, for the limited-stage SCLC, 26 patients who had high mRNA expression of the four genes *ERCC1*, *PKM2*, *TOPO-IIA* and *TOPO-IIB* had significantly shorter progression free survival compared to 25 patients with low mRNA of the same genes. The same group of patients had also significantly shorter overall survival compared to patients with low expression levels of the four genes. Similar results were found for patients with extensive-stage SCLC. Based on these findings we can characterize the high mRNA expression of *ERCC1*, *PKM2*, *TOPO-IIA* and *TOPO-IIB* as unfavorable gene signature and the low mRNA expression as a favorable gene signature for progression free survival and overall survival of patients with SCLC regardless of the stage of the disease. In the multivariate analysis, the unfavorable gene signature was an independent predictor of shorter progression free survival and overall survival for both stages of the disease. Through this study we have demonstrated that with the use of pharmacogenomics analysis we can identify subgroups of patients with SCLC,

which are more or less likely to benefit from chemotherapy with platinum-etoposide combinational therapy.

2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 *Επιδημιολογία του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (ΜΚΠ)*

Από το 1930 υπάρχει μια σταθερή αύξηση της συχνότητας και της θνησιμότητας από τον καρκίνο του πνεύμονα, κυρίως λόγω της επικράτησης της συνήθειας του καπνίσματος, πριν και μετά τον 1^ο και 2^ο Παγκόσμιο πόλεμο. Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η κύρια αιτία θανάτου στον ανδρικό πληθυσμό από τις αρχές της δεκαετίας του 1950 ενώ το 1987 ξεπέρασε τον καρκίνο του μαστού και έγινε η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο και στο γυναικείο πληθυσμό, στις Ηνωμένες Πολιτείες [1].

Με βάση τα δύο αναγνωρισμένα μητρώα καρκίνου στις Ηνωμένες Πολιτείες, τη SEER (the Surveillance, Epidemiology and End Results) βάση δεδομένων και το NPCR (the National Cancer Institute and the National Program of Cancer Registries) πρόγραμμα ελέγχου και πρόληψης νοσημάτων, το 2012 υπήρξαν 226.160 νέα κρούσματα καρκίνου του πνεύμονα, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 14% του συνόλου των νέων περιπτώσεων καρκίνου [1]. Παράλληλα διαπιστώθηκαν 160.340 θάνατοι από την ίδια νόσο, ποσοστό που αντιπροσωπεύει το 28% του συνόλου των θανάτων από νεοπλασματική νόσο [1]. Ο καρκίνος του πνεύμονα προκαλεί περισσότερους θανάτους από ότι οι τρεις επόμενες πιο συχνές μορφές καρκίνου μαζί (καρκίνος του παχέος εντέρου, του μαστού και του προστάτη). Η θνησιμότητα διαφέρει μεταξύ των δύο φύλων, με τα ποσοστά θανάτου στους άνδρες να συνεχίζουν να μειώνονται από το 1991 ενώ μετά από αρκετές δεκαετίες συνεχών αυξήσεων τα αντίστοιχα ποσοστά στις γυναίκες έχουν σταθεροποιηθεί [1].

Το αναμενόμενο ποσοστό πενταετούς επιβίωσης για όλους τους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα είναι 16,3% ενώ το αντίστοιχο ποσοστό είναι 65,2% για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, 90% για τον καρκίνο του μαστού και 99,9% για τον καρκίνο του προστάτη [1]. Σε σύγκριση με τους Καυκάσιους, που κατά τη διάρκεια της περιόδου 2001-2007 το πενταετές ποσοστό επιβίωσης από καρκίνο του πνεύμονα ήταν 16,7%, στους Έγχρωμους η πιθανότητα πενταετούς επιβίωσης ήταν 13% [1]. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων SEER η πιθανότητα διάγνωσης καρκίνου του πνεύμονα στη διάρκεια της ζωής του ανθρώπου είναι 7,66% για τους άνδρες και 6,33% για τις γυναίκες ενώ η πιθανότητα θανάτου από καρκίνο του πνεύμονα είναι επίσης μεγαλύτερη στους άνδρες [1].

Οι τέσσερις πιο σημαντικές ιστολογικές μορφές του καρκίνου του πνεύμονα, το αδενοκαρκίνωμα, το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα, το μεγαλοκυτταρικό και το μικροκυτταρικό καρκίνωμα, αποτελούν πάνω από το 90% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα στις Ηνωμένες Πολιτείες [1]. Ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (ΜΚΠ) διαφέρει από τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΜΚΠ), λόγω του μικρού χρόνου διπλασιασμού των κυττάρων, της πρώιμης ανάπτυξης απομακρυσμένων μεταστάσεων και της σημαντικής αρχικής ανταπόκρισης στην χημειοθεραπεία και στην ακτινοβολία [2]. Ωστόσο, παρά την αρχική ανταπόκριση στη θεραπεία, η νόσος τελικά υποτροπιάζει και οι ασθενείς καταλήγουν [3]. Η συχνότητα των διαφόρων ιστολογικών υποτύπων του καρκίνου του πνεύμονα έχει αλλάξει σημαντικά κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών. Ο ΜΚΠ είναι λιγότερο συχνός, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 14% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα ενώ ο ΜΜΚΠ αφορά το υπόλοιπο 85% [1]. Αν και ο ακανθοκυτταρικός και ο ΜΚΠ ήταν οι πιο συχνοί ιστολογικοί υπότυποι της νόσου κατά την περίοδο που η επιδημιολογία του καρκίνου του πνεύμονα σχετιζόταν

με το κάπνισμα, πιο πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει το αδενοκαρκίνωμα, ως τον ιστολογικό υπότυπο που πλέον επικρατεί [4, 5]. Την περίοδο 2001-2007, το ποσοστό επιβίωσης για τον ΜΜΚΠ ήταν 18% σε σύγκριση με 6,2% για το ΜΚΠ [1].

Η μείωση της επίπτωσης του ΜΚΠ μπορεί να εξηγηθεί από την ελάττωση της συνήθειας του καπνίσματος τα τελευταία χρόνια στο Δυτικό Κόσμο αλλά και από την αλλαγή της σύνθεσης των τσιγάρων. Το 1950 στα 151.3 εκατομμύρια κατοίκων των ΗΠΑ υπήρχαν 55 εκατομμύρια καπνιστές (36%), ενώ το 1990 οι καπνιστές στα 248,8 εκατομμύρια κατοίκων ήταν 50,1 εκατομμύρια (20%) [6]. Παρά το γεγονός ότι η ετήσια κατανάλωση τσιγάρων αυξήθηκε από 248,8 δισεκατομμύρια το 1964 σε 511,2 δισεκατομμύρια το 1981, μειώθηκε στα 465 δισεκατομμύρια το 1998 [6]. Επιπλέον, η ετήσια κατανάλωση τσιγάρων σε ενήλικες άνω των 18 ετών μειώθηκε από 3,800 το 1965 σε 2,800 το 1993 [7]. Το κάπνισμα είναι από τους πιο ισχυρούς παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη του ΜΚΠ. Περισσότερο από το 90% των ασθενών με ΜΚΠ είναι ενεργοί ή πρώην καπνιστές και ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου σχετίζεται με την διάρκεια αλλά και την ένταση του καπνίσματος [8]. Έχει αναφερθεί ότι ο σχετικός κίνδυνος (OR odds ratio) για την ανάπτυξη του ΜΚΠ αυξάνεται με βάση τον αριθμό των τσιγάρων που καταναλώνονται καθημερινά καθώς και με την ηλικία της έναρξης του καπνίσματος [9]. Επιπλέον, ο σχετικός κίνδυνος μειώνεται από 14,5 στους ενεργούς καπνιστές σε 10,9 σε όσους έχουν διακόψει το κάπνισμα για λιγότερο από 4 χρόνια και σε 2,2 σε όσους έχουν διακόψει το κάπνισμα για περισσότερο από 25 χρόνια [9]. Σύμφωνα με μια μετα-ανάλυση που αξιολόγησε τη συσχέτιση του καπνίσματος με τους διάφορους ιστολογικούς υποτύπους του καρκίνου του πνεύμονα, υπάρχει σημαντικά ισχυρότερη συσχέτιση ανάμεσα στο κάπνισμα και τον ΜΚΠ καθώς και τον πλακώδη υπότυπο του ΜΜΚΠ, σε σύγκριση με το αδενοκαρκίνωμα, και το μεγαλοκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα [10]. Ο

υψηλότερος σχετικός κίνδυνος παρατηρήθηκε σε ενεργούς καπνιστές με ΜΚΠ (72,5) ενώ ήταν υψηλότερος για τις γυναίκες καπνίστριες από ότι για τους άνδρες (79,9 έναντι 20.3) [10]. Επομένως, η μείωση του ποσοστού των καπνιστών μπορεί να ευθύνεται για την αναλογικά μεγαλύτερη μείωση στη συχνότητα εμφάνισης του ΜΚΠ και του πλακώδους ΜΜΚΠ, των δύο ιστολογικών υποτύπων έντονα συνδεδεμένων με το κάπνισμα, και για την αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης του αδενοκαρκίνωματος, του ιστολογικού υποτύπου που είναι πιο κοινός σε μη καπνιστές.

Οι περισσότερες από τις καρκινογόνες ουσίες στον καπνό είναι παρούσες στη πίσσα στην πίσσα, ένα μίγμα από χημικές ουσίες ικανές να προκαλέσουν καρκίνο. Από το 1954, η πωλούμενη-σταθμισμένη μέση περιεκτικότητα σε πίσσα και νικοτίνη των αμερικανικών τσιγάρων, που ορίζεται ως η απόδοση της πίσσας και της νικοτίνης σε κάθε τσιγάρο που διατίθεται στις ΗΠΑ σταθμισμένη με τον αριθμό των πακέτων της κάθε μάρκας που πωλούνται κάθε χρόνο, μειώθηκε από περίπου 38 mg και 2,7 mg σε 12 mg και 0,95 mg, αντίστοιχα [7]. Η χαμηλότερη εκπομπή πίσσας έχει επιτευχθεί με την αποτελεσματική χρήση του φίλτρου καθώς και με αλλαγές στη σύνθεση του νέφους καπνού. Οι καπνιστές τσιγάρων με χαμηλή περιεκτικότητα σε νικοτίνη τείνουν να καπνίζουν πιο έντονα, με βαθύτερες εισπνοές προκειμένου να έχουν την επιθυμητή αντίδραση σε αυτή την εξαρτησιογόνο ουσία του καπνού [6]. Επιπλέον, η χρήση του φίλτρου οδήγησε στην μείωση του μεγέθους της αεριζόμενης ζώνης, ενώ το φίλτρο δεν είναι αποτελεσματικό στην συγκράτηση όλων των χημικών ουσιών. Ενώ οι μακροχρόνιοι καπνιστές τσιγάρων με υψηλή νικοτίνη και χωρίς φίλτρο έχουν την υψηλότερη απόθεση των σωματιδίων στα σημεία διακλάδωσης του τραχειοβρογχικού δέντρου, η βαθύτερη εισπνοή των μικρότερων σωματιδίων οδηγεί σε αυξημένη απόθεση αυτών στους μικρότερους αεραγωγούς και στις κυψελίδες. Η

περιφερική αυτή κατανομή είναι χαρακτηριστική του αδενοκαρκινώματος, αλλά όχι του ΜΚΠ και του πλακώδους ΜΜΚΠ [11, 12]. Επιπλέον οι αλλαγές στη σύνθεση του καπνού μπορεί να εμπλέκονται στην αυξανόμενη συχνότητα του αδενοκαρκινώματος. Κατά τις τελευταίες δεκαετίες, υπήρξε μια μείωση στην ποσότητα του βενζο (α) πυρένιου, και μία αύξηση στην ποσότητα της 4-(μεθυλνιτροζαμινο)-1-3-(πυρριδυλ)-1-βουτανόνης, που σε αρκετά ζωικά μοντέλα επάγεται τη δημιουργία αδενώματος και αδενοκαρκινώματος [13] [14].

Η μείωση του χάσματος μεταξύ των δυο φύλων στη συχνότητα του ΜΚΠ θα μπορούσε να εξηγηθεί τουλάχιστον εν μέρει από την αύξηση του αριθμού των γυναικών που διαγιγνώσκονται με καρκίνο του πνεύμονα κατά τη διάρκεια των τελευταίων 20 ετών. Η αύξηση αυτή σχετίζεται άμεσα με την αύξηση της συνήθειας του καπνίσματος στο γυναικείο πληθυσμό, η οποία αν και υστερεί σε σχέση με των ανδρών, έφτασε στο απόγειο του 55% στις γυναίκες που είχαν γεννηθεί μεταξύ 1935 και 1944 [15]. Το εκτιμώμενο ποσοστό των καπνιστών στις ΗΠΑ για το έτος 1997 ήταν 25,7% στους άνδρες και 20,7% στις γυναίκες [15]. Παρά το γεγονός ότι υπήρξε μια σημαντική μείωση στη συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του πνεύμονα στους άνδρες μετά τη κορύφωση της νόσου το 1984, η συχνότητα εμφάνισης στις γυναίκες επιβραδύνθηκε μόνο τα τελευταία χρόνια και παρουσίασε πλατό το 1994 [15, 16]. Παρά το γεγονός ότι το κάπνισμα έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης όλων των ιστολογικών υποτύπων καρκίνου του πνεύμονα στους άνδρες και τις γυναίκες, ο σχετικός κίνδυνος για τους καπνιστές σε σύγκριση με τους μη καπνιστές είναι υψηλότερος για τον ΜΚΠ στις γυναίκες [17]. Ως εκ τούτου, το αυξημένο ποσοστό των γυναικών καπνιστριών, ο μεγαλύτερος κίνδυνος που έχουν οι γυναίκες καπνίστριες να αναπτύξουν ΜΚΠ μαζί με τη μείωση της συνήθειας του καπνίσματος

και συνεπώς της εμφάνισης της νόσου στους άνδρες μπορούν να εξηγήσουν τη μείωση της διαφοράς στη συχνότητα εμφάνισης του ΜΚΠ μεταξύ των δύο φύλων.

Αρκετές μελέτες σε ασθενείς με ΜΚΠ έχουν δείξει μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης στις γυναίκες σε σύγκριση με τους άντρες. Σε μια μελέτη που συνέκρινε την επιβίωση των γυναικών και των ανδρών που έλαβαν θεραπεία για ΜΚΠ τα έτη 1973 - 1986 στο Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου των ΗΠΑ, τόσο η μέση επιβίωση (13 μήνες έναντι 10 μήνες) όσο και η επιβίωση πέραν των 2,5 χρόνων (15% έναντι 6%) ήταν σημαντικά καλύτερες για τις γυναίκες [18]. Παρόμοια ευρήματα προέκυψαν από μια μεγάλη αναδρομική ανάλυση πέντε μελετών που έγινε από την Ομάδα Β μελέτης καρκίνου και λευχαιμιών (Cancer and Leukemia Study Group B) μεταξύ 1972 και 1986, στην οποία οι γυναίκες είχαν καλύτερα ποσοστά ανταπόκρισης στη θεραπεία και καλύτερη επιβίωση [19]. Σε μια αναδρομική μελέτη της SWOG (Southwest Oncology Group) αναφέρεται ότι τα βελτιωμένα ποσοστά επιβίωσης στις γυναίκες αφορούσαν ασθενείς με περιορισμένο στάδιο νόσου [20].

Εν κατακλείδι, η ανάλυση της βάσης δεδομένων SEER μπορεί να επιβεβαιώσει την μειωμένη συχνότητα εμφάνισης του ΜΚΠ τα τελευταία 30 χρόνια. Ο ΜΚΠ αποτελεί πλέον μόνο το 12,95% του συνόλου των νέο-διαγνωσθέντων περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα, μια μείωση που θα μπορούσε να εξηγηθεί από την μείωση της συνήθειας του καπνίσματος, ιδίως στους άνδρες, και από την μεταβολή της σύνθεσης των τσιγάρων, συμπεριλαμβανομένης της μειωμένης σύστασης σε πίσσα και νικοτίνη. Με τη συνεχή αύξηση της συχνότητας εμφάνισης του καρκίνου του πνεύμονα στις γυναίκες, αύξηση που σχετίζεται κυρίως με το κάπνισμα, ο αριθμός των περιπτώσεων ΜΚΠ στις γυναίκες έχει εξισωθεί με αυτόν των ανδρών. Η καλύτερη πρόγνωση της νόσου στις γυναίκες έτσι όπως έχει φανεί μέσα από

αναδρομικές μελέτες αλλά και η συνολική βελτίωση της επιβίωσης τόσο για τους άνδρες όσο και τις γυναίκες κατά τη διάρκεια των τελευταίων 30 ετών είναι πολύ μικρή. Τέλος δεδομένου ότι ο ΜΚΠ συνδέεται στενά με το κάπνισμα μπορεί να συμπεριληφθεί στον κατάλογο των νοσημάτων που μπορούν να προληφθούν.

2.2 Κλινική εικόνα-Διάγνωση-Σταδιοποίηση ΜΚΠ

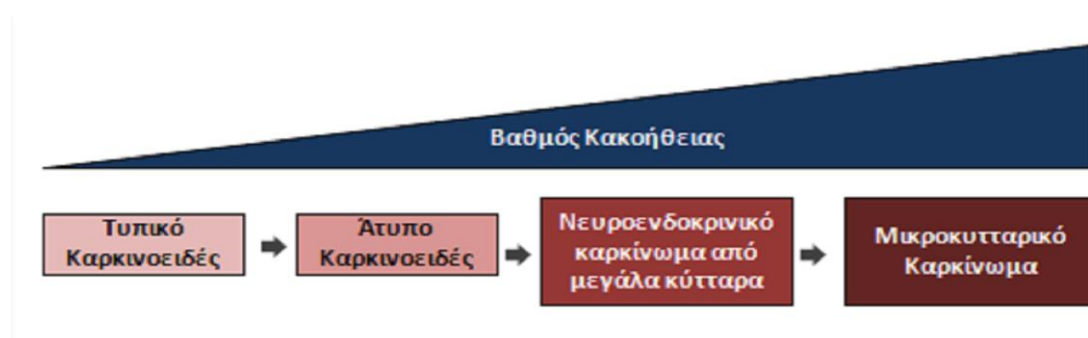
2.2.1 Κλινική εικόνα ΜΚΠ

Οι ασθενείς με ΜΚΠ παρουσιάζουν συχνά εκτεταμένη νόσο κατά τη διάγνωση. Η κλινική εικόνα σχετίζεται είτε με την έκταση της νόσου στο θώρακα ή με τις απομακρυσμένες μεταστάσεις. Ο βήχας και η δύσπνοια αποτελούν τα πιο συχνά συμπτώματα της νόσου (Πίνακας 1) [21].

Πίνακας 1: Συχνότητα συμπτωμάτων στο ΜΚΠ [21]	
ΣΥΜΠΤΩΜΑ Ή ΣΗΜΕΙΟ	Συχνότητα, (%)
<u>Τοπικά</u>	
<i>Βήχας</i>	50
<i>Δύσπνοια</i>	40
<i>Θωρακικό άλγος</i>	35
<i>Αιμόπτυση</i>	20
<i>Βράγχος φωνής</i>	10
<u>Απομακρυσμένα</u>	
Απώλεια σωματικού βάρους	50
Αδυναμία	40
Ανορεξία	30
Παρανεοπλασματικά σύνδρομα	15
Πυρετός	10

Ο ΜΚΠ τείνει να αναπτύσσεται κεντρικά, με πυλαίες μάζα και πυλαία αδеноπάθεια καθώς και λεμφαδένες στο μεσοθωράκιο [22]. Συνήθως, οι ασθενείς παρουσιάζονται κατά τη διάγνωση με συμπτώματα εκτεταμένης μεταστατικής νόσου, όπως απώλεια σωματικού βάρους, ατονία, οστικά άλγη ή νευρολογικά συμπτώματα. Είναι πολύ σπάνιο κατά τη διάγνωση ο ασθενής να παρουσιάζει μόνο μονήρη περιφερική αδеноπάθεια χωρίς κεντρικούς λεμφαδένες. Στη σπάνια αυτή περίπτωση, μια βιοψία δια λεπτής βελόνης μπορεί να μην διαφοροποιήσει επαρκώς τον ΜΚΠ από τυπικό καρκινοειδές ή άτυπο καρκινοειδές ή ακόμα από το υψηλής κακοήθειας νευροενδοκρινικό καρκίνωμα από μεγάλα κύτταρα [23-25] (Εικόνα 1)

Εικόνα 1 : Νευροενδοκρινικά καρκίνωμα του Πνεύμονα



Οι ασθενείς με ΜΚΠ παρουσιάζουν συχνά νευρολογικά ή ενδοκρινικά παρανεοπλασματικά σύνδρομα [26-28]. Οι παρανεοπλασματικές ενδοκρινικές διαταραχές συνοδεύονται από έκτοπη παραγωγή πεπτιδικών ορμονών, και οι παρανεοπλασματικές νευρολογικές επιπλοκές σχετίζονται με αντισώματα που προκαλούν βλάβη στο κεντρικό νευρικό σύστημα (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Παρανεοπλασματικά σύνδρομα στον ΜΚΠ		
Σύνδρομο	% ασθενών	Υπεύθυνη ορμόνη ή αντίσωμα
<u>ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ</u>		
Σύνδρομο απρόσφορης έκκρισης αντιδιουρητικής ορμόνης	15	Αντιδιουρητική ορμόνη (ADH)

(SIADH)		
Έκτοπη παραγωγή ACTH (σύνδρομο Cushing)	2-5	Κορτικοτροπίνη
Ακρομεγαλία	1	Αυξητική ορμόνη
<u>ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ</u>		
Μυασθενικό σύνδρομο Lambert-Eaton (LEMS)	3	Αυτοαντισώματα κατά των διαύλων ασβεστίου
Εγκεφαλομυελίτιδα/Υποξεία αισθητική νευροπάθεια	1	Αντί- Hu
Δευτεροπαθής αμφιβληστροειδοπάθεια από καρκίνο	1	Αντί-Retinal

Υπονατριάμια μπορεί να βρεθεί στο 15% των ασθενών κατά τη διάγνωση [29]. Σε πολλούς από αυτούς τους ασθενείς, η απρόσφορη έκκριση της αντιδιουρητικής ορμόνης (σύνδρομο απρόσφορης έκκρισης αντιδιουρητικής ορμόνης, SIADH), επίσης γνωστή ως αργινίνη-βαζοπρεσίνη, οδηγεί σε κατακράτηση ύδατος με επακόλουθο τη μείωση της συγκέντρωσης του νατρίου στον ορό [30]. Η υπονατριάμια μπορεί επίσης να προκληθεί από τη παραγωγή του κολπικού νατριουρητικού πεπτιδίου από τα κύτταρα του όγκου [30, 31]. Η κλινική εικόνα του SIADH είναι βασικά εκείνη της υπονατριάμιας και οφείλεται στην αθρόα είσοδο ύδατος στα κύτταρα του εγκεφάλου. Οι ασθενείς εμφανίζουν αρχικά κεφαλαλγία, ναυτία, εμέτους και σε σοβαρότερες περιπτώσεις διαταραχή των ψυχοδιανοητικών λειτουργιών, ανησυχία, διέγερση, λήθαργο, επιληπτοειδείς σπασμούς και τελικά κόμα. Εργαστηριακά ευρήματα περιλαμβάνουν την υπο-ωσμωτικότητα του ορού, την υπερ-ωσμωτικότητα των ούρων ($\geq 100 \text{ mmol / kg}$), και μια κανονική προς υψηλή συγκέντρωση νατρίου στα ούρα (40 mmol / L). Το σύνδρομο βελτιώνεται όταν ο όγκος ανταποκρίνεται στη θεραπεία, αν και συχνά χρειάζεται να ληφθούν

επιπρόσθετα μέτρα για την αντιμετώπιση της συμπτωματικής υπονατριάμιας. Πρόσθετα μέτρα όσον αφορά τη θεραπευτική προσπέλαση του SIADH περιλαμβάνουν τον περιορισμό των προσλαμβανομένων υγρών, τη χορήγηση φαρμάκων που αναστέλουν την επίδραση της αντιδιουρητικής ορμόνης στο ουροφόρο σωληνάριο, όπως είναι η δεμεκλοκυκλίνη ενώ σε περίπτωση οξείας συμπτωματικής υπονατριάμιας συνιστάται η χορήγηση υπέρτονου διαλύματος NaCl 3% σε συνδυασμό με διουρητικά της αγκύλης, με τέτοιο ρυθμό ώστε η αύξηση του νατρίου να μην υπερβαίνει το 1,0 - 2,0 mEq/L ανά ώρα [32].

Περίπου 2-5% των ασθενών με ΜΚΠ παρουσιάζουν κλινικά έκδηλο σύνδρομο Cushing κατά τη διάγνωση [33]. Το σύνδρομο οφείλεται στην έκτοπη έκκριση κορτικοτροπίνης (ACTH). Ωστόσο χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι ενώ η κορτικοτροπίνη ανιχνεύεται στο 50% των ασθενών με ΜΚΠ, κλινικά έκδηλο σύνδρομο Cushing σημειώνεται μόνο στο 2-5% των περιπτώσεων αυτών [34]. Οι κλινικές εκδηλώσεις σε περίπτωση έκτοπης υπερέκκρισης ACTH περιλαμβάνουν ατροφία των μυών, μυϊκή αδυναμία, απώλεια σωματικού βάρους, οίδημα, αρτηριακή υπέρταση, ενώ εργαστηριακά ευρήματα είναι η υποκαλιαιμία, η υπεργλυκαιμία, η υποχλωραιμία και η μεταβολική αλκάλωση. Οι κλινικές εκδηλώσεις του συνδρόμου Cushing (πανσεληνοειδές προσωπείο, Buffalo hump, ανακατανομή του λίπους, κυανέρυθρες ραβδώσεις κτλ) συνήθως απουσιάζουν, εκτός από τη περίπτωση ασθενών με παρατεταμένη κλινική πορεία της νόσου [35]. Η έκτοπη υπερέκκριση ACTH προκαλεί ωστόσο υπέρχρωση του δέρματος και θεωρείται ότι το συγκεκριμένο κλινικό εύρημα σε ασθενείς με σύνδρομο Cushing, σχεδόν πάντοτε υποδηλώνει για την ύπαρξη εξω-επινεφριδιακού όγκου. Σε ορισμένες περιπτώσεις εκτός από την ACTH, σε αυξημένες ποσότητες ανευρίσκονται και διάφορα άλλα κλάσματα της προ-οπιομελανοκορτίνης (όπως π.χ. β-LPH, εγκεφαλίνη κ.α.) οπότε και

σημειώνονται πρόσθετες κλινικές εκδηλώσεις όπως νευρολογικά σύνδρομα, διαταραχή των ψυχοδιανοητικών λειτουργιών, ελαττωμένη δραστηριότητα, κατατονία, καχεξία-ανορεξία, μείωση της επιπολής και εν τω βάθει αισθητικότητα .[35] Εκτός από τη θεραπεία του υποκείμενου όγκου, η θεραπεία του συνδρόμου συχνά απαιτεί τη καταστολή της παραγωγής κορτιζόλης με τη χορήγηση μετυραπόνης, μιτοτάνης, αμινογλουτεθιμίδης, οκτρεοτίδης ή κετοκοναζόλης. Η αμινογλουτεθιμίδη, η κετοκοναζόλη και η μιτοτάνη θα πρέπει να συνδυάζονται με υδροκορτιζόνη προκειμένου να αποτραπεί η ανάπτυξη υπολειτουργίας των επινεφριδίων [36].

Το μυασθενικό σύνδρομο Lambert-Eaton (LEMS) είναι μια σπάνια αυτοάνοση διαταραχή που προκαλείται από αντισώματα έναντι των προσυναπτικών τασεοελεγχόμενων διαύλων ασβεστίου στη νευρομυϊκή σύναψη [37]. Η μείωση του ασβεστίου επηρεάζει δευτερευόντως τη δράση της ακετυλοχολίνης και η μειωμένη απελευθέρωση ακετυλοχολίνης στις απολήξεις των κινητικών νεύρων οδηγεί στη κλασική εγγύς μυϊκή αδυναμία [38]. Εκτός από τη μυϊκή αδυναμία, επηρεάζονται συχνά και οι “αυτόματες” λειτουργίες του σώματος, κάτι που μπορεί να προκαλέσει ξηροστομία ή δυσκοιλιότητα ενώ όχι τόσο συχνά εμφανιζόμενα είναι επίσης τα προβλήματα ομιλίας, μάσησης, κατάποσης ή ακόμα και αναπνοής. Η διάγνωση τίθεται με την ανίχνευση των αυτοαντισωμάτων με τη μέθοδο της ραδιοανοσοκατακρήμνισης [39]. Το ηλεκτρομυογράφημα παρουσιάζει τη χαρακτηριστική αύξηση της έντασης των δυναμικών κατόπιν υψηλής συχνότητας διέγερσης των μυών [40].

Η θεραπεία του υποκείμενου ΜΚΠ οδηγεί γενικά σε νευρολογική βελτίωση των ασθενών με το σύνδρομο αυτό ενώ επιπρόσθετα ορισμένοι ασθενείς λαμβάνουν θεραπεία με 3,4-διαμινοπυριδίνη, η οποία βελτιώνει σημαντικά τη μυϊκή ισχύ [41].

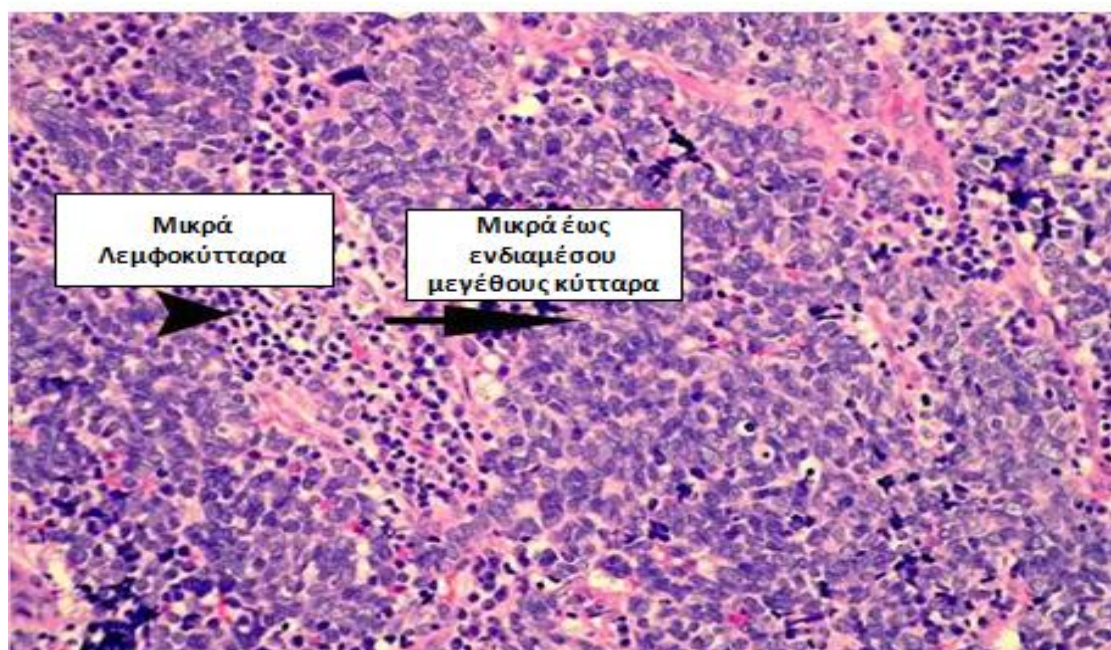
Για τους ασθενείς με σοβαρή μυϊκή αδυναμία, η ενδοφλέβια χορήγηση ανοσοσφαιρίνης ή η πλασμαφαίρεση μπορούν να προσφέρουν βραχυπρόθεσμο όφελος [41]. Για όσους δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία με 3,4-διαμινοπυριδίνη, η πρεδνιζόνη μόνη της ή με αζαθειοπρίνη ή κυκλοσπορίνη μπορούν επίσης να βοηθήσουν σημαντικά στην ανακούφιση από τα συμπτώματα του συνδρόμου [41].

2.2.2 Διάγνωση ΜΚΠ

Η διάγνωση του ΜΚΠ στηρίζεται στην ιστολογική εξέταση υλικού από βρογχοσκόπηση ή στη κυτταρολογική εξέταση δείγματος διαδερμικής ή διαβρογχικής αναρρόφησης με λεπτή βελόνη [42, 43]. Στη βρογχοσκόπηση συνήθως αναδεικνύεται υποβλεννογόνια διήθηση, γεγονός που εξηγεί εν μέρει τη χαμηλή πιθανότητα εύρεσης καρκινικών κυττάρων στο κυτταρολογικό βούρτσισμα ή στα δείγματα πτυέλων.

Με βάση την τελευταία ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας ως ΜΚΠ ορίζεται «ένας κακοήθης επιθηλιακός όγκος που αποτελείται από μικρά κύτταρα με ελάχιστο κυτταρόπλασμα, ασαφές περίγραμμα, λεπτή κοκκιώδη πυρηνική χρωματίνη, και απόντες ή δυσδιάκριτους πυρηνίσκους [44] (εικόνα 2).

Εικόνα 2: Ιστολογική εικόνα ΜΚΠ



Τα κύτταρα είναι στρογγυλά, οβάλ ή ατρακτοειδή, με εμφανή πυρηνική αλλοίωση και μεγάλο αριθμό μιτώσεων [44]. Η ταξινόμηση του ΜΚΠ έχει απλοποιηθεί σε δύο κατηγορίες; στις περισσότερες από το 90% των περιπτώσεων πρόκειται για τον τυπικό ΜΚΠ. Στο υπόλοιπο 10% υπάρχει ένας συνδυασμός ΜΚΠ με οποιονδήποτε από τους υπόλοιπους ιστολογικούς υποτύπους του ΜΜΚΠ. Στις περιπτώσεις αυτές ο ΜΚΠ μπορεί να συνυπάρχει με αδenoκαρκίνωμα, πλακώδες καρκίνωμα, ή καρκίνωμα από μεγάλα κύτταρα [44]. Η προσπάθεια να διαιρεθεί ο ΜΚΠ σε υποτύπους από μικρά κύτταρα, ενδιάμεσα κύτταρα και σε μικτούς υποτύπους από μικρά/ενδιάμεσα κύτταρα δεν έχει οποιαδήποτε κλινική, προγνωστική, ή θεραπευτική αξία και ως εκ τούτου δεν χρησιμοποιείται [45]. Αντιθέτως έχει πολύ μεγάλη σημασία να αναφέρεται στην ιστολογική έκθεση αν ο ΜΚΠ συνδυάζεται με κύτταρα πλακώδους καρκινώματος ή αδenoκαρκινώματος, διότι σε τέτοιες περιπτώσεις, η θεραπεία γίνεται με βάση το μικροκυτταρικό στοιχείο [46].

Μια ανασκόπηση της SEER βάσης δεδομένων ανέδειξε 94% συμφωνία μεταξύ ανεξαρτήτων παθολογοανατόμων αναφοράς και των καταγεγραμμένων ιστολογικών τους διαγνώσεων [47]. Ωστόσο, επειδή το υλικό της βιοψίας από ΜΚΠ είναι ευάλωτο και μπορεί εύκολα να αλλοιωθεί κατά τη διάρκεια της βιοψίας ή της αναρρόφησης με λεπτή βελόνα, η διαφοροποίηση από τον ΜΜΚΠ μπορεί να είναι δύσκολη σε ορισμένες περιπτώσεις. Συχνά χρειάζεται να γίνει διαφορική διάγνωση του ΜΚΠ από τους καρκινοειδείς όγκους. Τα τυπικά καρκινοειδή αποτελούνται από μεμονωμένα ή χαλαρά ομαδοποιημένα ομοιόμορφα μικρά κύτταρα με λιγιστό ροζ κυτταρόπλασμα, με τη χαρακτηριστική μορφή "αλάτι και πιπέρι" της πυρηνικής χρωματίνης, μικρούς δυσδιάκριτους πυρηνίσκους, ενώ απουσιάζουν οι νεκρώσεις και οι αλλοιώσεις του πυρήνα. Αντιθέτως, τα άτυπα καρκινοειδή παρουσιάζουν υπερχρωματικούς αλλοιωμένους πυρήνες κατά συνέπεια, μπορούν να συγχέονται με το ΜΚΠ ιδίως όταν πρόκειται για κυτταρολογική εξέταση δείγματος διαδερμικής ή διαβρογικής αναρρόφησης με λεπτή βελόνη [48, 49] (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Διαγνωστικά κριτήρια Νευροενδοκρινικών καρκινωμάτων του Πνεύμονα				
	Τυπικό Καρκινοειδές	Άτυπο Καρκινοειδές	Νευροενδοκρινικό καρκίνωμα από μεγάλα κύτταρα	Μικροκυτταρικό καρκίνωμα
Βαθμός κακοήθειας	Χαμηλός	Ενδιάμεσος	Υψηλός	Υψηλός
Μορφολογία	Καλής διαφοροποίησης	Καλής διαφοροποίησης	Χαμηλής διαφοροποίησης	Χαμηλής διαφοροποίησης
Μιτώσεις ανά 10 HPFs (High Power Fields)	<2	2-10	>10 (Μέση τιμή, 70)	>10 (Μέση τιμή, 80)
Νεκρώσεις	Καμία	Λίγες-Τοπικές	Εκτεταμένες	Εκτεταμένες

Τα κακοήθη λεμφώματα, ιδιαίτερα εκείνα που αποτελούνται από μικρά, ομοιόμορφα λεμφοκύτταρα μπορούν να συγχέονται με τον ΜΚΠ στη κυτταρολογική εξέταση. Αν και το κυτταρικό πρότυπο των λεμφωμάτων είναι διαφορετικό η εικόνα συχνά μπορεί να είναι παραπλανητική. Η ανοσοϊστοχημική εξέταση μπορεί να είναι χρήσιμη σε αυτές τις περιπτώσεις. Επιθηλιακοί δείκτες, όπως οι κυτταροκερατίνες, είναι παρόντες στο ΜΚΠ και μπορούν να βοηθήσουν στη διαφοροποίηση του από τα λεμφώματα. [35].

Τα νεοπλάσματα από μικρά στρογγυλά κύτταρα, όπως το νευροβλάστωμα, το εμβρυϊκό ραβδομυοσάρκωμα, οι δεσμοπλαστικοί όγκοι από μικρά στρογγυλά κύτταρα, καθώς και οι πρωτογενείς περιφερικοί νευροεξωδερματικοί όγκοι χρειάζονται επίσης συχνά να διαφοροδιαγνωσθούν από τον ΜΚΠ [42]. Συνήθως οι όγκοι αυτοί αφορούν νεαρότερες ηλικίες και το κλινικό ιστορικό σε συνδυασμό με τα ανοσοϊστοχημικά ευρήματα, είναι χρήσιμα στη διαφορική διάγνωση. Κυτταρολογικά, οι όγκοι αυτοί χαρακτηρίζονται από ομάδες ή μεμονωμένα μικρά κύτταρα με υψηλή αναλογία πυρήνα-κυτταροπλάσματος, πυρηνική άλω, και σχηματισμό ροζετών [42].

Τα χαμηλής διαφοροποίησης ακανθοκυτταρικά καρκινώματα όπως και τα μεγαλοκυτταρικά καρκινώματα μπορεί μερικές φορές να είναι δύσκολο να διακριθούν από το ΜΚΠ. Στις περιπτώσεις αυτές, τα κύτταρα μπορεί να είναι μικρά με διάταξη συγκυτίου αλλά ωστόσο η χρωματίνη είναι χονδροκοκκιώδης και το κυτταρόπλασμα είναι πυκνότερο από ότι στο ΜΚΠ. Η έλλειψη της πυρηνικής υπέρχρωσης και η παρουσία δυσκερατωτικών κύτταρων είναι επίσης χρήσιμα διαγνωστικά χαρακτηριστικά υπέρ του πλακώδες καρκίνωματος [46, 50]. Επιπλέον,

νευροενδοκρινικοί δείκτες όπως η χρωμογρανίνη, συναπτοφυσίνη και CD56 μπορεί να είναι χρήσιμοι στη διαφοροποίηση του ΜΚΠ από τον ΜΜΚΠ [50].

2.2.3 Σταδιοποίηση ΜΚΠ

Οι ασθενείς με ΜΚΠ παρουσιάζονται σπάνια με περιορισμένη νόσο, ικανή για χειρουργική εξαίρεση με αποτέλεσμα το κατά TNM (πρωτοπαθής εστία -Tumor, λεμφαδένες-Node, μεταστάσεις-Metastasis) σύστημα σταδιοποίησης να μην χρησιμοποιείται. Η σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα στην 7^η έκδοση του TNM μπορεί να εφαρμοστεί τόσο στον ΜΜΚΠ όσο και στον ΜΚΠ και ίσως σε επίπεδο κλινικών μελετών θα πρέπει να αρχίσει να χρησιμοποιείται αυτό το σύστημα σταδιοποίησης γιατί επιτρέπει πιο ακριβείς εκτιμήσεις της αποτελεσματικότητας μιας θεραπείας. Στη κλινική όμως πράξη αντί αυτού, με βάση τη Veterans Administration Lung Study Group (VALG) σταδιοποίηση, οι ασθενείς κατατάσσονται ως έχοντες είτε περιορισμένο στάδιο νόσου (limited disease; LD) ή εκτεταμένο στάδιο νόσου (extensive disease; ED) [51]. Ο ορισμός της περιορισμένης νόσου ποικίλει, αλλά γενικά περιλαμβάνει ασθενείς των οποίων η νόσος είναι περιορισμένη σε ένα ημιθώρακιο με πυλαίους και μεσοθωρακικούς λεμφαδένες που μπορούν να περιληφθούν μέσα σε ένα ακτινοθεραπευτικό πεδίο. Εκτεταμένη ορίζεται η νόσος που εκτείνεται πέραν αυτών των ορίων [51]. Οι ετερόπλευροι μεσοθωρακικοί και οι ομόπλευροι υπερκλείδιοι λεμφαδένες ταξινομούνται συνήθως ως περιορισμένο στάδιο νόσου ενώ λίγο πιο αμφιλεγόμενη είναι η κατάσταση σε ότι αφορά τους ετερόπλευρους πυλαίους και υπερκλείδιους λεμφαδένες. Περίπου τα 2/3 των ασθενών παρουσιάζονται κατά τη διάγνωση με απομακρυσμένες μεταστάσεις που αφορούν συνήθως τον ετερόπλευρο πνεύμονα, το ήπαρ, τα επινεφρίδια τον εγκέφαλο, τα οστά και τον μυελό των οστών.

Για τη πλήρη σταδιοποίηση της νόσου απαιτείται η λήψη του ιστορικού και η κλινική εξέταση, αξονικές τομογραφίες (Computed Tomography, CT) θώρακος, ήπατος και επινεφριδίων με ενδοφλέβια χορήγηση σκιαγραφικού καθώς και απεικόνιση του εγκεφάλου κατά προτίμηση με μαγνητική τομογραφία ή αξονική τομογραφία με ενδοφλέβια χορήγηση σκιαγραφικού. Παρόλα αυτά, από τη στιγμή που θα διαπιστωθεί ότι ο ασθενής έχει εκτεταμένη νόσο, η περαιτέρω σταδιοποίηση μπορεί να παραληφθεί, με εξαίρεση την απεικόνιση του εγκεφάλου. Εξαιτίας της επιθετικής πορείας της νόσου προτείνεται η σταδιοποίηση να μην καθυστερεί την έναρξη της θεραπείας περισσότερο από μια εβδομάδα [22]. Η βιοψία του μυελού των οστών προτείνεται για τους ασθενείς που έχουν ευρήματα στην αιματολογική τους εικόνα (π.χ. ουδετεροπενία, θρομβοπενία, ή εμπύρηννα ερυθρά αιμοσφαίρια στο περιφερικό τους επίχρισμα) χωρίς άλλη ένδειξη απομακρυσμένων μεταστάσεων [22]. Η διήθηση του μυελού των οστών σαν μοναδικό εύρημα εκτεταμένης νόσου απαντάται σε λιγότερο από 5% των ασθενών [22].

Η ποζιτρονική τομογραφία (Positron emission tomography, PET) μπορεί να βοηθήσει με μεγαλύτερη ακρίβεια στη σταδιοποίηση της νόσου μιας και πρόκειται για νεόπλασμα με υψηλή μεταβολική δραστηριότητα [52, 53]. Περίπου το 19% των ασθενών που έχουν σταδιοποιηθεί ως έχοντες περιορισμένη νόσο μπορεί να βρεθούν ότι έχουν απομακρυσμένες μεταστάσεις και, επομένως, εκτεταμένο στάδιο νόσου με τη χρήση του PET [22]. Αντίθετα, μόνο το 8% των ασθενών με εκτεταμένη νόσο μπορούν να υποσταδιοποιηθούν με τη χρήση του PET σε περιορισμένη νόσο [22]. Η συνδυασμένη ποζιτρονική και αξονική τομογραφία (PET/ CT) υπερέχει του απλού PET [53]. Για τις περισσότερες μεταστατικές εστίες, το PET/ CT είναι ανώτερο της απλής απεικόνισης με CTς ή απλό PET, αλλά υστερεί της μαγνητικής τομογραφίας ή της CT για την απεικόνιση του εγκεφάλου [54]. Αλλαγές στη θεραπευτική

αντιμετώπιση βασιζόμενες στη σταδιοποίηση με PET έχουν καταγραφεί περίπου στο 27% των ασθενών κυρίως λόγω αλλαγών στο σχεδιασμό του πεδίου ακτινοβολίας στο θώρακα ύστερα από καλύτερη απεικόνιση των ενδοθωρακικών θέσεων της νόσου [55, 56]. Πάντως αν και το PET/CT μπορεί να βελτιώσει την ακρίβεια της σταδιοποίησης καλό είναι να γίνεται παθολογοανατομική επιβεβαίωση των βλαβών που εντοπίζονται με PET/CT και οδηγούν σε αύξηση του σταδίου της νόσου [22]. Σε περίπτωση που υπάρχει πλευριτικό υγρό θα πρέπει να παρακεντείται και να γίνεται κυτταρολογική ανάλυση. Αν η θωρακοκέντηση δεν αναδείξει καρκινικά κύτταρα στο πλευριτικό υγρό τότε η θωρακοσκόπηση είναι μια επιλογή για να επιβεβαιώσει ή να αποκλείσει την διήθηση του υπεζωκότα, που είναι σημείο εκτεταμένης νόσου [22].

Η σταδιοποίηση του ΜΚΠ δεν θα πρέπει να γίνεται με βάση μόνο τα συμπτώματα του ασθενή ή τα ευρήματα στις αιματολογικές του εξετάσεις. Χαρακτηριστικά, το σπινθηρογράφημα οστών μπορεί να είναι θετικό στο 30% των ασθενών ακόμα και όταν δεν παρουσιάζουν οστικά άλγη ή αυξημένη αλκαλική φωσφατάση στο αίμα τους. Επίσης, η απεικόνιση του εγκεφάλου μπορεί να εντοπίσει συμμετοχή του κεντρικού νευρικού συστήματος στο 10-15% των περιπτώσεων κατά τη διάγνωση της νόσου και το 30% αυτών των ασθενών μπορεί να είναι ασυμπτωματικοί [22]. Η έγκαιρη αντιμετώπιση των εγκεφαλικών μεταστάσεων δύναται να ελαττώσει τη χρόνια νευρολογική νοσηρότητα και να βελτιώσει τη ποιότητα της ζωής των ασθενών. Οι προγνωστικοί παράγοντες του ΜΚΠ απεικονίζονται στον πίνακα 4 και 5 [20, 57, 58].

Πίνακας 4: Προγνωστικοί παράγοντες του ΜΚΠ	
<i>Ευνοϊκοί παράγοντες</i>	<i>Δυσμενείς παράγοντες</i>
Περιορισμένο στάδιο νόσου	Εκτεταμένο στάδιο νόσου
Καλή γενική κατάσταση (PS, Performance status=0-2)	Επηρεασμένη γενική κατάσταση (PS, Performance status =3-4)
Φυσιολογική γαλακτική αφυδρογονάση (LDH, lactate dehydrogenase)	Αυξημένη γαλακτική αφυδρογονάση

Πίνακας 5: Προγνωστικοί παράγοντες του εκτεταμένου σταδίου νόσου	
<i>Ευνοϊκοί παράγοντες</i>	<i>Δυσμενείς παράγοντες</i>
Νεαρή ηλικία	Μεγάλη ηλικία
Καλή γενική κατάσταση (PS=0-2)	Επηρεασμένη γενική κατάσταση (PS=3-4)
Φυσιολογική LDH	Αυξημένη LDH
Φυσιολογικά επίπεδα κρεατινίνης	Αυξημένα επίπεδα κρεατινίνης
Μονήρης μεταστατική εστία	Πολλές μεταστατικές εστίες

2.3 Θεραπεία ΜΚΠ

2.3.1 1ης γραμμής Χημειοθεραπεία

Περίπου το ένα τρίτο των ασθενών έχουν περιορισμένη νόσο κατά τη διάγνωση ενώ περίπου το 80-90% αυτών ανταποκρίνεται στη συνδυασμένη χημειοθεραπεία με ή χωρίς ακτινοβολία στο θώρακα [59, 60]. Ο ΜΚΠ είναι μια συστηματική νόσος με τάση για πρόωρη αιματογενή διασπορά και σχεδόν σπάνια μπορεί να θεραπευτεί με χειρουργική εξαίρεση. Συνεπώς η χημειοθεραπεία είναι ο κύριος τρόπος για την αντιμετώπιση της νόσου [61]. Για τους ασθενείς με εκτεταμένο στάδιο νόσου, η χημειοθεραπεία είναι η μοναδική συνιστώμενη αντιμετώπιση ενώ η ακτινοβολία μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιλεκτικά προκειμένου να ανακουφίσει τον ασθενή από

τα συμπτώματα της νόσου. Ο συνδυασμός ετοποσίδης και σισπλατίνης είναι η καθιερωμένη συνδυασμένη χημειοθεραπεία 1^{ης} γραμμής και για τα δύο στάδια της νόσου [61, 62]. Αυτός ο συνδυασμός έχει αντικαταστήσει παλαιότερους συνδυασμούς με αλκυλιωτικούς παράγοντες ή ανθρακυκλίνες λόγω της ανωτερότητάς του σε ότι αφορά τόσο την αποτελεσματικότητα όσο και τη τοξικότητα για το περιορισμένο στάδιο της νόσου [63]. Στη κλινική πράξη η καρβοπλατίνη συχνά αντικαθιστά τη πλατίνη προκειμένου να αποφευχθούν οι ανεπιθύμητες ενέργειες της τελευταίας όπως είναι η ναυτία, η νευροπάθεια ή η νεφροπάθεια, αν και η καρβοπλατίνη έχει μεγαλύτερο κίνδυνο μυελοκαταστολής [64]. Από μικρές τυχαιοποιημένες μελέτες έχει φανεί παρόμοια αποτελεσματικότητα ανάμεσα στη σισπλατίνη και τη καρβοπλατίνη για τον ΜΚΠ [65, 66]. Πρόσφατα μια μεταανάλυση τεσσάρων τυχαιοποιημένων μελετών συνέκρινε τους συνδυασμούς με πλατίνη έναντι των συνδυασμών με καρβοπλατίνη στον ΜΚΠ [67]. Από τους 663 ασθενείς που συμπεριελήφθησαν στη μεταανάλυση, το 32% είχε περιορισμένο στάδιο και το 68% εκτεταμένο στάδιο νόσου. Δεν ανευρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα ποσοστά ανταπόκρισης (67% έναντι 66%), στο διάστημα ελεύθερο νόσου (5,5 έναντι 5,3 μηνών) ή στην συνολική επιβίωση (9,6 έναντι 9,4 μηνών) μεταξύ των ασθενών που έλαβαν συνδυασμούς με πλατίνη ή καρβοπλατίνη αντιστοίχως, ενισχύοντας την αντίληψη για ισοδυναμία των δύο φαρμάκων [67].

Πολλοί άλλοι συνδυασμοί έχουν επίσης εκτιμηθεί κυρίως για την εκτεταμένη νόσο χωρίς όμως να προσφέρουν σημαντικό όφελος σε σύγκριση με το καθιερωμένο σχήμα πλατίνης-ετοποσίδης. Ο συνδυασμός της σισπλατίνης με την ιρινοτεκάνη είναι αυτός με τα πιο ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Αρχικά, μια μικρή μελέτη φάσης III, που έλαβε χώρα στην Ιαπωνία, έδειξε ότι ασθενείς με εκτεταμένη νόσο που έλαβαν θεραπεία με ιρινοτεκάνη και σισπλατίνη είχαν μια μέση επιβίωση που έφτανε τους

12,8 μήνες σε σύγκριση με 9,4 μήνες για τους ασθενείς που έλαβαν τον κλασσικό συνδυασμό με ετοποσίδη και σισπλατίνη ($p=0,002$) [68]. Το διαιτητικό ποσοστό επιβίωσης έφτανε το 19,5% για το συνδυασμό ιρινοτεκάνη-σισπλατίνη έναντι 5,2% για την ετοποσίδη μαζί με τη σισπλατίνη [68]. Παρά τα εντυπωσιακά αυτά αποτελέσματα και τον αρχικό ενθουσιασμό, δυο μεγαλύτερες μελέτες φάσης III που ακολούθησαν στις Ηνωμένες Πολιτείες, απέτυχαν να επαληθεύσουν την ανωτερότητα του συνδυασμού ιρινοτεκάνη-σισπλατίνη έναντι ετοποσίδης-σισπλατίνης σε ότι αφορά την ανταπόκριση ή την ολική επιβίωση [69, 70]. Μια τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης II σε 70 ασθενείς συνέκρινε τον συνδυασμό καρβοπλατίνη-ιρινοτεκάνη με τον συνδυασμό καρβοπλατίνη-ετοποσίδη και έδειξε μια μικρή βελτίωση στο διάστημα ελεύθερο νόσου για το συνδυασμό με την ιρινοτεκάνη [71]. Μια τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III σε 220 ασθενείς ανέδειξε ότι η μέση συνολική επιβίωση ήταν ελαφρώς βελτιωμένη με τον συνδυασμό ιρινοτεκάνη-καρβοπλατίνη συγκριτικά με τον συνδυασμό καρβοπλατίνη-ετοποσίδη (από του στόματος χορήγηση) (8,5 έναντι 7,1 μηνών, $p=0,04$) [72]. Σε μια επίσης πρόσφατη μεταανάλυση φάνηκε βελτίωση στο διάστημα ελεύθερο νόσου και στη συνολική επιβίωση με την ιρινοτεκάνη μαζί με ανάλογα πλατίνης σε σύγκριση με την ετοποσίδη και τα ανάλογα πλατίνης [73].

Παρόλα τα παραπάνω αποτελέσματα, αυτό το όφελος στην επιβίωση είναι μικρό και λαμβάνοντας πάντα υπόψη τη τοξικότητα των συνδυασμών με ιρινοτεκάνη, ο συνδυασμός ετοποσίδης με ανάλογα πλατίνης παραμένει η πρώτη επιλογή για τους ασθενείς με ΜΚΠ ανεξάρτητα από το στάδιο της νόσου [22].

Για τους ασθενείς με εκτεταμένη νόσο, ποσοστά ανταπόκρισης που φτάνουν το 60-70% είναι δυνατόν να επιτευχθούν με τη συνδυασμένη χημειοθεραπεία [74]. Παρόλα αυτά, η μέση επιβίωση αγγίζει μόνο τους 9-11 μήνες και το διαιτητικό ποσοστό επιβίωσης είναι λιγότερο από 5% [75]. Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει προκειμένου να

βελτιωθούν τα αποτελέσματα για τους ασθενείς με εκτεταμένο ΜΚΠ, όπως για παράδειγμα η προσθήκη ενός τρίτου παράγοντα στο κλασικό διπλό σχήμα πλατινης-ετοποσιδης. Σε δύο μελέτες, η προσθήκη της ιφωσφαμίδης (ή κυκλοφωσφαμίδης με μια ανθρακυκλίνη) στο σχήμα πλατίνη-ετοποσίδη βελτίωσε ελαφρώς την επιβίωση για τους ασθενείς με εκτεταμένη νόσο [76, 77]. Παρόλα αυτά, η τακτική αυτή έχει σχεδόν εγκαταλειφτεί λόγω της σημαντικής τοξικότητας [78]. Το ίδιο συνέβη και όταν η πακλιταξέλη προστέθηκε στο σχήμα της πλατίνης ή καρβοπλατίνης με ετοποσίδη. Ένα μικρό όφελος φάνηκε σε μια μελέτη φάσης II που δεν επιβεβαιώθηκε όμως σε μελέτη φάσης III που ακολούθησε, ενώ η τοξικότητα ήταν πολύ σημαντική [79]. Από την άλλη μεριά, η θεραπεία συντήρησης πέραν από τους 4-6 κύκλους καθιερωμένης θεραπείας μπορεί να παρατείνει ελάχιστα τη διάρκεια της ανταπόκρισης χωρίς όμως βελτίωση στην επιβίωση και με μεγαλύτερο κίνδυνο συσσωρευμένης τοξικότητας [80].

Η ανικανότητα εξολόθρευσης των υπολειπόμενων καρκινικών κυττάρων πάρα την αρχική χημειοευαισθησία της νόσου, υποδηλώνει τη παρουσία καρκινικών βλαστοκυττάρων (stem cells), τα οποία είναι ανθεκτικά στη χημειοθεραπεία. Διαδοχικά σχήματα χημειοθεραπείας που έχουν σαν στόχο την έκθεση του όγκου σε όσο το δυνατόν περισσότερα φάρμακα κατά τη θεραπεία 1^{ης} γραμμής, έχουν δοκιμαστεί προκειμένου να αποφευχθεί ή να καθυστερήσει η ανάπτυξη αντίστασης, χωρίς όμως να έχει φανεί το όφελος αυτής της προσέγγισης μέσα από τυχαιοποιημένες μελέτες [81-83]. Επίσης πολύ-σχήματα σε κυκλική εβδομαδιαία χορήγηση έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί προκειμένου να αυξηθεί η ένταση της δόσης. Τα πρώιμα αποτελέσματα μιας μελέτης φάσης II ήταν ενθαρρυντικά [84], παρόλα αυτά από τυχαιοποιημένες μελέτες δεν φάνηκε όφελος στην επιβίωση, ενώ

αυξημένη θνησιμότητα σχετιζόμενη με τη θεραπεία παρατηρήθηκε με την εφαρμογή αυτών των σχημάτων [85, 86].

Ο ρόλος της μεγα-θεραπείας για τον ΜΚΠ παραμένει υπό διερεύνηση. Υψηλότερα ποσοστά πλήρων και μερικών ανταποκρίσεων και ελαφρώς μεγαλύτερα διαστήματα μέσης επιβίωσης έχουν παρατηρηθεί για τους ασθενείς που έλαβαν μεγα-θεραπεία σε σύγκριση με αυτούς που υποβλήθηκαν σε συμβατικές δόσεις της ίδιας χημειοθεραπείας [87]. Τα αποτελέσματα αυτά όμως δεν επαληθεύτηκαν μέσα από τυχαιοποιημένες μελέτες φάσης III [88, 89]. Μια μεταανάλυση που συνέκρινε τις κλασικές δόσεις έναντι μεγα-θεραπείας για τα σχήματα κυκλοφωσφαμίδη-αδριαμυκίνη-βινκριστίνη και ετοποσιδη-σισπλατίνη διαπίστωσε ότι η μεγα-θεραπεία προσέφερε ένα πολύ μικρό και κλινικά ασήμαντο όφελος στην επιβίωση για τον εκτεταμένο ΜΚΠ [90].

Επίσης το πιθανό όφελος από τους αντι-αγγειογενετικούς παράγοντες έχει αρχίσει να διερευνάται για τον ΜΚΠ. Για το εκτεταμένο στάδιο νόσου, έχουν προκύψει ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε ότι αφορά τα ποσοστά ανταπόκρισης αλλά και την επιβίωση από μελέτες φάσης II με πλατινουχους συνδυασμούς μαζί με μπεβασιζουμάμπη (Bevacizumab) [91]. Τυχαιοποιημένες μελέτες φάσης III βρίσκονται σε εξέλιξη προκειμένου να επιβεβαιώσουν τα αποτελέσματα αυτά.

Συνολικά μπορούμε να καταλήξουμε με σχετική ασφάλεια στο συμπέρασμα ότι οι μέχρι τώρα προσπάθειες να βελτιώσουμε την έκβαση των ασθενών με ΜΚΠ με σχήματα ή τρόπους χορήγησης διαφορετικούς από τη καθιερωμένη συνδυασμένη θεραπεία με ετοποσιδη και ανάλογα πλατίνης έχουν αποτύχει και περαιτέρω προσπάθειες χρειάζονται προκειμένου να προχωρήσουμε ένα βήμα εμπρός και να προσφέρουμε στους ασθενείς μας αισιοδοξία για το μέλλον [92].

2.3.2 Ηλικιωμένοι ασθενείς

Η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα αυξάνει όσο αυξάνει η ηλικία. Αν και η μέση ηλικία διάγνωσης της νόσου είναι τα εβδομήντα χρόνια, οι ηλικιωμένοι ασθενείς συνήθως υπο-αντιπροσωπεύονται στις κλινικές μελέτες [93]. Συνήθως, η χρονολογική ηλικία σχετίζεται αντίστροφα με την ανοχή της θεραπείας, παρόλα αυτά η βιολογική ηλικία και η λειτουργικότητα του κάθε ασθενή ξεχωριστά θα πρέπει να καθορίζουν την επιλογή του θεραπευτικού σχήματος. Η ηλικιωμένοι ασθενείς που είναι λειτουργικοί με βάση τη γηριατρική αξιολόγηση θα πρέπει να λαμβάνουν συνδυασμένη χημειοθεραπεία 1^{ης} γραμμής όπως και οι νεότεροι ασθενείς, με πιο στενή όμως παρακολούθηση γιατί ο κίνδυνος ανεπιθύμητων ενεργειών και κυρίως μυελοκαταστολής ή έκπτωσης της λειτουργίας άλλων οργάνων είναι μεγαλύτερος για τις ηλικίες άνω των εβδομήντα ετών. Συνολικά οι ηλικιωμένοι ασθενείς έχουν παρόμοια πρόγνωση όπως και οι νεότεροι ασθενείς με το ίδιο στάδιο νόσου. Τυχαίοποιημένες μελέτες έχουν δείξει ότι λιγότερο ισχυρές θεραπείες, όπως η μονοθεραπεία με ετοποσίδη είναι κατώτερες της κλασσικής συνδυασμένης χημειοθεραπείας για τους ηλικιωμένους ασθενείς που είναι σε καλή γενική κατάσταση (PS 0-2) [94, 95]. Πολλαπλές άλλες στρατηγικές έχουν διερευνηθεί για τους ηλικιωμένους ασθενείς με ΜΚΠ [66, 96-98]. Η χρήση τεσσάρων χορηγήσεων του συνδυασμού καρβοπλατίνης/ετοποσίδης φαίνεται να έχει καλά αποτελέσματα γιατί ο υπολογισμός των δόσεων της καρβοπλατίνης με τη μέθοδο της «περιοχής κάτω από την καμπύλη» (Area-Under-The-Curve, AUC) λαμβάνει υπόψη την έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας στους ασθενείς αυτούς [98]. Επίσης η τακτική της χορήγησης πλήρων αλλά λιγότερων δόσεων χημειοθεραπείας έχει διερευνηθεί στους ηλικιωμένους ασθενείς και τα αποτελέσματα με μόνο δυο κύκλους χημειοθεραπείας

φαίνεται να είναι ικανοποιητικά αν και δεν έχουν συγκριθεί απευθείας με αυτά της καθιερωμένης θεραπείας του ΜΚΠ [99].

2.3.3 2ης γραμμής Χημειοθεραπεία

Αν και ο ΜΚΠ είναι ιδιαίτερα χημειοευαίσθητη νόσος με πολύ καλή ανταπόκριση στην αρχική χημειοθεραπεία, τελικά οι ασθενείς υποτροπιάζουν και η νόσος τους γίνεται χημειοανθεκτική [100, 101]. Οι ασθενείς αυτοί έχουν μια μέση επιβίωση μόνο 4-5 μηνών ακόμα και με τη χορήγηση περαιτέρω χημειοθεραπείας. Η χημειοθεραπεία 2^{ης} γραμμής προσφέρει σημαντική ανακούφιση από τα συμπτώματα σε αρκετούς ασθενείς. Η πιθανότητα ανταπόκρισης εξαρτάται από το διάστημα που έχει μεσολαβήσει από το τέλος της χημειοθεραπείας 1^{ης} γραμμής έως την υποτροπή. Αν το διάστημα αυτό είναι λιγότερο από τρεις μήνες (ανθεκτική νόσος) η πιθανότητα ανταπόκρισης σε περαιτέρω χημειοθεραπεία είναι πολύ μικρή (<10%). Αν έχουν μεσολαβήσει περισσότεροι από τρεις μήνες από το τέλος της χημειοθεραπείας 1^{ης} γραμμής έως την υποτροπή τότε η νόσος θεωρείται ευαίσθητη και τα αναμενόμενα ποσοστά ανταπόκρισης σε περαιτέρω χημειοθεραπεία φτάνουν το 25% [22].

Συνήθως η χημειοθεραπεία 2^{ης} γραμμής είναι μονοθεραπεία. Με βάση τα αποτελέσματα από μελέτες φάσης II, φάρμακα που έχουν δραστηριότητα στη φάση αυτή της νόσου είναι η πακλιταξέλη, η δοσιταξέλη, η τοποτεκάνη, η ιρινοτεκάνη, η βινορελμπίνη, η γεμισιταμπίνη, η ιφωσφαμίδη, η τεμοζολαμίδη και η ετοποσίδη (από του στόματος χορήγηση) [35, 102-107]. Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι η τεμοζολαμίδη μπορεί να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική σε ασθενείς με ΜΚΠ, ιδίως αν έχουν εγκεφαλικές μεταστάσεις και μεθυλιωμένη την μεθυλγουανίνη- DNA-μεθυλτρανσφεράση (MGMT) [102].

Μια τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III συνέκρινε τη μονοθεραπεία με ενδοφλέβια τοποτεκάνη με τη συνδυασμένη χημειοθεραπεία με κυκλοφωσφαμίδη-αδριαμυκίνη-βινκριστίνη. Και τα δυο σκέλη είχαν παρόμοια ποσοστά ανταπόκρισης και παρόμοια επιβίωση αλλά η ενδοφλέβια τοποτεκάνη είχε σαφώς λιγότερη τοξικότητα [108]. Σε μια άλλη μελέτη φάσης III η τοποτεκάνη δια του στόματος βελτίωσε τη συνολική επιβίωση συγκρινόμενη με τη βέλτιστη υποστηρικτική φροντίδα (26 έναντι 14 εβδομάδων) [109]. Η μονοθεραπεία με τοποτεκάνη είναι ενδεδειγμένη από τον FDA (Food and Drug Administration) θεραπεία για ασθενείς με ΜΚΠ που έχουν ανταποκριθεί στην αρχική χημειοθεραπεία αλλά παρουσιάζουν υποτροπή μετά από 3 έως και 6 μήνες. Η τοποτεκάνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε από το στόμα είτε ενδοφλέβια, γιατί τόσο η αποτελεσματικότητα όσο και η τοξικότητα είναι παρόμοιες και με τους δυο τρόπους χορήγησης του φαρμάκου [103, 107, 108, 110]. Το καθιερωμένο σχήμα $1,5\text{mg}/\text{m}^2$ της ενδοφλέβιας τοποτεκάνης για 5 ημέρες έχει παρατηρηθεί ότι είναι τοξικό και μελέτες έχουν δείξει ότι λιγότερο ισχυρά σχήματα μπορεί να είναι το ίδιο αποτελεσματικά με λιγότερη τοξικότητα [111]. Τα αποτελέσματα σχετικά με την εβδομαδιαία χορήγηση τοποτεκάνης είναι αντικρουόμενα και η προσέγγιση αυτή χρήζει περισσότερης έρευνας [107, 112].

Πρόσφατα δεδομένα από μελέτες φάσης II δείχνουν ότι η αμρουμπικίνη, μια πειραματική ανθρακυκλίνη, έχει σημαντική δράση σε ασθενείς με ανθεκτικό ΜΚΠ [113-115]. Παρόλα αυτά τοξικότητες βαθμού 3-4 και κυρίως ουδετεροπενία είναι συχνές με αυτό το φάρμακο [116]. Μια τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης II έχει καταλήξει στο συμπέρασμα ότι η αμρουμπικίνη μπορεί να είναι πιο δραστική από τη τοποτεκάνη σαν θεραπεία 2^{ης} γραμμής σε ασθενείς με ΜΚΠ που έχουν υποτροπιάσει μετά από την θεραπεία πρώτης γραμμής με ποσοστά ανταπόκρισης 44% και 15% αντιστοίχως ($p=0,02$) [117].

Η βέλτιστη διάρκεια της θεραπείας 2^{ης} γραμμής δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, αν και είναι συνήθως μικρή ενώ οι ασθενείς συχνά διακόπτουν τη θεραπεία λόγω τοξικότητας ακόμα και να έχουν μερική ανταπόκριση. Γενικά προτείνεται η χημειοθεραπεία 2^{ης} γραμμής να συνεχίζεται έως δυο κύκλους πέραν της βέλτιστης ανταπόκρισης ή μέχρι προόδου νόσου ή ανάπτυξης μη ανεκτής τοξικότητας [22].

2.3.4 Ακτινοθεραπεία

2.3.4.1 Ακτινοθεραπεία στον θώρακα

Για το περιορισμένο στάδιο του ΜΚΠ η ακτινοθεραπεία θώρακος πρέπει να ξεκινά με τον πρώτο ή δεύτερο κύκλο χημειοθεραπείας, μιας και αυτός ο τρόπος χορήγησης έχει αποδειχτεί ότι είναι πιο αποτελεσματικός σε σύγκριση με τη χορήγηση της ακτινοθεραπείας μετά το πέρας της συστηματικής χημειοθεραπείας [35].

Η λιγότερο εξελιγμένη τεχνολογία για την ακτινοβολία του θώρακος στο ΜΚΠ είναι η CT-σχεδιασμένη τρισδιάστατη (three-dimensional conformal radiation therapy, 3DCRT) σύμμορφη ακτινοθεραπεία, ενώ πιο εξελιγμένες τεχνικές δύναται επίσης να χρησιμοποιηθούν (π.χ. τετραδιάστατη, four-dimensional 4DCRT). Το πεδίο της ακτινοβολίας καθορίζεται από τα ευρήματα του PET/CT μετά τη έναρξη της χημειοθεραπείας αν και πάντα θα πρέπει να εκτιμούνται και οι απεικονίσεις κατά τη διάγνωση της νόσου και οι προσβεβλημένοι περιοχικοί λεμφαδένες θα πρέπει να περιλαμβάνονται στο πεδίο της ακτινοβολήσης [118, 119].

Με βάση τα αποτελέσματα μιας τυχαιοποιημένης μελέτης, η προσθήκη της διαδοχικής θωρακικής ακτινοβολίας μπορεί να εφαρμοστεί σε επιλεγμένους ασθενείς με εκτεταμένο στάδιο αλλά μικρό φορτίο νόσου που έχουν πλήρη ή σχεδόν πλήρη ανταπόκριση μετά από την αρχική χημειοθεραπεία. Στη μελέτη αυτή οι ασθενείς που είχαν πλήρη ανταπόκριση στις απομακρυσμένες τους μεταστάσεις μετά από τρεις

κύκλους χημειοθεραπείας με πλατίνη και ετοποσίδη, τυχαιοποιήθηκαν είτε να συνεχίσουν τη χημειοθεραπεία είτε να λάβουν επιταχυνόμενη υπερκλασματοποιημένη ακτινοθεραπεία σε συνδυασμό με καρβοπλατίνη και ετοποσίδη. Οι ερευνητές βρήκαν ότι η προσθήκη της ακτινοβολίας βελτίωσε σημαντικά την επιβίωση των ασθενών (17 έναντι 11 μηνών) [120].

2.3.4.2 Προφυλακτική ακτινοθεραπεία εγκεφάλου

Οι ενδοκρανιακές μεταστάσεις ανευρίσκονται σε περισσότερο από το 50% των ασθενών με ΜΚΠ. Τυχαιοποιημένες μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγηση προφυλακτικής ακτινοθεραπείας εγκεφάλου (Prophylactic Cranial Irradiation, PCI) είναι αποτελεσματική και μειώνει τη πιθανότητα εμφάνισης εγκεφαλικών μεταστάσεων χωρίς όμως να προσφέρει όφελος στην επιβίωση [121]. Μια μεταανάλυση όλων των τυχαιοποιημένων μελετών PCI ανέδειξε 5,4% μείωση της 3-ετούς πιθανότητας εμφάνισης εγκεφαλικών μεταστάσεων σε ασθενείς που έλαβαν PCI; από 15,3% στην ομάδα ελέγχου στο 20,7% στην ομάδα που έλαβε PCI [122]. Αν και ο αριθμός των ασθενών με εκτεταμένο στάδιο νόσου ήταν μικρός σε αυτή τη μεταανάλυση, το όφελος ήταν παρόμοιο και για τα δυο στάδια της νόσου. Μια άλλη μελέτη της EORTC συνέκρινε την εφαρμογή PCI έναντι της μη χορήγησης PCI σε 286 ασθενείς με εκτεταμένο στάδιο νόσου, των οποίων όμως η νόσος είχε ανταποκριθεί στην αρχική χημειοθεραπεία. Η PCI μείωσε τις εγκεφαλικές μεταστάσεις (14,6% έναντι 40,4%) και αύξησε το μονοετές ποσοστό επιβίωσης (27,1% έναντι 13,3%) στους ασθενείς που έλαβαν PCI έναντι της ομάδας ελέγχου [123]. Έτσι η PCI προτείνεται για τους ασθενείς με περιορισμένο αλλά και με εκτεταμένο στάδιο νόσου και πλήρη ή μερική ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία ¹NS γραμμής [123, 124]

2.4 Φαρμακογενετική ανάλυση στο ΜΚΠ-Πιθανοί βιοδείκτες- Συσχέτιση με θεραπεία ΜΚΠ-Στόχοι της διατριβής

2.4.1 Ο ρόλος των γονιδίων *ERCC1* και *BRCA1*

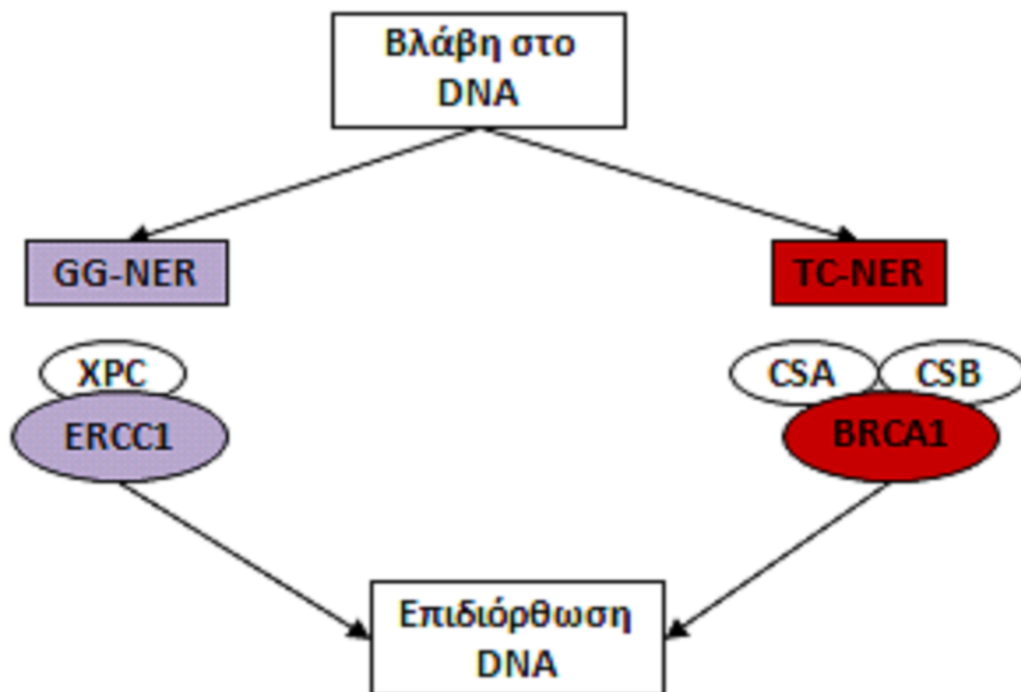
Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται ευρέως στη θεραπεία του ΜΚΠ, όπως η σισπλατίνη και η καρβοπλατίνη, προκαλούν βλάβες στο DNA που αν το κύτταρο αδυνατεί να επιδιορθώσει αναπόφευκτα οδηγείται στον κυτταρικό θάνατο. Παρόμοιοι μηχανισμοί αντίστασης έχουν περιγραφεί για τα δυο αυτά ανάλογα της πλατίνης. Ένας από τους κύριους παράγοντες καρκινογένεσης είναι η αδυναμία του κυττάρου να επιδιορθώσει βλάβες στο γενετικό του υλικό, ενώ ένα κύτταρο με ακέραιους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA μπορεί να αντισταθεί στη δράση της χημειοθεραπείας. Η ικανότητα των κυττάρων να επιδιορθώνουν τις βλάβες του γενετικού τους υλικού εξαρτάται από πολύπλοκους μηχανισμούς που αλληλεπιδρούν με τους μηχανισμούς ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου καθώς και αυτούς που ελέγχουν τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

Ένας από τους πλέον διαδεδομένους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς που χρησιμοποιεί ο οργανισμός για να επιδιορθώσει βλάβες από τη πλατίνη, είναι ο μηχανισμός της εκτομής νουκλεοτιδίων (Nucleotide Excision Repair, NER). Πρόκειται για ένα μονοπάτι που λειτουργεί σε διαδοχικά στάδια: 1) αναγνώριση της βλάβης, 2) ξεδίπλωμα της διπλής έλικας του DNA γύρω από τη βλάβη, 3) εκτομή της λανθασμένης περιοχής και 4) γέμισμα του κενού. Αποτελείται από δυο υπό-μονοπάτια, το λεγόμενο Global Genome NER (GG-NER) και το transcription coupled NER (TC-NER), τα οποία χρησιμοποιούν ένα κοινό βασικό μηχανισμό επιδιόρθωσης και διαφέρουν στον τρόπο με τον οποίο αναγνωρίζονται οι βλάβες και στις αλληλουχίες που τελικά στοχεύουν. Συγκεκριμένα, το TC-NER αναγνωρίζει περιοχές

που βρίσκονται σε ενεργό μεταγραφή ενώ το GG-NER μπορεί να αναγνωρίζει και να επιδιορθώνει όλο το γονιδίωμα [125].

Το γονίδιο *ERCC1* (Excision repair cross complementing gene 1) κωδικοποιεί ένα ένζυμο που κατέχει κεντρικό ρόλο στο GG-NER [126]. Μαζί με πρωτεΐνες της ομάδας xeroderma pigmentosum (XP) και ειδικότερα τη XPF κόβει το 5' άκρο της λανθασμένης περιοχής της έλικας του DNA [127] (Εικόνα 3).

Εικόνα 3



Κόρια υπό-μονοπάτια του μηχανισμού εκτομής νουκλεοτιδίων (Nucleotide Excision Repair, NER)

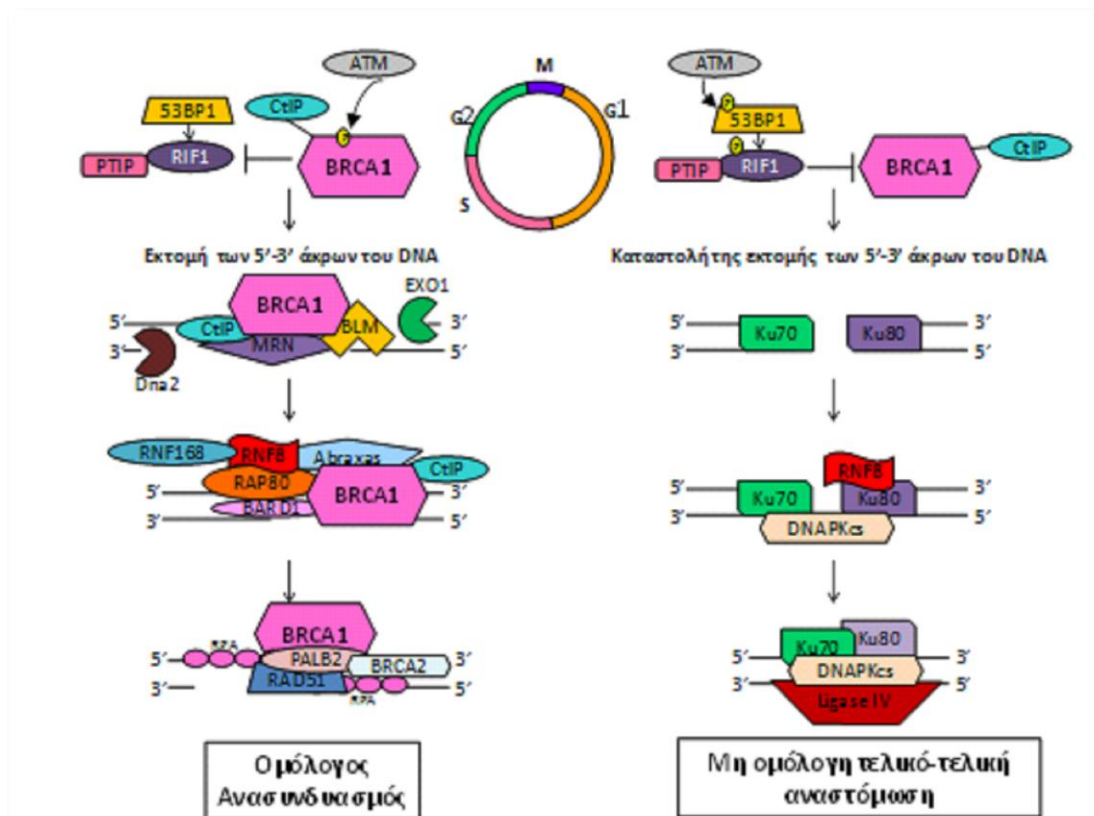
Η πλειοψηφία των μελετών στον ΜΜΚΠ σχετικά με την έκφραση του γονιδίου *ERCC1* ή της πρωτεΐνης ERCC1 και τη θεραπεία με πλατίνη, έχουν σαν κοινό εύρημα ότι τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης αυτού του ενζύμου σχετίζονται με καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία με πλατίνη [128-130]. Μια μετα-ανάλυση που συμπεριέλαβε τα αποτελέσματα από 12 επιλεγμένες μελέτες επιβεβαίωσε τον πιθανό προβλεπτικό ρόλο του ενζύμου ERCC1 είτε σε επίπεδο mRNA είτε σε επίπεδο πρωτεΐνης, αφού ασθενείς με ΜΜΚΠ και αρνητική ή χαμηλή έκφραση του ενζύμου είχαν καλύτερα ποσοστά ανταπόκρισης στη θεραπεία με πλατίνη και μεγαλύτερη μέση επιβίωση. Στη συγκεκριμένη μετα-ανάλυση φάνηκε οι η ανοσοϊστοχημεία υπερείχε ελαφρώς από την mRNA έκφραση σαν τεχνική ανίχνευσης ενώ ο

προβλεπτικός ρόλος του ενζύμου φάνηκε να είναι ελαφρώς υψηλότερος στον Ασιατικό πληθυσμό [131].

Από την άλλη μεριά *in vitro* μελέτες έχουν αναδείξει ότι το TC-NER μονοπάτι, στο οποίο κύριο ρόλο κατέχει το γονίδιο *BRCA1* (breast cancer susceptibility gene 1), έχει σημαντικότερο προβλεπτικό ρόλο στην ανταπόκριση στη θεραπεία με ανάλογα της πλατίνης [132]. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, αφού το σύστημα GG-NER φαίνεται να έχει μικρή δυνατότητα αναγνώρισης και συγκόλλησης σε DNA βλάβες προκαλούμενες από τη πλατίνη ενώ το TC-NER μονοπάτι στοχεύει ειδικά τις βλάβες από τη πλατίνη [132]. Μεταβολές στην έκφραση του *BRCA1* τροποποιούν τη δράση του συστήματος TC-NER και συνεπώς μπορούν να προκαλέσουν αντίσταση στη χημειοθεραπεία ή στην ακτινοβολία [133, 134].

Το γονίδιο *BRCA1* συμμετέχει επίσης και σε άλλα συστήματα επιδιόρθωσης του DNA όπως στο σύστημα του ομόλογου ανασυνδυασμού (homologous recombination repair, HR) αλλά και στη μη ομόλογη τελικό-τελική αναστόμωση (non-homologous end joining, NHEJ) καθώς επίσης και στο mismatch repair system (MMR), μηχανισμοί επιδιόρθωσης που επίσης μπορούν να αναγνωρίσουν βλάβες στο DNA προκαλούμενες από ανάλογα της πλατίνης [135] (εικόνα 4).

Εικόνα 4



Το γονίδιο *BRCA1* συμμετέχει στον σύστημα του ομόλογου ανασυνδυασμού καθώς και στη μη ομόλογη τελικό-τελική αναστόμωση

Παρόλο που η έκφραση του *BRCA1* έχει συσχετιστεί με αντίσταση στα ανάλογα της πλατίνης φαίνεται ότι το ίδιο γονίδιο σχετίζεται με ευαισθησία στις ταξάνες. Οι ταξάνες είναι φάρμακα που ενώνονται με τη β-τουμπουλίνη και σταθεροποιούν τους μικροσωληνίσκους παρεμποδίζοντας το σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου και επομένως διακόπτουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το γονίδιο *BRCA1* δρα με παρόμοιο τρόπο και έχει βρεθεί να αποτελεί προβλεπτικό βιοδείκτη της δράσης των ταξανών [136-138].

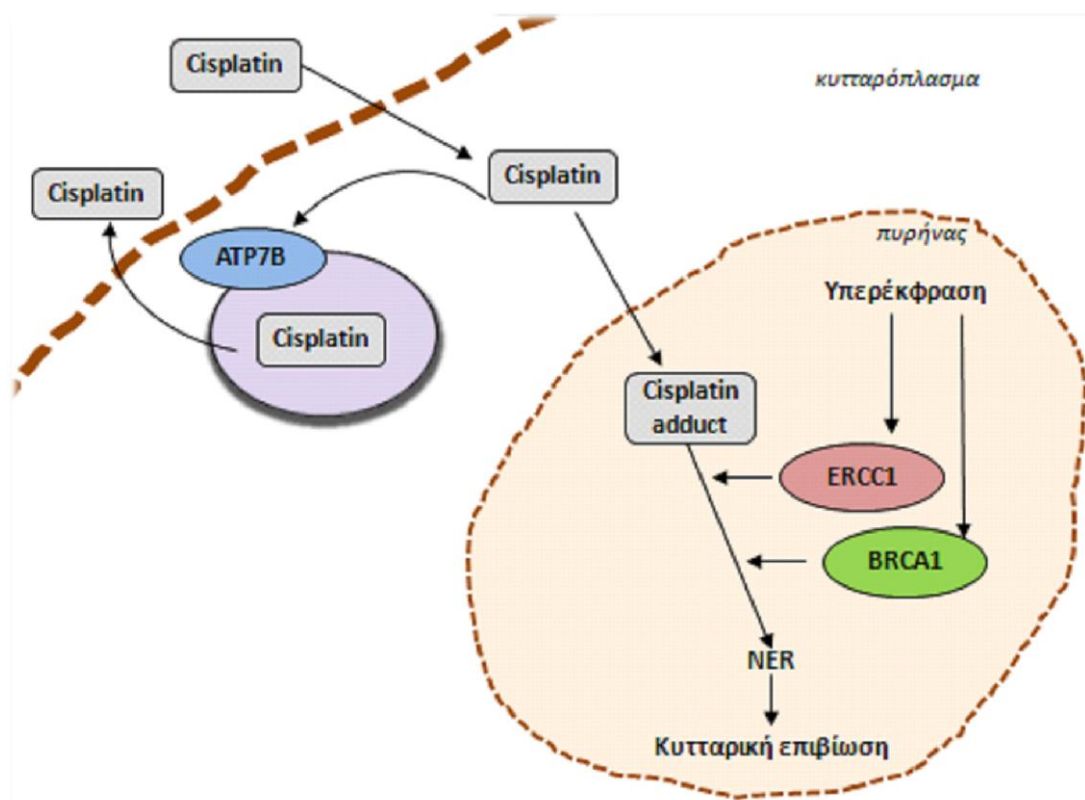
2.4.2 Αντλίες εκροής φαρμάκων-ATP7B

Ένας άλλος μηχανισμός που σχετίζεται με αντίσταση στη χημειοθεραπεία και ειδικότερα στα ανάλογα της πλατίνης είναι η μειωμένη ενδοκυττάρια συγκέντρωση του φαρμάκου, είτε επειδή το κύτταρο έχει μειωμένη ικανότητα πρόσληψης είτε επειδή έχει αυξημένη ικανότητα αποβολής του. Συγκεκριμένα, πρωτεΐνες-μεταφορείς στην επιφάνεια του κυττάρου που συμβάλλουν στην ομοιόσταση του χαλκού συμμετέχουν και στη πρόσληψη και αποβολή των πλατινούχων φαρμάκων [139].

Ο χαλκός είναι ένα απαραίτητο μέταλλο για τη δράση διαφόρων κυτταρικών ενζύμων. Την ίδια στιγμή η αυξημένη συγκέντρωση του χαλκού στον οργανισμό μπορεί να είναι τοξική. Για τον λόγο αυτόν, το κύτταρο διαθέτει αντλίες που ρυθμίζουν την ενδοκυττάρια συγκέντρωση του χαλκού. Η νόσος του Wilson είναι μια κληρονομική ασθένεια που οφείλεται σε μια αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή της μεταφοράς του χαλκού στο κύτταρο και χαρακτηρίζεται από χρόνια ηπατική νόσο και νευρολογική ή και νεφρολογική δυσλειτουργία λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης του χαλκού στο ήπαρ, στον εγκέφαλο και τους νεφρούς [140]. Η νόσος αυτή έχει αποδοθεί σε μεταλλάξεις στο γονίδιο *ATP7B* (ATPase, Cu⁺⁺ transporting, beta polypeptide) που κωδικοποιεί έναν P-τύπο ATPase μεταφορέα χαλκού. Ο μεταφορέας αυτός εκτός από το χαλκό έχει αποδειχθεί πλέον ότι ευθύνεται και για τη μεταφορά των αναλόγων της πλατίνης [140].

Μελέτες έχουν αναδείξει δυο μεταφορείς εκροής, ATP7A και ATP7B, που ρυθμίζουν την ενδοκυττάρια συγκέντρωση της πλατίνης, ενώ πρόσφατες μελέτες έχουν συσχετίσει την υπερέκφραση του γονιδίου *ATP7B* με αντίσταση στη πλατίνη και τη καρβοπλατίνη [141] (εικόνα 5).

Εικόνα 5



Εκροή πλατίνης από το κύτταρο με τη μεσολάβηση της πρωτεΐνης ATP7B

2.4.3 MYC: Προγνωστικός παράγοντας για τον ΜΚΠ

Η οικογένεια του γονιδίου *MYC* αποτελείται τουλάχιστον από τα γονίδια *MYC* (c-Myc), *MYCN* (N-Myc) και *MYCL1* (L-Myc) και παίζουν σημαντικό ρόλο στη καρκινογένεση αλλά και τη βιολογία και κλινική πορεία του ΜΚΠ [142]. Πρόκειται για μια οικογένεια ογκοπρωτεϊνών που λειτουργούν ως μεταγραφικοί ενεργοποιητές εκατοντάδων γονιδίων που συμμετέχουν σε διάφορες βιολογικές διαδικασίες.

Με τη μέθοδο ανάλυσης μικροσυστοιχιών (microarray analysis) έχει βρεθεί ότι κυρίως το γονίδιο *MYC* και, λιγότερο, τα γονίδια *MYCN* και *MYCL1* υπερεκφράζονται στο ΜΚΠ [143].

Το γονίδιο *MYC* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 8q24 και αποτελείται από τρία εξόνια. Η έκφραση του στα φυσιολογικά κύτταρα ρυθμίζεται από διάφορους παράγοντες όπως

αυξητικούς παράγοντες ή από παράγοντες που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο. Έτσι, ένα φυσιολογικό κύτταρο που βρίσκεται σε κατάσταση ηρεμίας έχει πολύ χαμηλή έκφραση του *MYC* ενώ όταν δέχεται το ερέθισμα αυξητικών παραγόντων αυξάνεται σημαντικά η έκφραση του γονιδίου. Μη φυσιολογική υπερέκφραση του *MYC* στο μη καρκινικό κύτταρο ενεργοποιεί τον p19/p14ARF και p53-εξαρτώμενο προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

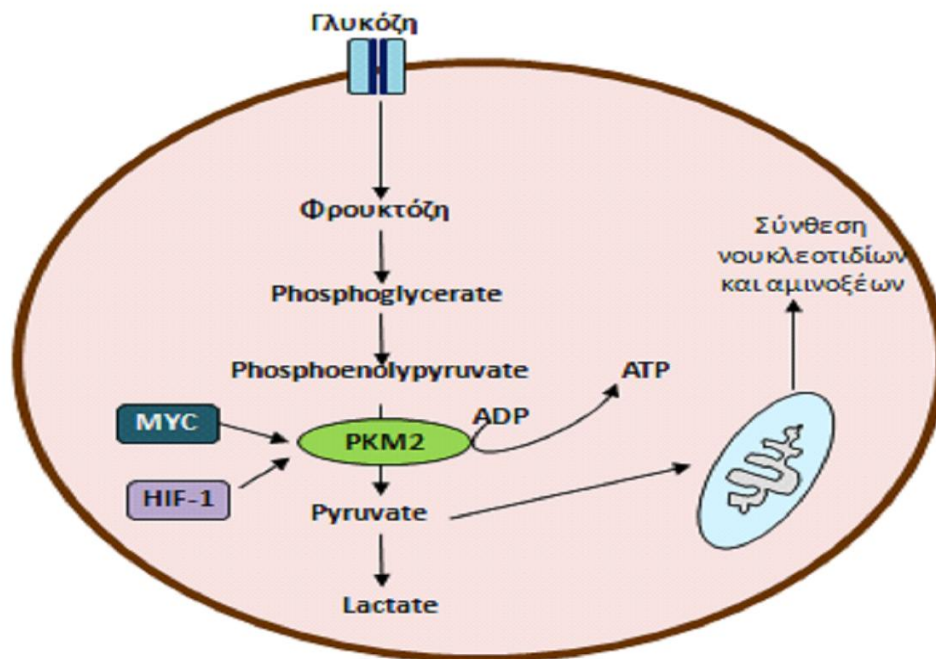
Η ενεργοποίηση του γονιδίου *MYC* έχει περιγραφεί ότι προκαλεί καρκινογένεση με ποικίλους μηχανισμούς. Χρωμοσωμικές διαμεταθέσεις, όπως συμβαίνει στη περίπτωση του λεμφώματος Burkitt, μπορούν να μεταφέρουν το γονίδιο *MYC* σε περιοχές με γονίδια που κωδικοποιούν ανοσοσφαιρίνες. Επίσης, η ενίσχυση της περιοχής του γονιδίου *MYC* αυξάνει τον αριθμό των αντιγράφων του και οδηγεί τελικά στην υπερέκφραση του, γεγονός που έχει παρατηρηθεί να συμβαίνει και στον ΜΚΠ. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου, από την άλλη μεριά, παρατηρείται αυξημένη μεταγραφή του *MYC* που μπορεί να οφείλεται σε μεταλλάξεις ενός άλλου μεταγραφικού παράγοντα της β-κατενίνης. Άλλος μηχανισμός υπερέκφρασης του *MYC* είναι η απομάκρυνση των αποσταθεροποιητικών αλληλουχιών 3' UTR με συνέπεια τα αυξημένα επίπεδα *MYC* mRNA. Τέλος το ογκογονίδιο Ras φαίνεται να αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του *MYC* μέσω ενός μετα-μεταγραφικού μηχανισμού [144].

Υπερέκφραση ή ενίσχυση του γονιδίου *MYC* υφίσταται στο 18-31% του ΜΚΠ και ιδιαίτερος στη χημειοανθεκτική νόσο [145-147]. Η χαμηλή έκφραση του γονιδίου *MYC* έχει περιγραφεί να σχετίζεται με ευαισθησία σε αλκυλιωτικούς παράγοντες όπως η πλατίνη [148].

2.4.4 Το μονοπάτι της γλυκόλυσης- PKM2

Η ισομορφή M2 της πυροσταφυλικής κινάσης (pyruvate kinase isoform M2, PKM2) και η συσχέτισή της με αντίσταση στα ανάλογα της πλατίνης βρίσκονται υπό διερεύνηση [149, 150]. Η PKM2 είναι το τελικό ένζυμο στο μονοπάτι της γλυκόλυσης που καταλύει τη μετατροπή του φωσφοενολπυροσταφυλικού και του ADP σε πυροσταφυλικό οξύ και ATP [151]. Από τις τέσσερις ισομορφές της πυροσταφυλικής κινάσης (PK), η πρωτεΐνη PKM2 είναι αυτή που εκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα και είναι σημαντική για τον μεταβολισμό και την αύξηση του όγκου [152, 153] (εικόνα 6).

Εικόνα 6



Δράση του ενζύμου PKM2

Διάφορες μελέτες έχουν αναδείξει μια αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του γονιδίου *PKM2* και στην ευαισθησία στη χημειοθεραπεία [151]. Η καταστολή της έκφρασης του *PKM2* μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη μεταβολική δραστηριότητα

και κυτταρική απόπτωση [154]. Επίσης, άλλες μελέτες έχουν αναδείξει ότι στοχεύοντας τη πρωτεΐνη PKM2 είναι δυνατόν να αυξήσουμε την ευαισθησία του κυττάρου σε φάρμακα όπως η ταξάνες και τα ανάλογα της πλατίνης [155]. Από την άλλη μεριά, πρόσφατα δημοσιεύτηκε ότι η απενεργοποίηση της PKM2 μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση μιας και το καρκινικό κύτταρο μπορεί να απενεργοποιεί τη δράση του ενζύμου με ποικίλους μηχανισμούς και μέσω αυτών να διευκολύνει την ανάπτυξη του [156]. Συνεπώς, ο ρόλος του γονιδίου *PKM2* χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Η έκφραση του γονιδίου *PKM2* μπορεί να γίνει μέσω διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών όπως είναι τα PI3K/MAPK (phosphoinositide 3-kinase/mitogen-activated protein kinase) μονοπάτια. Κάτω από συνθήκες υποξίας, ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 (Hypoxia-inducible factor 1) μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα έκφρασης του *PKM2* γονιδίου ενώ το PI3K/AKT/mTOR (mammalian target of rapamycin) μονοπάτι μπορεί να επάγει την έκφραση του *PKM2* μέσω των γονιδίων *HIF-1* και *MYC* [154].

2.4.5 Τοποϊσομεράσες I και II (TOPO-I και II-A, II-B):

Μηχανισμός δράσης – Στόχος χημειοθεραπευτικών φαρμάκων

Οι DNA τοποϊσομεράσες I και II (TOPO-I και II-A, II-B), φαίνεται επίσης να εμπλέκονται στους μηχανισμούς αντίστασης σε χημειοθεραπευτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τον ΜΚΠ.

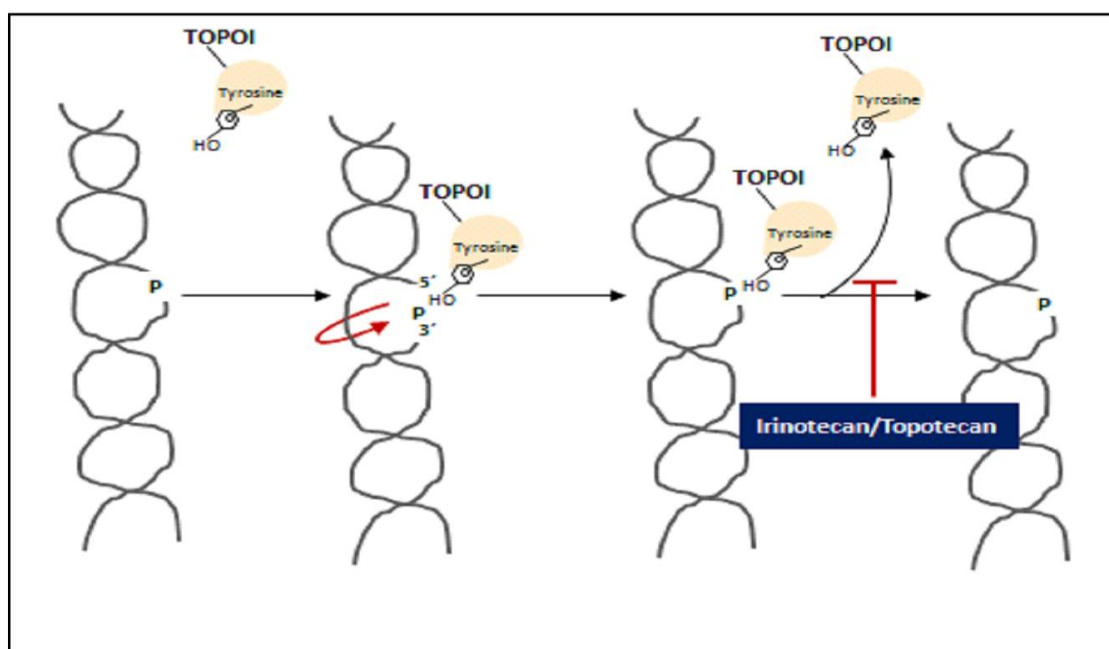
Κάθε κύτταρο περιέχει περίπου 2 μέτρα DNA υπέρ-διπλωμένο και δεμένο με πρωτεΐνες που ονομάζονται ιστόνες μέσα στον πυρήνα του. Οι διάφορες αλληλουχίες του DNA θα πρέπει να ξεδιπλωθούν ή να χαλαρώσουν ώστε να μπορέσουν να αναγνωριστούν από τα διάφορα DNA ένζυμα, υπεύθυνα για την αντιγραφή και τη

μεταγραφή του DNA. Οι DNA τοποϊσομεράσες TOPO-I και II μπορούν να μεταβάλουν την υπερελικωμένη δομή του DNA με το να διασπών και να ανασυγκολλούν τη μονή και τη διπλή έλικα του DNA, αντιστοίχως (εικόνα 7 και 8) Μελέτες έχουν δείξει ότι το ένζυμο TOPO-I σχετίζεται με ενεργώς μεταγραφόμενα γονίδια ενώ η TOPO-II απαιτείται για την αντιγραφή του DNA, και την επιτυχή έκβαση της μίτωσης [157].

Οι τοποϊσομεράσες αποτελούν στόχους για πολλά χημειοθεραπευτικά φάρμακα, όπως η ιρινοτεκάνη και η τοποτεκάνη που αναστέλλουν τη δραστηριότητα του ενζύμου TOPO-I ή η ετοποσίδη και η δοξορουμπικίνη που αναστέλλουν τη δράση της TOPO-II [158-160].

Η ιρινοτεκάνη και η τοποτεκάνη σταματούν τη δράση της TOPO-I στη φάση που το ένζυμο έχει κόψει τη μονή έλικα του DNA με αποτέλεσμα να δημιουργείται μόνιμη βλάβη στο DNA, την οποία το κύτταρο αδυνατεί να επιδιορθώσει και τελικά επέρχεται κυτταρικός θάνατος [161] (εικόνα 7).

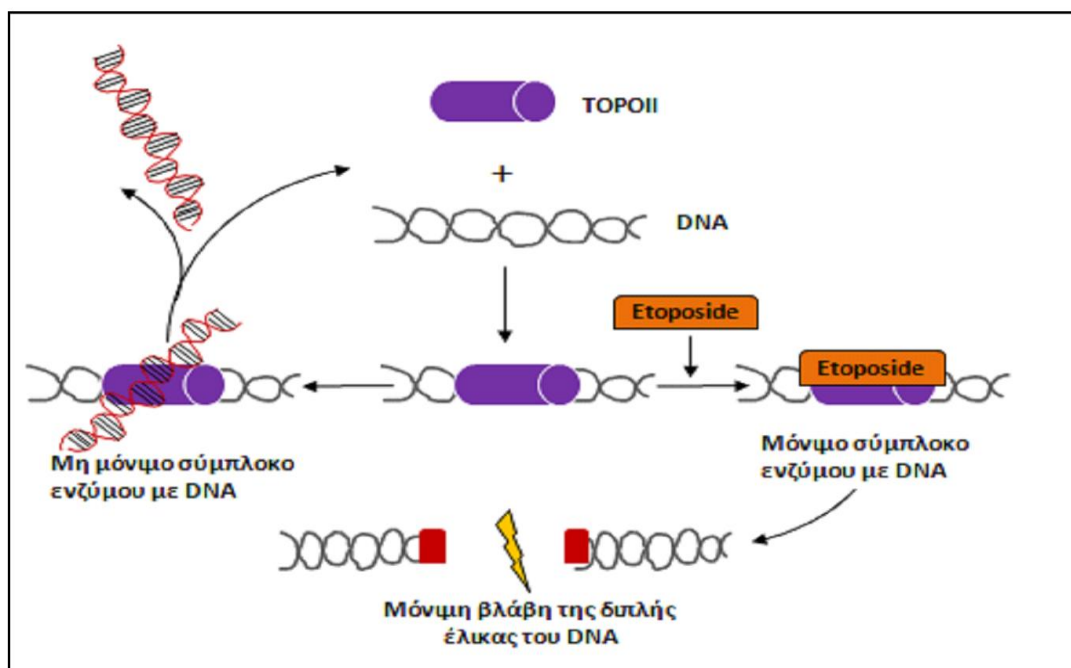
Εικόνα 7



Δράση του ενζύμου TOPO-I και των αναστολέων του

Το ένζυμο TOPO-II προσδένεται στη διπλή έλικα του DNA, κόβει και τις δύο έλικες, περνά με έναν ATP-εξαρτώμενο τρόπο μια δεύτερη έλικα DNA μέσα από το άνοιγμα που έχει δημιουργηθεί και εν συνεχεία ξαναενώνει τα άκρα στο αρχικό σημείο της αποκοπής [162]. Κατά τη διάρκεια αυτής της αντίδρασης η TOPO-II σχηματίζει ένα σύμπλοκο με το DNA και οι αναστολείς της TOPO-II, όπως η ετοποσίδη ή η δοξορουμπικίνη διατηρούν σταθερό αυτό το σύμπλοκο με αποτέλεσμα τη δημιουργία μόνιμης βλάβης στη διπλή έλικα του DNA [163] (εικόνα 8).

Εικόνα 8



Δράση του ενζύμου TOPO-II και των αναστολέων του

Υπάρχουν δύο υπότυποι του γονιδίου *TOPO-II*; *TOPOII-A* και *TOPOII-B*. Συγκεκριμένα το γονίδιο *TOPO-IIA* φαίνεται να εκφράζεται κυρίως σε κύτταρα που βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού και μια καλή συσχέτιση έχει παρατηρηθεί ανάμεσα στην έκφραση του *TOPO-IIA* και γνωστών δεικτών πολλαπλασιασμού σε

συμπαγείς όγκους [164]. Αντίθετα, η έκφραση της *TOPO-IIβ* φαίνεται να είναι σταθερή κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου [159].

2.5 Στόχοι της Μελέτης

Είναι φανερό ότι ο ΜΚΠ είναι μια επιθετική μορφή καρκίνου με ιδιαίτερα κλινικά και βιολογικά χαρακτηριστικά. Πριν από 25 χρόνια περίπου, είχαμε αρχίσει να αισιοδοξούμε και να πιστεύουμε ότι ο ΜΚΠ θα μπορούσε γιατί όχι να συμπεριληφθεί σε αυτά που ονομάζουμε ιάσιμα νεοπλάσματα. Είχαμε ένα ξεχωριστό σύστημα σταδιοποίησης, αποτελεσματικά φάρμακα καθώς και την ακτινοβολία του θώρακος για μια ιδιαίτερα χημειο- και ακτινο-ευαίσθητη νόσο. Κατόπιν προστέθηκε και η προφυλακτική ακτινοθεραπεία του εγκεφάλου. Βρισκόμαστε όμως 25 χρόνια αργότερα και οι ασθενείς φαίνεται να έχουν την ίδια φτωχή πρόγνωση.

Ίσως η λύση στα αινίγματα αυτής της νόσου μπορούν να βρεθούν μέσα από τη καλύτερη κατανόηση της βιολογίας της. Οι ασθενείς με ΜΚΠ σπάνια υποβάλλονται σε χειρουργική εξαίρεση του όγκου τους, με αποτέλεσμα να έχουμε στη διάθεσή μας για τη μελέτη της μοριακής βιολογίας της νόσου, μικρά και συχνά κακής ποιότητας βιοπτικά δείγματα, με υλικό που αρκεί συχνά μόνο για την ιστολογική επιβεβαίωση της νόσου. Θεωρητικά, τα μοριακά χαρακτηριστικά του αρχικού όγκου μπορούν να κατευθύνουν τη θεραπευτική απόφαση και να επιτρέψουν στον ογκολόγο να επιλέξει φάρμακα που θα προσφέρουν στον ασθενή του το μέγιστο όφελος με την ελάχιστη τοξικότητα. Τα τελευταία χρόνια, μέσα από μελέτες γονιδιακής ή πρωτεϊνικής έκφρασης ή μεταλλάξεων σε δείγματα ασθενών ή και σε κυτταρικές σειρές ή πειραματόζωα έχουν αναγνωριστεί βιοδείκτες που σχετίζονται με ευαισθησία ή αντίσταση σε θεραπεία με ανάλογα πλατίνης, ή σε αναστολείς τοποϊσομεράσης [165].

Στη μελέτη αυτή αναλύσαμε αναδρομικά τη προβλεπτική αξία, τόσο για την ανταπόκριση στη θεραπεία όσο και για την επιβίωση των ασθενών, της mRNA

έκφρασης των γονιδίων *BRCA1*, *ERCCL1*, *ATP7B*, *PKM2*, *TOPO-I*, *TOPO-IIA*, *TOPO-IIB* και *C-MYC* χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR) σε κύβους παραφίνης 184 ασθενών με ΜΚΠ που έλαβαν συνδυασμένη χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση τη πλατίνη με ή χωρίς ακτινοθεραπεία θώρακος.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Υπο μελέτη πληθυσμός

Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου (αριθμός έγκρισης: 4456/14-5-2010) ενώ όλοι οι ασθενείς έχουν υπογράψει έντυπο συγκατάθεσης για τη συμμετοχή τους στη μελέτη.

Μελετήθηκαν αναδρομικά 184 ασθενείς με ΜΚΠ. Τα κύρια χαρακτηριστικά τους περιγράφονται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6. Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά του υπό μελέτη πληθυσμού

Δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά	Απόλυτος αριθμός	%
	184	
Μέση ηλικία, έτη (εύρος)	63 (33-78)	
≤ 65 years	98	54
Φύλο		
Άρρενες	160	87
Θήλεα	24	13
Στάδιο νόσου		
Περιορισμένο	64	35
Εκτεταμένο	120	65
Γενική Κατάσταση (ECOG PS)		
0-1	131	71
2	53	29
LDH κατά τη διάγνωση		
Φυσιολογική	109	59
Αυξημένη	75	41
Θεραπευτική ακτινοβολία στο μεσοθωράκιο		
Περιορισμένο στάδιο νόσου	60	33

Εκτεταμένο στάδιο νόσου	0	0
Υποτροπή		
Ναι	171	93
Όχι	13	7
Χημειοθεραπεία δεύτερης γραμμής		
Ναι	145	79
Όχι	39	11
Κατάσταση επιβίωσης κατά την ανάλυση των δεδομένων		
Αποβιώσαντες	169	92
Επιβιώσαντες	15	8
Μέσο διάστημα χωρίς υποτροπή μετά τη χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής (εύρος)	Μήνες	
Περιορισμένο στάδιο νόσου	8.0 (1.3-121)	
Εκτεταμένο στάδιο νόσου	4.0 (0.3-16)	
Μέση συνολική επιβίωση (εύρος)	Μήνες	
Περιορισμένο στάδιο νόσου	15.0 (4.6-156.0)	
Εκτεταμένο στάδιο νόσου	7.6 (2.3-26.0)	

Η πλειοψηφία των ασθενών ήταν άρρενες (87%). Η μέση ηλικία ήταν 63 έτη. Το 71% των ασθενών ήταν σε καλή γενική κατάσταση (PS; European Cooperative Oncology Group-ECOG 0-1). Από τους 184 ασθενείς, οι 64 είχαν περιορισμένο στάδιο νόσου (35%), ενώ οι 120 είχαν εκτεταμένο στάδιο νόσου (65%). Το 41% των ασθενών είχε αυξημένα επίπεδα γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) κατά τη διάγνωση της νόσου. Σχεδόν όλοι οι ασθενείς με περιορισμένη νόσο έλαβαν θεραπευτική ακτινοβολία στο μεσοθωράκιο, η έναρξη της οποίας γινόταν με το 2^ο κύκλο χημειοθεραπείας. Από τους 184 ασθενείς που μελετήθηκαν, οι 171 παρουσίασαν υποτροπή μετά τη 1^η γραμμής θεραπεία, ενώ το 79% του συνολικού πληθυσμού έλαβε θεραπεία 2^{ης} γραμμής. Η θεραπεία 1^{ης} γραμμής που έλαβαν οι ασθενείς που συμμετείχαν στη μελέτη είχε ως εξής (πίνακας 7):

Πίνακας 7: Θεραπευτικό σχήμα

Φάρμακο	Δόση	Ημέρες χορήγησης	Τρόπος χορήγησης
Ετοποσίδη	100mg/m ²	1 ^η , 2 ^η και 3 ^η ημέρα	ενδοφλέβια
και			
Σισπλατίνη	80mg/m ²	1 ^η ημέρα	ενδοφλέβια
ή			
Καρβοπλατινη	AUC 5-6	1 ^η ημέρα	ενδοφλέβια

Το χημειοθεραπευτικό σχήμα ετοποσίδης και σισπλατίνης ή ετοποσίδης και καρβοπλατινης επαναλαμβάνονταν κάθε 21 ημέρες για 4 έως 6 κύκλους. Η θεραπεία, κυρίως το σχήμα με τη με σισπλατινη, συνοδευόταν από καλή ενυδάτωση. Αντιεμετική αγωγή δινόταν στους ασθενείς κατά τη διάρκεια της θεραπείας καθώς και για τις επόμενες 3-4 ημέρες.

Κατά τη στιγμή της ανάλυσης και μετά από ένα μέσο διάστημα παρακολούθησης 9,1 μηνών, το 92% του πληθυσμού είχε αποβιώσει, με τη μέση συνολική επιβίωση να είναι 7,6 μήνες για τους ασθενείς με εκτεταμένη νόσο και 15 μήνες για τους ασθενείς με περιορισμένο ΜΚΠ. Συγκεκριμένα καταγράφηκαν 171 υποτροπές και 169 θάνατοι. Το μέσο διάστημα χωρίς υποτροπή μετά τη θεραπεία πρώτης γραμμής ήταν 4 και 8 μήνες για την εκτεταμένη και την περιορισμένη νόσο αντιστοίχως.

Η ανταπόκριση στη θεραπεία της πρώτης γραμμής παρουσιάζεται στον πίνακα 8

Πίνακας 8: Ανταπόκριση στη θεραπεία 1^{ης} γραμμής

	Πλήρης ανταπόκριση Απόλυτος αριθμός (%)	Μερική ανταπόκριση Απόλυτος αριθμός (%)	Σταθερότητα νόσου Απόλυτος αριθμός (%)	Πρόοδος νόσου Απόλυτος αριθμός (%)	Μη εκτίμηση ανταπόκρισης Απόλυτος αριθμός (%)
Περιορισμένο στάδιο νόσου (64 ασθενείς)	13(20)	30 (47)	7 (11)	11 (17)	3 (5)
	Συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης (πλήρεις ανταποκρίσεις + μερικές ανταποκρίσεις): 43 (67)				
Εκτεταμένο στάδιο νόσου (120 ασθενείς)	1 (0.8)	42 (35)	18 (15)	54 (45)	5 (4.2)
	Συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης (πλήρεις ανταποκρίσεις + μερικές ανταποκρίσεις): 43 (35.8)				

3.2 Μεθοδολογία

3.2.1 Υλικά και μέθοδοι

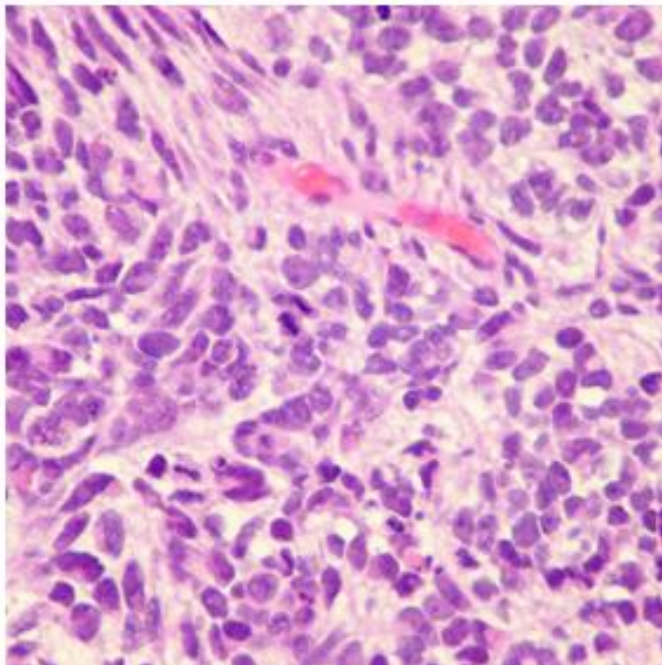
Χρησιμοποιήθηκε αρχειακό υλικό από τον πρωτοπαθή όγκο ασθενών, οι οποίοι είχαν λάβει χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση τη πλατίνη για ΜΚΠ περιορισμένου ή εκτεταμένου σταδίου. Το υλικό αξιολογήθηκε στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, και επιλέχθηκαν οι κύβοι παραφίνης που ήταν πιο αντιπροσωπευτικοί για τον όγκο από εξειδικευμένο παθολογοανατόμο.

3.2.2 Ιστολογική χρώση αιματοξυλίνης- ηωσίνης

Η χρώση αιματοξυλίνης- ηωσίνης είναι μία από συνηθέστερες και πιο διαδεδομένες ιστολογικές χρώσεις που χρησιμοποιούνται στη παθολογοανατομία. Χρησιμοποιείται συνήθως για τον χρωματισμό ιστολογικών τομών παραφίνης, οι οποίες έχουν δημιουργηθεί νωρίτερα με τη βοήθεια ειδικού μικροτόμου. Η χρώση αυτή πραγματοποιείται με τον συνδυασμό δύο επιμέρους χρωστικών, της αιματοξυλίνης

και της ηωσίνης. Οι χρωστικές που χρησιμοποιούνται προέρχονται συνήθως από τη χημεία χρωμάτων ενδυμάτων και μπορούν να προσκολληθούν στις κυτταρικές δομές λόγω φορτίου ή άλλων δυνάμεων. Πρόκειται για έγχρωμα, ιονιζόμενα οργανικά μόρια που συνήθως περιέχουν έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους με δομές συντονισμού. Τα μόρια αυτά, απορροφούν φωτόνια σε συγκεκριμένα μήκη κύματος ενώ αφήνουν ελεύθερα τα υπόλοιπα φωτόνια, που διαπερνώντας τα μόρια αυτά τους προσδίδουν χαρακτηριστικό χρώμα. Ανάλογα με το είδος του χρωμοφόρου μορίου που φέρει μία χρωστική το χρώμα φυσικά είναι διαφορετικό. Η αιματοξυλίνη δεσμεύεται από τα βασεόφιλα/όξινα μέρη του κυττάρου όπως τον πυρήνα, προσδίδοντας έντονο μωβ-μπλε χρώμα. Αντίθετα, η ηωσίνη δεσμεύεται από τα οξεόφιλα/βασικά μέρη χρωματίζοντας με ιώδες-ερυθρό χρώμα τις υπόλοιπες κυτταρικές δομές.

Εικόνα 9



Αιματοξυλίνη/ ηωσίνη ΜΚΠ

Το διχρωματικό τελικά αποτέλεσμα επιτρέπει τη μικροσκοπική παρατήρηση του ιστού που υπάρχει στη τομή της αντικειμενοφόρου πλάκας (Εικόνα 9). Έτσι είναι

δυνατόν να εντοπιστούν οι μη φυσιολογικές κυτταρικές δομές και κατά συνέπεια να διαχωριστούν και τα καρκινικά από τα μη καρκινικά τμήματα του ιστού που ενδιαφέρει τις εργασίες του παρόντος εργαστηρίου. Η μέθοδος της χρώσης που ακολουθήθηκε για τους σκοπούς της εργασίας αυτής, είναι η ακόλουθη:

Υλικά-συσκευές:

1. Κλίβανος θέρμανσης
2. Ειδική απαγωγός για την αποφυγή επαφής με πτητικές ουσίες
3. Πλαστικοί φορείς αντικειμενοφόρων με λαβή για τη μεταφορά τους και τον εμβαπτισμό τους στα απαραίτητα διαλύματα
4. Γυάλινα σκεύη για τη τοποθέτηση των υγρών διαλυμάτων εμβαπτισμού
5. Ξυλόλη για τη διαύγαση των ιστών
6. Αιθανόλη συγκέντρωσης 100%
7. Αιθανόλη συγκέντρωσης 95%
8. Αιθανόλη συγκέντρωσης 70%
9. Αποσταγμένο νερό
10. Αιματοξυλίνη (Sigma-Aldrich Mayer's hematoxylin solution)
11. Ηωσίνη αραιώσης 0.5% w/v (Riedel-de-Haen Eosin Y disodium salt purum for microscopy M=691.85g/Mol)
12. Απορροφητικό χαρτί
13. Τομές παραφίνης με έγκλειστο ιστό τοποθετημένες σε αντικειμενοφόρους πλάκες.

Μέθοδος:

Αρχικά, ο κλίβανος προθερμαίνεται ώστε να επιτύχουμε θερμοκρασία 50-55°C. Τοποθετούνται έπειτα σε αυτόν οι αντικειμενοφόροι πλάκες που έχουν τοποθετηθεί στους πλαστικούς φορείς. Αφήνουμε στον κλίβανο τις τομές για διάστημα 6-10

λεπτών, διάστημα επαρκές για να λιώσει ελαφρά η παραφίνη και να διευκολυνθεί η περαιτέρω διαδικασία, χωρίς όμως να υπερθερμανθεί και να ξεκολλήσει η τομή. Είναι πολύ σημαντικό για να είναι επιτυχής η χρώση, οι χρόνοι που αναφέρονται στη διαδικασία αυτή να τηρούνται με ακρίβεια.

Ακολουθεί το στάδιο της ενυδάτωσης με διαδοχικές εμβάπτσεις σε φθίνουσες συγκεντρώσεις αιθανόλης αφού πρώτα οι τομές εμβαπτιστούν σε ξυλόλη:

1. Εμβάπτιση σε ξυλόλη για 6 λεπτά
2. Εμβάπτιση σε 100% αιθανόλη για 1 λεπτό
3. Εμβάπτιση σε 95% αιθανόλη για 30 δευτερόλεπτα
4. Εμβάπτιση σε 70% αιθανόλη για 30 δευτερόλεπτα
5. Ξέπλυμα με αποσταγμένο νερό (0% αιθανόλη)

Έπειτα πραγματοποιείται εμβάπτιση στην αιματοξυλίνη για 30 δευτερόλεπτα ώστε να χρωματιστούν οι πυρήνες. Ακολουθούν δύο ξεπλύματα με αποσταγμένο νερό ώστε να απομακρυνθεί η μη δεσμευμένη αιματοξυλίνη. Κατόπιν πραγματοποιείται εμβάπτιση στην ηωσίνη για 1 λεπτό ώστε να χρωματιστούν τα οξεόφιλα.

Στη συνέχεια θα πρέπει ο ιστός να απαλλαγθεί από τη μη δεσμευμένη ηωσίνη και επίσης να αφυδατωθεί ξανά οπότε γίνονται τα ακόλουθα:

1. Εμβάπτιση σε 95% αιθανόλη για 30 δευτερόλεπτα
2. Εμβάπτιση σε 95% αιθανόλη για 30 δευτερόλεπτα
3. Εμβάπτιση σε 95% αιθανόλη για 30 δευτερόλεπτα
4. Εμβάπτιση σε 100% αιθανόλη για 30 δευτερόλεπτα

Τέλος, ακολουθεί διαύγαση σε ξυλόλη με εμβάπτιση για 1-2 λεπτά. Οι τομές στεγνώνουν ελεύθερες και αποθηκεύονται στις ειδικές καρτέλες μεταφοράς τους έως τη παρατήρησή τους και την επεξεργασία τους για απομόνωση επιθυμητών δομών με τη βοήθεια μικροσκοπίου-micro dissector.

3.2.3 Απομόνωση καρκινικών κυττάρων

Η επιλογή των καρκινικών κυττάρων από τις χρωματισμένες τομές, γίνεται με τη βοήθεια ανεστραμμένου μικροσκοπίου και τη χρήση πιεζοηλεκτρικού-micro dissector (Eppendorf, εικόνα 10 και 11).

Εικόνα 10

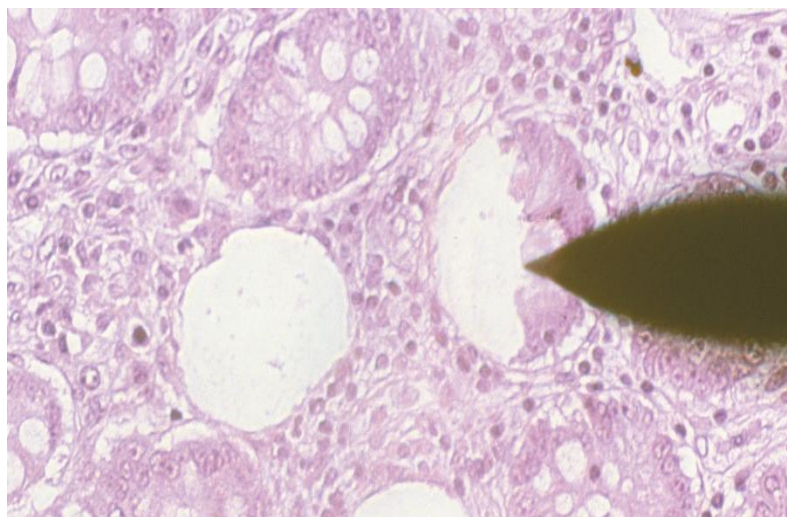


Πιεζοηλεκτρικός microdissector Eppendorf

Ο μικροτόμος αυτός φέρει δύο βραχίονες οι οποίοι προσαρμόζονται στο ανεστραμμένο μικροσκόπιο. Στην άκρη του ενός βραχίονα προσαρμόζεται νυστερίδιο το οποίο μέσω του βραχίονα συνδέεται με πηγή εκπομπής υπερήχων. Ο έτερος βραχίονας συνδέεται με ρύγχος αναρρόφησης. Και οι δύο βραχίονες συνδέονται στη συνέχεια με μικροχειριστήρια (joy stick). Ο χειριστής μέσω των μικροχειριστηρίων επιλέγει και κόβει τα καρκινικά κύτταρα με το νυστερίδιο και τα αναρροφά με το ρύγχος. Το μικροσκόπιο συνδέεται μέσω CCD (charge-coupled device) κάμερας με υπολογιστή για λήψη φωτογραφιών και για λόγους διασφάλισης της ποιότητας (παρακολούθηση χειριστή από πλέον πεπειραμένο προσωπικό). Τα κύτταρα που

έχουν απομονωθεί συλλέγονται σε σωληνάρια τύπου erpendorf και επεξεργάζονται έπειτα για να αποπαραφινοποιηθούν με τη διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω.

Εικόνα 11



Λειτουργία πιεζοηλεκτρικού microdissector Eppendorf

3.2.4 Αποπαραφινοποίηση

Η έγκλειση των ιστών σε κύβους παραφίνης για τη μονιμοποίηση-διατήρησή τους απαιτεί το πρωταρχικό βήμα της όποιας επεξεργασίας του ιστού να είναι η αποπαραφινοποίησή του. Η αποπαραφινοποίηση μπορεί να εφαρμοστεί σε ολόκληρες τομές από κύβους παραφίνης, είτε σε μικρότερη κλίμακα, σε microdissected κύτταρα που έχουν απομονωθεί από τομή. Για τη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η δεύτερη περίπτωση.

Υλικά-συσκευές:

- Αιθανόλη συγκέντρωσης 100%
- Μηχάνημα φυγοκέντρησης (erpendorf centrifuge)

- Πιπέτα συλλογής υγρών χωρητικότητας 1000μl και ρύγχη

Μέθοδος:

Η αποπαραφινποίηση microdissected κυττάρων που προηγείται της περαιτέρω επεξεργασίας τους όπως η κυτταρική λύση, είναι σύντομη εξαιτίας της μικρότερης ποσότητας παραφίνης που φέρουν σε σχέση με τις τομές. Τα τοποθετημένα σε αιθανόλη δείγματα, φυγοκεντρώνονται σε 10.000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρείται και ακολουθεί μία πλύση με απόλυτη (100%) αιθανόλη. Τα δείγματα αναδεύονται και φυγοκεντρώνονται για 5 λεπτά σε 10.000 rpm στους 4°C. Η αιθανόλη αφαιρείται και ακολουθεί άλλος ένας κύκλος πλύσης-φυγοκέντρωσης απομόνωσης κυτταρικής πελέτας. Εξαιρετικής σημασίας είναι να αποφευχθεί ή δυνατόν η απώλεια υλικού κατά τη διαδικασία αυτή καθώς και η πλήρης αφαίρεση της αιθανόλης, η οποία αναστέλλει τη δράση της πρωτεΐνάσης και ως εκ τούτου της πρωτεϊνικής πέψης.

3.2.5 Κυτταρική λύση- πρωτεϊνική πέψη

Η κυτταρική λύση είναι ένα απαραίτητο στάδιο όταν επιθυμούμε να απομονώσουμε νουκλεϊκά οξέα για περαιτέρω μελέτη. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιούμε ένα ειδικό διάλυμα λύσης και μια ενζυμική πρωτεΐνάση. Ειδικότερα, για τη λύση κυττάρων που έχουν απομονωθεί επιλεκτικά από τομή παραφίνης με διαδικασία microdissection και έχουν αποπαραφινποιηθεί, είναι δυνατόν να ακολουθηθεί το παρακάτω πρωτόκολλο.

Υλικά-συσκευές:

1. Σωληνάρια τύπου erpendorf χωρητικότητας 1,5 ml

2. Σωληνάρια τύπου erpendorf χωρητικότητας 1,5 ml όπου περιέχονται τα αποπαραφινωποιημένα κύτταρα, απαλλαγμένα από την αιθανόλη της αποπαραφινωποίησης.
3. Διάλυμα λύσης (10mM Tris, 0,1mM EDTA, 2% SDS)
4. Ένζυμο πρωτεΐνάσης: proteinase K, Qiagen (>600 mAU/ml, 20 mg/ml, διάλυμα)
5. Πιπέτα συλλογής υγρών χωρητικότητας 1000μl και ρύγχη
6. Θερμική συσκευή επώασης με ανάδευση (erpendorf thermomixer comfort)

Μέθοδος:

Παρασκευάζεται το διάλυμα λύσης σε τελικό όγκο αντίστοιχο του αριθμού των κυτταρικών δειγμάτων, υπολογίζοντας όγκο 400 μl για κάθε σωληνάριο-δείγμα. Προστίθεται στα σωληνάρια όπου περιέχονται τα κύτταρα προς λύση, 400 μl από το διάλυμα λύσης και, κατόπιν, 30 μl πρωτεΐνάσης (10mg/ml). Τα δείγματα τοποθετούνται στη θερμική συσκευή επώασης σε θερμοκρασία 60°C με ανάδευση για τη διευκόλυνση της πλήρους ενζυμικής λύσης. Η επώαση γίνεται για 16 τουλάχιστον ώρες (overnight). Δίνεται προσοχή ώστε τα κύτταρα στα οποία προστίθεται το διάλυμα λύσης και το ένζυμο να είναι απαλλαγμένα από την αιθανόλη με την οποία προηγουμένως αποπαραφινωποιήθηκαν, επειδή αυτή είναι ανασταλτικός παράγοντας της ενζυμικής δράσης της πρωτεΐνάσης K.

3.2.6 Εκχύλιση και καθαρισμός του RNA (RNA extraction)

Η εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων από τους ιστούς και ο καθαρισμός τους, είναι απαραίτητα βήματα για τη μελέτη τους. Η μοριακή βιολογία χρησιμοποιεί μία πληθώρα τέτοιων τεχνικών, των οποίων τα πρωτόκολλα διαφοροποιούνται ανάλογα με τις εκάστοτε διαγνωστικές ή ερευνητικές ανάγκες. Ακολουθεί η περιγραφή του

πρωτόκολλου που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα εργασία. Το βασικό δραστικό στοιχείο είναι ο φαινολικός παράγοντας. Πρόκειται για το αντιδραστήριο Trizol LS. Το αντιδραστήριο αυτό, είναι μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης. Χρησιμοποιείται ευρέως για την εκχύλιση νουκλεϊκών οξέων από ιστούς και από βιολογικά υγρά. Είναι τοξικό για αυτό η χρήση του γίνεται με προσοχή και κατά προτίμηση σε απαγωγό χημικών αερίων (hood).

Υλικά-συσκευές:

1. Ισοπροπανόλη
2. Χλωροφόρμιο
3. 75% αιθανόλη παρασκευασμένη με DEPC νερό (νερό κατεργασμένο με διαιθυλοπυροκαρβονικό εστέρα)
4. Γλυκογόνο (Roche 20mg/ml)
5. Οξικό νάτριο
6. Σωλήνρια τύπου eppendorf
7. Πιπέτες συλλογής υγρών και ρύγχη
8. Μηχάνημα φυγοκέντρησης (eppendorf centrifuge)

Μέθοδος:

Αρχικά, απαλλάσσονται τα λυμένα από το ένζυμο της πρωτεϊνάσης κύτταρα, από τις ακαθαρσίες της λύσης. Για να το πετύχουμε αυτό, τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 1 λεπτό σε 12.000 rpm στους 4°C. Συλλέγεται έπειτα προσεχτικά, σε σωληνάρια χωρητικότητας 2 ml το υπερκείμενο, το οποίο έχει όγκο περίπου 430 µl, σύμφωνα με το στάδιο της λύσης που προηγήθηκε. Προστίθεται περίπου τριπλάσιος όγκος Trizol (≈1200 µl) και αφού γίνεται ανάδευση με το χέρι, τα δείγματα επωάζονται στον

πάγο για 5 λεπτά περίπου. Έτσι επιτρέπουμε τη πλήρη αποσύνδεση των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων.

Έπειτα προστίθεται χλωροφόρμιο σε αναλογία: 0.2 ml χλωροφόρμιο/1ml Trizol. Ανακινούνται πολύ καλά τα δείγματα και επωάζονται 2 με 3 λεπτά σε πάγο. Έπειτα φυγοκεντρώνονται σε 12.000rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Προκύπτουν έτσι δύο φάσεις. Η οργανική φάση στο κάτω μέρος και μία υδατική στο επάνω μέρος. Το RNA, χάρη στο χλωροφόρμιο συγκεντρώνεται μόνο στην υδατική φάση η οποία και συλλέγεται με προσοχή σε καθαρό σωληνάριο, φροντίζοντας να μην μείνουν ίχνη της οργανικής φάσης. Προστίθεται έπειτα ίσος όγκος χλωροφορμίου και κατόπιν ανάδευσης, γίνεται επώαση με αυτό στον πάγο για 5 λεπτά. Κατόπιν φυγοκεντρώνονται τα δείγματα σε 12.000rpm για 8 λεπτά στους 4°C.

Μετά τη συλλογή της υδατικής φάσης σε καθαρά σωληνάρια, προστίθεται 2.5 μl γλυκογόνου για κάθε δείγμα (50μg συνολικά). Το γλυκογόνο, συγκεντρώνει και κλείνει στη ζελατινώδη υφή του το RNA. Έπειτα προστίθεται οξικό νάτριο όγκου ίσου με το 1/10 του υπάρχοντος όγκου στα δείγματα. Το οξικό νάτριο, σε 1 λεπτό περίπου κατακρημνίζει τα νουκλεϊκά οξέα. Τέλος προστίθεται ισοπροπανόλη σε αναλογία 1/1 με τον όγκο της υδατικής φάσης. Τα δείγματα αναδεύονται και τοποθετούνται σε θερμοκρασία -80°C για 16 ώρες, ώστε να ολοκληρωθεί η κατακρήμνιση.

Μετά από το στάδιο αυτό, τα δείγματα φυγοκεντρώνονται σε 12.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Το RNA σχηματίζεται σε ζελατινώδη πελέτα. Αφαιρείται το υπερκείμενο και εφαρμόζονται στις πελέτες δύο πλύσεις με αιθανόλη 75% κάθε μία από τις οποίες ακολουθείται από ανάδευση και φυγοκέντρηση σε 12.000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Η αιθανόλη έχει την ιδιότητα να αφαιρεί τις προσμίξεις του RNA σε άλατα που

υπάρχουν. Μετά από τη τελευταία φυγοκέντρωση, αφαιρείται και η τελευταία αιθανόλη όσο το δυνατόν ακριβέστερα και αφήνονται οι πελέτες να στεγνώσουν.

3.2.7 Χρήση DNAase για την διάσπαση του DNA

Στο σημείο αυτό, η απομόνωση του RNA έχει ολοκληρωθεί. Ωστόσο, στη περίπτωση που η μοριακή μελέτη που θα ακολουθήσει επηρεάζεται από την ύπαρξη DNA, που μέρος του επίσης απομονώνεται με τη παραπάνω διαδικασία (κυρίως DNA χαμηλού μοριακού βάρους), απαιτείται να απαλλαγούμε από αυτό. Η ανάγκη αυτή υπήρχε στη παρούσα εργασία. Χρησιμοποιήθηκε έτσι, το ένζυμο της DNAάσης το οποίο θραυματοποιώντας το DNA, το καθιστά ανενεργό και «αόρατο» στις επόμενες μοριακές τεχνικές.

Υλικά-συσκευές:

1. DEPC νερό
2. DNάση (rDNase I συγκέντρωσης 2 units/μl, Ambion)
3. Ρυθμιστικό διάλυμα DNάσης (10X DNase buffer, Ambion)
4. Παράγοντας απενεργοποίησης της DNάσης (DNase inactivation reagent, Ambion)
5. Σωλήνρια τύπου eppendorf
6. Πιπέτες συλλογής υγρών και ρύγχη
7. Μηχάνημα φυγοκέντρωσης (eppendorf centrifuge)
8. Θερμική συσκευή επώασης

Μέθοδος:

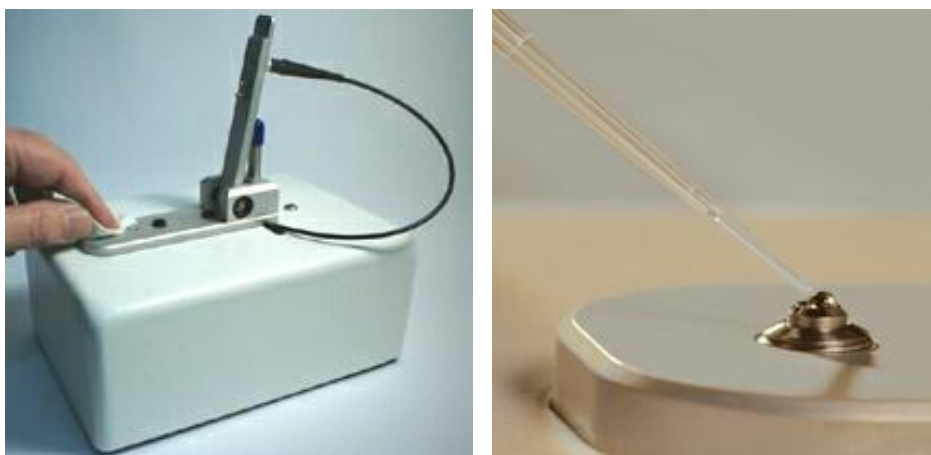
Αρχικά, διαλυτοποιείται η πελέτα σε 10 μl νερό. Προστίθεται έπειτα σε κάθε δείγμα, 1 μl του ρυθμιστικού διαλύματος και 1 μl του ενζύμου. Κατόπιν ανάδευσης, επωάζονται τα δείγματα στους 37°C για 30 λεπτά. Έπειτα προστίθενται 2 μl από τον παράγοντα απενεργοποίησης, ο οποίος αφήνεται να δράσει 3-4 λεπτά με ελαφριά

ανάδευση. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 2 λεπτά, σε 10.000rpm στους 4°C. Με αυτόν τον τρόπο, ο παράγοντας απενεργοποίησης, ο οποίος έχει λευκή μορφή και ρητινώδη υφή, μένει στο κάτω μέρος του σωληναρίου. Συλλέγεται σε σωληνάριο το μέρος που φέρει το RNA. Ο λόγος απομάκρυνσης της ρητίνης είναι ότι επηρεάζει τη μετέπειτα μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA στη φασματοφωτομετρική συσκευή.

3.2.8 Μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA και προσδιορισμός της καθαρότητας του με χρήση ειδικού φασματοφωτόμετρου (nanodrop)

Η ποσότητα του RNA που απομονώνεται με τις τεχνικές που αναφέρθηκαν παραπάνω, είναι σκόπιμο να προσδιοριστεί και επίσης να καθοριστεί ο βαθμός ύπαρξης άλλων προσμίξεων. Αυτό μπορεί να γίνει με τη βοήθεια ειδικής φασματοφωτομετρικής συσκευής- nanodrop (εικόνα 12).

Εικόνα 12 : Φασματοφωτόμετρο



Φασματοφωτόμετρο

Στο Εργαστήριο Βιολογίας του Καρκίνου, για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιείται η συσκευή Nanodrop spectrophotometer η οποία επιτρέπει τους παραπάνω υπολογισμούς σε εξαιρετικά μικρούς όγκους διαλυμάτων με επαρκή ακρίβεια. Η συσκευή αυτή, προσδιορίζει μεταξύ άλλων, 3 σημαντικές τιμές. Πρόκειται για α) τη

συγκέντρωση του RNA του μετρούμενου διαλύματος σε ng RNA/μl διαλύματος, β) τη τιμή του λόγου 260/280 γ) τη τιμή του λόγου 260/230. Τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν στα 260 nm. Οι πρωτεΐνες και ο αρωματικός δακτύλιος της φαινόλης, απορροφούν στα 260 αλλά και στα 280 nm όπου δεν απορροφούν τα νουκλεϊκά οξέα. Σε γενικές γραμμές, για να θεωρείται ένα δείγμα καθαρό θα πρέπει η απορρόφηση στα 260 να είναι σχεδόν διπλάσια αυτής στα 280. Ο λόγος δηλαδή απορρόφησης: OD260/OD280 όπου OD (optical density), πρέπει να είναι κατά το δυνατόν πλησιέστερα στο 2, ενώ ελάχιστο όριο αξιοπιστίας, (εμπιστοσύνης στο ότι η ποσότητα που μετρήθηκε αφορά νουκλεϊκά οξέα και όχι κάτι άλλο), τίθεται το 1.6. Στα 230 nm απορροφούν κυρίως άλατα και ανόργανες ενώσεις, οπότε πραγματοποιείται και ο έλεγχος αυτός.

Η διαδικασία της μέτρησης στη συσκευή είναι πολύ απλή και αυτοματοποιημένη. Ποσότητες διαλύματος όγκου 1-2 μl «φορτώνονται» στην ειδική επιφάνεια της συσκευής με τη μορφή σταγόνας (drop) και ακολουθεί η μέτρηση και η εμφάνιση των αντίστοιχων παραμέτρων. Βασικό σημείο της διαδικασίας, είναι ο «μηδενισμός» της συσκευής πριν από την έναρξη των μετρήσεων, χρησιμοποιώντας σταγόνα νερού απαλλαγμένη από νουκλεάσες και νουκλεϊκά οξέα.

Υλικά-συσκευές:

1. Συσκευή φασματοφωτομέτρησης Nanodrop και εγκατάσταση προγράμματος συσκευής σε H/Y
2. Πιπέτα και ρύγχη
3. Απορροφητικό χαρτί (kimwipes) με λεία επιφάνεια και υφή
4. Σωληνάριο με DEPC νερό (κατά προτίμηση εκείνο με το οποίο έγινε η επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας του RNA

Εικόνα 13



Μέτρηση στο Φασματοφωτόμετρο

Μέθοδος:

Αφού ανοίγεται το σύστημα της μέτρησης, τοποθετείται ποσότητα 1,5 μl DEPC νερού στην ειδική επιφάνεια της συσκευής και ενεργοποιείται η έναρξη των μετρήσεων. Μετά από καθαρισμό της επιφάνειας μέτρησης, επαναλαμβάνεται φόρτωμα νερού για να πραγματοποιηθεί η μέτρηση blanc δηλαδή η μέτρηση που «μηδενίζει» τη συσκευή θεωρώντας τιμή 0 αυτή που προκύπτει από τη μέτρηση αυτή και υπολογίζοντας τις επόμενες που θα ακολουθήσουν σύμφωνα με αυτή. Η διαδικασία αυτή διασφαλίζει ότι αν στο νερό με το οποίο αραιώθηκε το RNA υπήρχε «μόλυνση» σε νουκλεϊκά οξέα, αυτή δεν θα συνυπολογιστεί. Ακολουθούνται οι υπόλοιπες, κανονικές μετρήσεις μετρώντας με προσοχή ποσότητα 1,5 μl από την επιφάνεια του RNA. Μεταξύ των μετρήσεων των δειγμάτων στο nanodrop γίνεται μέτρηση και 1,5 μl DEPC νερού. Αυτό διασφαλίζει ότι η επιφάνεια της μέτρησης, απαλλάσσεται αποτελεσματικότερα από το προηγούμενο RNA οπότε δεν επηρεάζεται η τιμή της επόμενης.

3.2.9 *Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR*

(Polymerase Chain Reaction)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA ή RNA μεταξύ πολλών άλλων. Η βασική προϋπόθεση στη μέθοδο, είναι οι αλληλουχίες στα άκρα του πολλαπλασιαζόμενου τμήματος να είναι γνωστές. Η PCR πρακτικά, μπορεί να εφαρμοστεί σε οποιαδήποτε δείγμα περιέχει νουκλεϊκά οξέα. Έτσι είναι δυνατή στη περίπτωση βιολογικών υγρών, φρέσκων ή παραφρινοποιημένων ιστών, κατεψυγμένων ιστών, ευκαρυωτικών ή προκαρυωτικών κυττάρων, ακόμη και σε «αρχαία» δείγματα που μπορεί να φέρει στο φως η Παλαιοντολογία.

Η μέθοδος, έχει μία σειρά διαφορετικών εφαρμογών που εκτός των άλλων εξαρτώνται και από το είδος του νουκλεϊκού οξέως. Έτσι, ο πολλαπλασιασμός γενομικού DNA χρησιμοποιείται για τη κλωνοποίηση τμημάτων DNA, την εύρεση μεταλλάξεων, την αλληλούχηση, σε συγκριτικές μελέτες, στο προσδιορισμό αλληλομόρφων, στη διάγνωση και τη μελέτη της πορείας ασθενών κλπ. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η ποσοτική PCR και επίσης ενδιαφέρον έχει η εφαρμογή της στην εγκληματολογία και στη διεξαγωγή τεστ συγγένειας. Μερικές από τις εφαρμογές της μεθόδου σε RNA ή cDNA (συμπληρωματικό DNA) είναι η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση μεταγράφων που γίνεται με τη PCR πραγματικού χρόνου ή Real Time PCR, ή σύγκριση μεταγραφικών προτύπων, η κλωνοποίηση ακέραιου cDNA, η *in situ* (εν τόπω) PCR και άλλες.

Ο πολλαπλασιασμός του επιθυμητού τμήματος, γίνεται σε επαναλαμβανόμενους χρονικά, πανομοιότυπους κύκλους μετά από το πέρας των οποίων κάθε φορά, διπλασιάζεται ο αριθμός των αντιγράφων του προηγούμενου κύκλου. Ισχύει η σχέση

$N=N_0 \cdot (1+\alpha/100)^n$ όπου N ο θεωρητικός αριθμός αντιγράφων σε κάθε κύκλο, N_0 ο αρχικός αριθμός τους και n ο αριθμός των κύκλων. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει θερμοκρασιακές διακυμάνσεις υψηλής ή λιγότερο υψηλής θερμοκρασίας κατά τις οποίες οι έλικες των νουκλεϊκών οξέων ανοίγουν ή κλείνουν αντίστοιχα. Η διαδικασία δεν συνεχίζεται επ' άπειρων καθώς η αντίδραση αυτή επηρεάζεται από περιοριστικούς παράγοντες όπως ο χρόνος ζωής του χρησιμοποιούμενου ενζύμου, ή η επάρκεια ποσότητας και ποιότητας εκκινητών και ελεύθερων νουκλεοτιδίων.

Για τις ανάγκες της εργασίας αυτής, χρησιμοποιήθηκαν δύο εφαρμογές της τεχνολογίας PCR. Πρόκειται για την «αντίστροφη μεταγραφή-PCR» (reverse transcription PCR) ή RT PCR και τη «PCR πραγματικού χρόνου» (real time PCR).

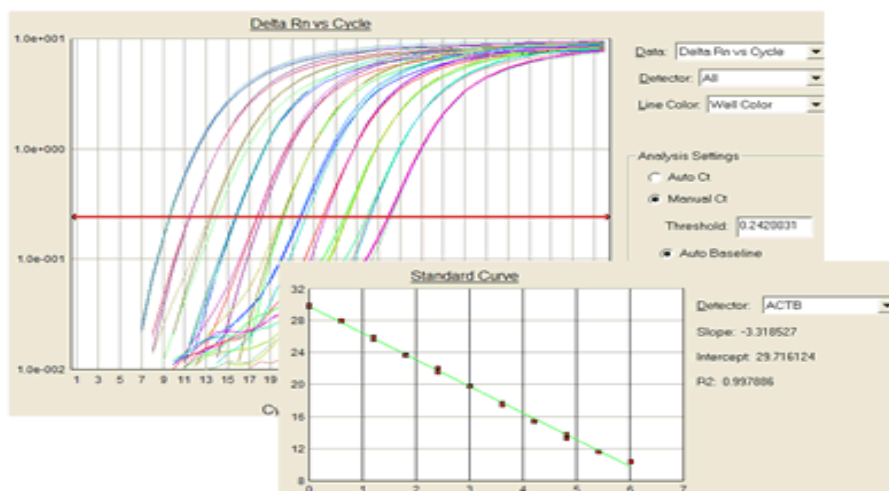
Στην RT-PCR, αφού γίνει απομόνωση ολικού RNA, απομακρύνεται το γενομικό DNA με DNAση και ακολουθεί αντίστροφη μεταγραφή του με oligo-dT, τυχαία εξαμερή ή ειδικούς εκκινητές. Τέλος, ακολουθεί η PCR στο cDNA προϊόν η οποία είναι ειδική για ένα γονίδιο.

Στη κλασσική PCR, η ανίχνευση του προϊόντος γίνεται στο τελευταίο σημείο. Στις ποσοτικές συγκρίσεις η ακρίβεια είναι μικρή, όπως και η ευαισθησία, δεν υπάρχει αυτοματοποιημένη εξαγωγή αριθμητικών αποτελεσμάτων και απαιτούνται στάδια μετά το τέλος της μεθόδου, πράγμα που τη καθιστά χρονοβόρο διαδικασία και επιρρεπή σε μολύνσεις. Τα παραπάνω δημιούργησαν την ανάγκη μίας PCR με μεγαλύτερη ευαισθησία και ικανότητα ανίχνευσης πριν το τελικό σημείο και μάλιστα στην εκθετική φάση όπου υπάρχει γραμμική σχέση της ποσότητας του προϊόντος με τη ποσότητα του εκμαγείου. Η ανίχνευση του προϊόντος ώστε να συσχετιστεί με τη ποσότητα του εκμαγείου, έγινε χάρη σε χρωστικές και την ιδιότητα του φθορισμού. Η τροποποιημένη αυτή PCR ονομάστηκε real time-PCR.

Η ποσοτικοποίηση στη PCR αυτή γίνεται με τη μελέτη των Cq (quantification cycle). Ως Cq ορίζεται ο κλασματικός αριθμός κύκλων όπου ο φθορισμός μίας αντίδρασης τέμνει τη γραμμή-κατώφλι (threshold). Η γραμμή αυτή τοποθετείται στην εκθετική φάση της PCR λίγο πάνω από την εικόνα του background, όπως φαίνεται στο διάγραμμα της καμπύλης πολλαπλασιασμού στην αντίδραση αυτή. Η ποσοτικοποίηση μπορεί να είναι σχετική ή απόλυτη. Στη σχετική ποσοτικοποίηση, η τελευταία γίνεται σύμφωνα με μία δεδομένη ποσότητα αναφοράς. Η απόλυτη γίνεται με δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς μεταξύ του δεκαδικού λογαρίθμου της ποσότητας του DNA και των Cq για διαδοχικές γνωστές ποσότητες cDNA. Η κλίση της ευθείας δίνει την απόδοση ενώ το R2 πρέπει να προσεγγίζει τη τιμή 1.

Η RT-qPCR χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία και ακρίβεια, εξαλείφει στάδια επεξεργασίας μετά τη PCR, υπάρχει μικρός χρόνος της αντίδρασης και γίνονται μαζικές αναλύσεις. Έτσι, η RT-qPCR χρησιμοποιείται σε πλήθος εφαρμογών όπως η μελέτη ιϊκού και μικροβιακού φορτίου, η μέτρηση των αντιγράφων περιοχών DNA σε γονιδιώματα, η διάκριση αλληλομόρφων και πολυμορφισμών και σε ποσοτικές μελέτες γονιδιακής έκφρασης (εικόνα 14).

Εικόνα 14



RT-qPCR

Ανάστροφη Μεταγραφή

Υλικά-συσκευές:

1. Συσκευή RT PCR θερμικού κυκλοποιητή (thermal cycler)
2. Σωλήνρια τύπου erpendorf
3. Πιπέτες συλλογής υγρών και ρύγχη
4. Σωληνάρια ενωμένα σε οκτάδες μικρού μεγέθους
5. dNTPs
6. Τυχαίοι εκκινητές (random primers)
7. Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης
8. DTT
9. Απενεργοποιητής RNAσών (RNase out)
10. Ενζυμο αντίδρασης (superscript III)
11. DEPC νερό
12. Εμπορικό RNA για χρήση ως calibrator (Liver, Breast, UPE)

Μέθοδος:

Αρχικά, τοποθετούνται στα ειδικά σωληνάρια οι ποσότητες του RNA σε καθαρή μορφή, απαλλαγμένο από γενωμικό DNA. Τοποθετείται ανά δείγμα συνολικός όγκος 50ng/γονίδιο που μελετήθηκε και επιπλέον η απαραίτητη ποσότητα DEPC νερού για να συμπληρωθεί ο όγκος έως τα 10 μl. Υπάρχει πάντα και ένα δείγμα μόνο με νερό σε κάθε οκτάδα, (δείγμα RT-) χωρίς RNA από το οποίο δεν ανιχνεύεται πολλαπλασιασμός (αρνητικός μάρτυρας) σε επόμενους χειρισμούς όπως η ηλεκτροφόρηση ή η Real Time-PCR. Επίσης στην αντίδραση, χρησιμοποιούμε RNA από φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς ώστε να μπορεί να γίνει εκτίμηση της ανάστροφης μεταγραφής και ποσοτικοποίηση των γονιδίων του ενδιαφέροντος. Τα δείγματα αυτά θέτουν τη βάση σύγκρισης (calibrators). Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ως calibrators 2 διαφορετικά εμπορικά RNA (liver, lung) σε ποσότητες: Liver: 1μg (1μl Liver+ 9 μl DEPC), Lung: 1μg (1μl Liver + 9 μl DEPC).

Κατόπιν, ετοιμάζεται ένα συνολικό μίγμα από τα dNTPs και τους random primers (εξαμερή), υπολογίζοντας 500 μM για κάθε dNTPs και 250ng random hexamers ανά αντίδραση. Προστίθενται 2 μl από αυτό σε κάθε δείγμα RNA καθώς και στον αρνητικό μάρτυρα. Τα δείγματα τοποθετούνται στη συσκευή για 5 λεπτά στους 65°C. Στο διάστημα αυτό προετοιμάζεται ένα δεύτερο μίγμα για το οποίο υπολογίζεται ανά δείγμα: 4μl ρυθμιστικού διαλύματος 5x, 1 μl 0.1 M DTT(10mM ανά αντίδραση), 1μl RNase out (32.6 Units ανά αντίδραση) και 1 μl superscript III. Μετά τα 5 λεπτά προστίθενται σε κάθε δείγμα 7 μl από το μίγμα περίπου. Ακολουθούν οι επόμενοι κύκλοι με θερμοκρασίες κατάλληλες για τη 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 έως τη real Time-PCR.

Ποσοτική REAL TIME PCR (RT-qPCR αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο)

Υλικά-συσκευές (εικόνα 15):

1. Συσκευή Real Time PCR με το κατάλληλο λογισμικό σε υπολογιστή AB Prism 7900
2. Πλαστικά «πιάτα» υποδοχής δειγμάτων (plates)
3. Πιπέτες συλλογής υγρών και ρύγχη
4. Σωληνάρια ενωμένα σε οκτάδες μικρού μεγέθους
5. Μίγμα ποσοτικής PCR (Qiagen real time PCR mix)
6. Εκκινητές των γονιδίων που θα εξεταστούν (10 μM)
7. Ανιχνευτές (probes) των γονιδίων που θα εξεταστούν
8. DEPC νερό

Εικόνα 15



ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System

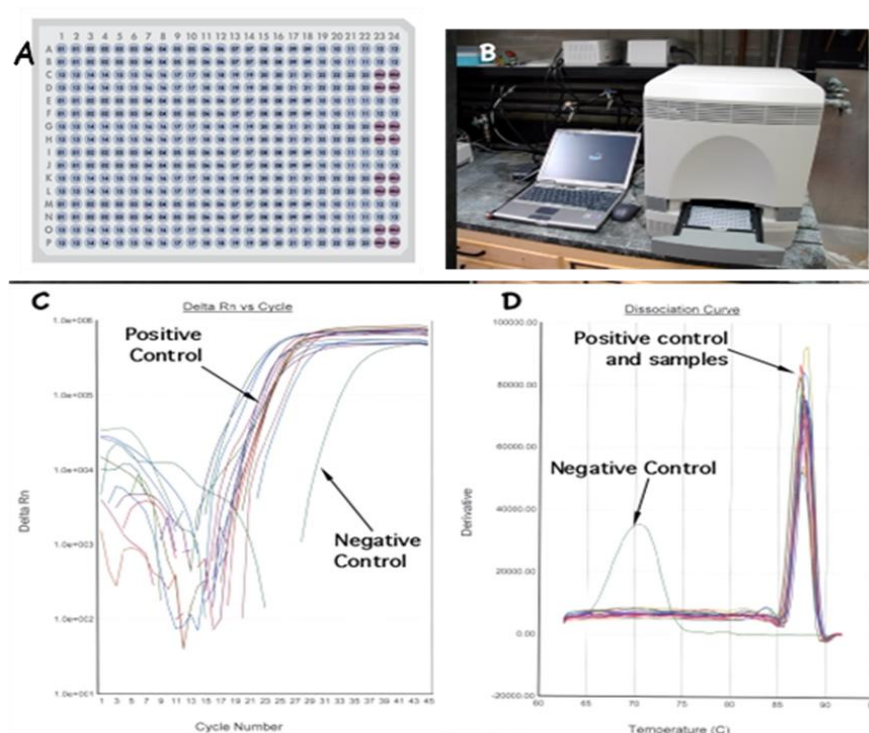
Μέθοδος:

Για τη ποσοτική real time PCR, 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 (2x Taqman Master Mix), 1,25 μl από κάθε έναν από τους 2 εκκινητές (1μM ανά αντίδραση), 0,50 μl από κάθε έναν από τους 2 probe (0.33μM ανά αντίδραση) και 0,75 μl νερού για κάθε δείγμα.

Κάθε δείγμα cDNA συμπεριλαμβανομένων και των calibrators και του αρνητικού μάρτυρα της RT PCR εξετάστηκε ως προς την έκφραση των γονιδίων: BRCA1, ERCC1, ATP7B, PKM2, TOPO-I, TOPO-IIA, TOPO-IIB και C-MYC και B-ACTIN (β-ακτίνη) και PGK1 (Φωσφογλυκερική κινάση 1). Το γονίδιο της β-ακτίνης και της PGK1 επειδή έχουν γνωστό πρότυπο έκφρασης χρησιμοποιούνται συχνά στη μέθοδο της real time PCR στον ρόλο του γονιδίου-μάρτυρα με το οποίο θα συγκριθούν τα πρότυπα έκφρασης των υπόλοιπων γονιδίων. Οι calibrators αραιώνονται ώστε να έχουν συγκέντρωση 10ng/2,5μl. Εξετάζονται επίσης και δείγματα RNA των ασθενών ώστε από τον μηδενικό πολλαπλασιασμό τους στη real time PCR να επιβεβαιωθεί ότι τα εξεταζόμενα cDNA ήταν απαλλαγμένα από μόλυνση με γενομικό DNA εξωγενούς προέλευσης που ίσως πρόσθεσε η διαδικασία. Κάθε δείγμα εξετάζεται για κάθε γονίδιο 3 φορές σε 3 διαφορετικές υποδοχές του ειδικού πιάτου ώστε να ελέγχεται η επαναληψιμότητα του αποτελέσματος. Η αραιώσεις των δειγμάτων γίνονται έτσι ώστε να επαρκεί το υλικό του cDNA για όλες τις θέσεις-αντιδράσεις. Η διαδικασία του «φορτώματος» στο ειδικό πιάτο (plate) των μιγμάτων της αντίδρασης και των cDNA γίνεται σε συνθήκες που να αποτρέπουν κατά το δυνατόν τις μολύνσεις των δειγμάτων από το εξωτερικό περιβάλλον και μεταξύ τους και επίσης σε χαμηλή θερμοκρασία. Μετά το φόρτωμα των επιθυμητών δειγμάτων, ακολουθεί η real time

PCR. Ο θερμοκρασιακός κύκλος είναι: 50° C για 2 λεπτά-95° C για 10 λεπτά-95° C για 15 δευτ.-60° C για 1 λεπτό (εικόνα 16).

Εικόνα 16



Διαδικασία RT-qPCR

Από τις τιμές Cq της έκφρασης που υπολογίζονται από το πρόγραμμα, ακολουθεί η ανάλυση των αποτελεσμάτων (της σχετικής έκφρασης κάθε γονιδίου) με την μέθοδο $\Delta\Delta C_t$ στην οποία εφαρμόζεται ο τύπος: ποσότητα έκφρασης γονιδίου = $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Στη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης είναι απαραίτητη πριν από την έναρξη της μελέτης, η εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των εκκινητών και του ιχνηθέτη. Στη παρούσα μελέτη ελέγχθηκε η γραμμικότητα μεταξύ της ποσοτικοποίησης των γονιδίων στόχων (*BRCA1*, *ERCCL1*, *ATP7B*, *PKM2*, *TOPO-I*, *TOPO-IIA*, *TOPO-IIB*

και *C-MYC*) και των γονιδίων αναφοράς (*β-ACTIN* και *PGK1*) ώστε τα αποτελέσματα από τη συγκριτική μελέτη της έκφρασης των γονιδίων να είναι αξιόπιστα.

Όλοι οι εκκινητές και ανιχνευτές σχεδιάστηκαν ώστε ένας από αυτούς (κατά προτίμηση ο ανιχνευτής) να βρίσκεται σε περιοχή σύνδεσης δύο εξωνίων ώστε να αποφεύγεται ο πολλαπλασιασμός γενομικού DNA. Οι ιχνευτές είναι σημασμένοι με φθοριούχα μόρια (FAM) 5' άκρο και αναστολέα τους (TAMRA) στο 3' άκρο. Το Tm όλων των εκκινητών και το Tm των ιχνευτών είναι τα ίδια για να μπορεί να γίνει η PCR για όλα τα γονίδια με την ίδια δραστηριότητα στην ίδια αντίδραση. Το Tm των ιχνευτών σχεδιάζεται να είναι 10°C υψηλότερο από αυτό των εκκινητών για να διευκολυνθεί η πρόσδεση τους στο υπόστρωμα. Για τη κατασκευή τους επιλέγεται η τεχνολογία MGB που δίνει υψηλό Tm με μικρότερο εύρος βάσεων ώστε να επιτευχθεί όσο το δυνατόν μικρότερο amplicon. Τέλος διενεργείται έρευνα στη βάση BLAST για να τεκμηριωθεί η ειδικότητα των εκκινητών και των ιχνευτών που σχεδιάστηκαν.

Οι εκκινητές και ανιχνευτές των γονιδίων στην παρούσα μελέτη ήταν:

<i>B-ACTIN</i>	Πρόσθιος εκκινητής:	5'-GGC ACC CAG CAC AAT GAA G-3'
	Οπίσθιος εκκινητής:	3'-GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT-3'
	Ανιχνευτής:	5' TCA AGA TCA TTG CTC CTC CTG AGC GC-3'
<i>PGK1</i>	Πρόσθιος εκκινητής:	5'- GGCTGGATGGGCTTGGA -3'
	Οπίσθιος εκκινητής:	5'-TCTGCTTAGCCCGAGTGACA-3'
	Ανιχνευτής:	5-TGTGGTCCTGAAAGCAGCAAGAAGTATGC-3'
<i>BRCAl</i>	Πρόσθιος εκκινητής:	5'-GGC TAT CCT CTC AGA GTG ACA TTT TA-3'
	Οπίσθιος εκκινητής:	5'-GCT TTA TCA GGT TAT GTT GCA TGG T-3'
	Ανιχνευτής:	5'-CCA CTC AGC AGA GGG-3'
<i>ERCCI</i>	Πρόσθιος εκκινητής:	5'-GGG AAT TTG GCG ACG TAA TTC-3'

	Οπίσθιος εκκινητής:	5'-GCG GAG GCT GAG GAA CAG-3'
	Ανιχνευτής:	5'-CAC AGG TGC TCT GGC CCA GCA CAT A-3'
PKM2	Πρόσθιος εκκινητής:	5'-GCC ATA ATC GTC CTC ACC AAG T-3'
	Οπίσθιος εκκινητής:	5'-GCA CGT GGG CGG TAT CTG-3'
	Ανιχνευτής:	5'-CAG GTC TGC TCA CCA GG -3'
MYC	Πρόσθιος εκκινητής:	5'-GAG CCC CTG GTG CTC CAT-3'
	Οπίσθιος εκκινητής:	5'-TCA TCT TCT TGT TCC TCC TCA GAG T-3'
	Ανιχνευτής:	5'-AGG AGA CAC CGC CCA C-3'
ATP7B	Πρόσθιος εκκινητής:	5'-CAT CCT GTG TGT CTA ACA TAG AAA GGA-3'
	Οπίσθιος εκκινητής:	5'-AGG CAA CCA ACA CGG AGA GA-3'
	Ανιχνευτής:	5'- CTG CAG AAA GAA GCT GGT-3'
TOPO-I	Πρόσθιος εκκινητής:	5'-GAG AGC TGT AGC CCT GTA CTT CAT C-3'
	Οπίσθιος εκκινητής:	5'- CAG TGT CCG CTG TTT CTC CTT -3'
	Ανιχνευτής:	5'-CAA GCT TGC TCT GAG AGC AGG CAA TG-3'
TOPO-IIA	Πρόσθιος εκκινητής:	5'-CAG AGC TTC CCG TCA GAA CAT-3'
	Οπίσθιος εκκινητής:	5'-GTG CCA TTC AAC ATG GGT TCT A-3'
	Ανιχνευτής:	5'- TGC AAT TCA TTC CTA CAT CTT CAT C-3'
TOPO-IIB	Πρόσθιος εκκινητής:	5'- TAT ATT GGG TCA GTG GAG CCA TT-3'
	Οπίσθιος εκκινητής:	5'- TGC AAT TCA TTC CTA CAT CTT CAT C-3'
	Ανιχνευτής:	5'-CGC AGT TCA TGT GGG TG-3'

3.3 Στατιστική ανάλυση

Ο υπολογισμός της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων έγινε τόσο με βάση τη διάμεση τιμή όσο και την ανάλυση σε τριτημόρια. Fisher's exact test χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη συγκρίσεων σε πίνακες 2X2 ενώ το χ^2 test για μελέτη συγκρίσεων σε πίνακες μεγαλύτερους από 2x2. Η συσχέτιση της συν-έκφρασης των διαφόρων γονιδίων έγινε με βάση το Spearman correlation coefficient test για μη παραμετρικές μεταβλητές. Mann-Whitney t-test χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη

συσχέτισης μεταξύ συνεχών μεταβλητών (π.χ. γονιδιακή έκφραση) και κατηγορικών μεταβλητών (π.χ. φύλο, εντόπιση όγκου, είδος μεταστάσεων, αρχικό στάδιο διάγνωσης). Logistic regression ανάλυση χρησιμοποιήθηκε για την ανάδειξη στατιστικά σημαντικών παραγόντων στη μονοπαραγοντική ανάλυση. Πολυπαραγοντική ανάλυση με Cox's proportional hazards πραγματοποιήθηκε για την ανάδειξη της σημαντικότητας των στατιστικά σημαντικών παραγόντων στη πολυπαραγοντική ανάλυση σε σχέση με την ανταπόκριση, το διάστημα έως την υποτροπή και την ολική επιβίωση. Το διάστημα έως την υποτροπή και η συνολική επιβίωση των ασθενών εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο Kaplan-Meier. Για όλα τα test το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε σαν $p=0.05$.

3.4 Αποτελέσματα

3.4.1 Αποτελέσματα mRNA έκφρασης των υπό εξέταση γονιδίων και συσχετίσεις μεταξύ αυτών

Η μέση τιμή mRNA έκφρασης για κάθε ένα γονίδιο που εξετάστηκε στην παρούσα μελέτη παρουσιάζεται λεπτομερώς στον πίνακα 9.

Πίνακας 9: Τιμές mRNA έκφρασης των υπό εξέταση γονιδίων

		Συνολικός πληθυσμός ασθενών	Περιορισμένο στάδιο νόσου	Εκτεταμένο στάδιο νόσου	Τιμή p
	Απόλυτος αριθμός (%)	184 (100)	64 (35)	120 (52)	
BRCA1	Μέση τιμή έκφρασης	6.99	6.89	7.01	0.81
	Εύρος	0.26-44.04	0.26-42.15	0.52-44.04	
	Επιτυχής εκτίμηση mRNA έκφρασης	113 (61.4)	40 (32.5)	73 (61)	
	Υψηλή έκφραση	56 (49.5)	21(52.5)	35 (47.9)	

	<i>Χαμηλή έκφραση</i>	57 (50.5)	19(47.5)	38 (52.1)	
ERCC1	<i>Μέση τιμή έκφρασης</i>	12.27	11.49	12.51	0.76
	<i>Εύρος</i>	0.02-273.77	0.02-216.7	0.29-273.77	
	<i>Επιτυχής εκτίμηση mRNA έκφρασης</i>	160 (87)	54 (84.4)	106 (88)	
	<i>Υψηλή έκφραση</i>	82 (51)	28 (52)	54 (51)	
	<i>Χαμηλή έκφραση</i>	78 (49)	26 (48)	52 (49)	
PKM2	<i>Μέση τιμή έκφρασης</i>	20.46	20.23	20.54	1.0
	<i>Εύρος</i>	6.5-117.22	6.5-115.42	6.82-111.22	
	<i>Επιτυχής εκτίμηση mRNA έκφρασης</i>	167 (91)	59 (93)	108 (90)	
	<i>Υψηλή έκφραση</i>	85 (51)	30 (51)	55 (51)	
	<i>Χαμηλή έκφραση</i>	82 (49)	29 (49)	53 (49)	
MYC	<i>Μέση τιμή έκφρασης</i>	0.33	0.35	0.33	1.0
	<i>Εύρος</i>	0.01-21.33	0.01-21.33	0.02-20.87	
	<i>Επιτυχής εκτίμηση mRNA έκφρασης</i>	83 (45.1)	32 (50)	51 (42.5)	
	<i>Υψηλή έκφραση</i>	41 (49.3)	16(50)	25 (49)	
	<i>Χαμηλή έκφραση</i>	42 (50.7)	16(50)	26 (51)	
ATP7B	<i>Μέση τιμή έκφρασης</i>	0.4	0.37	0.42	0.69
	<i>Εύρος</i>	0.01-1.87	0.01-1.54	0.03-1.87	
	<i>Επιτυχής εκτίμηση mRNA έκφρασης</i>	76 (41.3)	25 (39)	51 (42.5)	
	<i>Υψηλή έκφραση</i>	38 (50)	13(52)	25 (49)	
	<i>Χαμηλή έκφραση</i>	38 (50)	12(48)	26 (51)	
TOPO-I	<i>Μέση τιμή έκφρασης</i>	2.12	2.23	2.04	0.83
	<i>Εύρος</i>	1.02-26.12	1.02-26.12	1.09-21.98	
	<i>Επιτυχής εκτίμηση mRNA έκφρασης</i>	113 (61.4)	40 (62.5)	73 (61)	
	<i>Υψηλή έκφραση</i>	58 (51.3)	20(50)	38 (52)	

	<i>Χαμηλή έκφραση</i>	55 (48.7)	20(50)	35 (48)	
TOPO-IIA	<i>Μέση τιμή έκφρασης</i>	68.38	66.16	70.41	0.57
	<i>Εύρος</i>	4.43-226.3	4.43-211.5	4.82-226.3	
	<i>Επιτυχής εκτίμηση mRNA έκφρασης</i>	170 (92)	56 (87.5)	55 (46)	
	<i>Υψηλή έκφραση</i>	88 (52)	30 (53,6)	58 (51)	
	<i>Χαμηλή έκφραση</i>	82 (48)	26 (46.4)	56 (49)	
TOPO-IIB	<i>Μέση τιμή έκφρασης</i>	10.96	10.63	11.24	0.81
	<i>Εύρος</i>	2.14-103.28	2.02-101.54	2.14-103.28	
	<i>Επιτυχής εκτίμηση mRNA έκφρασης</i>	171 (93)	60 (94)	111 (93)	
	<i>Υψηλή έκφραση</i>	88 (51)	28 (46.7)	60 (54)	
	<i>Χαμηλή έκφραση</i>	83 (49)	32 (53.3)	51 (46)	

Η συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση διαφόρων γονιδίων επιβεβαίωσε το βιολογικό υπόβαθρο της επιλογής μας να εξετάσουμε τα συγκεκριμένα γονίδια σε αυτή τη νόσο. Σημαντική συσχέτιση βρήκαμε ανάμεσα στην έκφραση των *PKM2* και *C-MYC* ($r= 0.21$; $p= 0.015$), *BRCA1* και *ERCC1* ($r= 0.65$; $p<0.001$), *TOPO-I* και *TOPO-IIA* ($r= 0.40$; $p<0.001$), *TOPO-I* και *TOPO-IIB* ($r= 0.26$; $p= 0.002$), και μεταξύ *TOPO-IIA* και *TOPO-IIB* ($r= 0.67$; $p<0.001$). Δεν καταφέραμε να αναδείξουμε καμία σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στις τιμές έκφρασης των γονιδίων και στα κύρια κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών όπως στάδιο νόσου, φύλο, γενική κατάσταση (PS) και τιμές γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH).

3.4.2 Τιμές έκφρασης γονιδίων και έκβαση ασθενών

Όταν προσπαθήσαμε να συσχετίσουμε την mRNA έκφραση των γονιδίων με την έκβαση του συνολικού πληθυσμού των ασθενών (περιορισμένο και εκτεταμένο στάδιο νόσου), καμία σημαντική συσχέτιση δεν ανεδείχθη ανάμεσα στην έκφραση

των γονιδίων που μελετήσαμε και το ελεύθερο νόσου διάστημα ή την επιβίωση των ασθενών (πίνακας 10).

Πίνακας 10: Συνολικός πληθυσμός ασθενών: Σύγκριση ανάμεσα στην έκφραση των γονιδίων και το διάστημα ελεύθερο νόσου και την επιβίωση των ασθενών

<i>Γονίδιο</i>	<i>Διάστημα ελεύθερο νόσου (μήνες)</i>			<i>Συνολική επιβίωση (μήνες)</i>		
	<i>Μέσο</i>	<i>95% CI (Διάστημα εμπιστοσύνης)</i>	<i>Τιμή p</i>	<i>Μέση</i>	<i>95% CI (Διάστημα εμπιστοσύνης)</i>	<i>Τιμή p</i>
<i>BRCA1</i>						
Χαμηλή έκφραση	6.1	5.28-6.71	0.71	9.2	6.4-11.2	0.78
Υψηλή έκφραση	5.2	3.87-6.13		8.6	5.9-10.8	
<i>ERCC1</i>						
Χαμηλή έκφραση	6.3	5.13-7.42	0.49	9.4	6.6-11.8	0.27
Υψηλή έκφραση	5.8	4.77-6.86		8.2	5.4-10.3	
<i>PKM2</i>						
Χαμηλή έκφραση	6.0	4.59-7.41	0.44	9.3	6.5-11.7	0.36
Υψηλή έκφραση	4.0	2.68-5.31		8.6	5.8-11.0	
<i>MYC</i>						
Χαμηλή έκφραση	6.0	4.23-7.77	0.18	9.1	6.5-11.0	0.41
Υψηλή έκφραση	4.0	2.58-5.42		8.8	6.1-10.9	
<i>ATP7B</i>						
Χαμηλή έκφραση	6.0	4.9-7.1	0.79	9.0	6.3-10.7	0.90
Υψηλή έκφραση	6.0	4.29-7.7		9.0	6.2-11.2	
<i>TOPO-I</i>						
Χαμηλή έκφραση	6.0	4.29-7.7	0.34	9.2	6.4-10.8	0.62
Υψηλή έκφραση	5.1	3.77-6.23		8.7	6.2-10.7	
<i>TOPO-IIA</i>						
Χαμηλή έκφραση	6.1	4.64-7.36	0.13	9.2	6.4-11.0	0.60
Υψηλή έκφραση	4.0	2.77-5.23		8.7	6.3-10.5	
<i>TOPO-IIβ</i>						
Χαμηλή έκφραση	6.2	4.73-7.27	0.41	9.6	6.9-11.4	0.23
Υψηλή έκφραση	3.8	2.77-5.22		8.5	6.1-10.6	

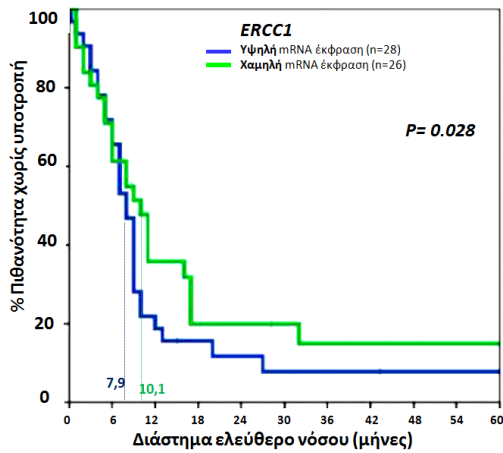
Όμως όταν εξετάσαμε ξεχωριστά τους ασθενείς με περιορισμένη και εκτεταμένη νόσο σημαντικές συσχετίσεις ανεδείχθησαν ανάμεσα στην έκφραση των γονιδίων και την έκβαση των ασθενών.

Συγκεκριμένα, στην ομάδα των ασθενών με περιορισμένη νόσο, μικρότερο μέσο ελεύθερο νόσου διάστημα διαπιστώθηκε για όσους είχαν υψηλή mRNA έκφραση των γονιδίων *ERCC1* (7.9 έναντι 10.1 μηνών; $p = 0.028$), *PKM2* (7.1 έναντι 9.0 μηνών; $p = 0.046$), *TOPO-I* (7.8 έναντι 10.2 μηνών; $p = 0.008$), *TOPO-IIA* (7 έναντι 9.3 μηνών; $p = 0.002$) και *TOPO-IIB* (6.6 έναντι 9.1 μηνών; $p < 0.001$) σε σύγκριση με τους ασθενείς με χαμηλή mRNA έκφραση των ίδιων γονιδίων (Πίνακας 11 και διαγράμματα 1A-1E). Δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην mRNA των γονιδίων *BRCA1*, *MYC* και *ATP7B* και το ελεύθερο νόσου διάστημα για το περιορισμένο στάδιο MKΠ.

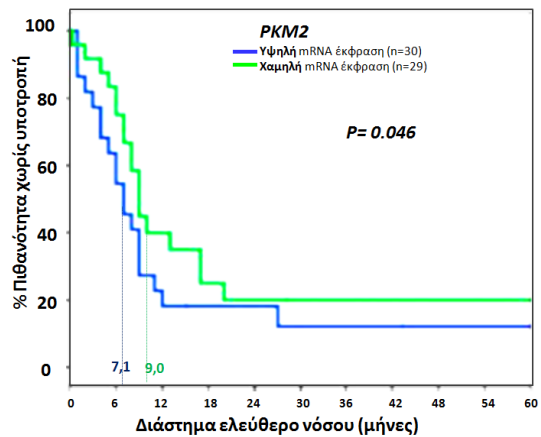
Πίνακας 11: Περιορισμένο στάδιο νόσου: Συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση των γονιδίων και το διάστημα ελεύθερο νόσου και την επιβίωση των ασθενών

Γονίδιο	Διάστημα ελεύθερο νόσου (μήνες)			Συνολική επιβίωση (μήνες)		
	Μέσο	95% CI (Διάστημα εμπιστοσύνης)	Τιμή p	Μέση	95% CI (Διάστημα εμπιστοσύνης)	Τιμή p
<i>BRCA1</i>						
Χαμηλή έκφραση	9.0	7.4-11.9	0.84	15.6	10.9-21.1	0.38
Υψηλή έκφραση	8.2	6.2-9.8		13.8	10.1-17.8	
<i>ERCC1</i>						
Χαμηλή έκφραση	10.1	7.5-10.4	0.028	19.1	16.5-21.6	0.014
Υψηλή έκφραση	7.9	6.6-9.3		13.2	9.7-16.3	
<i>PKM2</i>						
Χαμηλή έκφραση	9.0	7.4-10.5	0.046	18.0	15.6-25.4	0.026
Υψηλή έκφραση	7.1	4.6-8.9		12.0	6.9-14.1	
<i>MYC</i>						
Χαμηλή έκφραση	8.9	7.2-10.7	0.092	17.8	13.7-26.1	0.095
Υψηλή	7.3	4.8-9.1		12.2	6.2-16.7	

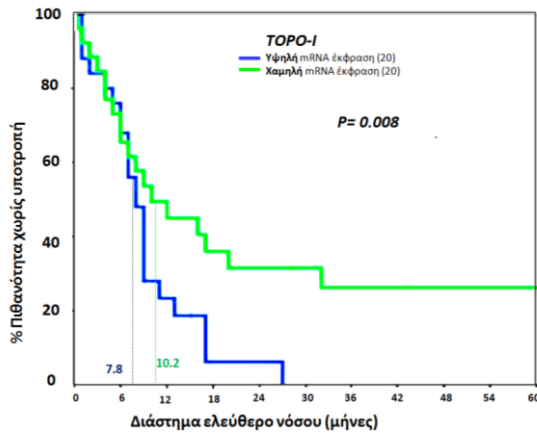
έκφραση						
ATP7B						
Χαμηλή έκφραση	9.0	7.6-11.1	0.93	15.3	10.6-21.0	0.91
Υψηλή έκφραση	8.8	7.3-10.7		14.8	10.3-20.7	
TOPO-I						
Χαμηλή έκφραση	7.8	6.6-8.3	0.008	13.9	9.0-19.1	0.41
Υψηλή έκφραση	10.2	7.9-16.2		16.1	9.8-22.2	
TOPO-IIA						
Χαμηλή έκφραση	7.0	4.6-7.4	0.002	18.3	12.8-23.2	0.021
Υψηλή έκφραση	9.3	7.7-10.9		13.0	7.8-17.1	
TOPO-IIB						
Χαμηλή έκφραση	6.6	4.2-8.7	<0.001	18.4	16.4-21.8	0.019
Υψηλή έκφραση	9.1	7.9-11.5		12.8	9.6-16.7	



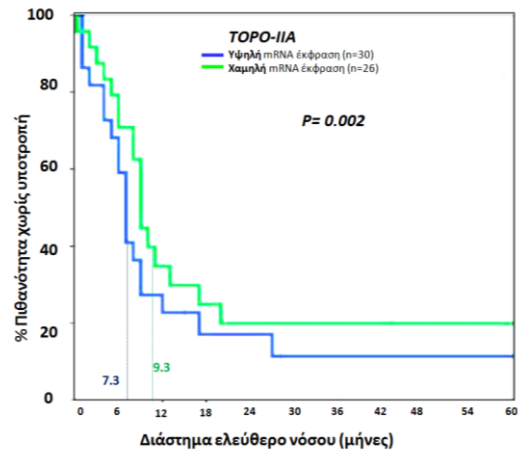
Διάγραμμα 1A: Επίπεδα mRNA έκφρασης *ERCC1* και ελεύθερο νόσου διάστημα στο ΜΚΠ περιορισμένου σταδίου



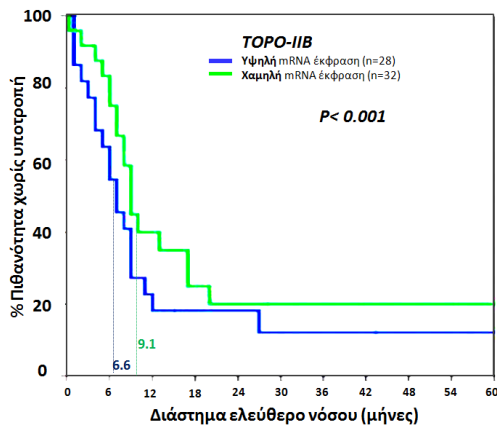
Διάγραμμα 1B: Επίπεδα mRNA έκφρασης *PKM2* και ελεύθερο νόσου διάστημα στο ΜΚΠ περιορισμένου σταδίου



Διάγραμμα 1Γ: Επίπεδα mRNA έκφρασης *TOPO-I* και ελεύθερο νόσου διάστημα στο ΜΚΠ περιορισμένου σταδίου

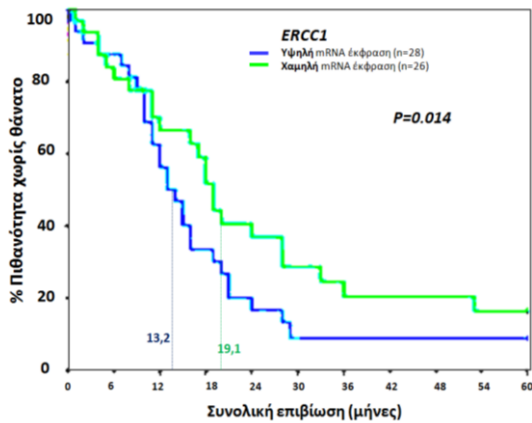


Διάγραμμα 1Δ: Επίπεδα mRNA έκφρασης *TOPO-IIA* και ελεύθερο νόσου διάστημα στο ΜΚΠ περιορισμένου σταδίου

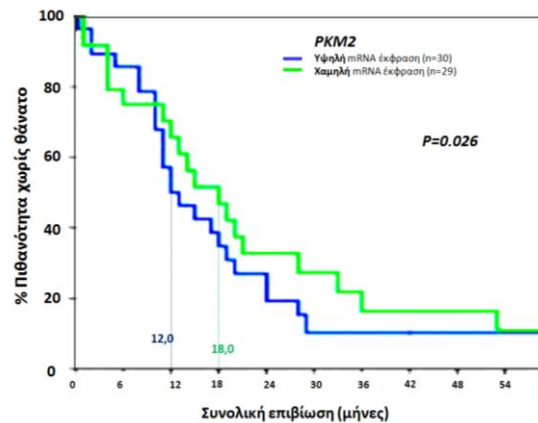


Διάγραμμα 1Ε: Επίπεδα mRNA έκφρασης *TOPO-IIB* και ελεύθερο νόσου διάστημα στο ΜΚΠ περιορισμένου σταδίου

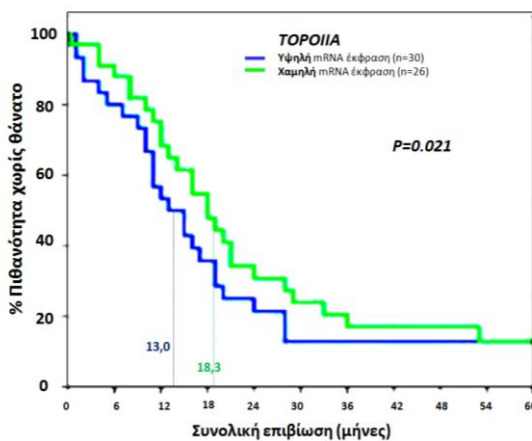
Επιπλέον, η μέση συνολική επιβίωση ήταν σημαντικά μειωμένη στους ασθενείς που είχαν υψηλή mRNA έκφραση των γονιδίων *ERCC1* (13.2 έναντι 19.1 μηνών; $p = 0.014$), *PKM2* (12 έναντι 18.0 μηνών; $p = 0.026$), *TOPO-IIA* (13.0 έναντι 18.3 μηνών; $p = 0.021$) και *TOPO-IIB* (12.8 έναντι 18.4 μηνών; $p = 0.019$) σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν χαμηλή έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στη μέση συνολική επιβίωση και στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *BRCA1*, *MYC*, *TOPO-I* και *ATP7B* για τους ασθενείς με περιορισμένο στάδιο νόσου (Πίνακας 11 και διαγράμματα 2Α-2Δ)



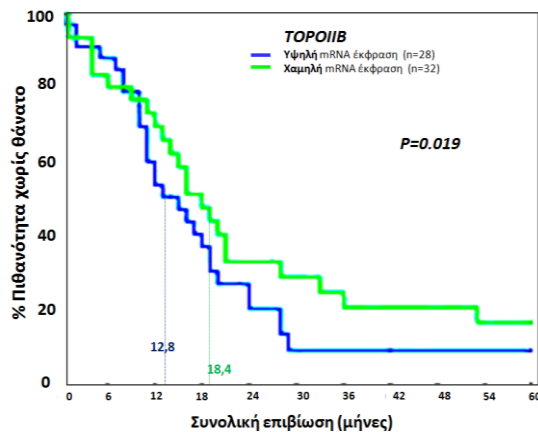
Διάγραμμα 2Α: Επίπεδα mRNA έκφρασης *ERCC1* και μέση επιβίωση ΜΚΠ περιορισμένου σταδίου



Διάγραμμα 2Β: Επίπεδα mRNA έκφρασης *PKM2* και μέση επιβίωση ΜΚΠ περιορισμένου σταδίου

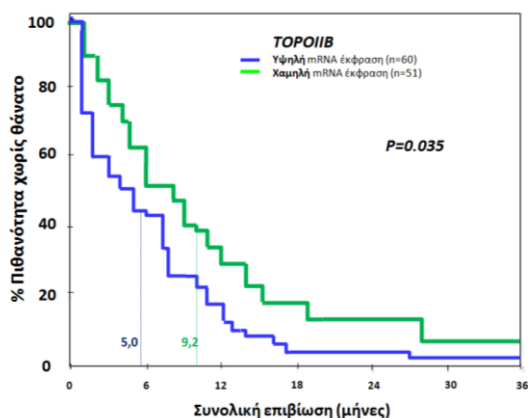


Διάγραμμα 2Γ: Επίπεδα mRNA έκφρασης *TOPO-IIA* και μέση επιβίωση ΜΚΠ περιορισμένου σταδίου



Διάγραμμα 2Δ: Επίπεδα mRNA έκφρασης *TOPO-IIB* και μέση επιβίωση ΜΚΠ περιορισμένου σταδίου

Για τους ασθενείς με εκτεταμένο στάδιο νόσο, η μοναδική στατιστικά σημαντική συσχέτιση που βρέθηκε ήταν ανάμεσα στη mRNA έκφραση του γονιδίου *TOPO-IIB*, και τη συνολική επιβίωση (πίνακας 12 και διάγραμμα 3). Συγκεκριμένα όπως φαίνεται στο διάγραμμα 3 οι ασθενείς με εκτεταμένο ΜΚΠ και υψηλή mRNA έκφραση του γονιδίου *TOPO-IIB* είχαν σημαντικά μειωμένη μέση συνολική επιβίωση (5.0 έναντι 9.2 μηνών; $p = 0.035$).



Διάγραμμα 3: Επίπεδα mRNA έκφρασης *TOPO-11B* και μέση επιβίωση στο εκτεταμένο στάδιο ΜΚΠ

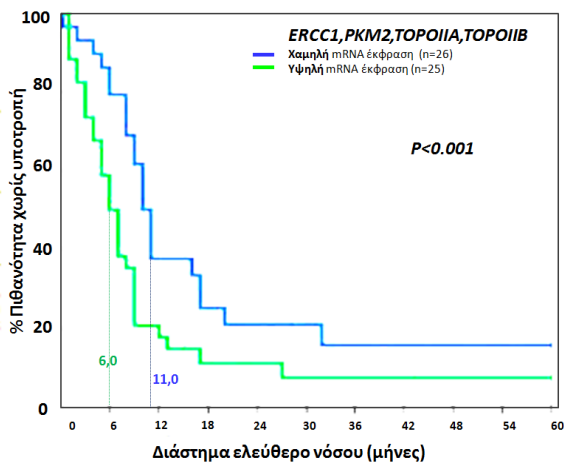
Πίνακας 12: Εκτεταμένο στάδιο νόσου: Συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση των γονιδίων και το διάστημα ελεύθερο νόσου και την επιβίωση των ασθενών

Γονίδιο	Διάστημα ελεύθερο νόσου (μήνες)			Συνολική επιβίωση (μήνες)		
	Μέσο	95% CI (Διάστημα εμπιστοσύνης)	Τιμή p	Μέση	95% CI (Διάστημα εμπιστοσύνης)	Τιμή p
BRCA1						
Χαμηλή έκφραση	4.2	2.7-5.6	0.85	7.6	6.8-9.9	0.53
Υψηλή έκφραση	3.9	2.2-5.0		6.9	4.7-8.5	
ERCC1						
Χαμηλή έκφραση	5.1	4.1-6.0	0.12	8.0	6.7-10.6	0.14
Υψηλή έκφραση	3.9	3.2-4.7		6.8	3.7-8.2	
PKM2						
Χαμηλή έκφραση	4.0	2.7-5.5	0.51	7.9	6.7-10.7	0.34
Υψηλή έκφραση	4.0	2.4-5.3		7.2	4.0-8.3	
MYC						
Χαμηλή έκφραση	4.1	2.6-5.7	0.82	7.8	6.7-10.5	0.46
Υψηλή έκφραση	3.9	2.8-5.1		7.4	4.1-8.1	
ATP7B						
Χαμηλή έκφραση	4.0	2.6-5.1	0.94	7.6	6.3-9.8	0.96

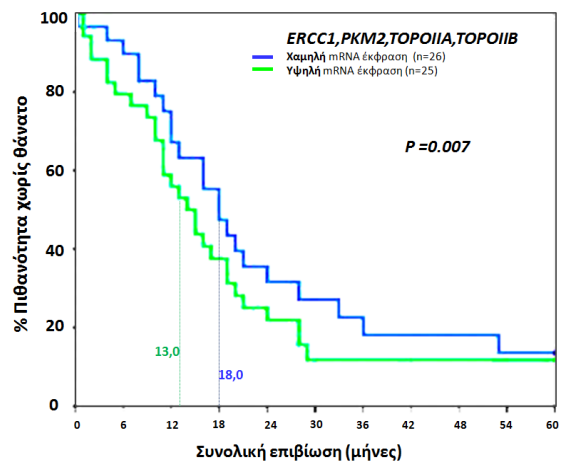
Υψηλή έκφραση	4.0	2.3-4.7		7.6	6.0-9.7	
TOPO-I						
Χαμηλή έκφραση	4.2	2.8-6.3	0.64	7.8	7.0-10.4	0.70
Υψηλή έκφραση	3.9	2.4-5.2		7.4	6.8-10.1	
TOPO-IIA						
Χαμηλή έκφραση	4.1	2.9-5.9	0.23	8.0	6.5-10.9	0.31
Υψηλή έκφραση	3.9	2.1-5.0		6.9	3.9-8.5	
TOPO-IIB						
Χαμηλή έκφραση	5.1	3.9-6.1	0.11	9.2	7.3-11.8	0.035
Υψηλή έκφραση	3.9	2.3-5.7		5.0	2.6-6.7	

Όπως έχει ήδη περιγραφεί, τα γονίδια *ERCC1* και *PKM2* σχετίζονται με ευαισθησία στα ανάλογα πλατίνης, ενώ οι τοποϊσομεράσες *TOPO-IIA* και *TOPO-IIB* σχετίζονται με ευαισθησία στην ετοποσίδη. Έτσι, όταν η έκφραση των τεσσάρων αυτών γονιδίων μελετήθηκε ταυτόχρονα, σημαντικές συσχετίσεις αναδείχτηκαν ανάμεσα στην mRNA έκφραση αυτών και το διάστημα ελεύθερο νόσου αλλά και τη μέση επιβίωση και για τους δύο πληθυσμούς των ασθενών, με το περιορισμένο και το εκτεταμένο στάδιο νόσου.

Συγκεκριμένα, για το περιορισμένο στάδιο MKII, οι 26 ασθενείς που είχαν υψηλή mRNA έκφραση των τεσσάρων αυτών γονιδίων (*ERCC1*, *PKM2*, *TOPO-IIA* και *TOPO-IIB*) είχαν στατιστικά σημαντικό μικρότερο διάστημα ελεύθερο νόσου σε σύγκριση με τους 25 ασθενείς με χαμηλή mRNA των ίδιων γονιδίων (6 έναντι 11 μηνών; $p < 0.001$). Η ίδια ομάδα ασθενών είχε επίσης σημαντικά μειωμένη επιβίωση συγκρινόμενη με τους ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *ERCC1*, *PKM2*, *TOPO-IIA* και *TOPO-IIB* (13 έναντι 18 μηνών; $p = 0.007$) (Διαγράμματα 4A και 4B).

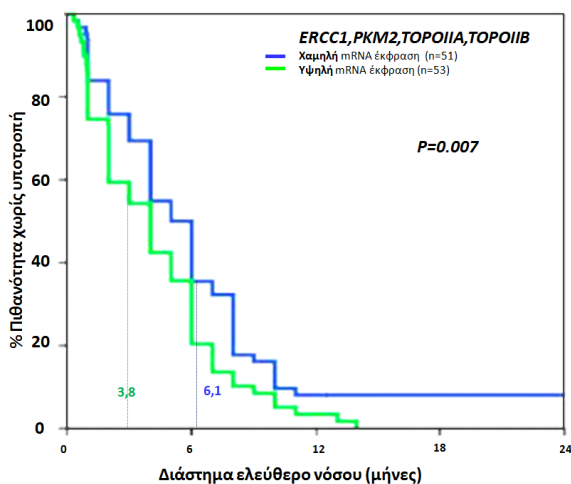


Διάγραμμα 4A: Διάστημα ελεύθερο νόσου ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *ERCC1*, *PKM2*, *TOPO-IIA* και *TOPO-IIB* για το περιορισμένο MKΠ

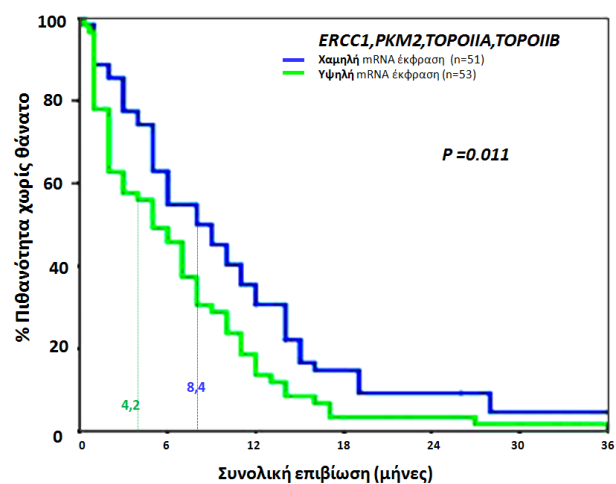


Διάγραμμα 4B: Μέση συνολική επιβίωση ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *ERCC1*, *PKM2*, *TOPO-IIA* και *TOPO-IIB* για το περιορισμένο MKΠ

Παρόμοια αποτελέσματα βρήκαμε και για τους ασθενείς με εκτεταμένο στάδιο νόσου. Οι 53 ασθενείς που είχαν υψηλή mRNA έκφραση των *ERCC1*, *PKM2*, *TOPO-IIA* και *TOPO-IIB* είχαν μικρότερο διάστημα ελεύθερο νόσου (3.8 έναντι 6.1 μηνών; $p = 0.007$) και μικρότερη συνολική επιβίωση (4.2 έναντι 8.4 μηνών; $p = 0.011$) όταν συγκρίθηκαν με τους 51 ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης των τεσσάρων αυτών γονιδίων (Διαγράμματα 5A και 5B).



Διάγραμμα 5A: Διάστημα ελεύθερο νόσου ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *ERCC1*, *PKM2*, *TOPO-IIA* και *TOPO-IIB* για το εκτεταμένο MKΠ



Διάγραμμα 5B: Μέση συνολική επιβίωση ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *ERCC1*, *PKM2*, *TOPO-IIA* και *TOPO-IIB* για το εκτεταμένο MKΠ

Με βάση τα αποτελέσματα αυτά μπορούμε να χαρακτηρίσουμε την υψηλή έκφραση mRNA των γονιδίων *ERCC1*, *PKM2*, *TOPO-IIA* και *TOPO-IIB* ως δυσμενή γονιδιακή υπογραφή και τη χαμηλή mRNA έκφρασή τους ως ευνοϊκή γονιδιακή υπογραφή για το διάστημα έως την υποτροπή αλλά και για τη συνολική επιβίωση των ασθενών με ΜΚΠ ανεξάρτητα από το στάδιο της νόσου.

3.4.3 Μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση για το διάστημα έως την υποτροπή και για την συνολική επιβίωση

Η μονοπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε ότι για τους ασθενείς με περιορισμένο στάδιο νόσου, η υψηλή mRNA έκφραση *ERCC1* (HR: 1.71, 95% CI: 1.24-2.91; p=0.01), *PKM2* (HR: 1.64, 95% CI: 1.17-2.42; p=0.031), *TOPO-I* (HR: 1.41, 95% CI: 1.26-1.98; p=0.044), *TOPO-IIA* (HR: 1.74, 95% CI: 1.33-3.1; p=0.009) και *TOPO-IIB* (HR: 1.82, 95% CI: 1.46-3.18; p=0.004), η δυσμενής γονιδιακή υπογραφή (HR: 4.97, 95% CI: 2.74-7.61; p=0.001), καθώς και η επηρεασμένη γενική κατάσταση (PS 2; HR: 1.46, 95% CI: 1.22-2.81; p=0.017) και τα αυξημένα επίπεδα γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH; HR: 1.52, 95% CI: 1.21-2.78; p=0.021) σχετίζονταν σημαντικά με μειωμένο διάστημα έως την υποτροπή (Πίνακας 13).

Πίνακας 13: Μονοπαραγοντική ανάλυση

	<i>Διάστημα έως την υποτροπή</i>			<i>Συνολική επιβίωση</i>		
	<i>Αναλογία κινδύνου (Hazard Ratio; HR)</i>	<i>95% CI</i>	<i>Τιμή p</i>	<i>Αναλογία κινδύνου (Hazard Ratio; HR)</i>	<i>95% CI</i>	<i>Τιμή p</i>
<i>Περιορισμένο στάδιο νόσου (n=64)</i>						
<i>ERCC1</i> έκφραση (υψηλή έναντι χαμηλής)	1.71	1.24 – 2.91	0.01	1.63	1.13-2.27	0.027

PKM2 expression (υψηλή έναντι χαμηλής)	1.64	1.17 – 2.42	0.031	1.49	1.06-1.84	0.046
TOPO-I έκφραση (υψηλή έναντι χαμηλής)	1.41	1.26– 1.98	0.044	1.37	0.96-1.51	0.106
TOPO-IIA έκφραση (υψηλή έναντι χαμηλής)	1.74	1.33-3.1	0.009	1.69	1.2-2.34	0.018
TOPO-IIB έκφραση (υψηλή έναντι χαμηλής)	1.82	1.46-3.18	0.004	1.8	1.43-3.11	0.006
Γονιδιακή υπογραφή (δυσμενής έναντι ευνοϊκής)	4.97	2.74-7.61	0.001	5.34	3.85-7.62	<0.001
Γενική κατάσταση PS (2 έναντι 0-1)	1.46	1.22 – 2. 81	0.017	1.58	1.29-2.9	0.013
Γαλακτική αφυδρογονάση LDH (αυξημένη έναντι φυσιολογικής)	1.52	1.21 – 2.78	0.021	1.56	1.22-2.94	0.027
Εκτεταμένο στάδιο νόσου (n=120)						
TOPO-IIB έκφραση (υψηλή έναντι χαμηλής)	1.25	0.89 – 1.80	0.186	1.53	1.09-1.89	0.046
Γονιδιακή υπογραφή (δυσμενής έναντι ευνοϊκής)	3.56	1.89 – 6.46	0.001	4.14	1.95-6.58	0.001
Γενική κατάσταση PS (2 έναντι 0-1)	1.81	1.17 – 2.83	0.023	1.94	1.62-2.58	0.017
Γαλακτική αφυδρογονάση LDH (αυξημένη έναντι φυσιολογικής)	1.93	1.43–2.94	0.019	2.01	1.61-2.64	0.013

Επιπλέον η υψηλή mRNA έκφραση ERCC1 (HR: 1.63, 95% CI: 1.13-2.27; p=0.027), PKM2 (HR: 1.49, 95% CI: 1.06-1.84; p=0.046), TOPO-IIA (HR: 1.69, 95% CI: 1.2-2.34; p=0.018), και TOPO-IIB (HR: 1.8, 95% CI: 1.43-3.11; p=0.006) καθώς και η δυσμενής γονιδιακή υπογραφή (HR: 5.34, 95% CI: 3.85-7.62; p<0.0001), η επηρεασμένη γενική κατάσταση (PS 2; HR: 1.58, 95% CI: 1.29-2.9; p=0.013) και τα αυξημένα επίπεδα γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH; HR: 1.56, 95% CI: 1.22-2.94;

p=0.027) σχετίζονταν με μειωμένη συνολική επιβίωση για τους ασθενείς με περιορισμένο στάδιο νόσου.

Για τους ασθενείς με εκτεταμένο στάδιο ΜΚΠ, μόνο η δυσμενής γονιδιακή υπογραφή (HR: 3.56, 95% CI: 1.89-6.46; p=0.001), η επηρεασμένη γενική κατάσταση (PS 2; HR: 1.81, 95% CI: 1.17-2.83; p=0.023) και τα αυξημένα επίπεδα γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH; HR: 1.93, 95% CI: 1.43-2.94; p=0.019) σχετίστηκαν με μειωμένο διάστημα ελεύθερο νόσου. Στην ίδια ομάδα ασθενών, η υψηλή έκφραση mRNA TOPO-IIΒ (HR: 1.53, 95% CI: 1.09-1.89; p=0.046), η δυσμενής γονιδιακή υπογραφή (HR: 4.14, 95% CI: 1.95-6.58; p=0.001), η επηρεασμένη γενική κατάσταση (PS 2; HR: 1.94, 95% CI: 1.62-2.58; p=0.017) και τα αυξημένα επίπεδα γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH; HR: 2.01, 95% CI: 1.61-2.64; p=0.013) σχετίστηκαν με μειωμένη συνολική επιβίωση.

Στη Cox αναλογική ανάλυση κινδύνου (Cox proportional hazard analysis) φάνηκε ότι για τους ασθενείς με περιορισμένο στάδιο νόσου η υψηλή mRNA έκφραση TOPO-IIΑ (HR: 1.62, 95% CI: 1.13-2.41; p=0.039) και TOPO-IIΒ (HR: 1.79, 95% CI: 1.40-2.88; p=0.022) καθώς και η δυσμενής γονιδιακή υπογραφή (HR: 3.18, 95% CI: 1.94-4.85; p=0.002) ήταν ανεξάρτητοι παράγοντες σχετιζόμενοι με μειωμένο διάστημα έως την υποτροπή (πίνακας 14). Για την ίδια ομάδα ασθενών η επηρεασμένη γενική κατάσταση (PS 2; HR: 1.38, 95% CI: 1.14-2.63; p=0.02) και τα αυξημένα επίπεδα γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH; HR: 1.6, 95% CI: 1.32-2.94; p=0.017) ήταν επίσης ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες μειωμένου διαστήματος έως την πρόοδο νόσου.

Παρομοίως, η υψηλή mRNA έκφραση TOPO-IIΒ (HR: 1.77, 95% CI: 1.41-2.91; p=0.016) και η δυσμενής γονιδιακή υπογραφή (HR: 4.35, 95% CI: 2.76-6.08; p=0.001) αναδείχθηκαν ως ανεξάρτητοι παράγοντες για μειωμένη επιβίωση στο

περιορισμένο στάδιο της νόσου. Η επηρεασμένη γενική κατάσταση (PS 2; HR: 1.45, 95% CI: 1.22-2.64; p=0.016) και τα αυξημένα επίπεδα γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH; HR: 1.63, 95% CI: 1.29-3.01; p=0.011) βρέθηκαν έως επιπλέον ανεξάρτητοι παράγοντες για μειωμένη επιβίωση στην ίδια ομάδα ασθενών.

Πίνακας 14: Cox αναλογική ανάλυση κινδύνου

	<i>Διάστημα έως την υποτροπή</i>			<i>Συνολική επιβίωση</i>		
	<i>Αναλογία κινδύνου (Hazard Ratio; HR)</i>	<i>95% CI</i>	<i>Τιμή p</i>	<i>Αναλογία κινδύνου (Hazard Ratio; HR)</i>	<i>95% CI</i>	<i>Τιμή p</i>
<i>Περιορισμένο στάδιο νόσου (n=64)</i>						
ERCC1 έκφραση (υψηλή έναντι χαμηλής)	1.34	0.96– 1.89	0.091	1.33	0.93-1.77	0.104
PKM2 έκφραση (υψηλή έναντι χαμηλής)	1.32	0.93 – 1.82	0.111	1.39	0.96-1.83	0.086
TOPO-I έκφραση (υψηλή έναντι χαμηλής)	1.29	0.86– 1.78	0.178	1.26	0.81-1.61	0.215
TOPO-IIA έκφραση (υψηλή έναντι χαμηλής)	1.62	1.13-2.41	0.039	1.49	0.97-2.12	0.081
TOPO-IIB έκφραση (υψηλή έναντι χαμηλής)	1.79	1.40-2.88	0.022	1.77	1.41-2.91	0.016
Γονιδιακή υπογραφή (δυσμενής έναντι ευνοϊκής)	3.18	1.94-4.85	0.002	4.35	2.76-6.08	0.001
Γενική κατάσταση PS (2 έναντι 0-1)	1.38	1.14 - 2.63	0.02	1.45	1.22-2.64	0.016
Γαλακτική αφυδρογονάση LDH (αυξημένη έναντι φυσιολογικής)	1.6	1.32 – 2.94	0.017	1.63	1.29-3.01	0.011
<i>Εκτεταμένο στάδιο νόσου (n=120)</i>						

ΤΟΡΟ-ΙΙΒ έκφραση (υψηλή έναντι χαμηλής)	1.11	0.74 – 1.63	0.29	1.44	0.98-1.83	0.064
Γονιδιακή υπογραφή (δυσμενής έναντι ευνοϊκής)	3.14	1.76 – 4.82	0.021	3.32	1.91-5.32	0.019
Γενική κατάσταση PS (2 έναντι 0-1)	1.76	1.19 – 2.78	0.031	1.88	1.58-2.47	0.024
Γαλακτική αφυδρογονάση LDH (αυξημένη έναντι φυσιολογικής)	1.84	1.41–2.77	0.022	1.92	1.56-2.44	0.019

Πολύ λίγο διέφεραν τα αποτελέσματα για το εκτεταμένο στάδιο της νόσου όπου η δυσμενής γονιδιακή υπογραφή (HR: 3.14, 95% CI: 1.76-4.82; $p=0.021$), η επηρεασμένη γενική κατάσταση (PS 2; HR: 1.76, 95% CI: 1.19-2.78; $p=0.031$) και τα αυξημένα επίπεδα γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH; HR: 1.84, 95% CI: 1.41-2.77; $p=0.022$) βρέθηκαν να είναι ανεξάρτητοι παράγοντες για μειωμένο διάστημα έως την υποτροπή και για τη μειωμένη συνολική επιβίωση.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ΜΚΠ είναι μια πολύ επιθετική μορφή καρκίνου του πνεύμονα με ξεχωριστά κλινικά και ιστολογικά χαρακτηριστικά. Σχετίζεται άμεσα με το κάπνισμα και έχει τη τάση για γρήγορη αιματογενή διασπορά [35]. Το υλικό που έχουμε συνήθως στη διάθεσή μας για τη μελέτη των υποκείμενων μοριακών αλλαγών αυτής της νόσου, είναι περιορισμένο και για αυτό θα πρέπει πάντα να χειρίζεται από έμπειρους στο καρκίνο του πνεύμονα παθολογοανατόμους. Αν και η συχνότητα της νόσου έχει μειωθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια παραμένει μια νόσος δύσκολη, τόσο στη διερεύνηση και κατανόηση της όσο και στη θεραπεία της. Οι συγκεκριμένες μοριακές τροποποιήσεις που οδηγούν στη δημιουργία της νόσου αλλά και αυτές που τη κάνουν

ευαίσθητη ή ανθεκτική στη χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία παραμένουν ασαφείς [92]. Οι περισσότερες μέχρι τώρα προσπάθειες για να αυξήσουμε τη δραστικότητα της χημειοθεραπείας έχουν αποτύχει και τελικά το ποσοστό των ασθενών με καλή επιβίωση παραμένει πολύ μικρό. Λόγω της δυσκολίας να έχουμε επαρκές αλλά και καλής ποιότητας βιοπτικό υλικό, μόνο λίγες και σχετικά μικρές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι τώρα για τον ΜΚΠ και η νόσος αυτή παραμένει ένα σημαντικό πεδίο έρευνας.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, η οποία είναι και η μεγαλύτερη φαρμακογενετική μελέτη μέχρι σήμερα στον ΜΚΠ, αναλύσαμε την έκφραση πολλαπλών γονιδίων και σχετίσαμε τα αποτελέσματα με την ανταπόκριση στη θεραπεία. Επιτύχαμε να αναδείξουμε ένα προβλεπτικό μοντέλο για τους ασθενείς με ΜΚΠ που λαμβάνουν θεραπεία με ανάλογα πλατίνης και ετοποσίδη.

Για πρώτη φορά, το 1999, βρέθηκε ότι νέοι προβλεπτικοί βιοδείκτες μπορούν να επηρεάσουν την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία αλλά και την επιβίωση των ασθενών με ΜΚΠ. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης, έχει προηγουμένα δημοσιευτεί ότι η έκφραση του γονιδίου *TOPO-1IB* μπορεί να προβλέψει την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία, με μεγαλύτερα ποσοστά ανταπόκρισης στους ασθενείς με χαμηλή έκφραση *TOPO-1IB*. Παράλληλα τα υψηλά επίπεδα έκφρασης *TOPO-1IA* στην ίδια μελέτη σχετίστηκαν με μικρότερη συνολική επιβίωση [158].

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε ότι οι ασθενείς με περιορισμένο στάδιο νόσου και χαμηλή mRNA έκφραση των γονιδίων *TOPO-1IA* και *TOPO-1IB* είχαν σημαντική μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο νόσου ($p=0.002$ και $p<0.001$, αντιστοίχως). Επίσης, οι ασθενείς με αυτό το μοριακό προφίλ είχαν και σημαντικά καλύτερη επιβίωση

($p=0.021$ και $p=0.019$, αντιστοίχως). Για την ομάδα των ασθενών με εκτεταμένο στάδιο νόσου, η υψηλή mRNA έκφραση του γονιδίου *TOPO-IIB* σχετίστηκε με μειωμένη συνολική επιβίωση ($p=0.035$).

Οι περισσότερες μελέτες σε κυτταρικές σειρές, έχουν δείξει αντίθετα αποτελέσματα από τη δική μας μελέτη. Συγκεκριμένα, *in vitro* έρευνες έχουν δείξει ότι υπάρχει μια θετική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση του γονιδίου *TOPO-IIA* και στην ευαισθησία στη χημειοθεραπεία, με την υψηλή έκφραση αυτού του γονιδίου στον ΜΚΠ να σχετίζεται με μεγαλύτερη ευαισθησία σε αναστολείς τοποϊσομεράσης II [166].

Η *TOPO-I* όπως προηγούμενα εξηγήθηκε αποτελεί στόχο για φάρμακα όπως είναι η ιρινοτεκάνη και η τοποτεκάνη. Διαπιστώθηκε ότι η υψηλή mRNA έκφραση του γονιδίου *TOPO-I* σχετίζεται με μειωμένο ελεύθερο νόσου διάστημα (HR: 1.41; $p=0.044$), παρά το γεγονός ότι στη συγκεκριμένη μελέτη οι ασθενείς δεν έλαβαν χημειοθεραπεία 1^{ns} γραμμής με τοποτεκάνη ή ιρινοτεκάνη. Η αυξημένη έκφραση αυτού του γονιδίου έχει περιγραφεί σε διάφορους τύπους νεοπλασμάτων [167]. Για παράδειγμα, σε μια μελέτη ασθενών με αδενοκαρκίνωμα ωοθηκών που έλαβαν σχήματα χημειοθεραπείας με βάση τη πλατίνη και χωρίς τη λήψη τοποτεκάνης, βρέθηκε ότι οι γυναίκες που είχαν υψηλή έκφραση του γονιδίου *TOPO-IA* είχαν σημαντικά μικρότερη συνολική επιβίωση σε σύγκριση με αυτές που είχαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου [168]. Το εύρημα αυτό ίσως υποδηλώνει ότι στους ασθενείς με ενισχυμένη έκφραση *TOPO-I*, η χορήγηση τοποτεκάνης θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη μιας και ενδέχεται να αλλάξει την έκβαση της νόσου προς όφελος των ασθενών. Το εύρημα αυτό χρήζει σαφώς περισσότερης διερεύνησης.

Η παρούσα μελέτη ανέδειξε, επίσης, ότι οι ασθενείς με περιορισμένο στάδιο νόσου και υψηλή mRNA έκφραση των γονιδίων *ERCC1* και *PKM2* είχαν μικρότερο διάστημα έως την υποτροπή της νόσου ($p=0.028$ και $p=0.046$, αντιστοίχως) καθώς και μικρότερη συνολική επιβίωση ($p=0.014$ και $p=0.026$, αντιστοίχως). Επίσης, στην ίδια ομάδα ασθενών, όσοι είχαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης *TOPO-I* είχαν σημαντικά βελτιωμένο ελεύθερο νόσου διάστημα ($p=0.008$) χωρίς όμως διαφορές στην ολική επιβίωση σε σχέση πάντα με τους ασθενείς με υψηλή έκφραση του γονιδίου αυτού. Τα ευρήματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που ανέδειξαν ότι η πρωτεϊνική ή η mRNA έκφραση των γονιδίων *ERCC1* και *TOPO-I* στον ΜΚΠ μπορεί να αποτελούν προβλεπτικούς δείκτες της ανταπόκρισης στη χημειοθεραπεία [169, 170].

Στη μελέτη των Sereno & συνεργατών, διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα mRNA έκφρασης του γονιδίου *TOPO-I* μπορούν να προβλέψουν την ανταπόκριση των ασθενών σε χημειοθεραπεία με βάση τη πλατίνη καθώς και τη πρόγνωση των ασθενών [170]. Παράλληλα αφού είναι γνωστό ότι τα επίπεδα έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου σχετίζονται με ανταπόκριση στη θεραπεία με σχήματα με καμπτοθεκίνες, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι ασθενείς με ΜΚΠ και υψηλή έκφραση *TOPO-I* είναι υποψήφιοι για σχήματα χημειοθεραπείας με ιρινοτεκάνη ή τοποτεκάνη [168]. Σε μια άλλη σχετικά πρόσφατη μελέτη, οι ερευνητές εξέτασαν την mRNA έκφραση των γονιδίων *ERCC1*, *RRM1* και *TOPO-II* σε 85 ασθενείς με ΜΚΠ που έλαβαν θεραπεία με ανάλογα πλατίνης και ετοποσίδη [169]. Στη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι η έκφραση της *TOPO-II* σχετίζεται με καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία για το περιορισμένο στάδιο της νόσου ενώ οι ασθενείς με το ίδιο στάδιο νόσου και χαμηλή mRNA του γονιδίου *ERCC1* είχαν σημαντικά καλύτερη συνολική επιβίωση. Στη πολυπαραγοντική ανάλυση φάνηκε ότι η έκφραση του γονιδίου

ERCC1 είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για τη συνολική επιβίωση στο περιορισμένο στάδιο του ΜΚΠ [169].

Σε μια παρόμοια μελέτη διαπιστώθηκε ότι η πρωτεϊνική έκφραση του γονιδίου *ERCC1* σε 77 ασθενείς με ΜΚΠ που έλαβαν θεραπεία με βάση τη πλατίνα, σχετιζόταν με φτωχή επιβίωση, ιδίως στους ασθενείς με περιορισμένο στάδιο νόσου, ενισχύοντας ακόμα περισσότερο τη γνώση ότι η έκφραση του *ERCC1* μπορεί να είναι ένας προγνωστικός βιοδείκτης για την ομάδα αυτή των ασθενών [171].

Τέλος, σε μια ακόμη μελέτη των Chiappori & συνεργατών, στην οποία χρησιμοποιήθηκε μια αυτόματη τεχνική ποσοτικοποίησης των επίπεδων *RRM1* (ribonucleotide reductase M1), *ERCC1* και *TOPO-II* με βάση τον ανοσοφθορισμό, φάνηκε ότι τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *TOPO-II* μπορούσαν να προβλέψουν τη καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία για το περιορισμένο στάδιο της νόσου. Στην ίδια μελέτη, μόνο τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *ERCC1* φάνηκαν να είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για τη συνολική επιβίωση. Καμία προγνωστική ή προβλεπτική αξία των γονιδίων αυτών δεν κατάφερε να ανευρεθεί για το εκτεταμένο στάδιο της νόσου [172].

Τα παραπάνω αποτελέσματα, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης, υποδηλώνουν ισχυρά ότι ο περιορισμένος ΜΚΠ αποτελεί μια νόσο που τουλάχιστον η βιολογία της φαίνεται να διαφέρει από αυτή του εκτεταμένου ΜΚΠ.

Ένα άλλο σημαντικό εύρημα της παρούσας μελέτης είναι ότι όταν έγινε συνδυασμένη ανάλυση των γονιδίων *ERCC1*, *PKM2* (που σχετίζονται με αντίσταση στην πλατίνη), *TOPO-IIA* και *TOPO-IIB* (που σχετίζονται με αντίσταση στην ετοποσίδη) διαπιστώθηκε ότι η ομάδα των ασθενών που είχε χαμηλή έκφραση των τεσσάρων γονιδίων, δηλαδή ευνοϊκό τύπο γονιδιακής υπογραφής, είχε σημαντικά καλύτερο

διάστημα ελεύθερο νόσου και καλύτερη μέση επιβίωση σε σύγκριση με τους ασθενείς με τη δυσμενή γονιδιακή υπογραφή.

Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με περιορισμένο στάδιο νόσου και ευνοϊκό προφίλ έκφρασης είχαν ένα διάστημα ελεύθερο νόσου περίπου ενός έτους ($p<0.001$) και μια συνολική επιβίωση που έφτανε τους 18 μήνες ($p=0.007$). Για τη νόσο εκτεταμένου σταδίου, οι ασθενείς που είχαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης και των τεσσάρων γονιδίων έφτασαν ένα διάστημα ελεύθερο νόσου 6,1 μηνών ($p=0.007$) και μια συνολική επιβίωση 8,4 μηνών ($p=0.007$), διαφορές σημαντικά μεγαλύτερες σε σχέση με τους ασθενείς με τη δυσμενή γονιδιακή υπογραφή (3,8 μήνες και 4.2 για το ελεύθερο νόσου διάστημα και για τη συνολική επιβίωση αντίστοιχα).

Φυσικά, παρόλα τα πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, απαιτείται επιφυλακτικότητα και αποφυγή εξαγωγής τελικών συμπερασμάτων, κυρίως λόγω των μειονεκτημάτων της μελέτης μας. Πρόκειται πρώτα από όλα για μια αναδρομική μελέτη, χωρίς ομάδα ελέγχου, και πάρα το γεγονός ότι ο αριθμός των ασθενών που συμπεριελήφθησαν είναι από τους μεγαλύτερους μέχρι σήμερα για παρόμοιες μελέτες, ο συνολικός αριθμός των ασθενών είναι ακόμα μικρός για να μπορούμε να καταλήξουμε σε ισχυρά συμπεράσματα.

Εντούτοις, μέσα από την έρευνά μας φάνηκε ότι με τη χρήση της φαρμακογενομικής ανάλυσης μπορούμε να εντοπίσουμε υποομάδες ασθενών με ΜΚΠ, που έχουν μεγαλύτερες ή μικρότερες πιθανότητες να ωφεληθούν σημαντικά από τη χημειοθεραπεία με πλατίνη/ετοποσίδη. Η παρούσα μελέτη μπορεί να αποτελέσει το έναυσμα για μια προοπτική μελέτη στον ΜΚΠ, όπου η προβλεπτική αξία των συγκεκριμένων βιοδεικτών θα μπορέσει να αξιολογηθεί με μεγαλύτερη αξιοπιστία. Τέλος, μέσα από την έρευνά μας, κατέστη σαφές ότι ακόμα και για νεοπλασματικά

νοσήματα όπως ο ΜΚΠ, όπου η πρόσβαση στο βιοπτικό υλικό, για τους λόγους που εξηγήθηκαν, είναι περιορισμένη, η συνδυασμένη και συλλογική προσπάθεια, ανάμεσα στον ογκολόγο, στον επεμβατικό πνευμονολόγο ή ακτινολόγο, στον παθολογοανατόμο και στον βιολόγο μπορεί να κάνει εφικτή τη προσπάθεια για ενδεδειγμένη μοριακή ανάλυση και κατανόηση της επιθετικής αυτής νόσου και να ανοίξει επιτέλους τον δρόμο για τη στοχευόμενη και επομένως αποτελεσματική θεραπεία της νόσου.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 10-29.
2. Elias AD. Small cell lung cancer: state-of-the-art therapy in 1996. *Chest* 1997; 112: 251S-258S.
3. Stupp R, Monnerat C, Turrisi AT, 3rd et al. Small cell lung cancer: state of the art and future perspectives. *Lung Cancer* 2004; 45: 105-117.
4. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest* 2003; 123: 21S-49S.
5. Valaitis J, Warren S, Gamble D. Increasing incidence of adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 1981; 47: 1042-1046.
6. Hoffmann D, Hoffmann I, El-Bayoumy K. The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. *Chem Res Toxicol* 2001; 14: 767-790.
7. Wynder EL, Muscat JE. The changing epidemiology of smoking and lung cancer histology. *Environ Health Perspect* 1995; 103 Suppl 8: 143-148.
8. Brownson RC, Chang JC, Davis JR. Gender and histologic type variations in smoking-related risk of lung cancer. *Epidemiology* 1992; 3: 61-64.
9. Barbone F, Bovenzi M, Cavallieri F, Stanta G. Cigarette smoking and histologic type of lung cancer in men. *Chest* 1997; 112: 1474-1479.
10. Khuder SA. Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer* 2001; 31: 139-148.
11. Stellman SD, Muscat JE, Thompson S et al. Risk of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung in relation to lifetime filter cigarette smoking. *Cancer* 1997; 80: 382-388.
12. Janssen-Heijnen ML, Coebergh JW. The changing epidemiology of lung cancer in Europe. *Lung Cancer* 2003; 41: 245-258.
13. Hoffmann D, Brunneemann KD, Prokopczyk B, Djordjevic MV. Tobacco-specific N-nitrosamines and Areca-derived N-nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenicity, and relevance to humans. *J Toxicol Environ Health* 1994; 41: 1-52.
14. Hoffmann D, Djordjevic MV, Hoffmann I. The changing cigarette. *Prev Med* 1997; 26: 427-434.
15. Wingo PA, Ries LA, Giovino GA et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1996, with a special section on lung cancer and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 675-690.
16. Bilello KS, Murin S, Matthay RA. Epidemiology, etiology, and prevention of lung cancer. *Clin Chest Med* 2002; 23: 1-25.
17. Osann KE, Anton-Culver H, Kurosaki T, Taylor T. Sex differences in lung-cancer risk associated with cigarette smoking. *Int J Cancer* 1993; 54: 44-48.
18. Johnson BE, Steinberg SM, Phelps R et al. Female patients with small cell lung cancer live longer than male patients. *Am J Med* 1988; 85: 194-196.
19. Spiegelman D, Maurer LH, Ware JH et al. Prognostic factors in small-cell carcinoma of the lung: an analysis of 1,521 patients. *J Clin Oncol* 1989; 7: 344-354.
20. Albain KS, Crowley JJ, LeBlanc M, Livingston RB. Determinants of improved outcome in small-cell lung cancer: an analysis of the 2,580-patient Southwest Oncology Group data base. *J Clin Oncol* 1990; 8: 1563-1574.

21. Chute CG, Greenberg ER, Baron J et al. Presenting conditions of 1539 population-based lung cancer patients by cell type and stage in New Hampshire and Vermont. *Cancer* 1985; 56: 2107-2111.
22. Kalemkerian GP, Akerley W, Bogner P et al. Small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2013; 11: 78-98.
23. Travis WD. Advances in neuroendocrine lung tumors. *Ann Oncol* 2010; 21 Suppl 7: vii65-71.
24. Gustafsson BI, Kidd M, Chan A et al. Bronchopulmonary neuroendocrine tumors. *Cancer* 2008; 113: 5-21.
25. Renshaw AA, Haja J, Lozano RL, Wilbur DC. Distinguishing carcinoid tumor from small cell carcinoma of the lung: correlating cytologic features and performance in the College of American Pathologists Non-Gynecologic Cytology Program. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129: 614-618.
26. Gandhi L, Johnson BE. Paraneoplastic syndromes associated with small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2006; 4: 631-638.
27. Kazarian M, Laird-Offringa IA. Small-cell lung cancer-associated autoantibodies: potential applications to cancer diagnosis, early detection, and therapy. *Mol Cancer* 2011; 10: 33.
28. Marchioli CC, Graziano SL. Paraneoplastic syndromes associated with small cell lung cancer. *Chest Surg Clin N Am* 1997; 7: 65-80.
29. Campling BG, Sarda IR, Baer KA et al. Secretion of atrial natriuretic peptide and vasopressin by small cell lung cancer. *Cancer* 1995; 75: 2442-2451.
30. Johnson BE, Chute JP, Rushin J et al. A prospective study of patients with lung cancer and hyponatremia of malignancy. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1669-1678.
31. Gross AJ, Steinberg SM, Reilly JG et al. Atrial natriuretic factor and arginine vasopressin production in tumor cell lines from patients with lung cancer and their relationship to serum sodium. *Cancer Res* 1993; 53: 67-74.
32. Forrest JN, Jr., Cox M, Hong C et al. Superiority of demeclocycline over lithium in the treatment of chronic syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone. *N Engl J Med* 1978; 298: 173-177.
33. Shepherd FA, Laskey J, Evans WK et al. Cushing's syndrome associated with ectopic corticotropin production and small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1992; 10: 21-27.
34. Stewart PM, Gibson S, Crosby SR et al. ACTH precursors characterize the ectopic ACTH syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994; 40: 199-204.
35. Jackman DM, Johnson BE. Small-cell lung cancer. *Lancet* 2005; 366: 1385-1396.
36. Winquist EW, Laskey J, Crump M et al. Ketoconazole in the management of paraneoplastic Cushing's syndrome secondary to ectopic adrenocorticotropin production. *J Clin Oncol* 1995; 13: 157-164.
37. Sher E, Gotti C, Canal N et al. Specificity of calcium channel autoantibodies in Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Lancet* 1989; 2: 640-643.
38. Lambert EH, Elmqvist D. Quantal components of end-plate potentials in the myasthenic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1971; 183: 183-199.
39. Voltz R, Carpentier AF, Rosenfeld MR et al. P/Q-type voltage-gated calcium channel antibodies in paraneoplastic disorders of the central nervous system. *Muscle Nerve* 1999; 22: 119-122.
40. Tim RW, Massey JM, Sanders DB. Lambert-Eaton myasthenic syndrome (LEMS). Clinical and electrodiagnostic features and response to therapy in 59 patients. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 841: 823-826.

41. Sanders DB. Lambert-eaton myasthenic syndrome: diagnosis and treatment. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 998: 500-508.
42. Delgado PI, Jorda M, Ganjei-Azar P. Small cell carcinoma versus other lung malignancies: diagnosis by fine-needle aspiration cytology. *Cancer* 2000; 90: 279-285.
43. Tondini M, Rizzi A. Small-cell lung cancer: importance of fiberoptic bronchoscopy in the evaluation of complete remission. *Tumori* 1989; 75: 266-268.
44. Shimosato Y. [Histological Typing of Lung and Pleural Tumors (3rd edition, 1999): Malignant epithelial tumors]. *Nihon Rinsho* 2002; 60 Suppl 5: 123-131.
45. Bepler G, Neumann K, Holle R et al. Clinical relevance of histologic subtyping in small cell lung cancer. *Cancer* 1989; 64: 74-79.
46. Silverman JF. Inflammatory and neoplastic processes of the lung: differential diagnosis and pitfalls in FNA biopsies. *Diagn Cytopathol* 1995; 13: 448-462.
47. Field RW, Smith BJ, Platz CE et al. Lung cancer histologic type in the surveillance, epidemiology, and end results registry versus independent review. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1105-1107.
48. Anderson C, Ludwig ME, O'Donnell M, Garcia N. Fine needle aspiration cytology of pulmonary carcinoid tumors. *Acta Cytol* 1990; 34: 505-510.
49. Wax TD, Coogan AC, Johnston WW. Clinical significance of an inconclusive cytopathologic diagnosis: a five-year experience at Duke University Medical Center. II. Analysis and follow-up of specimens from the respiratory tract. *Acta Cytol* 1997; 41: 1053-1057.
50. Johnston WW. Cytopathology of the respiratory tract. *Acta Cytol* 1995; 39: 1079-1080.
51. Argiris A, Murren JR. Staging and clinical prognostic factors for small-cell lung cancer. *Cancer J* 2001; 7: 437-447.
52. Azad A, Chionh F, Scott AM et al. High impact of 18F-FDG-PET on management and prognostic stratification of newly diagnosed small cell lung cancer. *Mol Imaging Biol* 2010; 12: 443-451.
53. Fischer BM, Mortensen J, Langer SW et al. A prospective study of PET/CT in initial staging of small-cell lung cancer: comparison with CT, bone scintigraphy and bone marrow analysis. *Ann Oncol* 2007; 18: 338-345.
54. Brink I, Schumacher T, Mix M et al. Impact of [18F]FDG-PET on the primary staging of small-cell lung cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004; 31: 1614-1620.
55. Kamel EM, Zwahlen D, Wyss MT et al. Whole-body (18)F-FDG PET improves the management of patients with small cell lung cancer. *J Nucl Med* 2003; 44: 1911-1917.
56. Vinjamuri M, Craig M, Campbell-Fontaine A et al. Can positron emission tomography be used as a staging tool for small-cell lung cancer? *Clin Lung Cancer* 2008; 9: 30-34.
57. Foster NR, Mandrekar SJ, Schild SE et al. Prognostic factors differ by tumor stage for small cell lung cancer: a pooled analysis of North Central Cancer Treatment Group trials. *Cancer* 2009; 115: 2721-2731.
58. Yip D, Harper PG. Predictive and prognostic factors in small cell lung cancer: current status. *Lung Cancer* 2000; 28: 173-185.
59. Murren JR, Davies M. Irinotecan and taxane combinations for non small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2001; 2 Suppl 2: S20-25.

60. Hanna NH, Einhorn LH. Small-cell lung cancer: state of the art. *Clin Lung Cancer* 2002; 4: 87-94.
61. Johnson BE, Janne PA. Basic treatment considerations using chemotherapy for patients with small cell lung cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2004; 18: 309-322.
62. Evans WK, Shepherd FA, Feld R et al. VP-16 and cisplatin as first-line therapy for small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1985; 3: 1471-1477.
63. Sundstrom S, Bremnes RM, Kaasa S et al. Cisplatin and etoposide regimen is superior to cyclophosphamide, epirubicin, and vincristine regimen in small-cell lung cancer: results from a randomized phase III trial with 5 years' follow-up. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4665-4672.
64. Bishop JF, Raghavan D, Stuart-Harris R et al. Carboplatin (CBDCA, JM-8) and VP-16-213 in previously untreated patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1987; 5: 1574-1578.
65. Skarlos DV, Samantas E, Kosmidis P et al. Randomized comparison of etoposide-cisplatin vs. etoposide-carboplatin and irradiation in small-cell lung cancer. A Hellenic Co-operative Oncology Group study. *Ann Oncol* 1994; 5: 601-607.
66. Okamoto H, Watanabe K, Kunikane H et al. Randomised phase III trial of carboplatin plus etoposide vs split doses of cisplatin plus etoposide in elderly or poor-risk patients with extensive disease small-cell lung cancer: JCOG 9702. *Br J Cancer* 2007; 97: 162-169.
67. Rossi A, Di Maio M, Chiodini P et al. Carboplatin- or cisplatin-based chemotherapy in first-line treatment of small-cell lung cancer: the COCIS meta-analysis of individual patient data. *J Clin Oncol* 2012; 30: 1692-1698.
68. Noda K, Nishiwaki Y, Kawahara M et al. Irinotecan plus cisplatin compared with etoposide plus cisplatin for extensive small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002; 346: 85-91.
69. Lara PN, Jr., Natale R, Crowley J et al. Phase III trial of irinotecan/cisplatin compared with etoposide/cisplatin in extensive-stage small-cell lung cancer: clinical and pharmacogenomic results from SWOG S0124. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2530-2535.
70. Hanna N, Bunn PA, Jr., Langer C et al. Randomized phase III trial comparing irinotecan/cisplatin with etoposide/cisplatin in patients with previously untreated extensive-stage disease small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 2038-2043.
71. Schmittel A, Fischer von Weikersthal L, Sebastian M et al. A randomized phase II trial of irinotecan plus carboplatin versus etoposide plus carboplatin treatment in patients with extended disease small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2006; 17: 663-667.
72. Hermes A, Bergman B, Bremnes R et al. Irinotecan plus carboplatin versus oral etoposide plus carboplatin in extensive small-cell lung cancer: a randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4261-4267.
73. Lima JP, dos Santos LV, Sasse EC et al. Camptothecins compared with etoposide in combination with platinum analog in extensive stage small cell lung cancer: systematic review with meta-analysis. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 1986-1993.
74. Simon M, Argiris A, Murren JR. Progress in the therapy of small cell lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 49: 119-133.
75. Chute JP, Chen T, Feigal E et al. Twenty years of phase III trials for patients with extensive-stage small-cell lung cancer: perceptible progress. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1794-1801.

76. Loehrer PJ, Sr., Ansari R, Gonin R et al. Cisplatin plus etoposide with and without ifosfamide in extensive small-cell lung cancer: a Hoosier Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1995; 13: 2594-2599.
77. Pujol JL, Daures JP, Riviere A et al. Etoposide plus cisplatin with or without the combination of 4'-epidoxorubicin plus cyclophosphamide in treatment of extensive small-cell lung cancer: a French Federation of Cancer Institutes multicenter phase III randomized study. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 300-308.
78. Miyamoto H, Nakabayashi T, Isobe H et al. A phase III comparison of etoposide/cisplatin with or without added ifosfamide in small-cell lung cancer. *Oncology* 1992; 49: 431-435.
79. Niell HB, Herndon JE, 2nd, Miller AA et al. Randomized phase III intergroup trial of etoposide and cisplatin with or without paclitaxel and granulocyte colony-stimulating factor in patients with extensive-stage small-cell lung cancer: Cancer and Leukemia Group B Trial 9732. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3752-3759.
80. Schiller JH, Adak S, Cella D et al. Topotecan versus observation after cisplatin plus etoposide in extensive-stage small-cell lung cancer: E7593--a phase III trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2114-2122.
81. Goldie JH, Coldman AJ. A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate. *Cancer Treat Rep* 1979; 63: 1727-1733.
82. Fukuoka M, Furuse K, Saijo N et al. Randomized trial of cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine versus cisplatin and etoposide versus alternation of these regimens in small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 855-861.
83. Roth BJ, Johnson DH, Einhorn LH et al. Randomized study of cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine versus etoposide and cisplatin versus alternation of these two regimens in extensive small-cell lung cancer: a phase III trial of the Southeastern Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 1992; 10: 282-291.
84. Miles DW, Earl HM, Souhami RL et al. Intensive weekly chemotherapy for good-prognosis patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1991; 9: 280-285.
85. Sculier JP, Paesmans M, Bureau G et al. Multiple-drug weekly chemotherapy versus standard combination regimen in small-cell lung cancer: a phase III randomized study conducted by the European Lung Cancer Working Party. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1858-1865.
86. Fukuoka M, Masuda N, Negoro S et al. CODE chemotherapy with and without granulocyte colony-stimulating factor in small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 1997; 75: 306-309.
87. Cohen MH, Creaven PJ, Fossieck BE, Jr. et al. Intensive chemotherapy of small cell bronchogenic carcinoma. *Cancer Treat Rep* 1977; 61: 349-354.
88. Arriagada R, Le Chevalier T, Pignon JP et al. Initial chemotherapeutic doses and survival in patients with limited small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 1993; 329: 1848-1852.
89. Thatcher N, Girling DJ, Hopwood P et al. Improving survival without reducing quality of life in small-cell lung cancer patients by increasing the dose-intensity of chemotherapy with granulocyte colony-stimulating factor support: results of a British Medical Research Council Multicenter Randomized Trial. Medical Research Council Lung Cancer Working Party. *J Clin Oncol* 2000; 18: 395-404.
90. Klasa RJ, Murray N, Coldman AJ. Dose-intensity meta-analysis of chemotherapy regimens in small-cell carcinoma of the lung. *J Clin Oncol* 1991; 9: 499-508.

91. Spigel DR, Greco FA, Zubkus JD et al. Phase II trial of irinotecan, carboplatin, and bevacizumab in the treatment of patients with extensive-stage small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2009; 4: 1555-1560.
92. Karachaliou N, Rosell R. Small-cell lung cancer: where are we now and what can we expect for the future? *Future Oncol* 2013; 9: 1065-1068.
93. Hurria A, Kris MG. Management of lung cancer in older adults. *CA Cancer J Clin* 2003; 53: 325-341.
94. Girling DJ. Comparison of oral etoposide and standard intravenous multidrug chemotherapy for small-cell lung cancer: a stopped multicentre randomised trial. Medical Research Council Lung Cancer Working Party. *Lancet* 1996; 348: 563-566.
95. Souhami RL, Spiro SG, Rudd RM et al. Five-day oral etoposide treatment for advanced small-cell lung cancer: randomized comparison with intravenous chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 577-580.
96. Neubauer M, Schwartz J, Caracandas J et al. Results of a phase II study of weekly paclitaxel plus carboplatin in patients with extensive small-cell lung cancer with Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status of 2, or age > or = 70 years. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1872-1877.
97. Westeel V, Murray N, Gelmon K et al. New combination of the old drugs for elderly patients with small-cell lung cancer: a phase II study of the PAVE regimen. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1940-1947.
98. Okamoto H, Watanabe K, Nishiwaki Y et al. Phase II study of area under the plasma-concentration-versus-time curve-based carboplatin plus standard-dose intravenous etoposide in elderly patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3540-3545.
99. Murray N, Grafton C, Shah A et al. Abbreviated treatment for elderly, infirm, or noncompliant patients with limited-stage small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3323-3328.
100. Hurwitz JL, McCoy F, Scullin P, Fennell DA. New advances in the second-line treatment of small cell lung cancer. *Oncologist* 2009; 14: 986-994.
101. Schneider BJ. Management of recurrent small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2008; 6: 323-331.
102. Pietanza MC, Kadota K, Huberman K et al. Phase II trial of temozolomide in patients with relapsed sensitive or refractory small cell lung cancer, with assessment of methylguanine-DNA methyltransferase as a potential biomarker. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 1138-1145.
103. Cheng S, Evans WK, Stys-Norman D, Shepherd FA. Chemotherapy for relapsed small cell lung cancer: a systematic review and practice guideline. *J Thorac Oncol* 2007; 2: 348-354.
104. Ettinger DS. New drugs for chemotherapy-naive patients with extensive-disease small cell lung cancer. *Semin Oncol* 2001; 28: 27-29.
105. Kelly K. New chemotherapy agents for small cell lung cancer. *Chest* 2000; 117: 156S-162S.
106. Masters GA, Declerck L, Blanke C et al. Phase II trial of gemcitabine in refractory or relapsed small-cell lung cancer: Eastern Cooperative Oncology Group Trial 1597. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1550-1555.
107. Agelaki S, Kontopodis E, Kotsakis A et al. A phase I clinical trial of weekly oral topotecan for relapsed small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 72: 45-51.

- 108.von Pawel J, Schiller JH, Shepherd FA et al. Topotecan versus cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine for the treatment of recurrent small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 658-667.
- 109.O'Brien ME, Ciuleanu TE, Tsekov H et al. Phase III trial comparing supportive care alone with supportive care with oral topotecan in patients with relapsed small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5441-5447.
- 110.Eckardt JR, von Pawel J, Pujol JL et al. Phase III study of oral compared with intravenous topotecan as second-line therapy in small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 2086-2092.
- 111.Huber RM, Reck M, Gosse H et al. Efficacy of a toxicity-adjusted topotecan therapy in recurrent small cell lung cancer. *Eur Respir J* 2006; 27: 1183-1189.
- 112.Shah C, Ready N, Perry M et al. A multi-center phase II study of weekly topotecan as second-line therapy for small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2007; 57: 84-88.
- 113.Ettinger DS, Jotte R, Lorigan P et al. Phase II study of amrubicin as second-line therapy in patients with platinum-refractory small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2598-2603.
- 114.Inoue A, Sugawara S, Yamazaki K et al. Randomized phase II trial comparing amrubicin with topotecan in patients with previously treated small-cell lung cancer: North Japan Lung Cancer Study Group Trial 0402. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5401-5406.
- 115.Onoda S, Masuda N, Seto T et al. Phase II trial of amrubicin for treatment of refractory or relapsed small-cell lung cancer: Thoracic Oncology Research Group Study 0301. *J Clin Oncol* 2006; 24: 5448-5453.
- 116.Shimokawa T, Shibuya M, Kitamura K et al. Retrospective analysis of efficacy and safety of amrubicin in refractory and relapsed small-cell lung cancer. *Int J Clin Oncol* 2009; 14: 63-69.
- 117.Jotte R, Conkling P, Reynolds C et al. Randomized phase II trial of single-agent amrubicin or topotecan as second-line treatment in patients with small-cell lung cancer sensitive to first-line platinum-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 2011; 29: 287-293.
- 118.Bogart JA, Herndon JE, 2nd, Lyss AP et al. 70 Gy thoracic radiotherapy is feasible concurrent with chemotherapy for limited-stage small-cell lung cancer: analysis of Cancer and Leukemia Group B study 39808. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 59: 460-468.
- 119.Liangswangwong V, Bonner JA, Shaw EG et al. Limited-stage small-cell lung cancer: patterns of intrathoracic recurrence and the implications for thoracic radiotherapy. *J Clin Oncol* 1994; 12: 496-502.
- 120.Jeremic B, Shibamoto Y, Nikolic N et al. Role of radiation therapy in the combined-modality treatment of patients with extensive disease small-cell lung cancer: A randomized study. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2092-2099.
- 121.Arriagada R, Le Chevalier T, Borie F et al. Prophylactic cranial irradiation for patients with small-cell lung cancer in complete remission. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 183-190.
- 122.Auperin A, Arriagada R, Pignon JP et al. Prophylactic cranial irradiation for patients with small-cell lung cancer in complete remission. Prophylactic Cranial Irradiation Overview Collaborative Group. *N Engl J Med* 1999; 341: 476-484.
- 123.Slotman B, Faivre-Finn C, Kramer G et al. Prophylactic cranial irradiation in extensive small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2007; 357: 664-672.

124. Le Pechoux C, Dunant A, Senan S et al. Standard-dose versus higher-dose prophylactic cranial irradiation (PCI) in patients with limited-stage small-cell lung cancer in complete remission after chemotherapy and thoracic radiotherapy (PCI 99-01, EORTC 22003-08004, RTOG 0212, and IFCT 99-01): a randomised clinical trial. *Lancet Oncol* 2009; 10: 467-474.
125. Nospikel T. DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 994-1009.
126. de Laat WL, Jaspers NG, Hoeijmakers JH. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* 1999; 13: 768-785.
127. Arora S, Kothandapani A, Tillison K et al. Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells. *DNA Repair (Amst)* 2010; 9: 745-753.
128. Cobo M, Isla D, Massuti B et al. Customizing cisplatin based on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expression: a phase III trial in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 2747-2754.
129. Papadaki C, Sfakianaki M, Ioannidis G 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; 7: 663-671.
130. Olaussen KA, Dunant A, Fouret P et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 2006; 355: 983-991.
131. Chen S, Zhang J, Wang R et al. The platinum-based treatments for advanced non-small cell lung cancer, is low/negative ERCC1 expression better than high/positive ERCC1 expression? A meta-analysis. *Lung Cancer* 2010; 70: 63-70.
132. Furuta T, Ueda T, Aune G et al. Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. *Cancer Res* 2002; 62: 4899-4902.
133. 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; 3: e3695.
134. Taron M, Rosell R, Felip E et al. BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 2443-2449.
135. Kennedy RD, Quinn JE, Johnston PG, Harkin DP. BRCA1: mechanisms of inactivation and implications for management of patients. *Lancet* 2002; 360: 1007-1014.
136. Sung M, Giannakakou P. BRCA1 regulates microtubule dynamics and taxane-induced apoptotic cell signaling. *Oncogene* 2013.
137. Lotti LV, Ottini L, D'Amico C et al. Subcellular localization of the BRCA1 gene product in mitotic cells. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 35: 193-203.
138. Mullan PB, Quinn JE, Gilmore PM et al. BRCA1 and GADD45 mediated G2/M cell cycle arrest in response to antimicrotubule agents. *Oncogene* 2001; 20: 6123-6131.
139. Kuo MT, Chen HH, Song IS et al. The roles of copper transporters in cisplatin resistance. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26: 71-83.
140. Komatsu M, Sumizawa T, Mutoh M et al. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. *Cancer Res* 2000; 60: 1312-1316.

141. Nakagawa T, Inoue Y, Kodama H et al. Expression of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) correlates with cisplatin resistance in human non-small cell lung cancer xenografts. *Oncol Rep* 2008; 20: 265-270.
142. Gu J, Linnoila RI, Seibel NL et al. A study of myc-related gene expression in small cell lung cancer by in situ hybridization. *Am J Pathol* 1988; 132: 13-17.
143. Kim YH, Girard L, Giacomini CP et al. Combined microarray analysis of small cell lung cancer reveals altered apoptotic balance and distinct expression signatures of MYC family gene amplification. *Oncogene* 2006; 25: 130-138.
144. Unlocking the mysterious mechanisms of Myc. *Nat Med* 2013; 19: 26-27.
145. Wistuba, II, Gazdar AF, Minna JD. Molecular genetics of small cell lung carcinoma. *Semin Oncol* 2001; 28: 3-13.
146. Johnson BE, Makuch RW, Simmons AD et al. myc family DNA amplification in small cell lung cancer patients' tumors and corresponding cell lines. *Cancer Res* 1988; 48: 5163-5166.
147. Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 976-990.
148. Biroccio A, Benassi B, Fiorentino F, Zupi G. Glutathione depletion induced by c-Myc downregulation triggers apoptosis on treatment with alkylating agents. *Neoplasia* 2004; 6: 195-206.
149. Guo W, Zhang Y, Chen T et al. Efficacy of RNAi targeting of pyruvate kinase M2 combined with cisplatin in a lung cancer model. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137: 65-72.
150. Martinez-Balibrea E, Plasencia C, Gines A et al. A proteomic approach links decreased pyruvate kinase M2 expression to oxaliplatin resistance in patients with colorectal cancer and in human cell lines. *Mol Cancer Ther* 2009; 8: 771-778.
151. Zhao Y, Butler EB, Tan M. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death Dis* 2013; 4: e532.
152. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 2008; 452: 230-233.
153. David CJ, Chen M, Assanah M et al. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature* 2010; 463: 364-368.
154. Wu S, Le H. Dual roles of PKM2 in cancer metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2013; 45: 27-35.
155. Saridaki Z PC, Tzardi M et al. PKM2 expression could predict resistance to oxaliplatin combination chemotherapy in patients with stage II/III or metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 24(Suppl 4):iv115. 2013.
156. Parnell KM, Foulks JM, Nix RN et al. Pharmacologic Activation of PKM2 Slows Lung Tumor Xenograft Growth. *Mol Cancer Ther* 2013.
157. Mo XM, Chen ZF, Qi X et al. DNA-Binding and Topoisomerase-I-Suppressing Activities of Novel Vanadium Compound Van-7. *Bioinorg Chem Appl* 2012; 2012: 756374.
158. Dingemans AM, Witlox MA, Stallaert RA et al. Expression of DNA topoisomerase IIalpha and topoisomerase IIbeta genes predicts survival and response to chemotherapy in patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2048-2058.
159. Kaufmann SH, Karp JE, Jones RJ et al. Topoisomerase II levels and drug sensitivity in adult acute myelogenous leukemia. *Blood* 1994; 83: 517-530.
160. Wang JC, Caron PR, Kim RA. The role of DNA topoisomerases in recombination and genome stability: a double-edged sword? *Cell* 1990; 62: 403-406.

161. Mathijssen RH, Loos WJ, Verweij J, Sparreboom A. Pharmacology of topoisomerase I inhibitors irinotecan (CPT-11) and topotecan. *Curr Cancer Drug Targets* 2002; 2: 103-123.
162. Osheroff N, Corbett AH, Robinson MJ. Mechanism of action of topoisomerase II-targeted antineoplastic drugs. *Adv Pharmacol* 1994; 29B: 105-126.
163. Wendorff TJ, Schmidt BH, Heslop P et al. The structure of DNA-bound human topoisomerase II alpha: conformational mechanisms for coordinating inter-subunit interactions with DNA cleavage. *J Mol Biol* 2012; 424: 109-124.
164. Kreipe H, Heidebrecht HJ, Hansen S et al. A new proliferation-associated nuclear antigen detectable in paraffin-embedded tissues by the monoclonal antibody Ki-S1. *Am J Pathol* 1993; 142: 3-9.
165. Bonanno L, Favaretto A, Rugge M et al. Role of genotyping in non-small cell lung cancer treatment: current status. *Drugs* 2011; 71: 2231-2246.
166. Guinee DG, Jr., Holden JA, Benfield JR et al. Comparison of DNA topoisomerase II alpha expression in small cell and nonsmall cell carcinoma of the lung. In search of a mechanism of chemotherapeutic response. *Cancer* 1996; 78: 729-735.
167. Husain I, Mohler JL, Seigler HF, Besterman JM. Elevation of topoisomerase I messenger RNA, protein, and catalytic activity in human tumors: demonstration of tumor-type specificity and implications for cancer chemotherapy. *Cancer Res* 1994; 54: 539-546.
168. Surowiak P, Materna V, Kaplenko I et al. Topoisomerase 1A, HER/2neu and Ki67 expression in paired primary and relapse ovarian cancer tissue samples. *Histol Histopathol* 2006; 21: 713-720.
169. Ceppi P, Longo M, Volante M et al. Excision repair cross complementing-1 and topoisomerase IIalpha gene expression in small-cell lung cancer patients treated with platinum and etoposide: a retrospective study. *J Thorac Oncol* 2008; 3: 583-589.
170. Sereno M, Cejas P, Moreno V et al. ERCC1 and topoisomerase I expression in small cell lung cancer: prognostic and predictive implications. *Int J Oncol* 2012; 40: 2104-2110.
171. Lee HW, Han JH, Kim JH et al. Expression of excision repair cross-complementation group 1 protein predicts poor outcome in patients with small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2008; 59: 95-104.
172. Chiappori AA, Zheng Z, Chen T et al. Features of potentially predictive biomarkers of chemotherapeutic efficacy in small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2010; 5: 484-490.

6. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΨΗΦΙΟΥ ΔΙΔΑΚΤΟΡΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Predictive Value of BRCA1, ERCC1, ATP7B, PKM2, TOPO1, TOPO-IIA, TOPOIIB and C-MYC Genes in Patients with Small Cell Lung Cancer (SCLC) Who Received First Line Therapy with Cisplatin and Etoposide

Niki Karachaliou^{1,2}, Chara Papadaki¹, Eleni Lagoudaki³, Maria Trypaki², Maria Sfakianaki², Anastasios Koutsopoulos³, Dimitris Mavroudis^{1,2}, Efstathios Stathopoulos³, Vassilis Georgoulas^{1,2}, John Souglakos^{1,2*}

¹ Laboratory of Tumour Cell Biology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece, ² Department of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, Crete, Greece, ³ Department of Pathology, University General Hospital of Heraklion, Crete, Greece

Abstract

Background: The aim of the study was to evaluate the predictive value of genes involved in the action of cisplatin-etoposide in Small Cell Lung Cancer (SCLC).

Methods: 184 SCLC patients' primary tumour samples were analyzed for *ERCC1*, *BRCA1*, *ATP7B*, *PKM2*, *TOPO1*, *TOPOIIA*, *TOPOIIB* and *C-MYC* mRNA expression. All patients were treated with cisplatin-etoposide.

Results: The patients' median age was 63 years and 120 (65%) had extended stage, 75 (41%) had increased LDH serum levels and 131 (71%) an ECOG performance status was 0-1. Patients with limited stage, whose tumours expressed high *ERCC1* ($p=0.028$), *PKM2* ($p=0.046$), *TOPO1* ($p=0.008$), *TOPOIIA* ($p=0.002$) and *TOPOIIB* ($p<0.001$) mRNA had a shorter Progression Free Survival (PFS). In limited stage patients, high expression of *ERCC1* ($p=0.014$), *PKM2* ($p=0.026$), *TOPOIIA* ($p=0.021$) and *TOPOIIB* ($p=0.019$) was correlated with decreased median overall survival (mOS) while in patients with extended stage, only high *TOPOIIB* expression had a negative impact on Os ($p=0.035$). The favorable expression signature (low expression of *ERCC1*, *PKM2*, *TOPOIIA* and *TOPOIIB*) was correlated with significantly better PFS and Os in both LS-SCLC ($p<0.001$ and $p=0.007$, respectively) and ES-SCLC ($p=0.007$ and $p=0.011$, respectively) group. The unfavorable expression signature was an independent predictor for poor PFS (HR: 3.18; $p=0.002$ and HR: 3.14; $p=0.021$) and Os (HR: 4.35; $p=0.001$ and HR: 3.32; $p=0.019$) in both limited and extended stage, respectively.

Conclusions: Single gene's expression analysis as well as the integrated analysis of *ERCC1*, *PKM2*, *TOPOIIA* and *TOPOIIB* may predict treatment outcome in patients with SCLC. These findings should be further validated in a prospective study.

Citation: Karachaliou N, Papadaki C, Lagoudaki E, Trypaki M, Sfakianaki M, et al. (2013) Predictive Value of BRCA1, ERCC1, ATP7B, PKM2, TOPO1, TOPO-IIA, TOPOIIB and C-MYC Genes in Patients with Small Cell Lung Cancer (SCLC) Who Received First Line Therapy with Cisplatin and Etoposide. PLoS ONE 8(9): e74611. doi:10.1371/journal.pone.0074611

Editor: Ganesh Chandra Jagetia, Mizoram University, India

Received March 19, 2013; Accepted August 5, 2013; Published September 13, 2013

Copyright: © 2013 Karachaliou et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was partially supported by grants from the Cretan Association for Biomedical Research (CABR) and the Hellenic Society of Medical Oncology (HeSMO). NIK is a recipient of a HeSMO fellowship. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: georgsec@med.uoc.gr

Introduction

Small cell lung cancer (SCLC) is a biologically complex malignancy with treatment that has remained largely unchanged over the last 30 years [1]. Although the proportion of patients with SCLC has been decreased, it still accounts for approximately 15% of all lung cancer cases [2]. SCLC is

characterized by early dissemination, and 70%–80% of patients have metastatic disease at diagnosis (extensive stage, ES-SCLC) while the rest present with disease limited to the thorax (limited-stage, LS-SCLC) [3]. The standard of care for SCLC is platinum-based combination chemotherapy, using either etoposide or irinotecan, in association with radiotherapy in limited stage disease (LS-SCLC). There is a typical disease

trajectory with an initial good clinical response followed by rapid relapse of chemoresistant tumour and death [4]. Because surgical resection is not part of standard care, SCLC research using primary tumour tissue is limited to small diagnostic samples and, thus, the therapeutic benefits from the molecular analysis of these tumours are limited during the last 30 years [5].

Theoretically, the molecular characteristics obtained from the primary tumours have the potential to affect therapeutic decisions and to allow clinicians to select chemotherapy drugs that will give patients maximal benefit while simultaneously minimize toxicity [6]. Primary and/or acquired resistance to chemotherapy or radiotherapy is the main cause of poor outcome in patients with lung cancer [7,8]. Over the last years a growing body of evidence, from gene expression, mutational and proteomic profiling studies, as well as from *in vitro* models led to the identification of molecular markers related with resistance to platinum analogs and topoisomerase inhibitors [9].

The Excision Repair Cross Complementation group 1 (*ERCC1*) is an enzyme which plays a key role in the GG-Nucleotide Excision Repair (GG-NER) pathway which repairs DNA adducts and other DNA helix-distorting lesions including those associated with cisplatin administration [10]. The majority of studies on *ERCC1* and cisplatin, in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) as well as in other solid tumours, share in common the finding that low-*ERCC1* expression is associated with a better response to platinum-based chemotherapy [11-13]. On the other hand, the results of *in vitro* studies have suggested the superiority of TC-NER pathway, in which breast cancer susceptibility gene 1 (*BRCA1*) protein is involved, to GG-NER pathway in predicting platinum resistance [14]. Modulation of *BRCA1* expression leads to modification of TC-NER and, hence, to radio- and chemo-resistance [15,16]. *BRCA1* is also involved in homologous recombination repair (HRR) and non-homologous end joining (NHEJ), in response to DNA damage and may be a regulator of mitotic spindle assembly, as *BRCA1* and β -tubulin co-localize to the microtubules of the mitotic spindle and to the centrosomes [17,18]. In addition, recent data have shown that import and export transporters involved in maintenance of copper homeostasis are also involved in the transport of cisplatin [19]. Especially, overexpression of the P-type transporter *ATP7B* conferred cisplatin resistance associated with decreased intracellular accumulation of cisplatin and carboplatin [20]. Also, the role of pyruvate kinase isoform M2 (*PKM2*) in resistance to platinum analogs is recently under extensive investigation [21,22]; *PKM2* replaces the specific isoforms (type L, R, and M1) during tumorigenesis and substitution is under the control of the transcription factor *C-MYC* [23,24]. The overexpression of MYC proteins in SCLC is largely a result of gene amplification and leads to more rapid proliferation and loss of terminal differentiation [25]. *C-MYC* overexpression occurs in 16–32% of SCLC and in 40% of cell lines established from patients whose disease progressed after chemotherapy [26,27]. Finally, several mechanisms of resistance have been suggested to involve DNA topoisomerase I and II (*TOPOI* and *TOPOII*), which are the target of several compounds, including topoisomerase-I inhibitors (such as irinotecan and topotecan)

as well as topoisomerase-II inhibitors (such as etoposide and doxorubicin) [7,28,29].

This study retrospectively analyzes the predictive value on both response to treatment and survival of *BRCA1*, *ERCC1*, *ATP7B*, *PKM2*, *TOPOI*, *TOPOIIA*, *TOPOIIB* and *C-MYC* mRNA levels, as they are detected by real-time PCR in SCLC patients treated with platinum-based combination chemotherapy with or without chest radiotherapy.

Materials and Methods

Patients

From the database of histologically confirmed SCLC patients, treated with cisplatin and etoposide, in the Department of Medical Oncology in the University Hospital of Heraklion, we retrospectively collected all available tissue samples and the corresponding clinical data. In total, 184 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) bronchoscopic or fine needle aspiration (FNA) biopsies from the primary tumours were collected. The study was approved by the institutional review board and all patients had signed informed consent for molecular analysis at the time of diagnosis. Main inclusion criteria were: histologically confirmed SCLC; first-line treatment with cisplatin or carboplatin and etoposide with or without radiotherapy and available tumour tissue. The study has been approved from the ethics and scientific committee of University Hospital of Heraklion (approval number 4456/14-5-2010) and all patients sign informed consent for their participation in the study.

Pathological evaluation, micro-dissection and RNA extraction

All paraffin-embedded tumours were reviewed by two independent pathologists to ensure the validity of the specimen and to select the proper area for microdissection. Sections of 5µm thickness were prepared and after staining with nuclear Fast Red (Sigma-Aldrich, St Louis, MO USA) cancer cells were procured using an Eppendorf piezoelectric microdissector (Eppendorf, Hamburg, Germany). RNA extraction was performed using the trizol LS method (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 50ng of total RNA for each gene was needed to prepare cDNA, using SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) [30,31]. 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 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) as calibrators. Final expression values were determined as follows: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (sample- ΔCt / 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 housekeeping genes values. In all experiments, only triplicates with a standard deviation of the Ct value <0.25 were accepted. In addition, genomic DNA contamination was excluded by including non-reverse transcribed RNA as a control for all 184 patients' samples.

Primers and probes for gene expression analysis were designed using Primer Express 2.0 Software (AB) on the basis

of their Ref Seq in <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene> designed. The detailed sequence and hybridization data are provided in table S1.

Statistical Considerations

Gene expression levels were quantified as continuous variable. The Pearson's correlation coefficient analysis was used to determine correlation among different genes. Progression free survival (PFS) was calculated from the diagnosis of disease to demonstrated radiological progression or death from any cause. Overall survival (OS) was calculated from the diagnosis of disease to death from any cause. Median PFS and OS were estimated using the Kaplan-Meier curves and comparisons have been made using two-sided log-rank test. A univariate Cox regression analysis, with hazard ratios and 95% confidence intervals (CIs), was used to assess the association between each potential predictive factor and survival or PFS. These factors were then included in a multivariate Cox proportional hazards regression model with a stepwise procedure (both forward and backward) to evaluate the independent significance of different variables on survival and PFS. All results were considered as statistically significant with $p < 0.05$ (two-sided test).

Results

Patients' characteristics and clinico-pathological features

The main demographics and clinical characteristics of the study population are summarized in Table 1. Patients were predominately males (87%), with median age of 63 years and good performance status (PS; European Cooperative Oncology Group-ECOG 0-1:71%); about one third had LS-SCLC and 41% presented elevated serum levels of LDH at the time of initial diagnosis. The treatment protocol consisted of four to six three-week cycles of 100mg of epoxide per square meter on days 1, 2 and 3 and 80mg of cisplatin per square meter or carboplatin AUC 5-6 on day 1. All regimens required hydration and administration of antiemetic drugs. Sixty of LS-SCLC patients (60 out of 64; 94%) received curative radiotherapy which was started with cycle 2 of chemotherapy.

Patients' outcome was typical for SCLC. At the time of analysis and after a median follow-up of 9.1 months (min-max: 0.3-156 months), 171 disease relapses and 169 deaths have been recorded. The median OS was 15 months for patients with LS-SCLC and 8 months for those with ES-SCLC and the median PFS was 8 and 4 months, respectively (Table 1). The response to first line treatment is presented in Table 2.

Genes' mRNA expression and correlations

The median expression values for each gene are presented in Table S2. The correlation among several genes' expression confirmed the biological model at the basis of the selection of the analyzed genes. Significant correlations were observed between PKM2 and *C-MYC* ($r = 0.21$; $p = 0.015$), *BRCA1* and *ERCC1* ($r = 0.65$; $p < 0.001$), *TOPO1* and *TOPO1IA* ($r = 0.40$; $p < 0.001$), *TOPO1* and *TOPO1IB* ($r = 0.26$; $p = 0.002$), and

Table 1. Patients' and tumours' characteristics.

Feature	N	%
	184	
Median Age (Range) years	63 (33-78)	
≥ 65 years	98	54
Gender		
Male	160	87
Female	24	13
Stage		
Limited	64	35
Extended	120	65
ECOG PS		
0-1	131	71
2	53	29
LDH @ Diagnosis		
Normal	109	59
Elevated	75	41
Curative Radiotherapy		
Limited	60	33
Extended	0	0
Relapse		
Yes	171	93
No	13	7
Second line Chemotherapy		
Yes	145	79
No	39	11
Survival Status		
Death	169	92
Alive	15	8
Median Progression Free Survival (Range)	Months	
Extended	4.0 (0.3-16)	
Limited	8.0 (1.3-121)	
Median Overall Survival (Range)	Months	
Extended	7.6 (2.3-26.0)	
Limited	15.0 (4.6-156.0)	

doi: 10.1371/journal.pone.0074611.t001

Table 2. Response to treatment.

	CR n (%)	PR n (%)	SD n (%)	PD n (%)	NE n (%)
LS-SCLC (n=64)	13 (20)	30 (47)	7 (11)	11 (17)	3 (5)
	ORR: 43 (67)				
ES-SCLC (n=120)	1 (0.8)	42 (35)	18 (15)	54 (45)	5 (4.2)
	ORR: 43 (35.8)				

CR: Complete Response, PR: Partial Response, SD: Stable Disease,

PD: Progressive Disease, ORR: Overall Response Rate

doi: 10.1371/journal.pone.0074611.t002

between *TOPO-1IA* and *TOPO1IB* ($r = 0.67$; $p < 0.001$). There was no any significant correlation between the studied genes and the main clinical features such as disease stage, gender, PS and LDH levels.

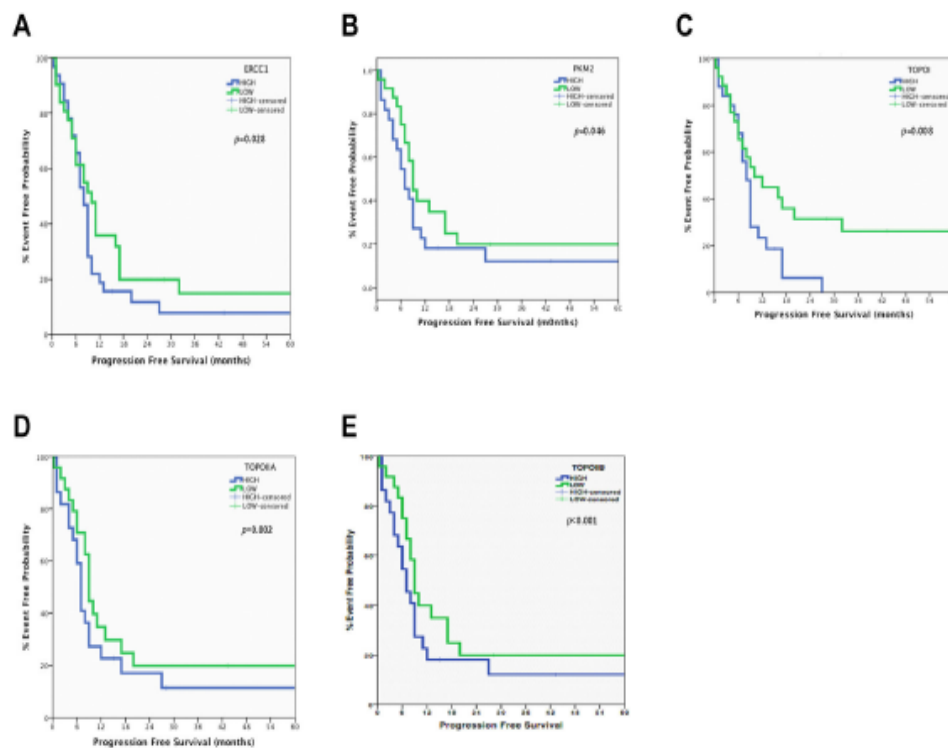


Figure 1. Progression Free Survival in Limited Stage-SCLC. A. *ERCC1* mRNA levels and Progression Free Survival in Limited Stage-SCLC. B. *PKM2* mRNA levels and Progression Free Survival in Limited Stage-SCLC. C. *TOPO1* mRNA levels and Progression Free Survival in Limited Stage-SCLC. D. *TOPOIIA* mRNA levels and Progression Free Survival in Limited Stage-SCLC. E. *TOPOIIB* mRNA levels and Progression Free Survival in Limited Stage-SCLC.

doi: 10.1371/journal.pone.0074611.g001

Genes' expression and patients' outcome

When the whole patients' population was analyzed no significant correlation has been observed regarding median PFS or OS (Table S3). In contrast, when we examined separately LS-SCLC and ES-SCLC patients' significant associations have been revealed. Indeed, in the LS-SCLC group, shorter median PFS was observed in patients with high mRNA expression of *ERCC1* (7.9 vs. 10.1 months; $p = 0.028$), *PKM2* (7.1 vs. 9.0 months; $p = 0.046$), *TOPO1* (7.8 vs. 10.2 months; $p = 0.008$), *TOPOIIA* (7 vs. 9.3 months; $p = 0.002$) and *TOPOIIB* (6.6 vs. 9.1 months; $p < 0.001$) in comparison with those with low expression of these genes (Table S4 and Figure 1). Moreover, median OS was significantly decreased in patients with high mRNA expression of *ERCC1* (13.2 vs. 19.1 months; $p = 0.014$), *PKM2* (12 vs. 18.0 months; $p = 0.026$), *TOPOIIA* (13.0 vs. 18.3 months; $p = 0.021$) and *TOPOIIB* (12.8 vs. 18.4 months; $p = 0.019$) in comparison with those with low expression of these genes (Table S4 and Figure 2). No significant correlation has been observed between median PFS and OS and mRNA expression of any of the studied genes, with the exception of *TOPOIIB*, in patients with ES-SCLC (Table S5). More specifically, high mRNA expression of

TOPOIIB was significantly associated with decreased median OS (5.0 vs. 9.2 months; $p = 0.035$) (Table S5 and Figure 2E)

When the expression of *ERCC1*, *PKM2* (sensitivity to platinum analogs) and *TOPOIIA* and *TOPOIIB* (sensitivity to etoposide) were combined significant correlations in both patients' populations have been observed. The unfavorable expression signature (high mRNA expression of *ERCC1*, *PKM2*, *TOPOIIA* and *TOPOIIB*) in patients with LS-SCLC ($n=26$) was a significant predictor of shorter median PFS (6 vs. 11 months; $p < 0.001$) and OS (13 vs. 18 months; $p = 0.007$) when compared with those with favorable expression signature (low mRNA expression of *ERCC1*, *PKM2*, *TOPOIIA* and *TOPOIIB*; $n=25$) (Figure 3A and 3B). Similarly, in the ES-SCLC group, the patients with the unfavorable expression signature ($n=53$) presented significantly decreased PFS (3.8 vs. 6.1 months; $p = 0.007$) and OS (4.2 vs. 8.4 months; $p = 0.011$) in comparison with those with the favorable expression signature ($n=51$; Figure 3C and D)

Multivariate analysis for PFS and OS

Univariate analysis demonstrated that in patients with LS-SCLC high *ERCC1* (HR: 1.71, 95% CI: 1.24-2.91; $p = 0.01$),

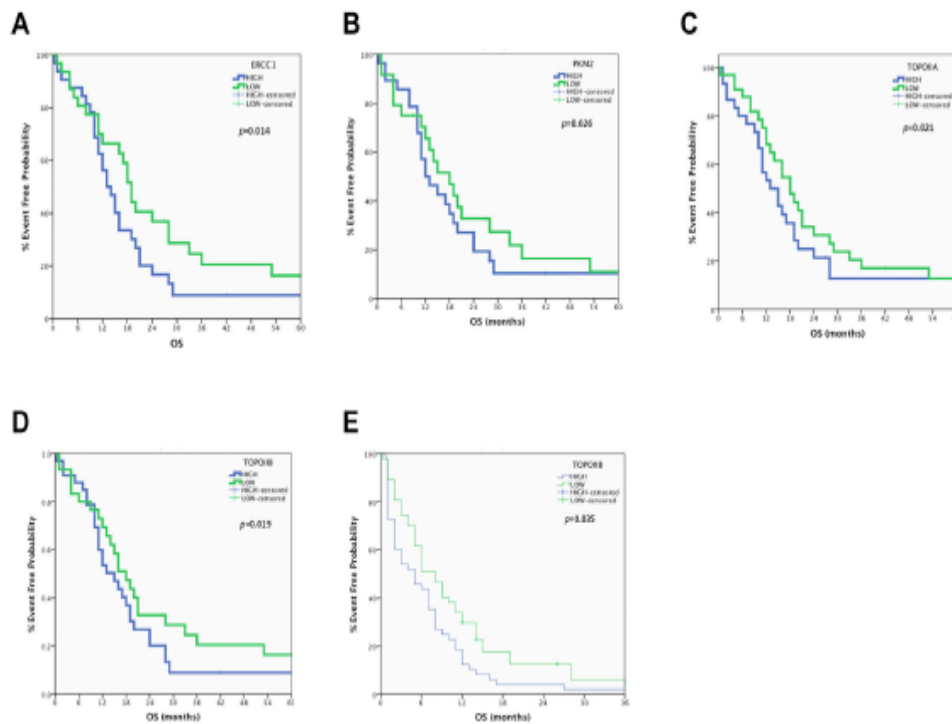


Figure 2. Overall Survival in Limited Stage-SCLC. A. *ERCC1* mRNA levels and Overall Survival in Limited Stage-SCLC. B. *PKM2* mRNA levels and Overall Free Survival in Limited Stage-SCLC. C. *TOPOIIA* mRNA levels and Overall Free Survival in Limited Stage-SCLC. D. *TOPOII B* mRNA levels and Overall Free Survival in Limited Stage-SCLC. E. *TOPOII B* mRNA levels and Overall Free Survival in Extended Stage-SCLC.

doi: 10.1371/journal.pone.0074611.g002

PKM2 (HR: 1.64, 95% CI: 1.17-2.42; $p=0.031$), *TOPOI* (HR: 1.41, 95% CI: 1.26-1.98; $p=0.044$), *TOPOIIA* (HR: 1.74, 95% CI: 1.33-3.1; $p=0.009$) and *TOPOII B* (HR: 1.82, 95% CI: 1.46-3.18; $p=0.004$) mRNA expression, the unfavourable expression signature (HR: 4.97, 95% CI: 2.74-7.61; $p=0.001$), as well as PS of 2 (HR: 1.46, 95% CI: 1.22-2.81; $p=0.017$) and elevated serum levels of LDH (HR: 1.52, 95% CI: 1.21-2.78; $p=0.021$) were significantly associated with decreased PFS (Table 3). Also, high *ERCC1* (HR: 1.63, 95% CI: 1.13-2.27; $p=0.027$), *PKM2* (HR: 1.49, 95% CI: 1.06-1.84; $p=0.046$), *TOPOIIA* (HR: 1.69, 95% CI: 1.2-2.34; $p=0.018$), *TOPOII B* (HR: 1.8, 95% CI: 1.43-3.11; $p=0.006$) mRNA expression as well as the unfavourable expression signature (HR: 5.34, 95% CI: 3.85-7.62; $p<0.0001$), PS of 2 (HR: 1.58, 95% CI: 1.29-2.9; $p=0.013$) and elevated serum levels of LDH levels (HR: 1.56, 95% CI: 1.22-2.94; $p=0.027$) were associated with decreased median OS. In ES-SCLC group, only the unfavourable expression signature (HR: 3.56, 95% CI: 1.89-6.46; $p=0.001$), PS of 2 (HR: 1.81, 95% CI: 1.17-2.83; $p=0.023$) and elevated serum levels of LDH (HR: 1.93, 95% CI: 1.43-2.94; $p=0.019$) were associated with decreased PFS, while *TOPOII B* (HR: 1.53, 95% CI: 1.09-1.89; $p=0.046$) mRNA expression, the unfavourable expression signature (HR: 4.14, 95% CI:

1.95-6.58; $p=0.001$), PS of 2 (HR: 1.94, 95% CI: 1.62-2.58; $p=0.017$) and elevated serum levels of LDH (HR: 2.01, 95% CI: 1.61-2.64; $p=0.013$) were correlated with shorter median OS (Table 4).

Cox proportional hazard analysis revealed that in patients with LS-SCLC high mRNA expression of *TOPOIIA* (HR: 1.62, 95% CI: 1.13-2.41; $p=0.039$) and *TOPOII B* (HR: 1.79, 95% CI: 1.40-2.88; $p=0.022$) as well as unfavourable expression signature (HR: 3.18, 95% CI: 1.94-4.85; $p=0.002$), PS of 2 (HR: 1.38, 95% CI: 1.14-2.63; $p=0.02$) and elevated serum levels of LDH (HR: 1.6, 95% CI: 1.32-2.94; $p=0.017$) emerged as independent factors associated with decreased PFS (Table 4). Similarly, *TOPOII B* (HR: 1.77, 95% CI: 1.41-2.91; $p=0.016$) mRNA expression, unfavourable expression signature (HR: 4.35, 95% CI: 2.76-6.08; $p=0.001$), PS of 2 (HR: 1.45, 95% CI: 1.22-2.64; $p=0.016$) and elevated serum levels of LDH levels (HR: 1.63, 95% CI: 1.29-3.01; $p=0.011$) were emerged as independent factors correlated with decreased median OS in the same group of patients (Table 4). In the group of patients with ES-SCLC only the unfavourable expression signature (HR: 3.14, 95% CI: 1.76-4.82; $p=0.021$), PS of 2 (HR: 1.76, 95% CI: 1.19-2.78; $p=0.031$) and elevated serum levels of LDH (HR: 1.84, 95% CI: 1.41-2.77; $p=0.022$) emerged as independent

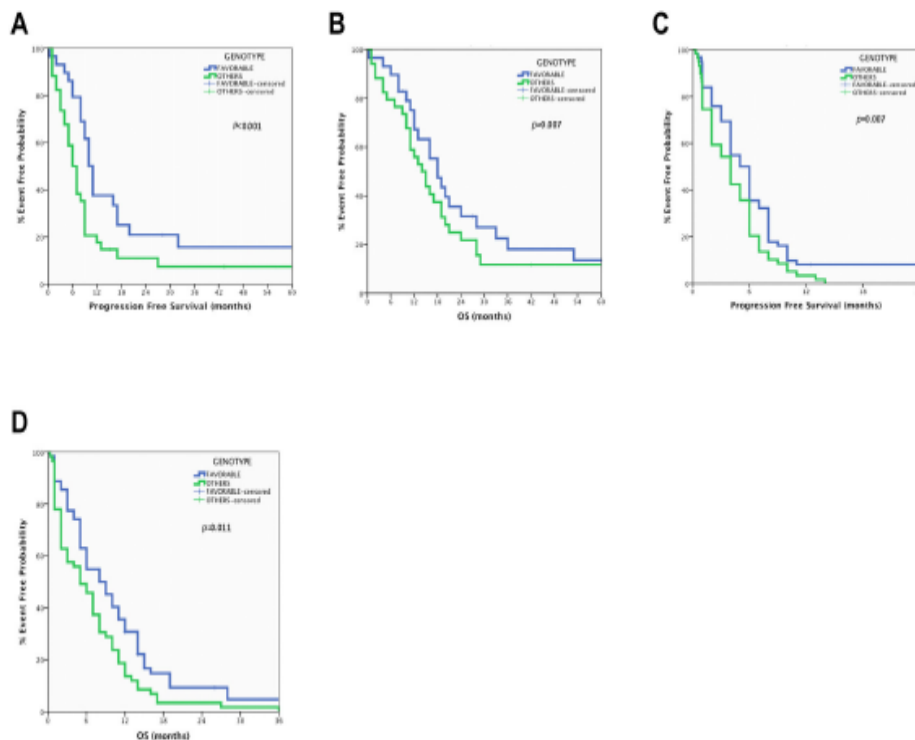


Figure 3. Predictive value of the expression signature (favorable: low *ERCC1*, *PKM2*, *TOPOIIA* and *TOPOIIB* mRNA levels) in SCLC. A. Correlation of expression signature with Progression Free Survival in Limited Stage-SCLC. B. Correlation of expression signature with Overall Survival in Limited Stage-SCLC. C. Correlation of expression signature with Progression Free Survival in Extended Stage-SCLC. D. Correlation of expression signature with Overall Survival in Extended Stage-SCLC.

doi: 10.1371/journal.pone.0074611.g003

factors associated with decreased PFS (Table 4). Similarly, unfavourable expression signature (HR: 3.32, 95% CI: 1.91-5.32; $p=0.019$), PS of 2 (HR: 1.88, 95% CI: 1.58-2.47; $p=0.024$) and elevated serum levels of LDH (HR: 1.92, 95% CI: 1.56-2.44; $p=0.019$), as well as *TOPOIIB* mRNA expression (HR: 1.44, 95% CI: 0.98-1.83; $p=0.064$) were revealed as independent factors associated with shorter median OS (Table 4).

Discussion

Over the past decades, there has been a modest improvement in survival of patients with SCLC, but the percentage of long-term survivors remains dismal. Due to the difficulty in obtaining sufficient and adequate tumour material, only few small studies have thus far been performed in SCLC and this disease remains an important target for treatment and research. In the present study which, in the best of our knowledge is the largest one, we analyzed the expression of several related genes with treatment response and we found a potential predictive model in SCLC patients treated with cisplatin and etoposide.

For the first time in 1999, new biological predictive markers were observed to have an impact on response to chemotherapy and survival of patients with SCLC. Consistent with our findings, Dingemans et al reported that *TOPOIIB* expression was predictive for response to chemotherapy, with higher response rates in patients with low *TOPOIIB* levels while high *TOPOIIA* expression predicted for shorter survival [7]. In agreement with these findings, we observed that LS-SCLC patients with low mRNA expression levels of *TOPOIIA* and *TOPOIIB* had significantly better PFS ($p=0.002$ and $p<0.001$, respectively) and OS ($p=0.021$ and $p=0.019$, respectively), while *TOPOIIB* was correlated with decreased median OS in ES-SCLC ($p=0.035$). The most of the *in vitro* studies have reported a close correlation between the expression of *TOPOIIA* and sensitivity to drugs. Also, the higher expression of this enzyme in SCLC has been reported as a possible reason for the higher chemosensitivity [32]. In contrast our results are in the opposite direction and this discrepancy may be attributed to methodological issues (protein versus mRNA expression, cell lines versus human cancer samples etc); in addition, it might be partially explained by the fact that, in our study, *TOPOII* inhibitors were administered together with

Table 3. Univariate analysis for Progression Free Survival and Overall Survival.

	Progression Free Survival			Overall Survival		
	Hazard Ratio	95% CI	p-value	Hazard Ratio	95% CI	p-value
Limited-Stage SCLC (n=64)						
ERCC1 expression (High vs Low)	1.71	1.24-2.91	0.01	1.63	1.13-2.27	0.027
PKM2 expression (High vs Low)	1.64	1.17-2.42	0.031	1.49	1.06-1.84	0.045
TOPOI expression (High vs Low)	1.41	1.26-1.98	0.044	1.37	0.96-1.51	0.106
TOPOIIA expression (High vs Low)	1.74	1.33-3.1	0.009	1.69	1.2-2.34	0.018
TOPOIIB expression (High vs Low)	1.82	1.46-3.18	0.004	1.8	1.43-3.11	0.005
Expression signature (unfavourable vs. favourable)	4.97	2.74-7.61	0.001	5.34	3.85-7.62	<0.001
PS (2 vs. 0-1)	1.46	1.22-2.81	0.017	1.58	1.29-2.9	0.013
LDH (elevated vs. normal)	1.52	1.21-2.78	0.021	1.56	1.22-2.94	0.027
Extended-Stage SCLC (n=120)						
TOPOIIB expression (High vs. Low)	1.25	0.89-1.60	0.186	1.53	1.09-1.89	0.046
Expression signature (unfavourable vs. favourable)	3.56	1.89-6.46	0.001	4.14	1.95-6.58	0.001
PS (2 vs. 0-1)	1.81	1.17-2.83	0.023	1.94	1.62-2.58	0.017
LDH (elevated vs. normal)	1.93	1.43-2.94	0.019	2.01	1.61-2.64	0.013

doi: 10.1371/journal.pone.0074611.t003

Table 4. Multivariate analysis for Progression Free Survival and Overall Survival.

	Progression Free Survival			Overall Survival		
	Hazard Ratio	95% CI	p-value	Hazard Ratio	95% CI	p-value
Limited-Stage SCLC (n=64)						
ERCC1 expression (High vs Low)	1.34	0.96-1.89	0.091	1.33	0.93-1.77	0.104
PKM2 expression (High vs Low)	1.32	0.93-1.82	0.111	1.39	0.96-1.83	0.086
TOPOI expression (High vs Low)	1.29	0.86-1.78	0.178	1.26	0.81-1.61	0.215
TOPOIIA expression (High vs Low)	1.62	1.13-2.41	0.039	1.49	0.97-2.12	0.081
TOPOIIB expression (High vs Low)	1.79	1.40-2.88	0.022	1.77	1.41-2.91	0.016
Expression signature (unfavourable vs. favourable)	3.18	1.94-4.85	0.002	4.35	2.76-6.08	0.001
PS (2 vs. 0-1)	1.38	1.14-2.63	0.02	1.45	1.22-2.64	0.016
LDH (elevated vs. normal)	1.6	1.32-2.94	0.017	1.63	1.29-3.01	0.011
Extended-Stage SCLC (n=120)						
TOPOIIB expression (High vs Low)	1.11	0.74-1.63	0.29	1.44	0.98-1.83	0.064
Expression signature (unfavourable vs. favourable)	3.14	1.76-4.82	0.021	3.32	1.91-5.32	0.019
PS (2 vs. 0-1)	1.76	1.19-2.78	0.031	1.88	1.58-2.47	0.024
LDH (elevated vs. normal)	1.84	1.41-2.77	0.022	1.92	1.56-2.44	0.019

doi: 10.1371/journal.pone.0074611.t004

cisplatin. The findings regarding the expression of *TOPOIIB* are also supported by other studies in SCLC [33].

In addition, *TOPOI* overexpression has been correlated with decreased PFS (HR: 1.41; $p=0.044$). Indeed, augmented expression of *TOPOI* has been described in various types of tumours [34]. For instance, ovarian cancer cases treated with platinum-based drugs but not with topotecan with increased expression of *TOPOIA* demonstrated a significant shorter overall survival, indicating that on cases with augmented expression of *TOPOIA* application of topotecan should be considered as it might change the outcome in this group of patients [35], but the biological rationale is lacking.

The current study also demonstrated that LS-SCLC patients with high expression of *ERCC1* and *PKM2* had shorter median PFS ($p=0.028$ and $p=0.046$, respectively) and OS ($p=0.014$ and $p=0.026$, respectively), while patients with low levels of *TOPOI* presented longer PFS ($p=0.008$) but not OS ($p=0.41$) compared with those with high mRNA expression. These findings are in agreement with those from recently reported studies which demonstrated that the protein or mRNA expression of *ERCC1* and *TOPOI* in SCLC is predictive of treatment efficacy [33,36]. Sereno et al have demonstrated that *TOPOI* mRNA analysis can predict cisplatin response and

prognosis in SCLC patients [36]. Simultaneously, since expression of *TOPOIA* has been documented as a significant predictive index in camptothecin based therapy, tumours with high expression of *TOPOI* may be more amenable to this type of treatment [35]. Also, Ceppi et al, quantified *ERCC1*, *RRM1*, and *TOPOII* mRNA expression in 85 SCLC patients treated with platinum/etoposide [33]; they found that *TOPOII* expression was associated with better response in LS-SCLC patients, while patients of the same stage of disease and low *ERCC1* mRNA levels had significantly longer survival. The multivariate analysis demonstrated that *ERCC1* expression was an independent prognostic factor for survival in LS-SCLC [33]. Similarly, Lee et al, reported that the protein expression of *ERCC1* in 77 SCLC patients treated with platinum-based doublets, was associated with poor OS, especially in patients with LS-SCLC indicating that high expression of *ERCC1* can be a prognostic biomarker for this group of patients [37]. Finally, Chiappori et al, using an immunofluorescence-based automated quantitative technique, scoring *RRM1*, *ERCC1* and *TOPOII* levels in tumour specimens, reported that *TOPOII* mRNA expression predicted for better response while *ERCC1* mRNA expression was the only independent prognostic factor for survival; conversely, there was no prognostic or predictive

role for any of these genes in ES-SCLC [38]. These findings strongly suggest that LS-SCLC seems to represent a disease which may be biologically distinct from ES-SCLC based on the affected molecular mechanism.

Another important finding in the present study is that the integrated analysis of *ERCC1*, *PKM2* (related with resistance to cisplatin), *TOP2IIA* and *TOP2IB* (related with resistance to etoposide) was able to confirm that the group of patients with the favorable expression signature (low expression of all genes) presented an improved OS and PFS when compared with those with the unfavorable expression signature. In fact, in LS-SCLC patients with the favorable expression signature, a PFS of almost one year ($p < 0.001$) and an OS of 18 months ($p = 0.007$) was observed, whereas ES-SCLC patients with low expression of the four genes achieved a PFS of 6.1 months ($p = 0.007$) and an OS of 8.4 months ($p = 0.011$) which were significantly higher compared to patients with the unfavorable expression signature (3.8 months and 4.2 for PFS and OS, respectively).

Despite that, the promising results of the present study should be interpreted with caution due to the limitation of this type of research and not definitive conclusions could be made. The study was retrospective, lacks a validation group and although has included the larger number of patients' samples reported ever, the total number of enrolled patients remains relatively small. However, we consider that this type of research may identify subgroups of patients with substantial benefit from the standard chemotherapy and radiotherapy for SCLC and may lead to the design of a prospective clinical trial in SCLC, where the predictive powers of these biomarker expression levels will be tested and validated prospectively. Finally, this study indicates that even in malignancies with limitations in tissue availability, such as SCLC, combinatory

efforts may provide adequate samples for molecular analysis and contribute by that to the goal of "individualized" treatment.

Supporting Information

Table S1. Sequence of the primers and probes of all reference and target genes.

(DOC)

Table S2. Genes' expression values.

(DOC)

Table S3. Whole patients' population: Correlation of genes' expression value with Progression Free Survival and Overall Survival.

(DOCX)

Table S4. LS-SCLC#: Correlation of genes' expression value and Progression Free Survival and Overall Survival.

(DOCX)

Table S5. ES-SCLC#: Correlation of genes' expression value and Progression Free Survival and Overall Survival.

(DOCX)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NK CP DM VG JS. Performed the experiments: NK CP EL MT MS AK ES JS. Analyzed the data: NK AK DM ES VG JS. Contributed reagents/materials/analysis tools: NK ES VG JS. Wrote the manuscript: NK VG JS. Contributed samples: AK DM.

References

- Metro G, Duranti S, Fischer MJ, Cappuzzo F, Crino L (2012) Emerging drugs for small cell lung cancer—an update. *Expert Opin Emerg Drugs* 17: 31–36. doi:10.1517/14728214.2012.658588. PubMed: 22288522.
- Jänne PA, Freidlin B, Saxman S, Johnson DH, Livingston RB et al. (2002) Twenty-five years of clinical research for patients with limited-stage small cell lung carcinoma in North America. *Cancer* 95: 1529–1538. doi:10.1002/oncr.10841. PubMed: 12237922.
- Govindan R, Page N, Morgensztern D, Read W, Tierney R et al. (2008) Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database. *J Clin Oncol* 24: 4539–4544. doi:10.1200/JCO.2005.04.4869. PubMed: 17008892.
- Amarasena IU, Walters JA, Wood-Baker R, Fong K (2008) Platinum versus non-platinum chemotherapy regimens for small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev* CD: 008849. PubMed: 18843733.
- Lawson MH, Cummings NM, Rassl DM, Russell R, Brenton JD et al. (2011) Two novel determinants of etoposide resistance in small cell lung cancer. *Cancer Res* 71: 4877–4887. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0080. PubMed: 21642373.
- Bepler G (2005) Using translational research to tailor the use of chemotherapy in the treatment of NSCLC. *Lung Cancer* 50 Suppl 1: S13–S14. doi:10.1016/S0169-5002(05)81553-3. PubMed: 16291424.
- Dingemans AM, Witlox MA, Stallaert RA, van der Valk P, Postmus PE et al. (1999) Expression of DNA topoisomerase IIalpha and topoisomerase IIbeta genes predicts survival and response to chemotherapy in patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 5: 2048–2058. PubMed: 10473085.
- Viktorsson K, De Petris L, Lewensohn R (2005) The role of p53 in treatment responses of lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 331: 868–880. doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.192. PubMed: 15885943.
- Bonanno L, Favaretto A, Rugge M, Taron M, Rosell R (2011) Role of genotyping in non-small cell lung cancer treatment: current status. *Drugs* 71: 2231–2246. doi:10.2165/11597700-000000000-00000. PubMed: 22085382.
- de Laat WL, Jaspers NG, Hoejmakers JH (1999) Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* 13: 768–785. doi:10.1101/gad.13.7.768. PubMed: 10197977.
- Cobo M, Isla D, Massuti B, Montes A, Sanchez JM et al. (2007) Customizing cisplatin based on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expression: a phase III trial in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 25: 2747–2754. doi:10.1200/JCO.2006.09.7915. PubMed: 17602080.
- Papadaki C, Sfakianaki M, Ioannidis G, Lagoudaki E, Trypaki M et al. (2012) 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* 7: 663–671. doi:10.1097/JTO.0b013e318244bdd4. PubMed: 22425915.
- Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, André F et al. (2008) DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med* 355: 983–991. doi:10.1056/NEJMoa080570. PubMed: 18857145.
- Furuta T, Ueda T, Aune G, Sarasin A, Kraemer KH et al. (2002) Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. *Cancer Res* 62: 4899–4902. PubMed: 12208738.
- Boukovinas I, Papadaki C, Mendez P, Taron M, Mavroudis D et al. (2008) Tumor BRCA1, RRM1 and RRM2 mRNA expression levels and clinical response to first-line gemcitabine plus docetaxel in non-small-

- cell lung cancer patients. *PLOS ONE* 3: e3695. doi:10.1371/journal.pone.0003695. PubMed: 19002265.
16. Taron M, Rosell R, Felip E, Mendez P, Souglakos J et al. (2004) BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Hum Mol Genet* 13: 2443-2449. doi:10.1093/hmg/ddh280. PubMed: 15317748.
 17. Lotti LV, Ottini L, D'Amico C, Gradini R, Cama A et al. (2002) Subcellular localization of the BRCA1 gene product in mitotic cells. *Genes Chromosomes Cancer* 35: 193-203. doi:10.1002/gcc.10105. PubMed: 12353282.
 18. Mullan PB, Quinn JE, Gilmore PM, McWilliams S, Andrews H et al. (2001) BRCA1 and GADD45 mediated G2/M cell cycle arrest in response to antimicrotubule agents. *Oncogene* 20: 6123-6131. doi: 10.1038/sj.onc.1204712. PubMed: 11593420.
 19. Kuo MT, Chen HH, Song IS, Savaraj N, Ishikawa T (2007) The roles of copper transporters in cisplatin resistance. *Cancer Metastasis Rev* 26: 71-83. doi:10.1007/s10555-007-9045-3. PubMed: 17318448.
 20. Nakagawa T, Inoue Y, Kodama H, Yamazaki H, Kawai K et al. (2008) Expression of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) correlates with cisplatin resistance in human non-small cell lung cancer xenografts. *Oncol Rep* 20: 265-270. PubMed: 18636185.
 21. Guo W, Zhang Y, Chen T, Wang Y, Xue J et al. (2011) Efficacy of RNAi targeting of pyruvate kinase M2 combined with cisplatin in a lung cancer model. *J Cancer Res Clin Oncol* 137: 65-72. doi:10.1007/s00432-010-0860-5. PubMed: 20336315.
 22. Martínez-Balibrea E, Plasencia C, Ginés A, Martínez-Cardús A, Musulén E et al. (2009) A proteomic approach links decreased pyruvate kinase M2 expression to oxaliplatin resistance in patients with colorectal cancer and in human cell lines. *Mol Cancer Ther* 8: 771-778. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0882. PubMed: 19372549.
 23. Christoff HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE et al. (2008) The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 452: 230-233. doi: 10.1038/nature06734. PubMed: 18337823.
 24. David CJ, Chen M, Assanah M, Canoll P, Manley JL (2010) HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature* 463: 364-368. doi:10.1038/nature08697. PubMed: 20010808.
 25. Prins J, De Vries EG, Mulder NH (1993) The myc family of oncogenes and their presence and importance in small-cell lung carcinoma and other tumour types. *Anticancer Res* 13: 1373-1385. PubMed: 8239508.
 26. Johnson BE, Makuch RW, Simmons AD, Gazzdar AF, Burch D et al. (1988) myc family DNA amplification in small cell lung cancer patients' tumors and corresponding cell lines. *Cancer Res* 48: 5163-5166. PubMed: 2842046.
 27. Meyer N, Penn LZ (2008) Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer* 8: 978-990. doi:10.1038/nrc2231. PubMed: 19029958.
 28. Kaufmann SH, Karp JE, Jones RJ, Miller CB, Schneider E et al. (1994) Topoisomerase II levels and drug sensitivity in adult acute myelogenous leukemia. *Blood* 83: 517-530. PubMed: 7904487.
 29. Wang JC, Caron PR, Kim RA (1990) The role of DNA topoisomerases in recombination and genome stability: a double-edged sword? *Cell* 62: 403-406. doi:10.1016/0092-8674(90)90002-V. PubMed: 2165864.
 30. Papadaki C, Mylonaki A et al. (2009) Predictive significance of BRCA1, TXR1 and TSP1 tumoral expression in patients with metastatic breast cancer treated with taxanes-based 1st line chemotherapy. *Impact Congress, Abstract RT*
 31. Papadaki C, Tsaroucha E, Kaklamanis L, Lagoudaki E, Trypaki M et al. (2011) 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* 104: 316-323. doi:10.1038/sj.bjc.6606027. PubMed: 21157449.
 32. Guinee DG Jr., Holden JA, Benfield JR, Woodward ML, Przygodzki RM et al. (1996) Comparison of DNA topoisomerase II alpha expression in small cell and non-small cell carcinoma of the lung. In search of a mechanism of chemotherapeutic response. *Cancer* 78: 729-735. doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(199608)78:4. PubMed: 8756364.
 33. Ceppi P, Longo M, Volante M, Novello S, Cappia S et al. (2008) Excision repair cross complementing-1 and topoisomerase IIalpha gene expression in small-cell lung cancer patients treated with platinum and etoposide: a retrospective study. *J Thorac Oncol* 3: 583-589. doi: 10.1097/JTO.0b013e3181734f24. PubMed: 18520795.
 34. Husain I, Mohler JL, Seigler HF, Besterman JM (1994) Elevation of topoisomerase I messenger RNA, protein, and catalytic activity in human tumors: demonstration of tumor-type specificity and implications for cancer chemotherapy. *Cancer Res* 54: 539-546. PubMed: 8275492.
 35. Surowiak P, Matema V, Kaplenko I, Spaczynski M, Dietel M et al. (2006) Topoisomerase 1A, HER2/neu and Ki67 expression in paired primary and relapse ovarian cancer tissue samples. *Histol Histopathol* 21: 713-720. PubMed: 16598670.
 36. Sereno M, Cejas P, Moreno V, Belda-Iniesta C, López R et al. (2012) ERCC1 and topoisomerase I expression in small cell lung cancer: prognostic and predictive implications. *Int J Oncol* 40: 2104-2110. PubMed: 22344449.
 37. Lee HW, Han JH, Kim JH, Lee MH, Jeong SH et al. (2008) Expression of excision repair cross-complementation group 1 protein predicts poor outcome in patients with small cell lung cancer. *Lung Cancer* 59: 95-104. doi:10.1016/j.lungcan.2007.07.023. PubMed: 17889401.
 38. Chiappori AA, Zheng Z, Chen T, Rawal B, Scheil MJ et al. (2010) Features of potentially predictive biomarkers of chemotherapeutic efficacy in small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 5: 484-490. doi: 10.1097/JTO.0000391377.17179.6b. PubMed: 20107425.

7. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Dr Niki Karachaliou is a medical oncologist and member of the Translational Research Unit in the Instituto Oncológico Dr. Rosell in Barcelona. She completed her graduate studies at the University of Athens - Medical School (1994-2002) with the score of 9 (maximum score 10). She then completed a three-year residency in internal medicine, including six months of hematology, and a second three-year residency in medical oncology at the University Hospital of Heraklion, Crete, Greece (2005 – 2011). In 2012, she was accepted as a research fellow in translational research under the mentorship of Dr Rafael Rosell in Barcelona, Spain, where she was offered a permanent position after nine months.

She is co-author of 28 papers published in international peer-reviewed journals, including a review in *Lancet* on “Genetics and biomarkers in personalisation of lung cancer treatment” and an editorial in *Nature Reviews in Clinical Oncology* on “Maintenance therapy and precision medicine in NSCLC”. She was also Guest Editor of a special series of two issues in *Translational Lung Cancer Research Journal* on targeted therapy for lung cancer.

Since 2010, when Dr Karachaliou started work on her medical thesis, “Prognostic and/or predictive value of ERCC1, BRCA1, ATP7B, PKM2, , TOPOI, TOPOIIA, TOPOIIB and CMYC genes in patients with small cell lung cancer (SCLC)”, she has been fully involved in translational research. She has broad experience in gene expression analyses by quantitative real-time polymerase chain reaction (QRT-PCR) and RNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue and from blood (plasma/platelets).

PERSONAL DATA

Name: NIKI KARACHALIOU

Nationality: Greek

Date of birth: June 6, 1976

Home Address: C/Nena Casas 19-23
Barcelona, 08017 Spain

Telephone: +34 93 205 66 18
+34 647 100 062

Work Address: Quiron Dexeus University Hospital
C/Sabino Arana 5-19
08028, Barcelona, Spain

Telephone: + 34 93 546 01 22 / 01 19

Fax: + 34 93 546 01 72

Email Address: nkarachaliou@oncorosell.com

Languages: Greek (native), English (fluent, UCLES Certificate of Proficiency), Spanish (advanced)

EDUCATION

- 1995:** Admission to the University of Athens, Medical School after National Examination
- 2002:** Medical Degree from the University of Athens with the score 9/10 – duration of studies: 6 years
- 2010:** Approval by the University of Crete Medical School of the PhD thesis proposal (title: Prognostic and/or predictive value of ERCC1, BRCA1, ATP7B, TOPO1, TOPO2A and TOPO2B genes in patients with small cell lung cancer)
- 2011:** Specialty Certification in Medical Oncology by the University Hospital of Heraklion, Crete (December 21, 2011)-
- 2012** Research Fellow, Translational Research Unit, Pangaea Biotech/Insitituto Oncológico Dr Rosell, Dexeus-Quiron University Hospital (9 months)

PROFESSIONAL EXPERIENCE

2012-present Medical oncologist

Translational Research Unit, Pangaea Biotech/Insitituto Oncológico Dr Rosell, Dexeus-Quiron University Hospital

2008-2011 Resident in Medical Oncology

Airforce General Hospital of Athens, University Hospital of Heraklion, Crete

2005-2008: Resident in Internal Medicine & Hematology

General Hospital of Halkis, Sotiria University Hospital of Athens

LABORATORY EXPERIENCE (2010-present)

- RNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue and blood (plasma/platelets)
- Retro-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)
- Gene expression analyses by quantitative real-time polymerase chain reaction (QRT-PCR)
- RT-PCR for EML4-ALK fusion transcript expression (v1, v2, v3) in FFPE tissue and blood (plasma/platelets)
- Sequencing
- Design and validation of PCR primers

MEMBERSHIP IN PROFESSIONAL ASSOCIATIONS

- Hellenic Society of Medical Oncology (HESMO)
- Greek Young Oncologist Group (GYON)
- American Society of Clinical Oncology (ASCO)

CONTRIBUTIONS TO PROFESSIONAL JOURNALS

REVIEWER / EDITORIAL BOARD MEMBER OF

- Editorial board member, Translational Lung Cancer Research
- Editorial board member, Chinese Journal of Cancer Research
- Reviewer, Annals of Oncology
- Guest editor of special issues, Translational Lung Cancer Research Journal
- This series of special issues has been recommended as valuable volumes of literature for worldwide physicians by the Spanish Lung Cancer Group, French Lung Cancer Group, Clinical and Translational Oncology Group and European Thoracic Oncology Platform
<http://www.tlcr.org/article/view/1026/1677>

PUBLICATIONS

Review articles:

- Systemic treatment in EGFR-ALK NSCLC patients: second line therapy and beyond. **Karachaliou N**, Rosell R, Morales-Espinosa D, Viteri S. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2014 Mar 10. [Epub ahead of print]
- Genetics and biomarkers in personalisation of lung cancer treatment. Rosell R, Bivona TG, **Karachaliou N**. *Lancet.* 2013 Aug 24;382(9893):720-31
- Signaling Pathways Modulating Dependence of Lung Cancer on Mutant Epidermal Growth Factor Receptor and Mechanisms of Intrinsic and Acquired Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors. Wannesson L, Viteri S, Costa C, **Karachaliou N**, Molina-Vila MA, Rosell R. *Curr Pharm Des.* 2013 Nov 5. [Epub ahead of print]
- PharmGKB summary: very important pharmacogene information for the epidermal growth factor receptor. Hodoglugil U, Carrillo MW, Hebert JM, **Karachaliou N**, Rosell R, Altman RB, Klein TE. *Pharmacogenet Genomics.* 2013 Nov;23(11):636-42
- Small-cell lung cancer: where are we now and what can we expect for the future? **Karachaliou N** and Rosell R. *Future Oncol.* 2013 Aug; 9(8):1065-8.
- Adaptive resistance to targeted therapies in cancer. Rosell R, **Karachaliou N**, Morales-Espinosa D, Costa C, Molina MA, Sansano I, Gasco A, Viteri S, Massuti B, Wei J, González Cao M, Martínez Bueno A. *Transl Lung Cancer Res* Vol 2, No 3 (June 2013)
- The role of SOX2 in small cell lung cancer, lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. **Karachaliou N**, Rosell R, Viteri S. *Transl Lung Cancer Res* Vol 2, No 3 (June 2013)
- Customized chemotherapy in metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). Wei J, Moran T, Zou Z, Qian X, Wang L, Camps C, Hu W, Chaib I, Sanchez B, Xu L, **Karachaliou N**, Sanchez-Ronco M, Liu B, Rosell R. *Transl Lung Cancer Res* Vol 2, No 3 (June 2013)
- Are we ready to use biomarkers for staging, prognosis and treatment selection in early-stage non-small-cell lung cancer? Massuti B, Sanchez JM, Hernando-

Trancho F, **Karachaliou N**, Rosell R. *Transl Lung Cancer Res* Vol 2, No 3 (June 2013)

- ALK and ROS1 as a joint target for the treatment of lung cancer: a review. Puig Bellacasa R, **Karachaliou N**, Estrada-Tejedor R, Teixidó J, Costa C, Borrell J. *Transl Lung Cancer Res* Vol 2, No 2 (April 2013)
- Comprehensive molecular screening: from the RT-PCR to the RNA-seq. Costa C, Giménez-Capitán A, **Karachaliou N**, Rosell R. *Transl Lung Cancer Res* Vol 2, No 2 (April 2013)
- CK-coated magnetic-based beads as a tool to isolate circulating tumor cells (CTCs) in human tumors. Mayo C, Ortega F, Giménez-Capitán A, Molina-Vila MA, Serrano MJ, Viteri S, Costa C, Gascó A, Bertran-Alamillo J, **Karachaliou N**, Lorente JA, Tarón M, Rosell R. *Transl Lung Cancer Res*. Vol 2, No 2 (April 2013)
- KRAS Mutations in Lung Cancer. **Karachaliou N**, Mayo C, Costa C, Magrí I, Gimenez-Capitan A, Molina-Vila MA, Rosell R. *Clin Lung Cancer*. 2013 May;14(3):205-14
- EJC MO.tv April 16, 2012. Rebiopsies at time of progression could be crucial for development of new targeted therapies in EGFR TKI-resistant NSCLC. Rosell R and **Karachaliou N**.
- Pazopanib: a second generation antiangiogenic multitargeted tyrosine kinase inhibitor. **Karachaliou N** and Saridaki Z, *Forum of Clinical Oncology* 2010

Original articles:

- The impact of EGFR T790M mutations and BIM mRNA expression on outcome in patients with EGFR-mutant NSCLC treated with erlotinib or chemotherapy in the randomized phase III EURTAC trial. Costa C, Molina-Vila MA, Drozdowskyj A, Gimenez-Capitan A, Bertran-Alamillo J, **Karachaliou N**, Gervais R, Massuti B, Wei J, Moran T, Majem M, Felip E, Carcereny E, Garcia-Campelo R, Viteri S, Taron M, Ono M, Giannikopoulos P, Bivona TG, Rosell R. *Clin Cancer Res*. 2014 Feb 3. [Epub ahead of print]
- Predictive value of BRCA1, ERCC1, ATP7B, PKM2, TOPOI, TOPO-IIA, TOPOIIB and C-MYC genes in patients with Small Cell Lung Cancer (SCLC)

who received first line therapy with cisplatin and etoposide. **Karachaliou N**, Papadaki C, Lagoudaki E, Trypaki M, Sfakianaki M, Koutsopoulos A, Mavroudis D, Stathopoulos E, Georgoulas V, Souglakos J. *PLoS One*. 2013 Sep 13;8(9):e74611

- BRCA1, LMO4, and CtIP mRNA Expression in Erlotinib-Treated Non-Small-Cell Lung Cancer Patients with EGFR Mutations. **Karachaliou N**, Costa C, Gimenez-Capitan A, Molina-Vila MA, Bertran-Alamillo J, Mayo C, Massuti B, Majem M, Carcereny E, Moran T, Sanchez JJ, Viteri S, Gasco A, Wannesson L, Souglakos J, Jimeno J, Rosell R. *J Thorac Oncol*. 2013 Mar;8(3):295-300.
- A multicenter phase II trial of docetaxel and capecitabine as salvage treatment in anthracycline- and taxane-pretreated patients with metastatic breast cancer. **Karachaliou N**, Ziras N, Syrigos K, Tryfonidis K, Papadimitraki E, Kontopodis E, Bozionelou V, Kalykaki A, Georgoulas V, Mavroudis D. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012 Jul;70(1):169-76.
- A multicenter phase II trial of docetaxel plus gemcitabine as salvage treatment in anthracycline- and taxane-pretreated patients with metastatic breast cancer. **Karachaliou N**, Kouroussis C, Papakotoulas P, Kalbakis K, Tryfonidis K, Vardakis N, Poppis E, Georgoulas V, Mavroudis D. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012 May;69(5):1345-52.
- Paclitaxel plus bevacizumab in patients with chemoresistant relapsed small cell lung cancer as salvage treatment: A phase II multicenter study of the Hellenic Oncology Research Group. Mountzios G, Emmanouilidis C, Vardakis N, Kontopodis E, Hatzidaki D, Popis E, **Karachaliou N**, Kotsakis A, Agelidou M, Georgoulas V. *Lung Cancer*. 2012 Jul;77(1):146-50
- Second-line paclitaxel/carboplatin versus vinorelbine/carboplatin in patients who have advanced non-small-cell lung cancer pretreated with non-platinum-based chemotherapy: a multicenter randomized phase II study. Pallis AG, Syrigos K, Kotsakis A, **Karachaliou N**, Polyzos A, Chandrinos V, Varthalitis I, Christophyllakis C, Ardavanis A, Vamvakas L, Vardakis N, Saridaki Z, Samonis G, Giassas S, Georgoulas V, Agelaki S. *Clin Lung Cancer*. 2011 Mar;12(2):100-5.

- Proteinuria and favourable clinical response in a patient receiving paclitaxel + bevacizumab for metastatic breast cancer. **Karachaliou N**, Saloustros E, Vamvakas L, Mavroudis D, Georgoulas V. *Ann Oncol*. 2010 Aug;21(8):1729-30
- A multicenter phase II trial with irinotecan plus oxaliplatin as first-line treatment for inoperable/metastatic cancer of the biliary tract. **Karachaliou N**, Polyzos A, Kentepozidis N, Kakolyris S, Ziras N, Vardakis N, Kalykaki A, Milaki G, Georgoulas V, Androulakis N. *Oncology*. 2010;78(5-6):356-60

Editorials:

- Lung cancer: Maintenance therapy and precision medicine in NSCLC. Rosell R, **Karachaliou N**. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013 Oct;10(10):549-50.
- Optimal Detection of ALK Rearranged Lung Adenocarcinomas. **Karachaliou N**, Rosell R. *J Thorac Oncol*. 2013 Mar;8(3):255-6
- Treatment of brain metastases in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations: the role of EGFR tyrosine kinase inhibitors. **Karachaliou N** and Rosell R. *Ann Palliat Med*. Vol 2, No 3 (July 2013)
- Front-line erlotinib in unselected patients with advanced NSCLC and poor performance status - the TOPICAL study. **Karachaliou N**, Wei J, Marques AD, Rosell R. *Transl Lung Cancer Res*. Vol 2, No 1 (February 2013)

Contributions to books:

- Molecular profile of patients with NSCLC. **Karachaliou N**, Molina-Vila MA, Rosell R. *Erlotinib in Lung Cancer: Impact and exceptional cases*. Editor: Konstantinos Syrigos (February 2014)

Journal	Impact factor	No of publications
Lancet	39.06	1
Nat Rev Clin Oncol	15.03	1

Clin Cancer Res	7.837	1
Ann Oncol	7.384	1
J Thorac Oncol	4.473	2
Plos One	3.730	1
Pharmacogenet Genomics	3.608	1
Lung Cancer	3.392	1
Curr Pharm Des	3.311	1
Future Oncology	3.202	1
Cancer Chemother Pharmacol	2.795	2
Oncology	2.165	1
Expert Review of Anticancer Therapy	2.066	1
Clin Lung Cancer	2.038	2

PARTICIPATION IN SCIENTIFIC MEETINGS

Coordinator:

- Cancer Pharmacogenetics and Pharmacogenomics as Tools for Clinical Practice and Research. Greek Young Oncologists Group educational course. Meeting Coordinators: Giannis Mountzios & Niki Karahaliou. November 16, 2013; Athens, Greece

Session chair:

- 1st International Congress on Controversies in Personalized Oncology: Predictive biomarkers, pathways & targeted therapy. Session 2, Signaling Pathways & Synthetic Lethality. March 7-10, 2013; Barcelona, Spain
- 10th Congress on Lung Cancer. Session 7, Molecular screening for synthetic lethality approaches. November 21-22, 2013; Barcelona, Spain

Invited speaker:

- Genetics and biomarkers in personalization of lung cancer treatment. Session: New therapies in lung cancer, 41 Congress of the international society of oncology and biomarkers, Barcelona, 15-18 March 2014
- Coordinating the pathology lab with the clinical practice. Session : Lung cancer clinical trials in the era of translational research, 3rd LUNG CANCER Network “From the bench to the bedside”, 31st January-1st February, Athens, Greece
- FGFR and other druggable biomarkers in Luminal B. Curso Pre-Simposio “Biología molecular del cáncer de origen ginecológico”, 40 Simposio Internacional “Descodificando el cáncer”. November 27, 2013; Barcelona, Spain
- Foretinib/erlotinib in EGFR WT NSCLC, second-line resistant EGFR-mutated patients and ROS1-positive, crizotinib-resistant patients. 10th Congress on Lung Cancer. November 21-22, 2013; Barcelona, Spain
- Predicting resistance by selection of signaling pathways. 10th Congress on Lung Cancer. November 21-22, 2013; Barcelona, Spain
- Pharmacogenetics and pharmacogenomics of molecular targeted agents in oncology. Greek Young Oncologists Group educational course "Cancer Pharmacogenetics and Pharmacogenomics as Tools for Clinical Practice and Research". November 16, 2013; Athens, Greece
- Biomarkers and surrogate markers in targeted cancer therapy. 19th Pan-Hellenic Conference of Clinical Oncology. April 25-27, 2013; Athens, Greece
- Crizotinib for ROS1-positive NSCLC. The need for further improvement in management – the patient’s request. VI Educational Symposium of the Spanish Lung Cancer Group. November 29-30, 2012; Alicante, Spain
- Handling fresh tumor tissue. VI Educational Symposium of the Spanish Lung Cancer Group. November 29-30, 2012; Alicante, Spain

Proffered papers:

- The concomitant presence of echinoderm microtubule associated protein like 4 - anaplastic lymphoma kinase (EML4-ALK) EML4-ALK fusion gene in egfr-

mutant non-smallcell lung cancer (NSCLC) patients treated with erlotinib or chemotherapy in the EURTAC trial. **Karachaliou N**, Costa C, Gimenez Capitan A, Drozdowskyj A, Gervais R, Vergnenegre A, Marinis F, Majem M, Felip E, Garcia Campelo R, Moran T, Viteri S, Gasco A, Massuti B, Rosell R. Mini Oral Abstract Session: Pathology, MO26.08. 15th World Conference on Lung Cancer. October 27-30, 2013; Sydney, Australia

- Integrated genomic analysis by whole exome and transcriptome sequencing of tumor samples from EGFR-mutant non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients with acquired resistance to erlotinib. Bivona T, Gianikopoulos P, Costa C, **Karachaliou N**, John J, Wilkerson M, Cauhlin A, Westesson O, Boley N, Hahne N, Parikh U, Lozan M, Viteri S, Perez Gracia J, Curioni A, Jantus Lewintre E, Camp C, Vergnenegre A, Gervais R, Wellde A, Barry J, Wellde Jr. G, Cardona AF, Stahel R, Polkinghorn W, Rosell R, Weissman J. Mini Oral Abstract Session: Biology & Medical Oncology, MO21.05. 15th World Conference on Lung Cancer. October 27-30, 2013; Sydney, Australia
- Integrated genomic analysis by whole exome and transcriptome sequencing of tumor samples from EGFR-mutant non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients (p) with acquired resistance to erlotinib. Weissman J, Giannikopoulos P, John J, Uzilov A, Costa C, **Karachaliou N**, Sansano I, Jantus-Lewintre E, Stahel R, Vergnenegre A, Gervais R, Perez-Gracia J.L, Lozano M, Wellde A, Bordoni R, Cardona Zorrilla A.F, Polkinghorn W, Wellde G, Rosell R, Bivona T. Clinical Science Symposium, Genetic Basis of Resistance to Targeted Therapies #11010: abstr 11010. 2013 ASCO Annual Meeting, May 31-June 4, 2013; Chicago, IL
- Prognostic and/or predictive value of ERCC1, BRCA1, ATP7B, TOPO1, TOPO2A, and TOPO2B genes in patients with small cell lung cancer (SCLC). **Karachaliou N**, Papadaki C, Lagoudaki E, Sfakianaki M, Mavroudis D, Trypaki M, Stathopoulos E, Georgoulas V, Sougklakos I. 18th Panhellenic Conference of Clinical Oncology. April 25-27, 2012; Athens, Greece

Poster presentations:

- ROR1 as a novel therapeutic target for EGFR-mutant non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients with the EGFR T790M mutation. **Karachaliou N**,

- Drozdowskyj A, Costa C, Molina M.A, Gimenez-Capitan A, Vergenenegre A, Massuti B, Moran T, Majem M, Felip E, Carcereny E, Garcia-Campelo R, Viteri S, Heidecke C, Estrada-Tejedor R, Teixido J, Bivona T, Giannikopoulos P, Ono M, Rosell R. Poster Session 3: Novel Cancer Genes and Pathways, P3.02-009. 15th World Conference on Lung Cancer. October 27-30, 2013; Sydney, Australia
- MED12, a component of the transcriptional mediator complex, and STAT3 influence outcome to platinum based chemotherapy in patients (p) with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). Morales-Espinosa D, Costa C, **Karachaliou N**, Molina-Vila M.A, Gimenez-Capitan A, Bonnano L, Majem M, Massuti B, Sanchez J.J, Rosell R. Poster Session 2: Novel Cancer Genes and Pathways, P2.02-001. 15th World Conference on Lung Cancer. October 27-30, 2013; Sydney, Australia
 - Impact of EGFR T790M mutations and BIM mRNA expression on progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) in patients with EGFR-mutant non-small-cell lung cancer (NSCLC) treated with erlotinib or chemotherapy in the randomized phase III EURTAC trial. Rosell R, Molina M.A, Drozdowskyj A, Costa C, Giménez-Capitan A, Bertran-Alamillo J, **Karachaliou N**, Gervais R, Massuti B, Wei J, Moran T, Majem M, Felip E, Carcereny E, Garcia-Campelo R, Viteri S. Poster Session 2: Prognostic and Predictive Biomarkers, P2.06-012. 15th World Conference on Lung Cancer. October 27-30, 2013; Sydney, Australia
 - EML4-ALK monitoring of crizotinib response in blood platelets and plasma of NSCLC patients. J. Nilsson C. Costa, **N. Karachaliou**, M. Taron, B. Tannous, E. Thunnissen, T. Wurdinger, R. Rosell, E. Smit. Poster Session 2: Prognostic and Predictive Biomarkers, P2.06-046. 15th World Conference on Lung Cancer. October 27-30, 2013; Sydney, Australia
 - MED12, a component of the transcriptional MEDIATOR complex, and STAT3 influence outcome to platinum-based chemotherapy in patients (p) with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC). Morales-Espinosa D, Costa C, **Karachaliou N**, Molina-Vila M.A, Gimenez-Capitan A, Bonnano L, Majem M, Massuti B, Sanchez J.J, Rosell R. Poster: Abstract 3514. The European Cancer Congress 2013 (ECCO-ESMO-ESTRO). September 27-October 1, 2013; Amsterdam, The Netherlands

- RAC1b mRNA expression and prognosis in advanced non-small cell lung cancer treated with first-line chemotherapy. Gasco A, Rodriguez I, Bonanno L, Moran T, **Karachaliou N**, Gimenez-Capitan A, Rodriguez S, Rosell R, Maurel J. Poster: Abstract 652. The European Cancer Congress 2013 (ECCO-ESMO-ESTRO). September 27-October 1, 2013; Amsterdam, The Netherlands
- Predictive value of BRCA1, ERCC1, ATP7B, PKM2, TOPO-I, TOPO-IIA, TOPO-IIB, and c-MYC genes in patients with small cell lung cancer (SCLC) who received first-line therapy with cisplatin and etoposide. Papadaki C, **Karachaliou N**, Lagoudaki E, Trypaki M, Sfakianaki M, Koutsopoulos A, Mavroudis D, Stathopoulos E, Georgoulas V, Souglakos J. General Poster Session #7594: abstr 7594. 2013 ASCO Annual Meeting, May 31-June 4, 2013; Chicago, IL
- ROR1 mRNA expression in EGFR-mutant non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients (p) with the T790M mutation: A potential therapeutic target. **Karachaliou N**, Drozdowskyj A, Costa C, Molina-Vila MA, Gimenez Capitan A, Vergnenegre A, Massuti B, Moran T, Majem M, Felip E, Carcereny E, Garcia-Campelo R, Viteri S, Heidecke C, Estrada-Tejedor R, Teixido J, Bivona T, Giannikopoulos P, Ono M, Rosell R. Poster Discussion Session #11027: abstr 11027. 2013 ASCO Annual Meeting, May 31-June 4, 2013; Chicago, IL
- Integrated genomic analysis of EGFR-mutant non-small cell lung cancer immediately following erlotinib initiation in patients. Bivona T, Giannikopoulos P, Costa C, **Karachaliou N**, Viteri S, Garcia-Campelo R, John J, Uzilov A, Wellde A, Polkinghorn W, Majem M, Felip E, Carcereny E, Heidecke C, Massuti B, Wellde G, Weissman J, Rosell R. General Poster Session #11067: abstr 11067. 2013 ASCO Annual Meeting, May 31-June 4, 2013; Chicago, IL
- Nondisruptive mutations of TP53 and overall survival (OS) in advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients (p). Carcereny E, Bertran J, Molina-Vila MA, Gervais R, Massuti B, Bonanno L, Moran T, Majem M, Felip E, Garcia-Campelo R, Vergnenegre A, Viteri S, Gasco A, Wannesson L, Mayo C, Pujantell L, Favaretto A, **Karachaliou N**, Rosell R. Poster Discussion Session #11029: abstr 11029. 2013 ASCO Annual Meeting, May 31-June 4, 2013; Chicago, IL
- High mRNA expression of LMO4, a BRCA1 downregulator, correlates with better prognosis in erlotinib-treated non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients (P) with EGFR mutations. **Karachaliou N**, Costa C, Gimenez-Capitan, S. Viteri

S, Gasco A, Camps C, Carcereny E, Massuti B, Souglakos J, Rosell R. General Poster Session #1655P. 37th ESMO Congress, September28-October 2, 2012; Vienna, Austria

- Overall survival (OS) to first- and second-line chemotherapy associated with mRNA expression of multiple myeloma set (MMSET) domain, p53-binding protein 1 (53BP1) and breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) in advanced gastric cancer patients (P). Wei J ,Liu B, Yu L, Zou Z, Qiang X, Sanchez J.J, Costa C, Gimenez-Capitan A, **Karachaliou N**, Rosell R. General Poster Session # 686P. 37th ESMO Congress, September28-October 2, 2012; Vienna, Austria
- Multicenter randomized phase II study of paclitaxel (P) and carboplatin (C) versus oral vinorelbine (OV) and carboplatin (C) as second line treatment in patients (PTS) with non small cell lung cancer (NSCLC) pretreated with non-platinum based chemotherapy. Aggelaki S, **Karachaliou N**, Polyzos A, Handrinos V, Vardakis N. General Poster Session. 21st International Congress on Anti-Cancer Treatment (ICACT), 2010; Paris, France
- A multicenter phase II trial with irinotecan plus oxaliplatin as first line treatment for inoperable/metastatic cancer of biliary tract. **Karachaliou N**, Androulakis N, Polyzos A, Kentepozidis N, Georgoulas V. General Poster Session. 21st International Congress on Anti-Cancer Treatment (ICACT), 2010; Paris, France