



**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ
ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ**



ΔΙΠΛΩΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ: ΑΠΟ ΤΗΝ ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗ ΩΣ ΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

**«Υγρή βιοψία σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό
καρκίνο του πνεύμονα: προφίλ μεταλλάξεων και
σύγκριση με βιοψία ιστού»**

Ευγενία Καπένη

1140010

ΑΘΗΝΑ 2020



**SCHOOL OF MEDICINE UNIVERSITY OF CRETE
NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION**



MSC ONCOLOGY: FROM ONCOGENESIS TO THERAPY

**«Liquid biopsy in patients with non small cell lung
cancer (NSCLC) : Mutations profile and
comparison with tissue biopsy»**

Evgenia Kapeni

1140010

ATHENS 2020

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
Summary.....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1. Καρκίνος του πνεύμονα	7
1.1. Επιδημιολογικά στοιχεία.....	7
1.2. Παράγοντες κινδύνου	7
1.3. Ιστολογικοί τύποι καρκίνου πνεύμονα	8
1.4. Προσυμπτωματικός έλεγχος	8
1.5. TNM classification system	9
1.6. Κλινική εικόνα-συμπτώματα	11
2. Διάγνωση καρκίνου του πνεύμονα	12
2.1. Προγνωστικοί παράγοντες στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.....	14
3. Θεραπεία καρκίνου του πνεύμονα	15
3.1. Χειρουργική προσέγγιση.....	15
3.2. Ακτινοθεραπεία.....	16
3.3. Χημειοθεραπεία	17
3.4. Στοχευμένη θεραπεία	17
3.4.1. EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor).....	18
3.4.2. ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase).....	20
3.4.3. ROS1 (c-Ros Oncogene 1).....	20
3.4.4. RET (Rearranged During Transfection).....	20
3.4.5. MET.....	21
3.4.6. KRAS (Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homologue)	21
3.4.7. PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase).....	21
3.4.8. BRAF.....	22
3.4.9. HER 2	22
4. Υγρή βιοψία.....	24
4.1. Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs).....	24
4.2. miRNAs και εξωσώματα	25
4.3. Ελεύθερο κυκλοφορούν DNA (cfDNA).....	25
4.4. Χρησιμότητα της υγρής βιοψίας στην κλινική πράξη	27
4.5. Υγρή βιοψία ή βιοψία ιστού;	28

5. Αλληλούχιση νέας γενιάς και ιατρική ακριβείας	29
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
1. Απομόνωση γενετικού υλικού	31
1.1. Απομόνωση DNA από ιστό.....	31
Αυτοματοποιημένη μέθοδος	32
Manual απομόνωση DNA από ιστό.....	33
1.2. Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων από υγρές βιοψίες (πλάσμα)	34
2. Ροή εργασίας για αλληλούχιση νέας γενιάς (NGS Workflow).....	35
2.1. Ενίσχυση αλληλουχιών στόχων με πολλαπλή PCR	35
2.2. Ροή εργασίας για αλληλούχιση νέας γενιάς για ελεύθερα κυκλοφορούντα νουκλεϊκά οξέα.....	36
2.3. Ροή εργασίας για αλληλούχιση νέας γενιάς για γενετικό υλικό από βιοψίες ιστού	37
2.4. Ανάλυση αποτελεσμάτων (NGS data analysis)	38
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	39
Σύγκριση μεταλλάξεων βιοψίας ιστού και κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων (CNA) υγρής βιοψίας (πλάσματος).....	40
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	44
NCCN Guidelines Version 4.2019	49
Βιβλιογραφικές παραπομπές.....	53

Περίληψη

Ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (ΜΜΚΠ) αποτελεί έναν από τους πιο θνησιγόνους και συχνούς καρκίνους παγκοσμίως. Πρόκειται για μια κακοήθεια που χαρακτηρίζεται από αρκετές στοχεύσιμες μεταλλάξεις. Η έγκαιρη ανίχνευσή τους συμβάλλει σημαντικά στην απόφαση της θεραπευτικής προσέγγισης και σε καλύτερα κλινικά αποτελέσματα. Αυτή η ανάγκη, σε συνδυασμό με τη συχνή έλλειψη βιοπτικού υλικού (από ιστό) ή την δυσκολία συλλογής του, οδηγεί στην ανεύρεση νέων μη επεμβατικών προσεγγίσεων. Η ανάλυση των κυκλοφορούντων νουκλεϊνικών οξέων όγκου (ctNA) στο πλάσμα των ασθενών είναι μια μορφή «υγρής βιοψίας» και παρέχει πληροφορίες σε πραγματικό χρόνο για το μοριακό προφίλ του όγκου χωρίς διηθητική βιοψία ιστού.

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να μελετήσουμε το προφίλ και τη συχνότητα των μεταλλάξεων που παρατηρούνται σε υγρές βιοψίες σε ασθενείς που πάσχουν από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Η ανάλυση έγινε με αλληλούχιση νέας γενιάς (NGS), μια τεχνική με μεγάλη ευαισθησία που μπορεί αξιόπιστα να ανιχνεύσει μεταλλάξεις να παρέχει κλινικά σχετικές πληροφορίες.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μια συγκριτική μελέτη σε δείγματα ιστού και πλάσματος από 70 ασθενείς, ώστε να αξιολογηθεί η ευαισθησία και η ειδικότητα κάθε μεθοδολογίας. Έπειτα, ακολούθησε ανάλυση δειγμάτων πλάσματος από 88 ασθενείς με ΜΜΚΠ.

Αποδείχθηκε πως η ευαισθησία της αλληλούχισης νέας γενιάς νουκλεϊκών οξέων υπολογίζεται στο 81,82% , η ειδικότητα στο 94,44% και προκύπτει συμφωνία κατά 85,92% συγκριτικά με την εφαρμογή της τεχνικής σε δείγματα ιστού.

Η ανάλυση έδειξε πως είναι δυνατή η ανίχνευση θεραπευτικώς στοχεύσιμων μεταλλαγών. Πιο συγκεκριμένα, στο 19% των ασθενών βρέθηκε μεταλλαγή στο γονίδιο EGFR, στο 12,5% στο RAS, στο 7% στο PIK3CA και στο 4,5% στο ERBB2.

Συμπερασματικά, η χρήση νέων ευαίσθητων τεχνικών NGS μπορεί αξιόπιστα να ανιχνεύσει μεταλλάξεις και να παρέχει κλινικά σημαντικές πληροφορίες. Η ανάλυση του κυκλοφορούντος νουκλεϊνικού οξέος του όγκου (ctDNA) ως υποκατάστατου της βιοψίας από ιστό στην κλινική πράξη αποδεικνύεται ιδιαίτερα χρήσιμη για τη λήψη αποφάσεων εξατομικευμένης θεραπείας για ασθενείς με ΜΜΚΠ.

Summary

Non small cell lung cancer (NSCLC) is one of the most common and fatal types of cancer worldwide. It is characterized by a majority of targeted mutations. The early detection of these mutations is important for the therapeutic choice and seems to have better clinical outcome. Additionally, tissue biopsy is often limited or absent, so there is a need of non invasive approaches. The analysis of circulating tumor nucleic acids (ctNA) in plasma of patients is a form of “liquid biopsy” which provides real time information about the molecular profile of the tumor, without invasive tissue biopsy.

The aim of this study was the determination of mutations profile and frequency which are detected in liquid biopsies of patients with non small cell lung cancer. The analysis was performed with next generation sequencing, a technique with high sensitivity which can reliably detect mutations and provide relative clinical information.

At first, a study was performed using samples from tissue and plasma of 70 patients in order to evaluate the sensitivity and specificity of each methodology. Then, analysis of plasma samples of 88 patients with NSCLC was occurred.

It was proven that the sensitivity of next generation sequencing of circulating tumor nucleic acids is 81,82%, the specificity is 94,44% and there is a 85,92% concordance in comparison with application of this technology at tissue samples.

The analysis showed that the detection of therapeutically targeted mutations is possible, as the 19% of the patients had mutation at the EGFR gene, 12,5% at the RAS gene, 7% at the PIK3CA gene and 4,5% at ERBB2.

In conclusion, the application of new sensitive techniques of NGS can reliably detect mutations and provide important clinical information. The analysis of circulating tumor DNA (ctDNA) as substitute of tissue biopsy in everyday clinical practice seems to be particularly useful in decision making of individualized treatment for patients with NSCLC.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Καρκίνος του πνεύμονα

1.1. Επιδημιολογικά στοιχεία

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την πιο συχνή μορφή καρκίνου που διαγιγνώσκεται παγκοσμίως και είναι η κυριότερη αιτία θανάτου σχετιζόμενη με τον καρκίνο.¹

Η εμφάνισή του είναι συχνότερη όσο αυξάνεται η ηλικία, παρουσιάζοντας μια αύξουσα πορεία στην ηλικία των 40 ετών, η οποία κορυφώνεται στην ηλικία των 60 ετών. Κάθε χρόνο καταμετρώνται πολλά νέα περιστατικά, που το 2012 έφταναν τα 1.8 εκατομμύρια και 1.59 εκατομμύρια θανάτους. Τα στοιχεία αυτά καθιστούν τον καρκίνο του πνεύμονα να ξεπερνά τον συνδυασμό των τριών επόμενων τύπων καρκίνου με μεγάλη θνησιμότητα (μαστού, προστάτη, παχέος εντέρου). Πιο συγκεκριμένα, αποτελεί το 29% και 26% των θανάτων που σχετίζονται με νεοπλάσματα σε άντρες και γυναίκες αντίστοιχα.² Όταν η διάγνωση γίνεται σε πρώιμα στάδια, φαίνεται να επωφελεί τους ασθενείς, οι οποίοι έχουν συγκεκριμένη θεραπευτική μεταχείριση. Ωστόσο, οι περισσότερες διαγνώσεις γίνονται σε προχωρημένο στάδιο της νόσου με αποτέλεσμα η πρόγνωση να είναι φτωχή, με την ολική πενταετή επιβίωση να κυμαίνεται στο 10-15%.

1.2. Παράγοντες κινδύνου

Καθετί που αυξάνει τις πιθανότητες εμφάνισης μιας παθολογικής κατάστασης αποτελεί παράγοντα κινδύνου. Όταν συνδυάζονται δύο ή και περισσότεροι τέτοιοι παράγοντες, οι πιθανότητες εμφάνισης της νόσου αυξάνονται. Τα περισσότερα περιστατικά κακοήθειας στον πνεύμονα οφείλονται στο κάπνισμα (>80%). Όσο νωρίτερα ξεκινά κάποιος το κάπνισμα, η συχνότητα και η διάρκεια σε έτη καπνίσματος αποτελούν τον κύριο παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα. Επικίνδυνο είναι ακόμη και το παθητικό κάπνισμα. Η έκθεση σε αρσενικό, χρώμιο, αμίαντο, βηρύλλιο, κάδμιο, νικέλιο, αιθάλη ή πίσσα, και σε ιονίζουσα ακτινοβολία αποτελούν επίσης παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα. Επιβαρυντική είναι και η ατμοσφαιρική και ενδοοικιακή ρύπανση (τζάκια/ θέρμανση σε ανοιχτές εστίες). Επιπλέον, είναι σημαντικό το οικογενειακό ιστορικό του άτομο, εάν δηλαδή υπάρχει περιστατικό καρκίνου του πνεύμονα σε συγγενή πρώτου βαθμού, αλλά και η ύπαρξη χρόνιας πνευμονοπάθειας ή μόλυνση από τον ιό HIV.

1.3. Ιστολογικοί τύποι καρκίνου πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα απαντάται σε δύο κύριες μορφές: τον μικροκυτταρικό (SCLC) και τον μη μικροκυτταρικό (NSCLC). Ο πρώτος αποτελεί το 15% των περιπτώσεων και πρόκειται για μια ιδιαίτερα επιθετική μορφή. Ο ΜΜΚΠ χωρίζεται σε δύο κύριους υπότυπους: το αδενοκαρκίνωμα (40%) και το πλακώδες καρκίνωμα (25-35%). Ωστόσο, υπάρχουν σε χαμηλότερα ποσοστά και το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα και καρκινοειδείς όγκοι.

1.4. Προσυμπτωματικός έλεγχος

Ο ΜΜΚΠ είναι μία από τις κυριότερες αιτίες θανάτου που σχετίζονται με καρκίνο. Αυτό το γεγονός καθιστά σημαντική την έγκαιρη διάγνωσή του. Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής συνιστάται προσυμπτωματικός έλεγχος με low dose CT (αξονική θώρακα χαμηλής ακτινοβολίας) συνιστάται σε συγκεκριμένες ομάδες ανθρώπων που θεωρούνται υψηλού κινδύνου, σύμφωνα με τις υπάρχουσες κατευθυντήριες οδηγίες (NCCN guidelines):

Ομάδα 1

- ✓ 55-74 ετών
- ✓ Καπνιστές ή σταμάτησαν το κάπνισμα τα τελευταία 15 χρόνια
- ✓ Έχουν καπνίσει τουλάχιστον 1 πακέτο τσιγάρα την ημέρα για 30+ χρόνια

Ομάδα 2

- ✓ >50 ετών
- ✓ Έχουν καπνίσει τουλάχιστον 1 πακέτο τσιγάρα την ημέρα για 20+ χρόνια
- ✓ Έχουν ακόμη ένα παράγοντα κινδύνου για καρκίνο του πνεύμονα, με εξαίρεση το παθητικό κάπνισμα

Ως αποτέλεσμα του προσυμπτωματικού ελέγχου με low dose CT φαίνεται να είναι η μείωση της θνησιμότητας από καρκίνο του πνεύμονα (κατά 20%) καθώς και η καλύτερη ποιότητα ζωής που παρέχει η έγκαιρη ανίχνευση της νόσου. Ωστόσο, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ο κίνδυνος ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (96%).³

Τέλος, μια στρατηγική που παραμένει ιδιαίτερα σημαντική για την μείωση των θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα είναι η προτροπή των ασθενών να διακόψουν το κάπνισμα.

1.5. TNM classification system

Το σύστημα ταξινόμησης κακοηθών όγκων TNM είναι ένα παγκοσμίως αναγνωρισμένο σύστημα για την ταξινόμηση της έκτασης του καρκίνου. Αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο για την ακριβή σταδιοποίηση της νόσου. Το «T» αφορά το μέγεθος και την έκταση του πρωτοπαθούς όγκου, το «N» δηλώνει την διασπορά της νόσου στους τοπικούς λεμφαδένες και το «M» περιγράφει την παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι γενικές πληροφορίες που μπορούμε να πάρουμε από το σύστημα TNM.⁴

Tx	Ο όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί
Tis	Καρκίνωμα in situ
T0	Καμία ένδειξη όγκου
T1, T2, T3, T4	Μέγεθος και/ή έκταση του πρωταρχικού όγκου
Nx	Οι λεμφαδένες δεν μπορούν να εκτιμηθούν
N0	Καμία μετάσταση στους τοπικούς λεμφαδένες
N1	Παρουσία μετάσταση στους τοπικούς λεμφαδένες, διασπορά κακοήθειας στους πιο κοντινούς ή λίγους τοπικούς λεμφαδένες
N2	Διασπορά καρκίνου μεταξύ N1 και N3
N3	Διασπορά καρκίνου σε πιο απομακρυσμένους ή σε περισσότερους τοπικούς λεμφαδένες
M0	Όχι απομακρυσμένες μεταστάσεις
M1	Μετάσταση σε απομακρυσμένα όργανα

Η ακριβής σταδιοποίηση ενός καρκίνου προσφέρει περισσότερες πιθανότητες βέλτιστης θεραπείας. Στην περίπτωση του καρκίνου του πνεύμονα, σύμφωνα με την 8^η έκδοση του TNM συστήματος σταδιοποίησης, η ταξινόμηση διαμορφώνεται ως εξής:

T stage		
Tx	Βρογχικές και κυτταρολογικές πτυέλων θετικές σε κακοήθεια, αλλά δεν είναι δυνατή η αξιολόγηση με βρογχοσκόπηση ή απεικονιστικές μεθόδους	
T0	Καμία ένδειξη όγκου	
Tis	Καρκίνωμα in situ	
T1	Όγκος ≤ 3 εκ. που περιβάλλεται από πνεύμονα / σπλαχνικό υπεζωκότα, δεν περιλαμβάνει κύριο βρόγχο	
	T1a(mi)	ελάχιστο διηθητικό καρκίνωμα
	T1a	Όγκος ≤ 1 εκ.
	T1b	Όγκος >1 ως ≤ 2 εκ.
T2	T1c	Όγκος >2 ως ≤ 3 εκ.
	Όγκος >3 ως ≤ 5 εκ. ή εμπλοκή του κύριου βρόγχου χωρίς την καρίνα, ανεξαρτήτως της απόστασης από την καρίνα ή διήθηση του σπλαχνικού υπεζωκότα ή ατελεκτασία ή μετά αποφρακτική πνευμονοπάθεια που φθάνει στην πύλη	
	T2a	Όγκος >3 ως ≤ 4 εκ.
T2b	Όγκος >4 ως ≤ 5 εκ.	
T3	Όγκος >5 ως ≤ 7εκ. στη μεγαλύτερη διάμετρο ή όγκος οποιουδήποτε μεγέθους ο οποίος διηθεί το θωρακικό τοίχωμα, περικάρδιο, φρενικό νεύρο ή δορυφορικά οζίδια στον ίδιο λοβό	
T4	Όγκος >7 εκ. στη μεγαλύτερη διάμετρο ή όγκος οποιουδήποτε μεγέθους ο οποίος διηθεί το μεσοθωράκιο, διάφραγμα, καρδιά, μεγάλα αγγεία, υποτροπιάζον λαρυγγικό νεύρο, καρίνα, τραχεία, οισοφάγο, σπονδυλική στήλη, ή ξεχωριστός όγκος σε διαφορετικό λοβό στον ίδιο πνεύμονα	
N stage		
N1	Μετάσταση στους ομόπλευρους περιβρογχικούς και/ή πυλαίους και ενδοπνευμονικούς αδένες	
N2	Μετάσταση στους ομόπλευρους μεσοθωρακικούς και / ή υποτροπιδικούς αδένες	
N3	Μετάσταση στους ετερόπλευρους μεσοθωρακικούς ή πυλαίους. ομόπλευρους ή ετερόπλευρους σκαληνούς/υπερκλείδιους	
M stage		
M1	Απομακρυσμένη μετάσταση	
	M1a	Όγκος σε ετερόπλευρους πνεύμονες ή κακοήθης πλευριτική ή περικαρδιακή συλλογή
	M1b	Μονήρης εξωθωρακική μετάσταση, συμπεριλαμβανομένου ενός μη περιοχικού λεμφαδένα
	M1c	Πολλαπλές εξωθωρακικές μεταστάσεις σε ένα ή περισσότερα όργανα

Τα στάδια του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα είναι σύμφωνα ξανά με την 8^η έκδοση σταδιοποίησης TNM:

	No	N1	N2	N3
T1	IA	IIB	IIIA	IIIB
T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB
T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
M1a	IVA	IVA	IVA	IVA
M1b	IVA	IVA	IVA	IVA
M1c	IVB	IVB	IVB	IVB

Τα υποσύνολα των T, N και M κατηγοριών ομαδοποιούνται σε ορισμένα στάδια, καθώς αυτοί οι ασθενείς έχουν παρόμοια πρόγνωση.

Για παράδειγμα, η cT1N0 νόσος (στάδιο IA) έχει ποσοστό πενταετούς επιβίωσης 77-92%. Στο άλλο άκρο του φάσματος κάθε νόσος M1c (στάδιο IVB) έχει ποσοστό πενταετούς

Εικόνα 1: Στάδια καρκίνου του ΜΜΚΠ. Πηγή: <https://radiologyassistant.nl/chest/lung-cancer/tnm-classification-8th-edition>

1.6. Κλινική εικόνα-συμπτώματα

Η διάγνωση καρκίνου στους πνεύμονες αποτελεί ένα τυχαίο εύρημα στο 5-10% των περιπτώσεων. Δυστυχώς, στα πρώιμα στάδια της νόσου δεν παρατηρούνται εμφανή συμπτώματα, με αποτέλεσμα να καθυστερεί η διάγνωση. Σε αρκετά προχωρημένα στάδια μόνο είναι εμφανή τα συμπτώματα, για αυτό και το 49% των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα είναι στάδιο IV. Ωστόσο, με τη βοήθεια των νέων τεχνολογιών, είναι δυνατό να εντοπιστεί ολοένα και πιο σύντομα η νόσος.

Τα συμπτώματα στον καρκίνο του πνεύμονα εξαρτώνται από το σημείο που βρίσκεται ο όγκος, καθώς και από την έκταση της νόσου. Περιλαμβάνουν επίμονο βήχα, αιμόπτυση, συριγμούς, λαχάνιασμα, θωρακικό άλγος, δύσπνοια, βραχνή φωνή, λοίμωξη, αδυναμία, πόνο και παραισθησία στο χέρι, οίδημα στο άνω σώμα. Ο πόνος στο θώρακα είναι μία από τις πιο ακριβείς μεθόδους για να αξιολογηθεί εάν ο όγκος έχει διηθήσει τον υπεζωκότα ή το θωρακικό τοίχωμα.

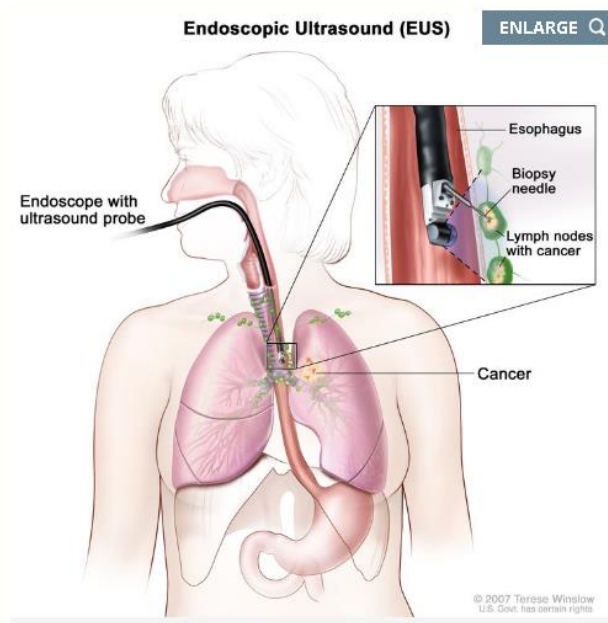
Σε ένα ποσοστό 7-15% εμφανίζονται και παρανεοπλασματικά σύνδρομα, συνηθέστερα στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Σε αυτά συγκαταλέγονται η υπερασβεστιαμία, η υπερτροφική πνευμονική οστεοαρθροπάθεια, το σύνδρομο απρόσφορης έκκρισης αντιδιουρητικής ορμόνης (SIADH) και το σύνδρομο Cushing.¹⁴

2. Διάγνωση καρκίνου του πνεύμονα

Η έγκαιρη διάγνωση και η ακριβέστερη σταδιοποίηση της νόσου είναι πολύτιμη ώστε να εξασφαλιστεί η καλύτερη πιθανή θεραπευτική προσέγγιση του ασθενούς.

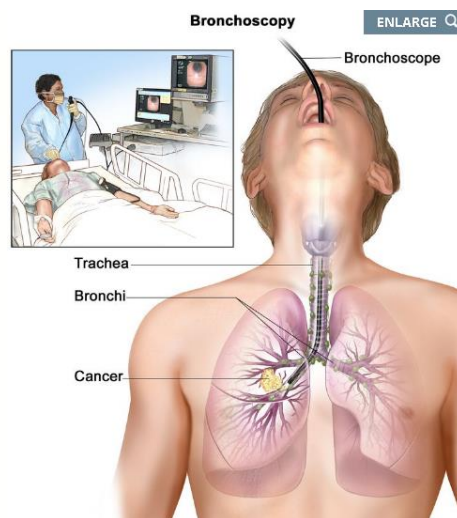
Για να πραγματοποιηθεί η διάγνωση της κακοήθειας στον πνεύμονα, αρχικά γίνεται κλινική εξέταση για την ανίχνευση ύποπτων ευρημάτων, αξιολογείται το ιστορικό υγείας του ασθενούς και λαμβάνονται υπόψη επιβαρυντικοί παράγοντες, όπως το κάπνισμα. Όταν υπάρχει υποψία βλάβης λόγω ύπαρξης συμπτωμάτων, αρχικά πραγματοποιείται μια ακτινογραφία θώρακα. Πιθανά ευρήματα αποτελούν πνευμονικός όζος, κοιλότητα, πύκνωση (μεταποφρακτική πνευμονία), ατελεκτασία, κυψελιδικά διηθήματα, πλευριτική συλλογή, περικαρδίτιδα, διεύρυνση μεσοθωρακίου (λεμφαδένες), άνωση διαφράγματος (διήθηση φρενικού). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην είναι πάντα εφικτό να επιβεβαιωθεί ή να αποκλειστεί η υποψία νόσου. Πολύτιμη, επομένως, είναι η υπολογιστική τομογραφία θώρακα που καθιστά πιο ξεκάθαρη απεικονιστικά τη διάγνωση και την έκταση της νόσου. Σε περιπτώσεις που δεν μπορεί να ακτινοβοληθεί ο ασθενής (νεαρή ηλικία, εγκυμοσύνη, περιπτώσεις αντένδειξης) χρησιμοποιείται μαγνητική τομογραφία.

Ωστόσο, πάντοτε απαιτείται ιστολογική επιβεβαίωση, οπότε γίνεται βιοψία. Ένας τρόπος είναι η βιοψία λεπτής βελόνης (Fine-needle aspiration (FNA) biopsy), όπου συλλέγεται ιστός ή υγρό από τον πνεύμονα με τη χρήση μιας λεπτής βελόνας, ώστε να εξεταστεί η ύπαρξη καρκινικών κυττάρων. Στην περίπτωση αυτή, είναι αναγκαία η καθοδήγηση στην εντόπιση του σημείου που θα γίνει η συλλογή με τη βοήθεια υπολογιστικής τομογραφίας, υπερήχου ή άλλης απεικονιστικής μεθόδου. Ενδοσκοπικές τεχνικές, όπως ο ενδοσκοπικός υπέρηχος (EUS) ή ενδοβρογχικός υπέρηχος (EBUS), χρησιμοποιούνται συχνά και επιτρέπουν την αξιολόγηση διήθησης των λεμφαδένων και του μεσοθωρακίου.



Εικόνα 2: Ενδοσκοπικός υπέρηχος. Πηγή: <https://www.cancer.gov/>

Μια άλλη μέθοδος είναι η βρογχοσκόπηση, με την οποία συλλέγεται βρογχικό έκπλυμα, γίνεται βιοψία του βρογχικού επιθηλίου και είναι έτσι εφικτός ο εντοπισμός και προσδιορισμός της βλάβης. Πρόκειται για μια μέθοδο με διαγνωστική ευαισθησία 60-80% που εξαρτάται από την εμπειρία του εξεταστή καθώς και την θέση και έκταση της βλάβης.



Εικόνα 3: Βρογχοσκόπηση. Πηγή: <https://www.cancer.gov/>

Σε κάποιες περιπτώσεις, πραγματοποιείται θωρακοτομή, με την οποία είναι δυνατή η ιστολογική διάγνωση και σταδιοποίηση αλλά και η εξαίρεση του όγκου και των λεμφαδένων, καθώς πρόκειται για μια χειρουργική επέμβαση – ανοιχτή βιοψία.

Η ανίχνευση απομακρυσμένων μεταστάσεων γίνεται με αξονικές τομογραφίες σε άλλες περιοχές, όπως άνω κοιλία και εγκέφαλο, καθώς και μαγνητικές τομογραφίες, σπινθηρογραφήματα οστών ή τομογραφίες εκπομπής ποζιτρονίων (PET). Επίσης, ανάλογα με τα ευρήματα, πραγματοποιούνται βιοψίες στους περιφερικούς λεμφαδένες, στο ήπαρ, τα επινεφρίδια, τα οστά και το δέρμα.

Για τον ακριβή προσδιορισμό του ιστολογικού τύπου του καρκίνου χρειάζεται να ελεγχθεί η έκφραση κάποιων πρωτεϊνών. Αυτό πραγματοποιείται με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας, όπου ειδικά αντισώματα προσδένονται στα αντιγόνα – δείκτες. Στην περίπτωση του ΜΜΚΠ, η έκφραση των TTF-1, Napsin A και CK7 αντιπροσωπεύουν την εικόνα αδενοκαρκινώματος, ενώ η έκφραση p40, CK5/6 και p63 σχετίζονται με πλακώδες καρκίνωμα.

2.1. Προγνωστικοί παράγοντες στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα

Τα χαρακτηριστικά του ασθενούς ή της νόσου που επιδρούν στην κλινική έκβασή της ανεξαρτήτως του θεραπευτικού χειρισμού αποτελούν προγνωστικό παράγοντα. Στην περίπτωση του ΜΜΚΠ χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες. Η πρώτη αφορά τις κλινικές παραμέτρους και περιλαμβάνει το στάδιο της νόσου κατά TNM, που αποτελεί τον σημαντικότερο προγνωστικό παράγοντα στο ΜΜΚΠ, τον δείκτη γενικής κατάστασης του ασθενούς κατά ECOG, την παρουσία συνδρόμου καρκινικής καχεξίας και το ιστορικό καπνίσματος του ασθενούς. Η δεύτερη κατηγορία αφορά ιστοπαθολογικές, εργαστηριακές και μοριακές παραμέτρους και περιλαμβάνει τα εξής:

- Παρουσία λεμφαγγειακής διήθησης
- Μικροσκοπική διήθηση αγγείων από καρκινικά κύτταρα
- Φτωχή διαφοροποίηση
- Αυξημένη γλυκολυτική δραστηριότητα του όγκου
- Αυξημένα επίπεδα LDH
- Μεταλλάξεις στο RAS, EGFR
- Παρουσία ηπατικών και οστικών μεταστάσεων

3. Θεραπεία καρκίνου του πνεύμονα

Η θεραπευτική προσέγγιση κάθε ασθενούς εξαρτάται από το στάδιο, τον ιστολογικό τύπο, τη γενική κατάσταση του ασθενούς, την πνευμονική λειτουργία, την ύπαρξη συνοδών νοσημάτων και φυσικά την επιθυμία του ασθενούς.

3.1. Χειρουργική προσέγγιση

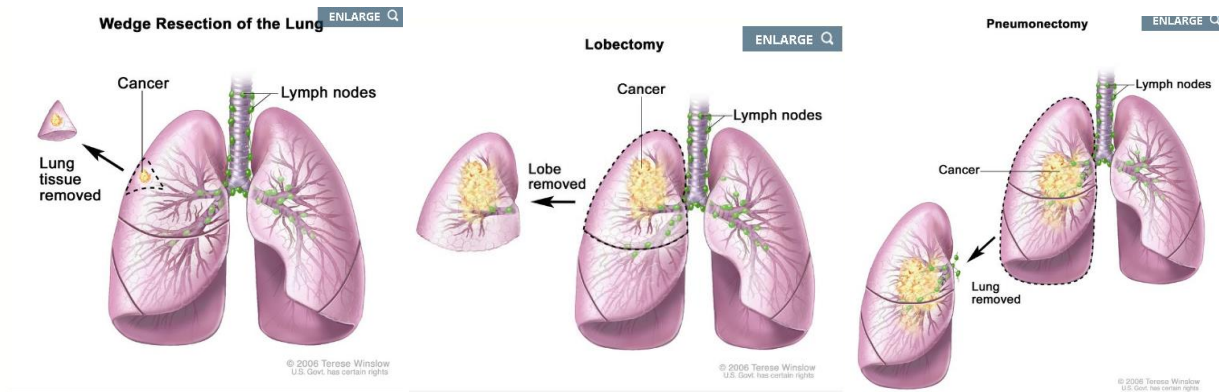
Γενικά, το χειρουργείο προσφέρει την καλύτερη θεραπευτική προσέγγιση όταν η θνησιμότητα και η νοσηρότητα είναι σε αποδεκτά ποσοστά. Βασική αρχή ενός χειρουργείου είναι η εκτομή R0, δηλαδή με ελεύθερα χειρουργικά όρια (χωρίς μικροσκοπικά εμφανή καρκινικά κύτταρα) και η δειγματοληψία ή εκτομή λεμφαδένων.

Ένα μεγάλο μέρος των ανθρώπων που πάσχουν από καρκίνο του πνεύμονα αντιστοιχεί σε ηλικιωμένους καπνιστές με πολλαπλές συννοσηρότητες, γεγονός που καθιστά αναγκαίο να αξιολογηθεί αν είναι κατάλληλοι για να υποβληθούν σε χειρουργική επέμβαση. Επιπλέον, συνιστάται η διακοπή του καπνίσματος πριν το χειρουργείο καθώς μειώνονται έτσι οι πνευμονικές επιπλοκές.

Χειρουργική εξαίρεση ενδείκνυται στα πρώιμα στάδια της νόσου, και σε προχωρημένη ή oligομεταστατική νόσο συνδυάζεται και με άλλες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Οι τεχνικές που εφαρμόζονται στην κλινική πράξη είναι οι εξής:

- Σφηνοειδής εκτομή: εκτομή όγκου και τμήματος υγιούς ιστού γύρω από αυτόν
- Τμηματεκτομή: εκτομή όγκου και τμήματος υγιούς ιστού γύρω από αυτόν (μεγαλύτερο από σφηνοειδούς εκτομής)
- Λοβεκτομή: εξαίρεση ολόκληρου λοβού του πνεύμονα
- Πνευμονεκτομή: εξαίρεση ολόκληρου πνεύμονα
- Εκτομές πνευμονικού παρεγχύματος με βρογχοπλαστική και αγγειοπλαστική (sleeve εκτομές)

Η επιλογή της τεχνικής γίνεται πάντα με αξιολόγηση της έκτασης της νόσου λαμβάνοντας υπόψη την νοσηρότητα και την ποιότητα ζωής του ασθενούς μετά το χειρουργείο.



Εικόνα 4: Εκτομές στον καρκίνο του πνεύμονα. Πηγή:<https://www.cancer.gov/>

Σε ορισμένες περιπτώσεις προχωρημένης νόσου, ενδείκνυται χορήγηση χημειοθεραπείας ή ακτινοθεραπείας ή συνδυασμός αυτών πριν το χειρουργείο, με σκοπό την υποσταδιοποίηση της νόσου ή την επίτευξη χειρουργική εξαίρεσης ενός όγκου που πριν ήταν μη εγχειρήσιμος.

Στην περίπτωση που ασθενείς έχει πολλαπλές μεταστάσεις, είτε στον πνεύμονα είτε σε απομακρυσμένα όργανα, η επέμβαση είναι αβέβαιη. Τα κριτήρια που λαμβάνονται υπόψη ώστε να είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί το χειρουργείο είναι τα εξής:

- ✓ Η πρωταρχική νόσος να είναι υπό έλεγχο
- ✓ Οι μεταστάσεις να είναι περιορισμένες στον πνεύμονα
- ✓ Οι μεταστάσεις να μπορούν να εξαιρεθούν πλήρως
- ✓ Η φυσική κατάσταση του ασθενούς να του επιτρέπει να αντέξει την επέμβαση

3.2. Ακτινοθεραπεία

Η ακτινοθεραπεία είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιεί διάφορες μορφές ακτινοβολίας με σκοπό να σκοτώσει τα καρκινικά κύτταρα ή να εμποδίσει την ανάπτυξή τους. Ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία, χορηγείται σε ασθενείς που δεν είναι εφικτό να χειρουργηθούν. Πολλές φορές εφαρμόζεται πριν τη χειρουργική επέμβαση, ώστε να μειωθεί το μέγεθος του όγκου και να υποσταδιοποιηθεί η νόσος, με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο χρόνος ελεύθερος νόσου και επιβίωσης. Μετεγχειρητικά συνιστάται έπειτα από ριζική εκτομή σε ασθενείς με τοπικά εκτεταμένη νόσο ώστε να αποφευχθεί ο κίνδυνος υποτροπής και να παραταθεί η επιβίωση. Σε ορισμένες περιπτώσεις όπου οι ασθενείς δεν μπορούν να υποστούν ένα χειρουργείο και ο όγκος ακτινοβόλησης δεν ξεπερνά τα 3 εκατοστά (πρώιμα στάδια καρκίνου του πνεύμονα), εφαρμόζεται στερεοτακτική ακτινοθεραπεία. Πρόκειται για ένα μικρό αριθμό συνεδριών με χορήγηση υψηλής δόσης ακτινοβολίας.

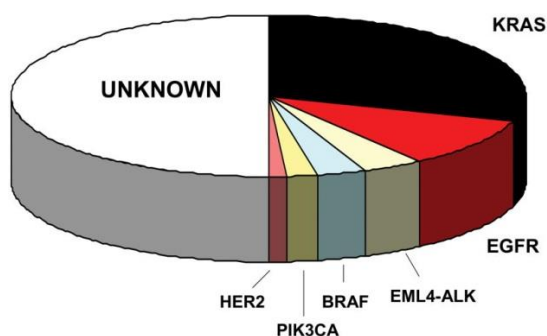
3.3. Χημειοθεραπεία

Η χημειοθεραπεία αποτελεί μια θεραπευτική προσέγγιση που χρησιμοποιεί φάρμακα ώστε να σταματήσει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Ανάλογα με το στάδιο της νόσου ή τον τύπο του καρκίνου εφαρμόζεται συστηματική χημειοθεραπεία, δηλαδή τα φάρμακα χορηγούνται από το στόμα ή ενδοφλέβια, ή περιοχική χημειοθεραπεία όπου τα φάρμακα διαχέονται απευθείας στο όργανο στόχο. Στον καρκίνο του πνεύμονα συνιστάται είτε προεγχειρητικά είτε μετεγχειρητικά, ως μονοθεραπεία ή ως συνδυασμός με ακτινοθεραπεία, ανάλογα με το στάδιο της νόσου. Γενικά, πρόκειται για ένα καρκίνο που εμφανίζει χημειοευαισθησία 5-40%. Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται είναι σισπλατίνη, καρβοπλατίνη, δοσεταξέλη, πακλιταξέλη, ετοποσίδη, κυκλοφωσφαμίδη, ιφωσφαμίδη, βινορελμπίνη, γεμισιταμπίνη, πεμετρεξέδη, και χορηγούνται είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυαστικά σχήματα.

3.4. Στοχευμένη θεραπεία

Η στοχευμένη θεραπεία βασίζεται σε οδηγούς-μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια οι οποίες πυροδοτούν τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Αυτή η ογκογονική δραστηριότητα συγκεκριμένων μεταλλαγών οδήγησε στη σχεδίαση φαρμάκων που στοχεύουν ειδικά αυτά τα γονίδια. Η κατανόηση αυτών των μεταλλαγών οδηγεί σε καλύτερη κατανόηση της νόσου με απώτερο αποτέλεσμα τη βέλτιστη διάγνωση και θεραπεία της νόσου. Έτσι, είμαστε πλέον στην εποχή της ιατρικής ακριβείας, καθώς το θεραπευτικό πλάνο καθορίζεται άμεσα από το μοριακό προφίλ του όγκου. Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί μια περίπτωση όπου έχουν αναγνωρισθεί πολλές σημαντικές γενετικές αλλαγές που ενέχονται στην αύξηση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων ή στην παρεμπόδιση μονοπατιών που οδηγούν σε ογκοκαταστολή και αποτελεί τον τύπο καρκίνου με τα περισσότερα εγκεκριμένα στοχευμένα φάρμακα. Αφορούν κυρίως μεταλλάξεις στα γονίδια EGFR, ALK και άλλα, όπου χρησιμοποιούνται αναστολείς κινασών τυροσίνης και φαίνεται να έχουν μεγαλύτερο θεραπευτικό όφελος σε σύγκριση με την συστηματική χημειοθεραπεία. Από το 1998 έχουν εγκριθεί από το FDA τρεις στοχευμένες θεραπείες για τη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα (το gefitinib το 2002, το erlotinib το 2003 και το bevacizumab το 2006). Κλινικές δοκιμές βρίσκονται σε εξέλιξη και αφορούν νέες στοχευμένες θεραπείες και λιγότερο επιθετικά θεραπευτικά σχήματα με σκοπό την αύξηση του χρόνου επιβίωσης του ασθενούς και του χρόνου ελεύθερου νόσου.²

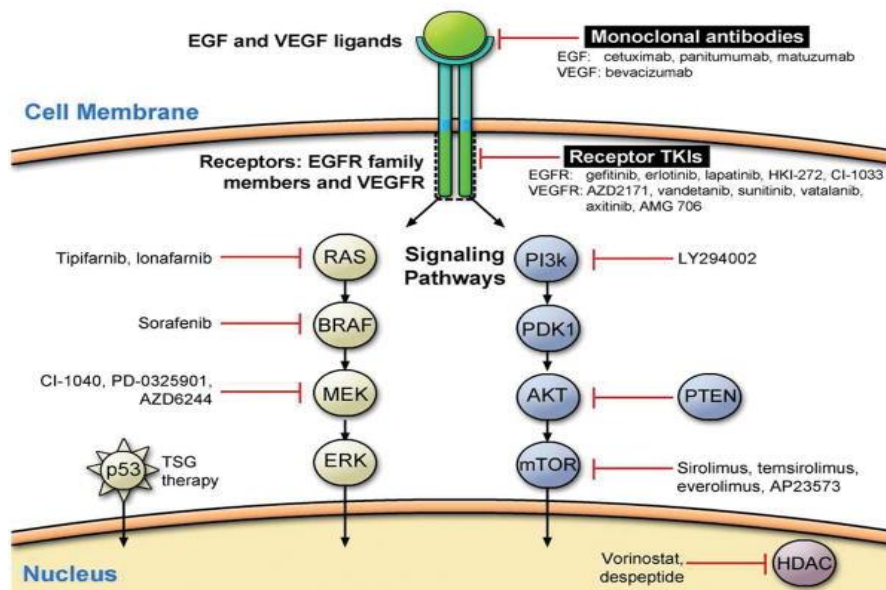
Activating mutations in lung adenocarcinoma



Εικόνα 5: Κλινικά σημαντικές ογκογόνες μεταλλάξεις του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα.⁵

3.4.1. EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)

Το γονίδιο EGFR ανήκει στην οικογένεια κινασών τυροσίνης ErbB. Αποτελείται από μια εξωκυττάρια περιοχή (πρόσδεση του εξωκυττάριου σήματος), από μια διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυττάρια περιοχή (τυροσίνη-κινάση). Με την πρόσδεση του συνδέτη και τον ομο-ή ετεροδιμερισμό και την ενεργοποίηση του υποδοχέα, ενεργοποιούνται κυρίως δυο “downstream” σηματοδοτικά μονοπάτια : PI3K / AKT και RAS / RAF / MAPK. Αυτές οι οδοί ενδοκυτταρικής σηματοδότησης ρυθμίζουν βασικές διαδικασίες όπως η απόπτωση και ο πολλαπλασιασμός. Στον καρκίνο του πνεύμονα, μεταλλάξεις στο γονίδιο EGFR εντοπίζονται κυρίως στα 4 πρώτα εξώνια RTK τομέα (18,19,20,21) δηλαδή την περιοχή τυροσίνης-κινάσης. Οι πιο συχνές γενετικές αλλαγές είναι η σημειακή μετάλλαξη L858R στο εξώνιο 21 έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση λευκίνης από αργινίνη και η απαλοιφή εντός πλαισίου ανάγνωσης στο εξώνιο 19, οι οποίες αποτελούν μαζί το 90-95% όλων των μεταλλαγών στο συγκεκριμένο γονίδιο. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο EGFR είναι ιδιαίτερα σημαντικές καθώς εμφανίζουν ευαισθησία σε αναστολείς κινασών τυροσίνης (TKIs). Οι αναστολείς αυτοί στοχεύουν μεταλλάξεις εντοπιζόμενες σε τέσσερα εξώνια (18-21) του EGFR γονιδίου, τα οποία κωδικοποιούν μέρος της επικράτειας κινάσης τυροσίνης και εντοπίζονται γύρω από την περιοχή πρόσδεσης του ATP ενζύμου. Αρκετά κλινικά χαρακτηριστικά, όπως το φύλο, το κάπνισμα, η εθνικότητα βρέθηκαν να σχετίζονται με την ανταπόκριση στη θεραπεία με TKIs .



Εικόνα 6: Τρέχουσες διαθέσιμες θεραπείες που στοχεύουν την οδό σηματοδότησης του EGFR. ⁵

Η θεραπεία με αναστολείς κινασών τυροσίνης χρησιμοποιείται ευρέως στην κλινική πράξη, αλλά πολλές φορές αναπτύσσεται αντίσταση στη θεραπεία με αναστολείς 1ης και 2ης γενιάς και ο ασθενής σταματά να ανταποκρίνεται στην θεραπεία. Αυτό οφείλεται είτε σε μεταλλαγές του στόχου, είτε σε ενεργοποίηση εναλλακτικών μονοπατιών σηματοδότησης που οδηγούν σε ανεξάρτητη από EGFR ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων είτε σε ιστολογικές μεταβολές.

Η πιο συχνή μεταλλαγή επίκτητης αντοχής στην θεραπεία με αναστολείς κινασών τυροσίνης 1ης και 2ης γενιάς είναι η T790M. Εντοπίζεται στο εξώνιο 20 ⁶ και οδηγεί στην αντικατάσταση της θρεονίνης σε μεθειονίνη, επάγοντας τη στερεοχημική παρεμπόδιση της πρόσδεσης του αναστολέα στον υποδοχέα του EGFR. Μπορεί να οφείλεται είτε σε de novo μεταλλάξεις που εμφανίζονται σε καρκινικά κύτταρα λόγω της γενετικής αστάθειας τους είτε από μεταβολές που προϋπήρχαν στον όγκο που δεν υποβλήθηκε σε θεραπεία σε πολύ χαμηλή συχνότητα. Η T790M εντοπίζεται στο 50-60% των περιπτώσεων ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του πνεύμονα και αναπτύσσουν αντίσταση στη θεραπεία με αναστολείς 1^{ης} και 2^{ης} γενιάς.⁷ Η παρουσία της είναι σπανία σε ασθενείς που δεν έχουν υποβληθεί σε κανένα είδος θεραπείας με αναστολείς TKIs. Η ανίχνευση της έχει σημαντικό θεραπευτικό όφελος, καθώς χορηγούνται στους ασθενείς αναστολείς 3ης γενιάς, όπως το osimertinib, το rociletinib και οι HM61713, ASP8273, EGF 816, PF-06747775. Το osimertinib εγκρίθηκε πρόσφατα από το FDA για μεταστατικούς EGFR T790M+ καρκίνους του πνεύμονα και φαίνεται να έχει σημαντικό αντίκτυπο στον χρόνο ελεύθερο νόσου (9,6 μήνες) σε σύγκριση με τους ασθενείς με EGFR T790M+ θετικούς όγκους.

3.4.2. ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase)

Χρωμοσωμικές αναδιατάξεις στο ALK οδηγούν σε σύντηξή του με άλλα ογκογόνα γονίδια, οδηγώντας έτσι στην δημιουργία παραλλαγμένων μορφών του ALK γονιδίου. Στον καρκίνο του πνεύμονα πιο συχνά παρατηρείται η σύντηξη του ALK με το EML4 (echinoderm microtubule associated protein like-4). Η χιμαιρική πρωτεΐνη EML4-ALK που προκύπτει ανιχνεύεται στο 2-7% των περιστατικών MMΚΠ και αφορά κυρίως μη καπνιστές ασθενείς. Συνήθως, η συγκεκριμένη αναδιάταξη δεν συνυπάρχει με μεταλλάξεις στα γονίδια EGFR και KRAS. Η θεραπεία με ALK αναστολείς έχει αποδειχθεί πως έχει μεγάλο κλινικό όφελος με αύξηση του μέσου χρόνου επιβίωσης. Τέτοιοι αναστολείς είναι οι crizotinib, ceritinib, and alectinib, οι οποίοι προτείνονται σε ανάλογη γραμμής θεραπείας σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες.

3.4.3. ROS1 (c-Ros Oncogene 1)

Το γονίδιο ROS-1 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6q22 και σχετίζεται ιδιαίτερα με το γονίδιο ALK, καθώς ταυτίζεται κατά 80% με αυτό, όσο αφορά την περιοχή πρόσδεσης του ATP. Αναδιατάξεις στο γονίδιο ROS-1 πυροδοτούν σηματοδοτικά μονοπάτια που οδηγούν σε ογκογένεση. Ανιχνεύονται στο 0,5-2% των ασθενών με MMΚΠ και κυρίως σε νεότερους και μη καπνιστές. Πρόσφατα, εγκρίθηκε από τον FDA η χορήγηση crizotinib (ALK αναστολέας) για την αντιμετώπιση των αναδιατάξεων στο γονίδιο ROS-1, καθώς αποδείχθηκε ιδιαίτερα αποτελεσματικό και σε αυτές τις περιπτώσεις.

3.4.4. RET (Rearranged During Transfection)

Συντήξεις στο γονίδιο RET ανιχνεύονται ως οδηγές μεταλλάξεις στο 1-2% των ασθενών με MMΚΠ και κυρίως σε νεότερους και μη καπνιστές. Η ύπαρξη αυτών των αναδιατάξεων αποκλείει την ύπαρξη αναδιάταξης ή μετάλλαξης στα γονίδια *EGFR*, *KRAS*, *ROS1* and *ALK*. Για την στόχευσή τους χρησιμοποιείται το Alectinib (εγκεκριμένος ALK αναστολέας).

3.4.5. MET

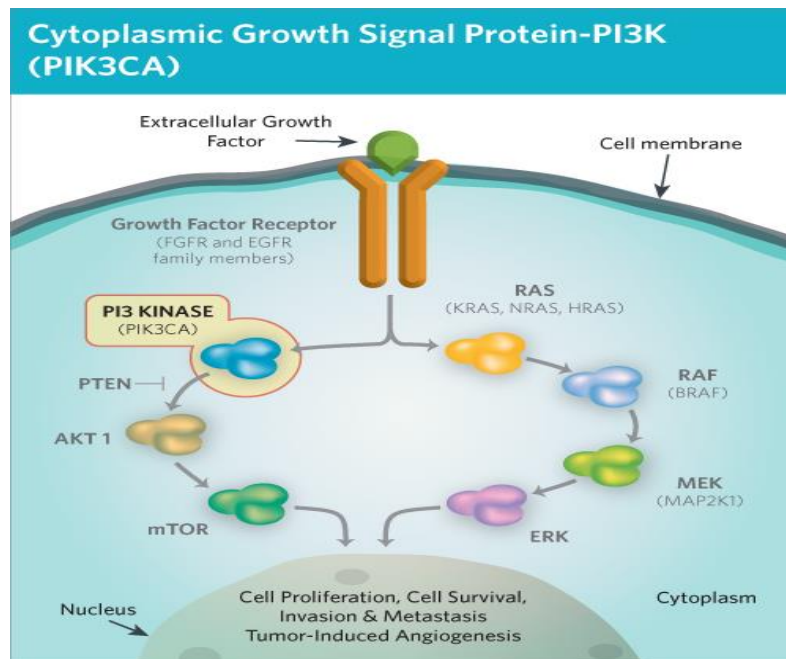
Το γονίδιο MET σχετίζεται με σηματοδοτικά μονοπάτια που αφορούν την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση του κυττάρου. Μεταλλάξεις στο MET ανιχνεύονται στο 2-7% των ασθενών με ΜΜΚΠ και αντιμετωπίζονται με τη χορήγηση crizotinib. Παρατηρείται, επίσης, ενίσχυση του γονιδίου MET να δρα ως μηχανισμός αντίστασης στη θεραπεία με αναστολείς κινασών τυροσίνης.

3.4.6. KRAS (Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homologue)

Το γονίδιο KRAS είναι από τα πιο συχνά ενεργοποιημένα γονίδια στον καρκίνο του πνεύμονα. Στο 20% των ασθενών με αδenoκαρκίνωμα ανιχνεύονται σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο KRAS και πιο συχνά στους καπνιστές. Στις περισσότερες περιπτώσεις εντοπίζεται μια αντικατάσταση αμινοξέος στα κωδικόνια 12, 13 και 61 με αποτέλεσμα την υπερέκφραση του KRAS γονιδίου. Οι μεταλλάξεις στο KRAS δεν συνυπάρχουν με μεταλλάξεις στο γονίδιο EGFR, χαρακτηρίζονται δηλαδή ως “αμοιβαία αποκλειόμενες” μεταλλάξεις. Οι ασθενείς με μεταλλαγμένο KRAS φαίνεται να μην ανταποκρίνονται στη θεραπεία με αναστολείς κινασών τυροσίνης (anti-EGFR). Ωστόσο, δεν εμφανίζεται κλινικό όφελος από την αναστολή της ενεργοποίησής του και μέχρι σήμερα δεν έχει ανακαλυφθεί κάποια αποτελεσματική θεραπεία από την στόχευσή του στον καρκίνο του πνεύμονα.

3.4.7. PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase)

Το σηματοδοτικό μονοπάτι (PI3K / AKT) έχει σημαντικό ρόλο στην έναρξη ή/και πρόοδο του καρκίνου του πνεύμονα. Μεταλλάξεις στο γονίδιο PIK3CA εντοπίζονται στο 1-4% των ασθενών με ΜΜΚΠ, και κυρίως στο πλακώδες καρκίνωμα. Εντοπίζονται στο εξόνιο 9 ή 20 και οδηγούν στην υπερέκφραση του γονιδίου PIK3CA. Οι σημαντικότερες μεταλλαγές είναι οι E542K, E545K, E545Q, H1047R, H1047L αλλά δεν έχει ακόμη εδραιωθεί η συσχέτισή τους με την εξέλιξη της νόσου στον καρκίνο του πνεύμονα. Ως αποτέλεσμα αυτών των γενετικών αλλαγών είναι η την υπερενεργοποίηση του PI3K/Akt/ m TOR μονοπατιού και κατ'επέκταση την αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τόσο των φυσιολογικών όσο και των καρκινικών κυττάρων. Σε κλινικές μελέτες έχουν δοκιμαστεί ως θεραπεία για τον ΜΜΚΠ αναστολείς των PI3K και Akt γονιδίων, ενώ έχουν εγκριθεί από τον FDA αναστολείς του m TOR γονιδίου, όπως το everolimus και το temsirolimus. Σε μελέτες προκλινικού σταδίου έχει διαπιστωθεί πως μεταλλαγές ή υπερέκφραση του PIK3CA γονιδίου σχετίζονται άμεσα με την ανταπόκριση με αντι-PIK3CA θεραπεία (NVP-BYL719) όπως και με την εμφάνιση αντίστασης στη θεραπεία με EGFR TKIs.



Εικόνα 7: Σηματοδοτικό μονοπάτι στο οποίο συμμετέχει το PIK3CA γονίδιο.
 Πηγή:<http://targetedcancer.org/>

3.4.8. BRAF

Μεταλλάξεις στο γονίδιο BRAF οδηγεί σε αυξημένη δραστηριότητα της κινάσης του BRAF γονιδίου. Εμφανίζονται συνήθως σε όγκους άγριου τύπου για τα EGFR, ALK γονίδια. Η πιο συχνή μεταλλαγή είναι η V600E, η αντικατάσταση δηλαδή της βαλίνης από γλουταμινικό οξύ, η ύπαρξη της οποίας σχετίζεται με μειωμένη ανταπόκριση στη θεραπεία με gefitinib. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι ασθενείς με MMΚΠ που φέρουν τη μεταλλαγή V600E στο BRAF γονίδιο φαίνεται να παρουσιάζουν πολύ καλή ανταπόκριση στη θεραπεία με vemurafenib ή dabrafenib. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί σε επίπεδο προκλινικών μελετών πως η θεραπεία με sorafenib είναι πολλά υποσχόμενη.⁸

3.4.9. HER 2

Το ERBB2 γονίδιο, που αποκαλείται συχνά HER2, είναι ένα γονίδιο που κωδικοποιεί έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα με ενδογενή δράση κινάσης τυροσίνης. Η πρόσδεση αυξητικών παραγόντων στον υποδοχέα αυτόν έχει ως αποτέλεσμα τη διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την κυτταρική ανάπτυξη, και την ικανότητα των κυττάρων για διήθηση και μετάσταση. Η ενεργοποίηση της σηματοδότησης του μονοπατιού που συμμετέχει το HER2 οδηγεί

στην καρκινογένεση είτε μέσω της ενίσχυσης του γονιδίου HER2 (του συνηθέστερου μηχανισμού) ή της μετάλλαξης γονιδίου HER2.

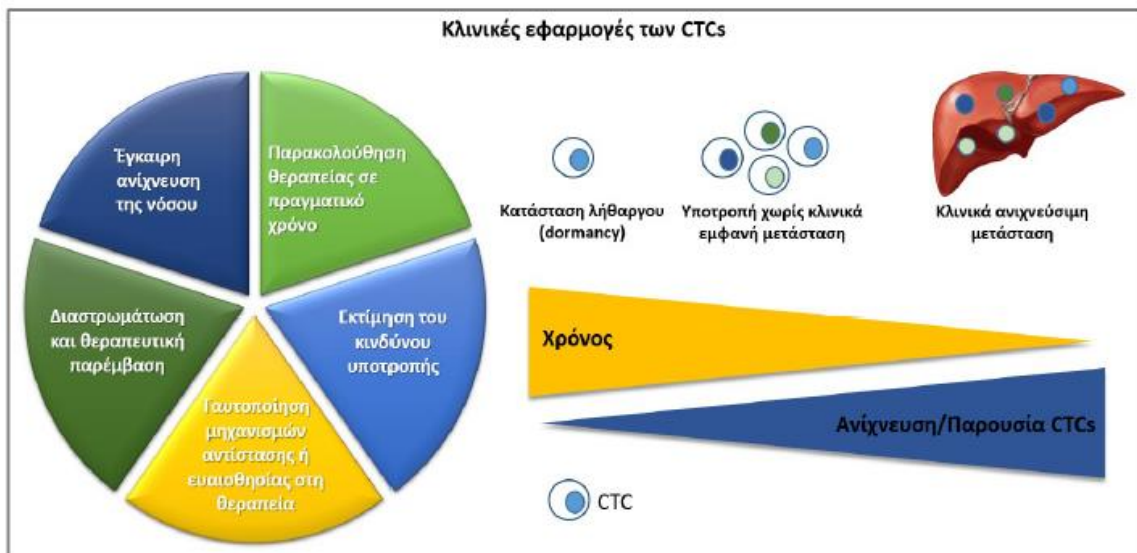
Η πιο συχνή μετάλλαξη στο γονίδιο αυτό είναι η προσθήκη στο εξώνιο 20 (Ex20Ins) το οποίο κωδικοποιεί ένα τμήμα της περιοχής της κινάσης. Η μετάλλαξη αυτή έχει παρατηρηθεί στο 2-4% των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, ενώ το ποσοστό αυτό αυξάνεται στο 6% για EGFR/KRAS/ALK αρνητικούς όγκους.⁹ Διάφορες κλινικές μελέτες δείχνουν πως η θεραπεία με trastuzumab (Μονοκλωνικό αντι-HER2 αντίσωμα) σε ασθενείς με ΜΜΚΠ που φέρουν μετάλλαξη στο HER-2 έχει σημαντικό κλινικό όφελος, ενώ άλλες αποδεικνύουν πως ο συνδυασμός του trastuzumab με τη χημειοθεραπεία προσφέρει έλεγχο της νόσου κατά 96%.

4. Υγρή βιοψία

Η υγρή βιοψία είναι μία μη επεμβατική διαδικασία κατά την οποία συλλέγεται περιφερικό αίμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την περιγραφή της κατάστασης ενός πρωτοπαθούς όγκου ή την ύπαρξη μεταστατικής νόσου. Από μια υγρή βιοψία είναι δυνατό να απομονωθούν κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, ελεύθερο κυκλοφορούν DNA, miRNAs και εξωσώματα.

4.1. Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs)

Τα **κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs)** είναι καρκινικά κύτταρα τα οποία προέρχονται από τον πρωτοπαθή όγκο. Απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος και η ποσότητά τους έχει συσχετιστεί με τα αποτελέσματα της θεραπείας και την ολική επιβίωση. Τα τελευταία χρόνια, ολοένα και αυξάνονται οι δημοσιεύσεις για αυτά σε επιστημονικά περιοδικά και αποτελούν σπουδαία εργαλεία για την πρόβλεψη και τη σταδιοποίηση της νόσου. Ωστόσο, η απλή απαρίθμηση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων, χωρίς μοριακό χαρακτηρισμό, μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα και υποθέσεις.



Εικόνα 8: Κλινικές εφαρμογές των CTC. Πηγή: Διάλεξη ΠΜΣ Ογκολογίας “Introduction to liquid biopsy”-Α. Μάρκου

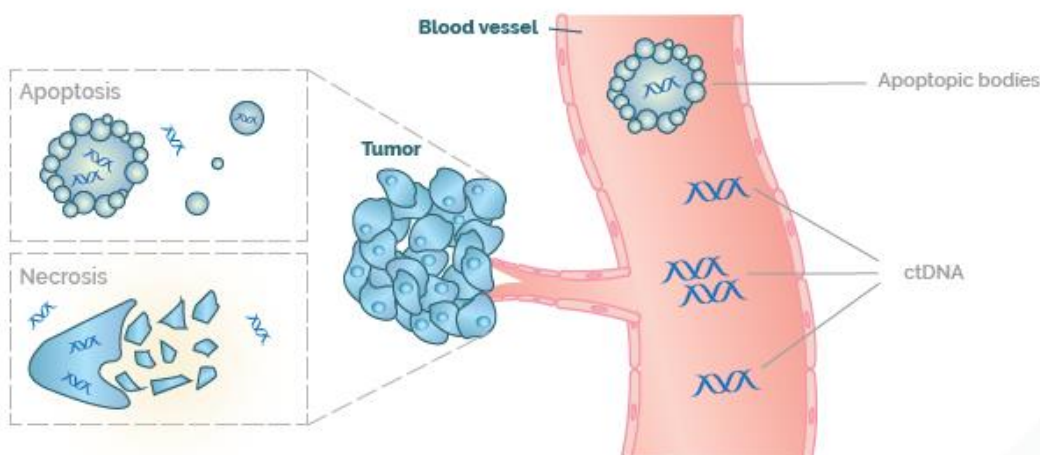
4.2. miRNAs και εξωσώματα

Τα **ελεύθερα κυκλοφορούντα miRNAs** είναι μικρά μόρια RNA που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες αλλά αποτελούν ομάδα γονιδιακών ρυθμιστών. Κυκλοφορούν στο αίμα, είναι εξαιρετικά σταθερά και η διαφοροποιημένη έκφρασή τους σε διάφορους τύπους καρκίνου τα καθιστά πολύτιμους διαγνωστικούς και προγνωστικούς δείκτες, καθώς και δείκτες ανταπόκρισης στη θεραπεία.

Τα **εξωσώματα** είναι μικρά κυστίδια (40-100 nm) που μπορούν να περιέχουν διάφορα μόρια, όπως πρωτεΐνες, miRNAs, DNA και mRNA. Μπορούν και αυτά να ανιχνευθούν στην κυκλοφορία του αίματος και έχουν πολλαπλές λειτουργίες.

4.3. Ελεύθερο κυκλοφορούν DNA (cfDNA)

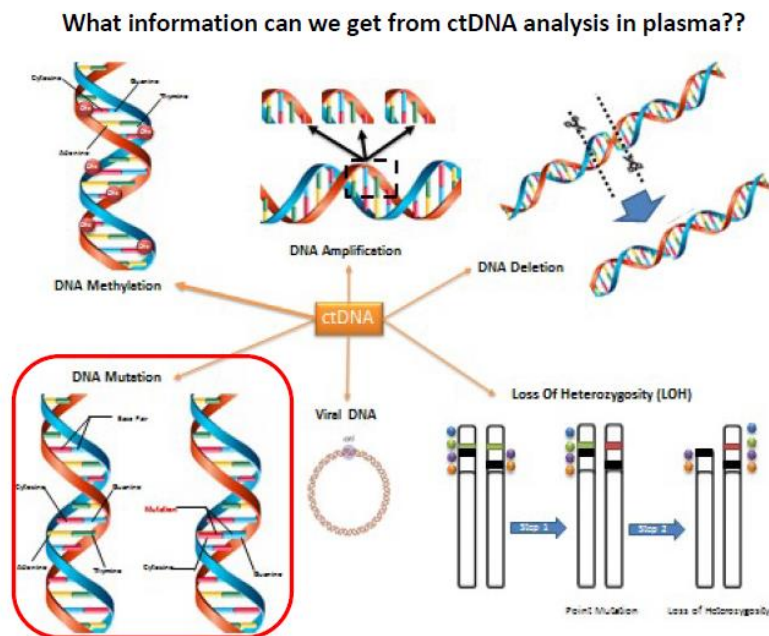
Ως ελεύθερο κυκλοφορούν DNA χαρακτηρίζονται θραύσματα DNA κυττάρων που κυκλοφορούν σε εξωκυττάρια βιολογικά δείγματα, όπως αίμα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, πτύελα, κόπρανα, ούρα, κυρίως με τη μορφή νουκλεοσωμάτων. Το μέγεθος του θραύσματος κυμαίνεται σε 170-200 ζεύγη βάσεων. Παρατηρείται σε φυσιολογικές καταστάσεις (εγκυμοσύνη, άσκηση, εγκεφαλικό, καρδιακή δυσλειτουργία, κάπνισμα) αλλά εμφανίζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε καρκινοπαθείς. Η προέλευση του cfDNA βασίζεται σε δύο θεωρίες. Η πρώτη αφορά ένα παθητικό μηχανισμό όπου προκύπτουν τμήματα DNA από την απόπτωση ή την νέκρωση των κυττάρων. Η δεύτερη αναφέρεται σε έναν ενεργητικό μηχανισμό, όπου τα κύτταρα πραγματοποιούν ενεργό αποβολή DNA, είτε μέσω του μηχανισμού ομοίωσης είτε για λόγους διακυτταρικής επικοινωνίας. Το ελεύθερο κυκλοφορούν DNA περιγράφηκε για πρώτη φορά πολλές δεκαετίες πριν, αλλά άρχισε να διερευνάται την τελευταία δεκαετία.¹⁰



Εικόνα 9: Προέλευση cfDNA¹¹

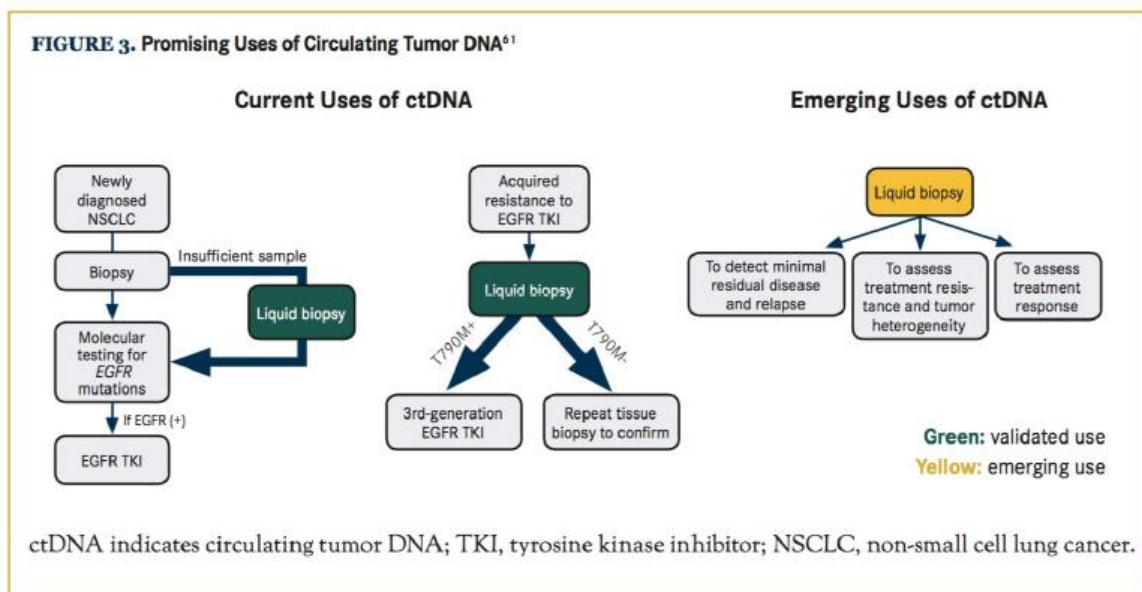
Ένα υποσύνολο του cfDNA (<1%) αποτελεί το ctDNA, το οποίο φέρει σωματικές μεταλλάξεις ενδεικτικές των καρκινικών κυττάρων. Η απελευθέρωσή του στην κυκλοφορία του αίματος επηρεάζεται από τον τύπο και το μέγεθος του όγκου, την τοποθεσία του καθώς και την αγγειοποίηση στην περιοχή αυτή.

Μελετώντας το ctDNA που ανιχνεύεται στο πλάσμα των ασθενών, με τη χρήση ευαίσθητων τεχνικών με όριο ανίχνευσης <0.01%, συλλέγονται πληροφορίες πολύτιμες για την έγκαιρη ανίχνευση και ταυτοποίηση των μοριακών αλλαγών που οδηγούν σε κλινική αντίσταση στη θεραπεία, επιτυγχάνοντας τη σύλληψη της μοριακής ετερογένειας του όγκου που σχετίζεται με τους μηχανισμούς αντίστασης.



Εικόνα 10: Πληροφορίες από ctDNA¹²

Επιπλέον, η ανίχνευση και ανάλυση του ctDNA χρησιμοποιείται για την έγκαιρη ανίχνευση της νόσου, την εκτίμηση του κινδύνου υποτροπής, την ταυτοποίηση θεραπευτικών στόχων και την παρακολούθηση της μοριακής ετερογένειας του όγκου σε πραγματικό χρόνο.



Εικόνα 11: Χρησιμότητα υγρής βιοψίας. Πηγή: Διάλεξη ΠΜΣ Ογκολογίας «Introduction to liquid biopsy»-Α. Μάρκου

4.4. Χρησιμότητα της υγρής βιοψίας στην κλινική πράξη

Η χρήση του ctDNA στην κλινική πράξη είναι πλέον εφικτή με τη χρήση ευαίσθητων μοριακών τεχνικών, όπως digital PCR, real-time PCR και Next Generation Sequencing.¹³ Ένα από τα βασικότερα γνωρίσματα των όγκων είναι η ετερογένειά τους, η οποία οδηγεί σε αυξημένη δυσκολία ανάλυσης του μοριακού τους προφίλ, καθώς παρατηρείται δυναμική εξέλιξη κατά την πρόοδο της νόσου. Υποκλώνιοι του όγκου αυξάνονται κατά την πρόοδο της νόσου μεταβάλλοντας την αναλογία των συγκεκριμένων παρεκκλίσεων μεταξύ του πρωτεύοντος όγκου και των μεταστάσεων. Η ετερογένεια του όγκου, λοιπόν, είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη αντίστασης στη θεραπεία, κυρίως αυτή που αφορά χορήγηση EGFR TKIs σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. Με τη χρήση, συνεπώς, της υγρής βιοψίας καθιστάται δυνατή η δημιουργία μιας πιο αντιπροσωπευτικής εικόνας του όγκου, καθώς ανιχνεύονται μεταλλάξεις που βρίσκονται σε οποιοδήποτε μέρος του. Καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει η ανίχνευση T790M μετάλλαξης αντίστασης του γονιδίου του EGFR που προσφέρει στοχευμένη θεραπεία σε ασθενείς που πάσχουν από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΜΚΠ), με ιδιαίτερα σημαντικό θεραπευτικό όφελος.

Ένας όγκος έχει την δυνατότητα να μεθίσταται και αυτό είναι δυνατό να συμβεί σε οποιοδήποτε στάδιο της εξέλιξής του. Τα επίπεδα του ctDNA φαίνεται να σχετίζονται άμεσα με το φορτίο της νόσου και επιτρέπουν την αξιολόγηση της εξέλιξης και της επιθετικότητας του όγκου, ακόμη και σε πρώιμο στάδιο, καθώς και τον έλεγχο κινδύνου υποτροπής μετά από το χειρουργείο. Η ανάλυση του ctDNA οδηγεί στον εντοπισμό οδηγών μεταλλάξεων που αποτελούν μεταστατικούς δείκτες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την έγκαιρη θεραπευτική παρέμβαση ώστε να προληφθεί η πρόοδος της μετάστασης, πριν ακόμη υπάρξουν εμφανείς κλινικές εκδηλώσεις.

Επιπρόσθετα, η ανίχνευση του ctDNA μπορεί να αποτελέσει ένα ακριβή προγνωστικό δείκτη για την έκβαση του ασθενούς, γεγονός που συμβάλει στη λήψη αποφάσεων για την οργάνωση των θεραπευτικών στρατηγικών.

Tumor heterogeneity and clonal evolution	Early detection of metastasis	Prognostic and predictive implications	Early detection for staging and diagnostic screening	Monitoring of treatment responses
<ul style="list-style-type: none"> Capacity for resistance due to anticancer agents Molecular properties differ within a tumor Primary tumor biopsy may not reflect current disease condition 	<ul style="list-style-type: none"> Correlation to disease burden, disease recurrence and decreased overall survival. Identified in blood in early stage disease Ct DNA detection after resection → high risk of recurrence 	<ul style="list-style-type: none"> High levels of KRAS mutated plasma → poor tumor response to EGFR TKIs → poor outcome in NSCLC patients Pretreatment levels of ctDNA → Shorter survival Invasive tumor biopsy avoidance Clinical decision making 	<ul style="list-style-type: none"> ct DNA detection shows variation among tumor types Independent biomarker of disease progression High detection in patients with pancreatic, ovarian, breast, bladder, melanoma and hepatocellular cancer Detection falls under 50% in patients with brain, renal, prostate, and thyroid cancer. Significant predictor of early relapse 	<ul style="list-style-type: none"> Emergence of secondary mutations associated with therapy resistance Detection of T790M at follow up → treatment with 3rd generation TKI (OSIMERTINIB) Valuable tool to assess tumor response in metastatic melanoma patients treated with PD1 inhibitors. Emergence of RAS mut.as a mechanism of resistance to EGFR TKIs. Abberations detection in AR → Prediction of response to androgen directed therapies

Εικόνα 12: Κλινική χρησιμότητα του ελεύθερου κυκλοφορούντος γενετικού υλικού¹⁴

4.5. Υγρή βιοψία ή βιοψία ιστού;

Για την ανίχνευση μεταλλάξεων και τον έλεγχο της εξέλιξης της νόσου απαιτείται βιοψία ή αρκετές βιοψίες. Οι επαναλαμβανόμενες βιοψίες ιστού αποτελούν μια επεμβατική και επώδυνη διαδικασία. Επιπλέον, υπάρχει ο κίνδυνος να χαθούν τμήματα του όγκου που αναπτύσσουν αντοχή στη θεραπεία ή έχουν αποκτήσει νέες μεταλλάξεις οδηγούς. Σε πολλές περιπτώσεις, όπου η νόσος είναι ήδη σε προχωρημένο στάδιο ή ο όγκος βρίσκεται σε δυσπρόσιτο σημείο, δεν είναι εφικτή η λήψη βιοψίας. Ακόμη, η ετερογένεια του όγκου συνεπάγεται τη ύπαρξη διαφορετικών μεταλλάξεων σε άλλες περιοχές του, με αποτέλεσμα να υπάρχει ο κίνδυνος να μην είναι αντιπροσωπευτική μια βιοψία ιστού. Αυτά τα δεδομένα γεννούν την ανάγκη για ανάπτυξη νέων τεχνικών που θα ξεπερνούν αυτά τα εμπόδια. Η υγρή βιοψία αποτελεί μια αρκετά ελπιδοφόρα πρόκληση στον τομέα της ογκολογίας. Πρόκειται για μια ελάχιστα επεμβατική, ανώδυνη μέθοδο, η οποία μειώνει το κόστος και το χρόνο διάγνωσης. Προσφέρει την δημιουργία ενός ολοκληρωμένου μοριακού χαρακτηρισμού του όγκου τυχόν και τον έλεγχο ελάχιστης υπολειμματικής νόσου. Οι πληροφορίες που συλλέγονται αφορούν την ανίχνευση μεταλλάξεων σχετικών με την ανθεκτικότητα σε μια θεραπεία, καθώς και την κατανόηση της μετάστασης και της ογκογένεσης. Συνεπώς, μπορούν να οδηγήσουν στην έγκαιρη διάγνωση και είναι χρήσιμες στη βελτιστοποίηση της θεραπείας του καρκίνου του πνεύμονα. Πλέον, πολλές μελέτες εξετάζουν την αποτελεσματικότητα της υγρής βιοψίας και ελέγχουν το ενδεχόμενο να υποκαταστήσει τη βιοψία ιστού, καθώς τα πλεονεκτήματά της, όπως η διάγνωση σε πρώιμα στάδια και η έγκαιρη ανίχνευση μικρομεταστατικής νόσου, επηρεάζουν σημαντικά την επιβίωση των ασθενών.

5. Αλληλούχιση νέας γενιάς και ιατρική ακριβείας

Την τελευταία δεκαετία, έχει παρατηρηθεί ραγδαία εξέλιξη στον τομέα της ογκολογίας, όσον αφορά το θεραπευτικό πλάνο. Καθοριστικό ρόλο έχει διαδραματίσει η εμφάνιση της ιατρικής ακριβείας. Πρόκειται για μια προσέγγιση, όπου χορηγείται συγκεκριμένη θεραπεία, η οποία αναμένεται να προσφέρει κλινικό όφελος σε ένα υποσύνολο ασθενών με κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά.¹⁵ Η ομαδοποίηση αυτή γίνεται σύμφωνα με το μοριακό προφίλ του όγκου, δηλαδή με βάση των σύνολο των ιδιαίτερων μοριακών χαρακτηριστικών του. Πρόκειται κυρίως για γενωμικές αλλαγές ή αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση. Επανάσταση σε αυτό τον τομέα έχει φέρει η ανάπτυξη νέων ευαίσθητων τεχνικών αλληλούχισης, καθώς και η εφαρμογή βιοπληροφορικών εργαλείων. Η αλληλούχιση νέας γενιάς (NGS) είναι μια μέθοδος υψηλής απόδοσης που επιτρέπει μαζική παράλληλη αλληλούχιση. Η προσέγγιση NGS χρησιμοποιείται για την αλληλούχιση του DNA και του RNA. Σε επίπεδο DNA είναι δυνατή η αλλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος, ολόκληρο του εξώματος ή και αλληλούχιση ενός πάνελ γονιδίων που θα επιλεγεί. Η αλληλούχιση σε επίπεδο RNA του τρανσκριπτώματος παρέχει πληροφορίες για τη γονιδιακή έκφραση.

Υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμες τουλάχιστον τέσσερις διαφορετικές πλατφόρμες αλληλούχισης νέας γενιάς. Καθεμιά από αυτές χρησιμοποιεί διαφορετική χημεία και διαφορετικό τρόπο ανίχνευσης της αλληλουχίας των βάσεων του DNA. Κοινό χαρακτηριστικό όλων είναι η μαζικά παράλληλη φύση της αλληλούχισης, δηλαδή η ταυτόχρονη αλληλούχιση πολλών μορίων DNA και η επεξεργασία τους με εξελιγμένους αλγόριθμους πληροφορικής.

Με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από αυτή την τεχνολογία, είναι δυνατή η εφαρμογή εξατομικευμένων θεραπειών. Σε αρκετές περιπτώσεις, συνεπώς, παρέχονται περισσότερες επιλογές στο σχεδιασμό του θεραπευτικού πλάνου, καθώς έχουν εγκριθεί πολλά στοχευμένα φάρμακα από τον FDA τα τελευταία χρόνια. Επίσης, τα αποτελέσματα του NGS μπορούν να έχουν προγνωστική αξία σε κάποιες περιπτώσεις ή να αξιολογούν την τοξικότητα σε μια θεραπεία.¹⁶ Το συμπέρασμα είναι πως η χρήση τέτοιων ευαίσθητων, γρήγορων και αξιόπιστων τεχνολογιών οδηγεί στο καλύτερο δυνατό κλινικό αποτέλεσμα για τον κάθε ασθενή.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Απομόνωση γενετικού υλικού

Η διαδικασία απομόνωσης γενετικού υλικού πραγματοποιήθηκε στο δωμάτιο απομόνωσης γενετικού υλικού, υπό ελεγχόμενη θερμοκρασία (μεταξύ 22-25 °C) σύμφωνα με τις απαιτήσεις φύλαξης των αντιδραστηρίων, τις απαιτήσεις λειτουργίας του εξοπλισμού και τις απαιτούμενες συνθήκες για άνετη εργασία των αναλυτών.

1.1. Απομόνωση DNA από ιστό

Αρχικά, αξιολογήθηκε μια τομή από κάθε βιοψία ιστού, η οποία βάφτηκε με αιματοξυλίνη και εωσίνη προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι υπάρχει >75% καρκινικών κυττάρων και να σημειωθεί η καρκινική περιοχή από τον παθολογοανατόμο.

Για την απομόνωση του DNA από κύβο παραφίνης χρησιμοποιήθηκε το κιτ της QIAGEN (Antwerp, Belgium), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

Πρωτόκολλο:

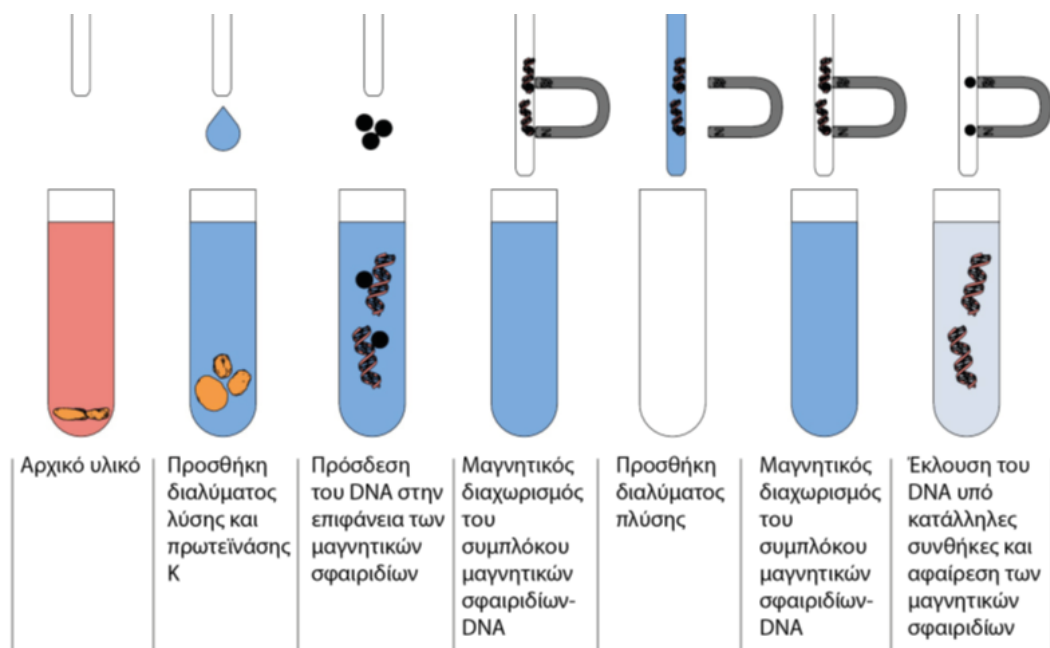
- i. Προσθήκη 160μl διαλύματος αποπαραφινποίησης (Deparaffinization solution) σε safe-lock tube 2ml
- ii. Απόξεση τμήματος του ιστού , με αποστειρωμένο νυστέρι από τη σημειωμένη καρκινική περιοχή
- iii. Vortex για 5-10sec
- iv. Σύντομο spin (στο max) στη φυγόκεντρο
- v. Προσθήκη 200μl ATL
- vi. Προσθήκη 20μl πρωτεΐνάση K
- vii. Επώαση για 1hour (ή overnight) σε υδατόλουτρο στους 56 °C ώστε να δράσει η πρωτεΐνάση K
- viii. Τοποθέτηση για 15min σε thermoblock στους 90 °C ώστε να σταματήσουμε τη δράση της πρωτεΐνάσης.

Αυτοματοποιημένη μέθοδος

Για την αυτοματοποιημένη απομόνωση του γενετικού υλικού ακολουθείται η χρήση του μηχανήματος QIA Symphony και του QIASYMPHONY DSP Mini Kit 192.



Εικόνα 13: QIA Symphony

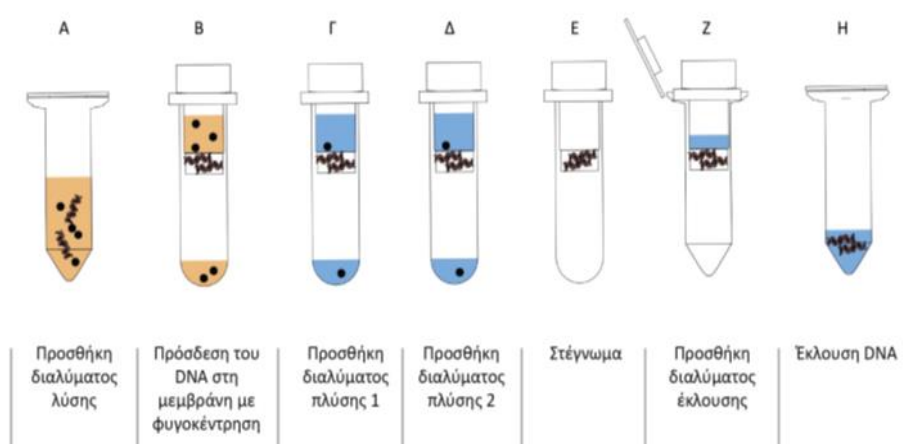


Εικόνα 14: Αρχή λειτουργίας του QIA Symphony . Πηγή: <http://hdl.handle.net/11419/645>

Manual απομόνωση DNA από ιστό

Στην περίπτωση της manual απομόνωσης, χρησιμοποιήθηκε το QIAmp FFPE tissue kit και σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή, η διαδικασία συνεχίστηκε ως εξής:

1. Προσθήκη 200μl AL buffer
2. Προσθήκη 200μl EtOH 100%
3. Vortex
4. Εισαγωγή του δείγματος σε κολώνα
5. Φυγοκέντρηση στις 13000G για 1min
6. Αλλαγή collection tube
7. Προσθήκη 500μl AW1 (wash buffer 1)
8. Φυγοκέντρηση σε 6000G για 1min
9. Αλλάγη collection tube
10. Προσθήκη 500μl AW2 (wash buffer 2)
11. Φυγοκέντρηση σε 6000G για 1min
12. Φυγοκέντρηση στο MAX (20000G) για 3min.
13. Προσθήκη 40μl ATE elution buffer και φυγοκέντρηση σε 14000G για 1min
14. Φωτομέτρηση του δείγματος με τη χρήση του Nano drop.



Εικόνα 15: Manual απομόνωση DNA. Πηγή: <http://hdl.handle.net/11419/645>

Η συγκέντρωση και η καθαρότητα κάθε δείγματος μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο (NanoDrop2000, Thermo Fisher Scientific). Αρχικά, έγινε μηδενισμός χρησιμοποιώντας 2 μl από το διάλυμα ATE στο οποίο έγινε η έκλυση του DNA και στη συνέχεια μετρήθηκε κάθε δείγμα DNA.

1.2. Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων από υγρές βιοψίες (πλάσμα)

Τα δείγματα των υγρών βιοψιών παραλήφθηκαν από το εργαστήριο σε ειδικά φιαλίδια (Cell-Free DNA BCT Tubes, Streck, La Vista, NE) που επιτρέπουν την σταθεροποίηση των κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων στο αίμα. Πραγματοποιήθηκαν δυο φυγοκεντρήσεις των 10' στα 2100RPM στους 4° C με σκοπό την απομόνωση του πλάσματος. Αυτό φυλάχθηκε στους -80°C μέχρι τη στιγμή της απομόνωσης του γενετικού υλικού με τη χρήση του QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Antwerp, Belgium), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

Πρωτόκολλο:

1. 200 μl Proteinase K
2. 1,6 ml ACL buffer
3. 3,6 ml ACB buffer-RNA carrier
4. 600 μl AW1
5. 750μl AW2
6. 750 μl Ethanol
7. 40 μl AVE Elution buffer

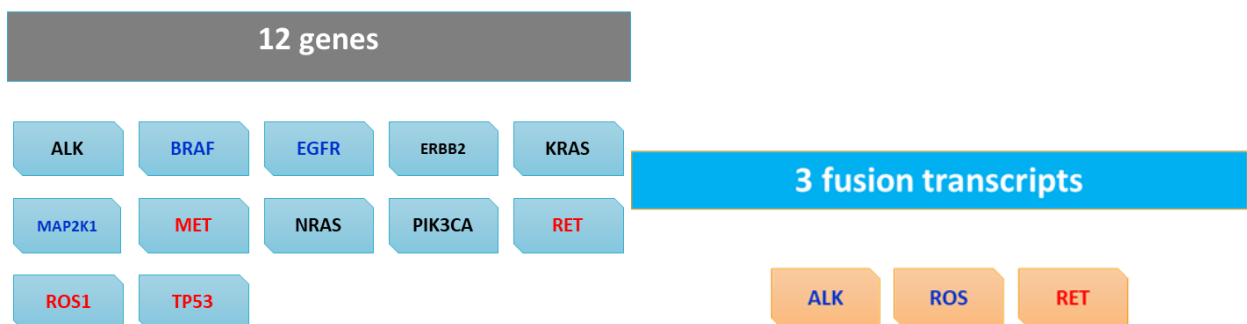


2. Ροή εργασίας για αλληλούχιση νέας γενιάς (NGS Workflow)

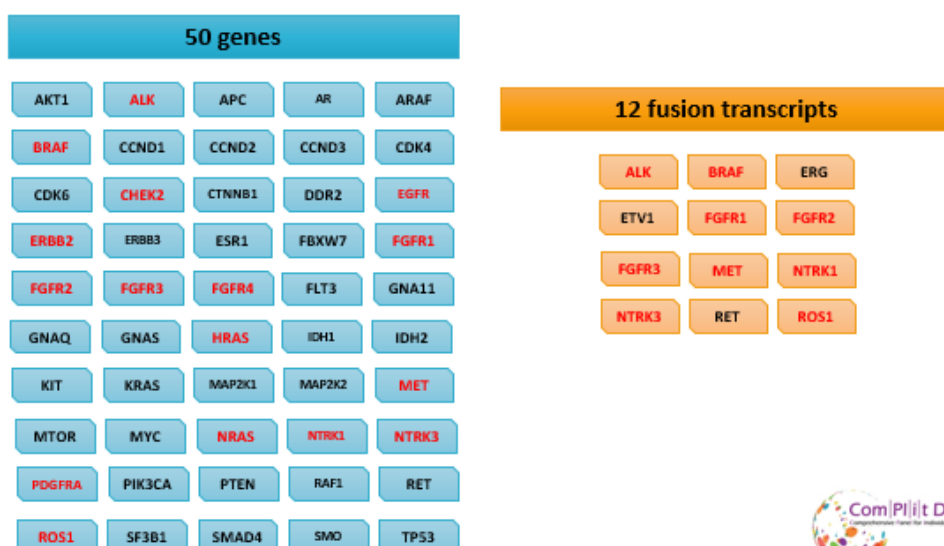
2.1. Ενίσχυση αλληλουχιών στόχων με πολλαπλή PCR

Στη συνέχεια, ακολούθησε ενίσχυση των περιοχών προς μελέτη με τη χρήση του κατάλληλου κιτ ανάλογα με τα γονίδια που επρόκειτο να αναλυθούν. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η ανίχνευση μεταλλαγμένων αλληλόμορφων σε πολύ μικρή συχνότητα (όριο ανίχνευσης 0,1%).

A) Με τη χρήση του Oncomine Lung Cell Free Total Nucleic Acid Research Assay (Thermofisher Scientific) εξετάσαμε ένα πάνελ 12 γονιδίων και 3 αναδιατάξεων σε δείγματα από υγρές βιοψίες, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.



B) Με τη χρήση Oncomine Pan Cancer Cell Free Total Nucleic Acid Research Assay (Thermo Fisher Scientific) εξετάσαμε ένα πάνελ 50 γονιδίων και 12 αναδιατάξεων σε δείγματα από υγρές βιοψίες, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

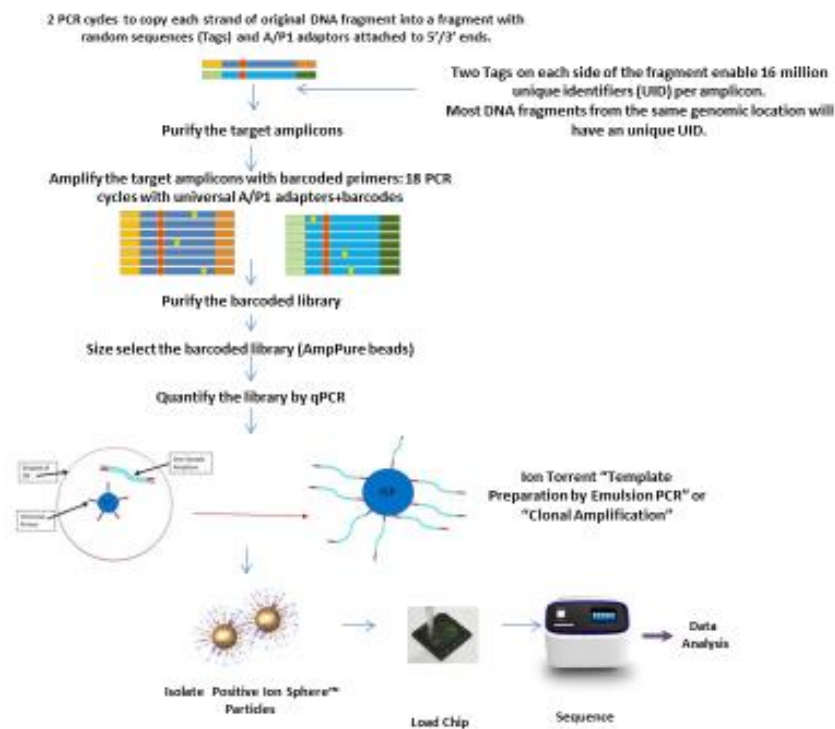


Γ) Με τη χρήση του Ion Ampliseq Colon and Lung Cancer Research Panel v2 και του Ion AmpliSeq™ RNA Fusion Lung Cancer Research Panel (Thermo Fisher Scientific) εξετάστηκε η ύπαρξη μεταλλαγών και αναδιατάξεων στα γονίδια *AKT1, ALK, BRAF, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB4, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, KRAS, MAP2K1, MET, NOTCH, NRAS, PIK3CA, PTEN, SMAD4, STK11, TP53, HRAS* σε δείγματα ιστού, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

2.2. Ροή εργασίας για αλληλούχιση νέας γενιάς για ελεύθερα κυκλοφορούντα νουκλεϊκά οξέα

Η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής:

- Αντίστροφη μεταγραφή του γενετικού υλικού που απομονώθηκε με τη χρήση του SuperScript™ VILO™ Master Mix
- Ενίσχυση των γονιδίων στόχων με τη χρήση ειδικών παρεχόμενων από το χρησιμοποιούμενο κιτ και ανάμιξη των αντίστοιχων εκκινητών (Lung/Pan Cancer cfTNA Panel) εφαρμόζοντας το κατάλληλο θερμικό πρωτόκολλο
- Καθαρισμός με χρήση αιθανόλης 80% των ενισχυμένων προϊόντων και πρόσδεση των barcodes με τη βοήθεια ειδικού θερμικού πρωτοκόλλου
- Καθαρισμός της βιβλιοθήκης και ποσοτικοποίηση με τη χρήση του Ion Library TaqMan® Quantitation Kit
- Χρησιμοποιήθηκε το Ion Chef™ System και πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση με τη βοήθεια του Ion S5™ Sequencing Kit

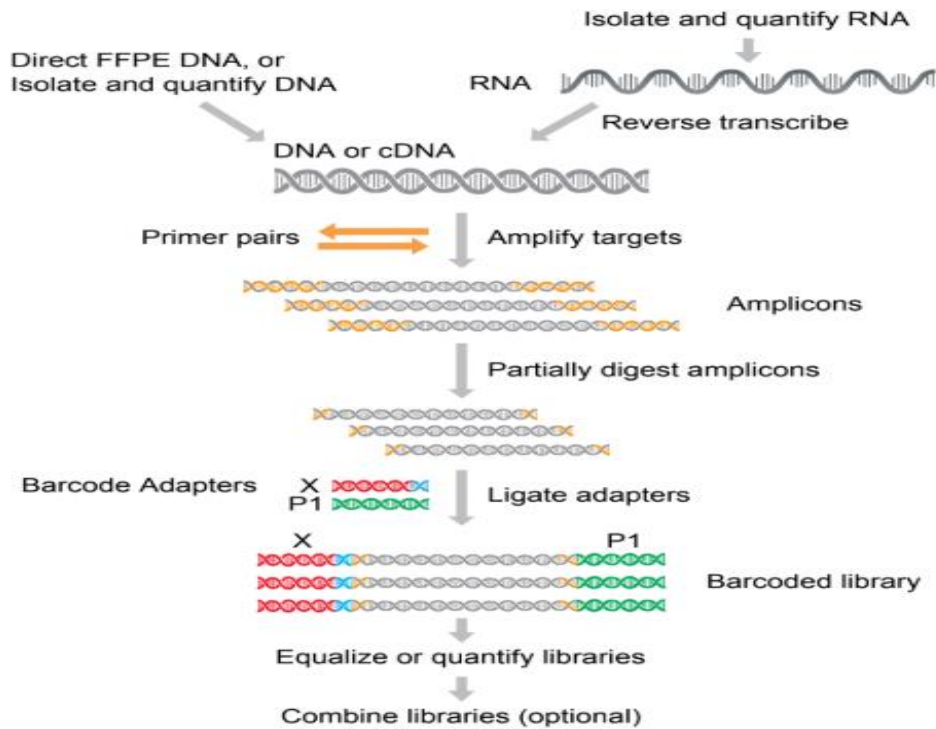


Εικόνα 16: OncoPrint Cell-Free Total Nucleic workflow

2.3. Ροή εργασίας για αλληλούχιση νέας γενιάς για γενετικό υλικό από βιοψίες ιστού

Όσον αφορά τα δείγματα ιστού ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

- Ενίσχυση των περιοχών στόχων με τη χρήση του κιτ βιβλιοθήκης Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) και το ανάλογο θερμικό πρωτόκολλο
- Απομάκρυνση των μη συνδεδεμένων εκκινητών με τη χρήση του ενζύμου FUPA (χρησιμοποιείται το ανάλογο θερμικό πρωτόκολλο)
- Προσθήκη των ειδικών αντάπτορων με τη χρήση Switch και της DNA λιγάσης χρησιμοποιώντας ειδικού θερμικού πρωτοκόλλου
- Καθαρισμός της βιβλιοθήκης
- Ποσοτικοποίηση της βιβλιοθήκης
- Χρησιμοποιήθηκε το Ion Chef™ System και πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση με τη βοήθεια του Ion S5™ Sequencing Kit



Εικόνα 17: Ion Ampliseq NGS workflow

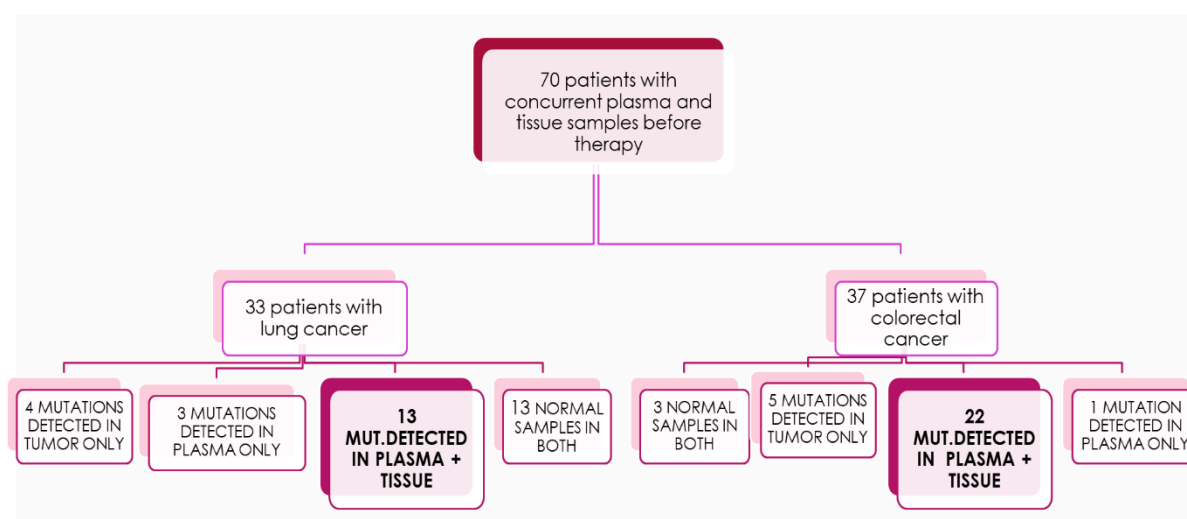
2.4. Ανάλυση αποτελεσμάτων (NGS data analysis)

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Ion Reporter™ 5.10.1.0 απευθείας από το λογισμικό Torrent Suite™ 5.10.1 (Thermo Fisher Scientific), με παράλληλο χειροκίνητο έλεγχο, μαζί με το εμπορικό λογισμικό ανάλυσης Sequence Pilot version 4.3.0 (JSI medical systems, Ettenheim, Germany). Η ανάλυση κάλυψης (coverage analysis) έγινε με τη χρήση του πρόσθετου «coverage analysis plug-in v5.0.4.0». Τα στατιστικά που προέκυψαν από αυτό, χρησιμοποιήθηκαν για να αξιολογηθεί η ποιότητα της κάθε βιβλιοθήκης κατά τη διαδικασία αλληλούχισης. Για τις βιβλιοθήκες DNA από δείγματα ιστού, η ανάλυση αλλαγής αριθμού αντιγράφων (copy number variation - CNV) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Ion Reporter™. Τα CNVs προέκυψαν βάσει του αριθμού των αντιγράφων σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Το λογισμικό αναφέρει όλα τα πιθανά CNVs, θεωρώντας υψηλής εμπιστοσύνης αυτά που εμφανίζουν σκορ >10. Αυτή η τιμή χρησιμοποιήθηκε σαν κατώφλι για τον προσδιορισμό ανίχνευσης αριθμού αντιγράφων. Η ανίχνευση των μεταλλάξεων στα ελεύθερα κυκλοφορούντα καρκινικά νουκλειικά οξέα, οι συντήξεις RNA και η ανάλυση αλλαγής αριθμού αντιγράφων (copy number variation - CNV) έγινε με το λογισμικό Ion Reporter, σύμφωνα με τις παρεχόμενες οδηγίες του κατασκευαστή (OncoPrint TagSeq Lung Liquid Biopsy w2.1—Single Sample, Thermo Fisher Scientific).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σύγκριση μεταλλάξεων βιοψίας ιστού και κυκλοφορούντων νουκλειικών οξέων (CNA) υγρής βιοψίας (πλάσματος)

Αρχικά, για να είναι εφικτή η σύγκριση και αξιολόγηση κάθε μεθόδου (βιοψία ιστού και υγρή βιοψία), πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε δείγματα ιστού και πλάσματος από 70 ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και παχέος εντέρου. Η συμφωνία των αποτελεσμάτων φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα.



Εικόνα 18: Διάγραμμα αποτελεσμάτων πειράματος

Από την μελέτη αυτή προκύπτει ότι από τα 33 δείγματα ιστού και πλάσματος ασθενών καρκίνου του πνεύμονα που εξετάσαμε, 13 μεταλλαγές ανιχνεύθηκαν και με τις 2 μεθόδους, 4 μεταλλαγές ανιχνεύθηκαν μόνο στον ιστό και 3 μόνο στο πλάσμα. Αντίστοιχα, όσον αφορά τους 37 ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου, 22 μεταλλαγές ανιχνεύθηκαν και με τις 2 μεθόδους, 5 μεταλλαγές ανιχνεύθηκαν μόνο στον ιστό και 1 μόνο στο πλάσμα

Επικεντρωθήκαμε στα στοιχεία που αφορούν τους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, καθώς αυτό είναι και το αντικείμενο της εργασίας. Τα αποτελέσματα των δυο μεθόδων βασίζονται μόνο στις θεραπευτικώς στοχεύσιμες μεταλλαγές. Θεραπευτικώς στοχεύσιμες θεωρούνται οι μεταλλαγές των BRAF, RAS, PIK3CA, EGFR και ERBB2 γονιδίων. Παρακάτω, απεικονίζονται με πράσινο χρώμα οι μεταλλαγές που ανιχνεύθηκαν και με τις δυο μεθόδους, με κόκκινο χρώμα οι μεταλλαγές που ανιχνεύθηκαν μόνο στον ιστό ενώ με κίτρινο οι μεταλλαγές που εντοπίστηκαν μόνο στο πλάσμα.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33				
AKT1																																					
APC																																					
BRAF				■															■	■																	
FBWX7																																					
KRAS		■					■			■	■	■	■		■								■			■								■			
NRAS						■																															
PIK3CA																																					
PTEN																																					
SMAD4																																					
TP53		■					■	■	■	■	■						■					■				■							■	■	■		
EGFR	■																							■												■	■
ERBB2																																					■

- Μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν και σε ιστό και σε πλάσμα
- Μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν μόνο σε ιστό
- Μεταλλάξεις που ανιχνεύθηκαν μόνο σε πλάσμα

Εικόνα 19: Σύγκριση αποτελεσμάτων των δύο μεθοδολογιών σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα

Η ευαισθησία και η ειδικότητα μιας μεθόδου είναι τα εργαλεία που βοηθούν να εκτιμηθεί η δυναμική της. Περιγράφουν την ακρίβεια μιας έρευνας και βοηθάνε στη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ των διαγνωστικών τεστ και την παρουσία ή απουσία μιας ασθένειας.

Η ευαισθησία της μεθόδου εκφράζει την ικανότητα του τεστ να ανιχνεύει τους αληθώς θετικούς σε μια ασθένεια και είναι ο λόγος των αληθώς θετικών προς το σύνολο εκείνων που φαίνεται να πάσχουν από την ασθένεια. Είναι ένας χρήσιμος ορισμός όταν απαιτείται λεπτομέρεια.

Η ειδικότητα της μεθόδου εκφράζει την ικανότητα του τεστ να ανιχνεύει τους αληθώς αρνητικούς (υγιείς) σε μια ασθένεια και είναι ο λόγος των αληθώς αρνητικών (υγιών) προς το σύνολο εκείνων που δεν φαίνεται να πάσχουν (και δεν πάσχουν) από την ασθένεια. Είναι χρήσιμος ορισμός για να διαχωριστούν με σιγουριά οι υγιείς.

Στα εν λόγω πειράματα, θεωρήθηκαν ως gold standard τα αποτελέσματα της αλληλούχησης επόμενης γενιάς (NGS) από δείγματα ιστού των ασθενών με σκοπό να υπολογιστεί η ευαισθησία και η ειδικότητα της από υγρές βιοψίες. Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής σχέσεις:

Ευαισθησία = Αληθώς θετικά/αληθώς θετικά + Ψευδώς αρνητικά

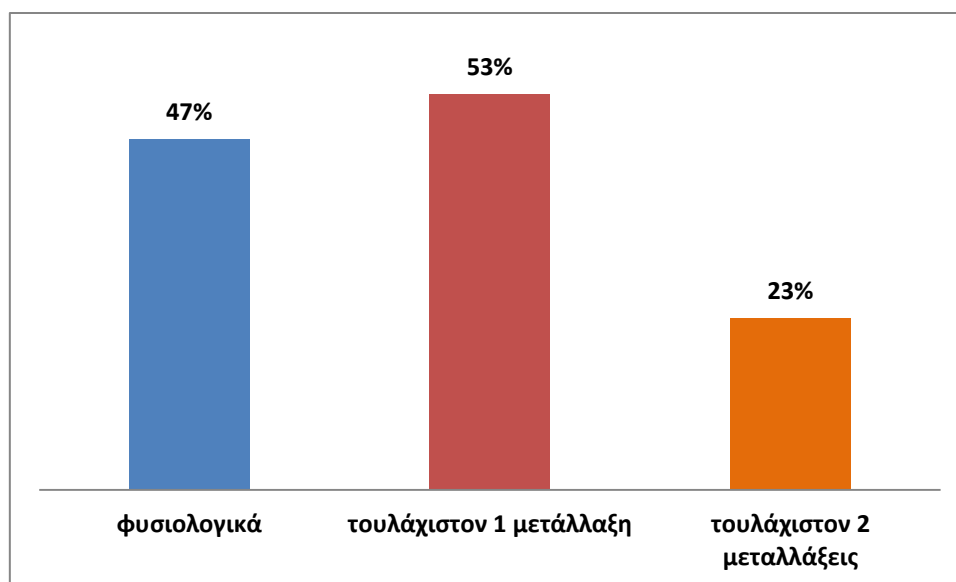
Ειδικότητα = Αληθώς αρνητικά / αληθώς αρνητικά + ψευδώς θετικά

Συνεπώς, αποδείχθηκε πως η ευαισθησία της μεθόδου υπολογίζεται στο 81,82% και η ειδικότητα στο 94,44%. Επίσης, προκύπτει συμφωνία των δύο μεθόδων κατά 85,92%. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα ποσοστά αυτά αναφέρονται στις θεραπευτικώς στοχεύσιμες μεταλλάξεις και όχι στον συνολικό αριθμό ανιχνεύσιμων μεταλλαγών.

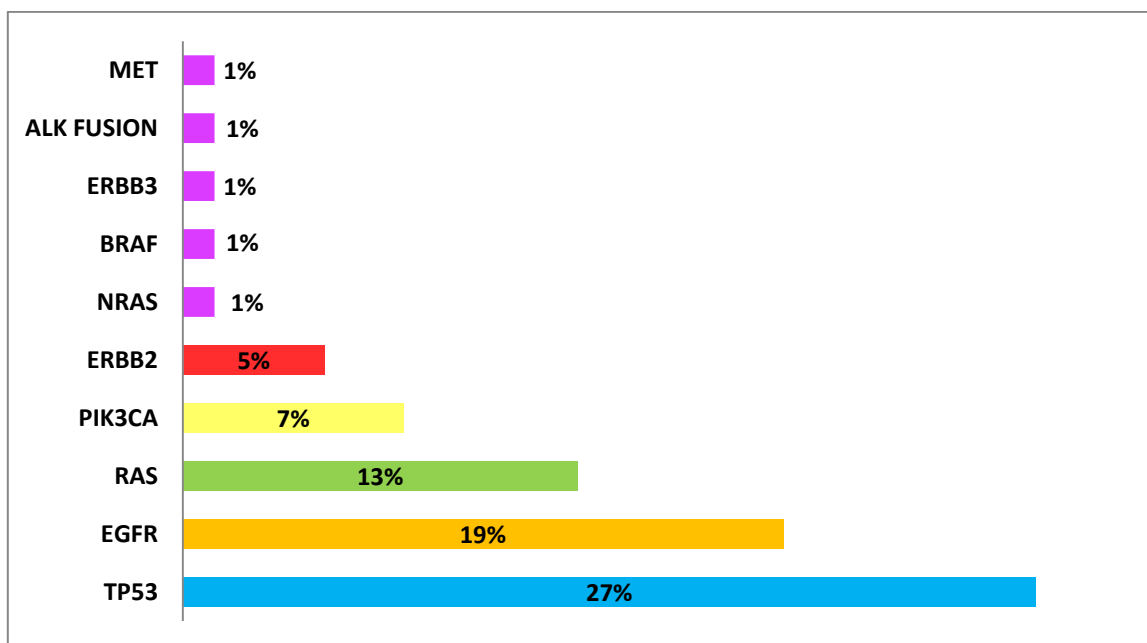
Εφαρμογή της υγρής βιοψίας και του NGS στην εύρεση του μοριακού προφίλ του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα

Έπειτα από την σύγκριση των δύο μεθοδολογιών και την αξιολόγηση της αλληλούχισης νέας γενιάς σε CNA, αποδείχθηκε ότι αυτή αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδο για τον εντοπισμό κλινικά σημαντικών μεταλλαγών για τον καρκίνο του πνεύμονα.

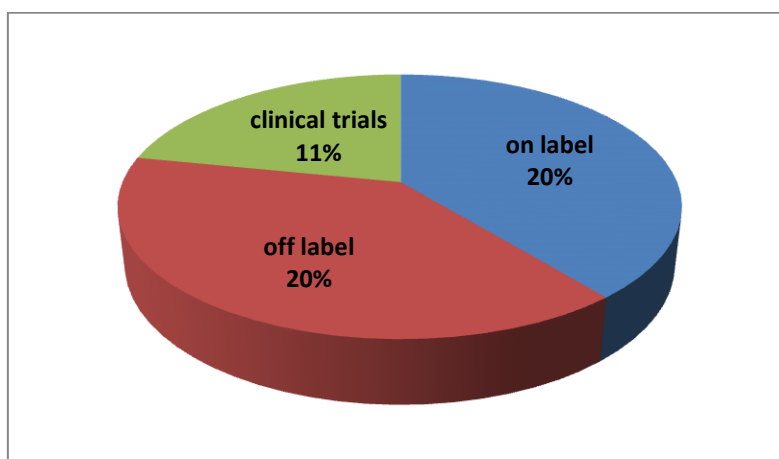
Ακολούθως, στο εργαστήριο της Genekor I.A.E. εξετάστηκαν δείγματα πλάσματος από 88 ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Πρέπει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχουν στοιχεία για το αν η δειγματοληψία έγινε πριν ή μετά την εφαρμογή κάποιας θεραπείας. Η ανάλυση έδειξε ότι δεν ανιχνεύθηκε καμία μεταλλαγή στο 47% των ασθενών, ενώ βρέθηκε τουλάχιστον μία μεταλλαγή στο 53% και τουλάχιστον δύο στο 23%.



Ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις στα γονίδια BRAF, RAS, PIK3CA, EGFR, ALK, ROS1 και ERBB2, που είναι θεραπευτικώς στοχεύσιμα, αλλά και σε άλλα γονίδια. Πιο συγκεκριμένα, το 27% των ασθενών βρέθηκε με μεταλλάξεις στο TP53, το 19% στο EGFR, το 12,5% στο RAS, το 7% στο PIK3CA και το 4,5% στο ERBB2. Σε χαμηλότερα ποσοστά ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις στα MET, NRAS, BRAF, ERBB3 καθώς και αναδιατάξεις στο γονίδιο ALK.



Σύμφωνα με τις γενετικές αλλαγές που βρέθηκαν, οι ασθενείς είχαν τη δυνατότητα να επωφεληθούν από εγκεκριμένες θεραπείες ή πρωτόκολλα κλινικών δοκιμών. Πιο συγκεκριμένα, το 20% των ασθενών είχε πρόσβαση σε θεραπείες με ένδειξη για τη συγκεκριμένη μετάλλαξη(οn label), ενώ το υπόλοιπο 20% των ασθενών μπορούσε να πάρει off label θεραπεία, δηλαδή να έχει πρόσβαση σε φάρμακα τα οποία έχουν μεν εγκριθεί για άλλες παθήσεις, αλλά όχι για την συγκεκριμένη περίπτωση αν και είναι δυνατόν να έχουν θεραπευτικό όφελος. Περίπου 11% των ασθενών παρουσίασαν μεταλλάξεις οι οποίες τους επιτρέπουν να ενταχθούν σε κλινικές μελέτες.



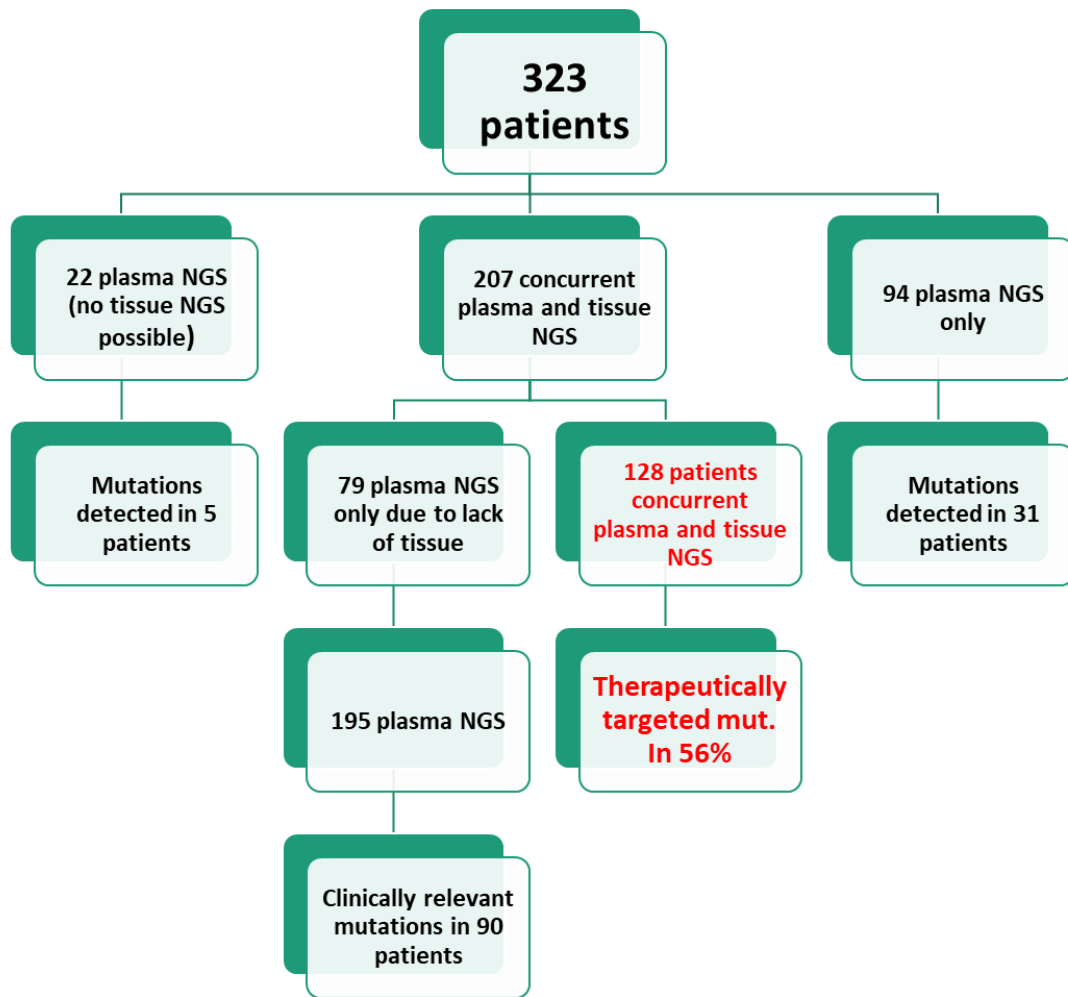
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αλληλούχιση νέας γενιάς (NGS) είναι ένα πολύτιμο εργαλείο στον τομέα της κλινικής ογκολογίας και διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στη διάγνωση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, όπου είναι διαθέσιμες πολλές θεραπευτικές επιλογές σύμφωνα με την ανάλυση του μοριακού προφίλ του ασθενούς. Η ταυτόχρονη ανάλυση πολλών θεραπευτικών στόχων με NGS είναι ιδανική σε αυτές τις περιπτώσεις.¹⁷

Σε πολλές περιπτώσεις ασθενών είναι εξαιρετικά δύσκολο ή και αδύνατο να υποβληθούν σε διαδικασία λήψης βιοψίας ιστού. Προκύπτει λοιπόν η ανάγκη για μια μη επεμβατική μέθοδο. Έτσι, σε κάποια περιστατικά πραγματοποιείται υγρή βιοψία και έπειτα γίνεται αλληλούχιση νέας γενιάς (NGS) στα κυκλοφορούντα νουκλεϊκά οξέα. Πρόκειται για μια εύκολη τεχνική, που ήδη χρησιμοποιείται ευρέως, ειδικά όταν δεν υπάρχει η εναλλακτική των δειγμάτων ιστού. Ωστόσο είναι γεγονός ότι, όπως πολλές άλλες καινοτόμες τεχνολογίες στην ιατρική, έτσι και η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS) πλάσματος ενσωματώθηκε στην κλινική πράξη χωρίς να αξιολογηθεί επαρκώς.

Η συμφωνία των αποτελεσμάτων αυτών των δύο μεθοδολογιών (αλληλούχιση επόμενης γενιάς σε ιστό και σε πλάσμα) αποτελεί ένα μεγάλο ερώτημα που απασχολεί τους ογκολόγους. Έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μελέτες προκειμένου να αξιολογηθεί η συμφωνία των δύο μεθοδολογιών, καθώς και η δυναμική της υγρής βιοψίας γενικότερα.

Για παράδειγμα, σε μια μελέτη των Aggarwal et al. του πραγματοποιήθηκε η ανάλυση 70 γονιδίων σε δείγματα από 323 ασθενείς. Οι 94 από αυτούς υποβλήθηκαν μόνο σε πλάσμα NGS, οι 207 σε NGS και στους δυο τύπους δειγμάτων και οι 24 μόνο σε πλάσμα NGS εξαιτίας ανεπαρκούς ποσότητας ιστού. Τα αποτελέσματα που πήραν απεικονίζονται αναλυτικά στο παρακάτω διάγραμμα.¹⁸



Εικόνα 20: Διάγραμμα αποτελεσμάτων της μελέτης των Aggarwal et al. ¹⁸

Συνολικά, από τους 116 ασθενείς για τους οποίους δεν πραγματοποιήθηκε βιοψία ιστού, το NGS στο πλάσμα τους συνέβαλε στην ανίχνευση μεταλλαγών στο 31% των ασθενών. Όσον αφορά τους υπόλοιπους 207 ασθενείς, για τους 79 η ποιότητα του γενωμικού υλικού που απομονώθηκε από τον ιστό τους ήταν αρκετά χαμηλή με αποτέλεσμα να υποβληθούν μόνο σε πλάσμα NGS. Έτσι ο συνολικός αριθμός των ασθενών που υποβλήθηκαν σε πλάσμα NGS έφτασε τους 195 εκ των οποίων οι 90 (46%) έφεραν κάποια παθογόνο μεταλλαγή. Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι μόνο οι 58 (30%) έφεραν θεραπευτικώς στοχεύσιμες μεταλλαγές στις οποίες, όπως προαναφέρθηκε, συγκαταλέγονται οι: BRAF, RAS, PIK3CA, EGFR, ALK, ROS1 και ERBB2, μεταλλαγές.

Συνεπώς μόνο το 1/3 των συνολικών ανιχνεύσιμων μεταλλαγών ήταν θεραπευτικώς στοχεύσιμες. Ωστόσο είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών (20%) που υποβλήθηκαν μόνο σε NGS πλάσματος έχοντας ήδη αναπτύξει αντίσταση σε θεραπεία με TKIs, είχαν 50-60% μεγαλύτερη πιθανότητα να φέρουν και κάποια από τις παθογόνες μεταλλαγές που αναφέρθηκαν και πιο συγκεκριμένα την T790M. Όσον αφορά το ποσοστό των ασθενών που υποβλήθηκαν σε NGS τόσο σε ιστό όσο και στο πλάσμα, η συμφωνία των αποτελεσμάτων και με τις δυο μεθόδους έφτασε το 81%.

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε δείγματα ιστού και πλάσματος από 70 ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και παχέος εντέρου, προκειμένου να αξιολογηθεί η συμφωνία των δύο μεθόδων. Τα αποτελέσματα έδειξαν συμφωνία στο 85,92%. Επίσης, καταλήγουμε στο γεγονός ότι η ευαισθησία της μεθόδου που χρησιμοποιεί δείγματα πλάσματος υπολογίζεται στο 81,82% και η ειδικότητα στο 94,44%.

Προκύπτει, λοιπόν, το ερώτημα “που οφείλεται η ασυμφωνία των αποτελεσμάτων των δυο αυτών μεθόδων;”

Με βάση τις κλινικές μελέτες που αφορούν τη συμφωνία των αποτελεσμάτων της ανάλυσης των θεραπευτικώς στοχεύσιμων μεταλλαγών στο πλάσμα και στον ιστό, καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα:

1) Η επίδραση της χημειοθεραπείας ή στοχευμένης θεραπείας μπορεί να επηρεάσει σε σημαντικό βαθμό τη συμφωνία των δυο μεθόδων. Πιο συγκεκριμένα, αποδείχθηκε ότι σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε αναποτελεσματική χημειοθεραπεία ή σε στοχευμένη θεραπεία χωρίς κάποια ανταπόκριση, η ανάλυση του ctDNA συμφωνούσε σε ποσοστό 91,3% με την ανάλυση της βιοψίας ιστού.¹⁹

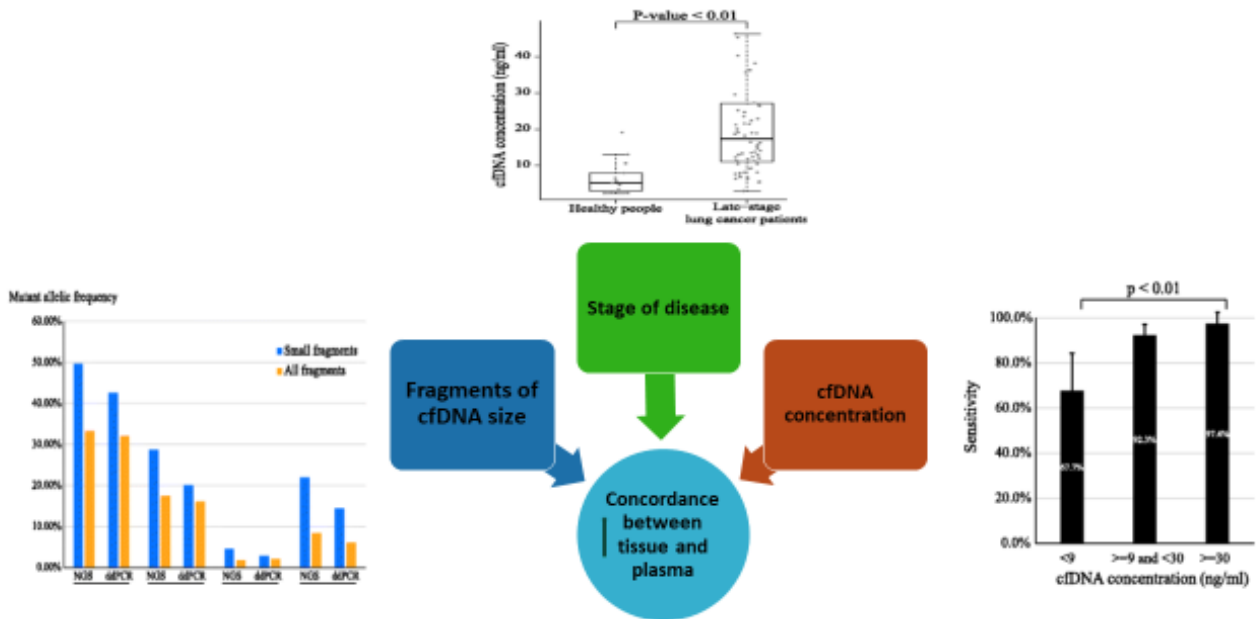
2) Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ της λήψης των δυο τύπων δειγμάτων μπορεί επίσης να επηρεάσει τη συμφωνία των αποτελεσμάτων.

3) Η συγκέντρωση του ελεύθερου κυκλοφορούντος DNA (cf DNA) σχετίζεται άμεσα με τη συμφωνία των δυο μεθόδων. Ειδικότερα, έχει αποδειχθεί ότι για τα δείγματα των οποίων η συγκέντρωση του cf DNA ήταν υψηλή, η ευαισθησία της ανάλυσής του ελεύθερου καρκινικού (ct DNA) ήταν αρκετά μεγαλύτερη καθώς και ότι η συχνότητα των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων. Αυτό το εξηγεί το γεγονός του ότι μικρή συγκέντρωση ελεύθερου κυκλοφορούντος DNA (cfDNA) συνεπάγεται και μικρή συγκέντρωση του ελεύθερου καρκινικού κυκλοφορούντος DNA (ct DNA). Επομένως, είναι φανερή η ανάγκη για όλο και πιο ευαίσθητες τεχνικές ανίχνευσης μεταλλαγών.¹⁹

4) Το μέγεθος των θραυσμάτων του cf DNA σχετίζεται με την ευαισθησία της ανίχνευσης των μεταλλαγών.

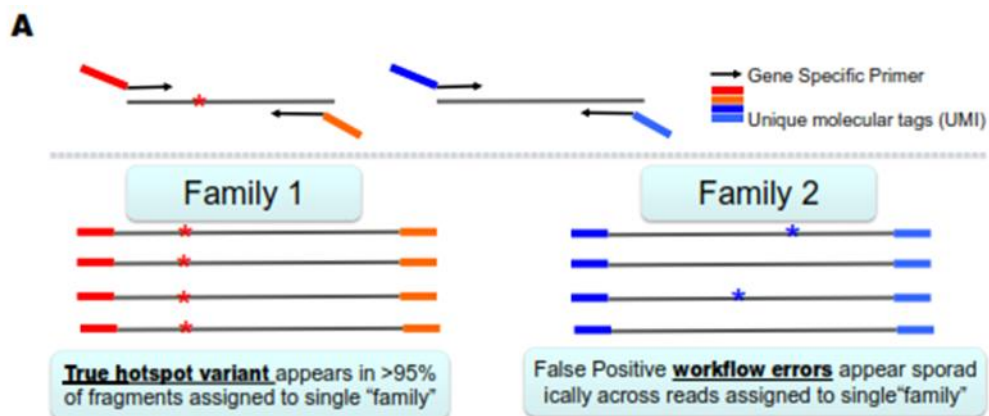
5) Διάφορα κλινικά χαρακτηριστικά του ασθενούς είναι ικανά να επηρεάσουν τη συμφωνία των αποτελεσμάτων της ανάλυσης του cf DNA και της βιοψίας ιστού. Αρχικά, ο μέσος όρος ζωής του cfDNA μετά το χειρουργείο είναι 114 λεπτά. Στην περίπτωση ασθενών που υποβλήθηκαν σε χειρουργείο του πρωτοπαθούς όγκου, η συμφωνία των δυο μεθόδων υπολογίστηκε 41%, ενώ στην περίπτωση ασθενών που υποβλήθηκαν σε χειρουργείο μεταστατικών εστιών η συμφωνία των δυο μεθόδων έφτασε το 87%.¹⁹

6) Το στάδιο της νόσου διαδραματίζει πολύ σπουδαίο ρόλο. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση ύπαρξης μεταστατικής εξωθωρακικής εστίας αυξάνεται το ποσοστό ανίχνευσης μεταλλαγών στον ιστό και στο πλάσμα ταυτόχρονα από ότι στην περίπτωση εντοπισμένων νόσων. Στην πρώτη περίπτωση, επίσης, αυξάνεται και το ποσοστό των μεταλλαγών που ανιχνεύονται μόνο στο πλάσμα.



Εικόνα 21: Οι κυριότεροι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η συμφωνία των δυο μεθόδων.

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για την παρούσα εργασία, εφαρμόστηκε η ευαίσθητη τεχνική της αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) σε πλάσμα, η οποία έχει υιοθετήσει την τεχνολογία UMI. Πρόκειται για μία τεχνολογία η οποία χρησιμοποιεί μοναδικούς μοριακούς αναγνωριστές, που σημαίνουν κάθε μόριο της βιβλιοθήκης, με τελικό αποτέλεσμα να ανιχνεύονται μόνο τα γονίδια στόχοι. Έτσι, αυξάνεται η ειδικότητα της μεθόδου, καθώς μειώνονται τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα.



Εικόνα 22: Επιδιόρθωση λαθών με τη χρήση της UMI τεχνολογίας

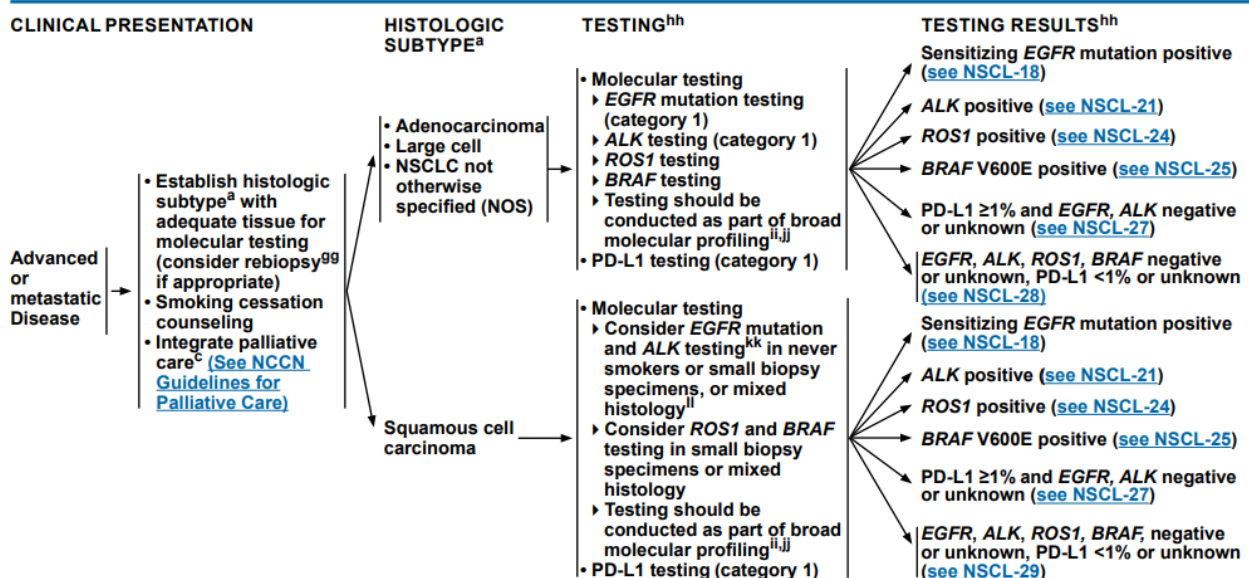
Η ανάλυση, λοιπόν, των δειγμάτων από πλάσμα ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα έδειξε ότι μεγάλο ποσοστό αυτών βρέθηκε με μεταλλάξεις στο EGFR, για το οποίο υπάρχουν ήδη εγκεκριμένες θεραπείες. Αυτές, όπως προαναφέρθηκε, σχετίζονται κυρίως με αναστολείς κινασών τυροσίνης, και οι ασθενείς που λαμβάνουν τέτοια θεραπεία φαίνεται να έχουν σημαντικό κλινικό όφελος. Ανιχνεύθηκαν, επίσης, όπως ήταν αναμενόμενο, σε χαμηλότερο ποσοστό και αναδιατάξεις στο ALK, για τις οποίες υπάρχει επίσης εγκεκριμένη θεραπεία με ικανοποιητικά θεραπευτικά αποτελέσματα. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο RAS, βρέθηκαν στο 23% των ασθενών, μπορεί να μην έχουν εγκεκριμένη θεραπεία, αλλά φαίνεται να σχετίζονται σημαντικά με την ανθεκτικότητα στη θεραπεία με αναστολείς κινασών τυροσίνης. Επίσης, το γονίδιο RAS αποτελεί σημαντικό προγνωστικό βιοδείκτη στην περίπτωση αδενοκαρκινώματος. Τέλος, οι γενετικές αλλαγές στα γονίδια ERBB2 και MET θεωρούνται αναδυόμενοι βιοδείκτες και περιλαμβάνονται στις κατευθυντήριες οδηγίες.

NCCN Guidelines Version 4.2019

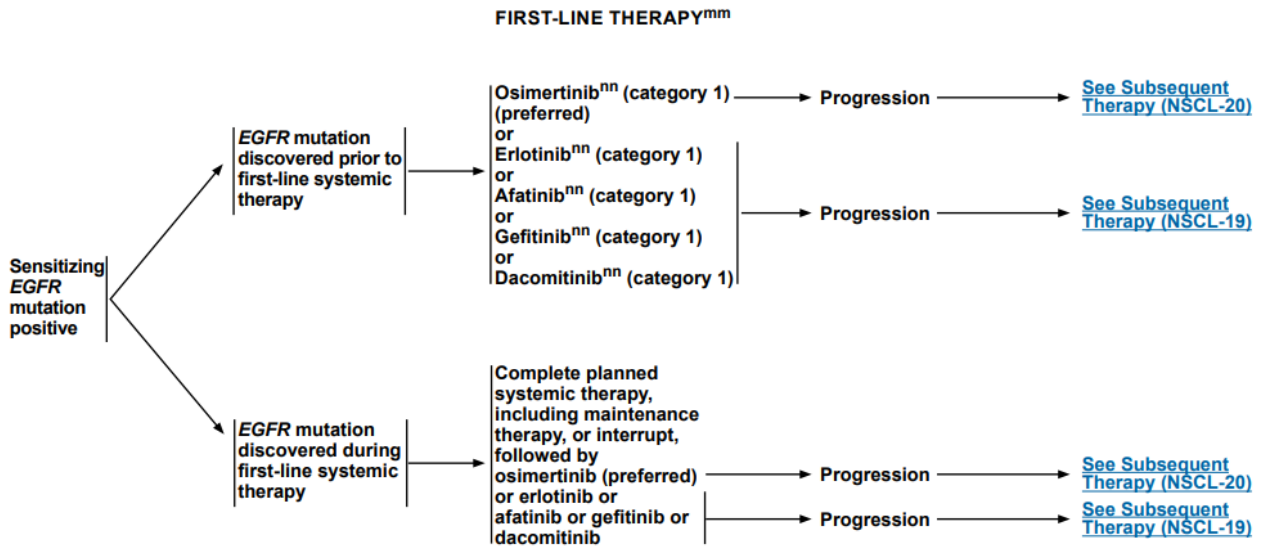


NCCN Guidelines Version 4.2019 Non-Small Cell Lung Cancer

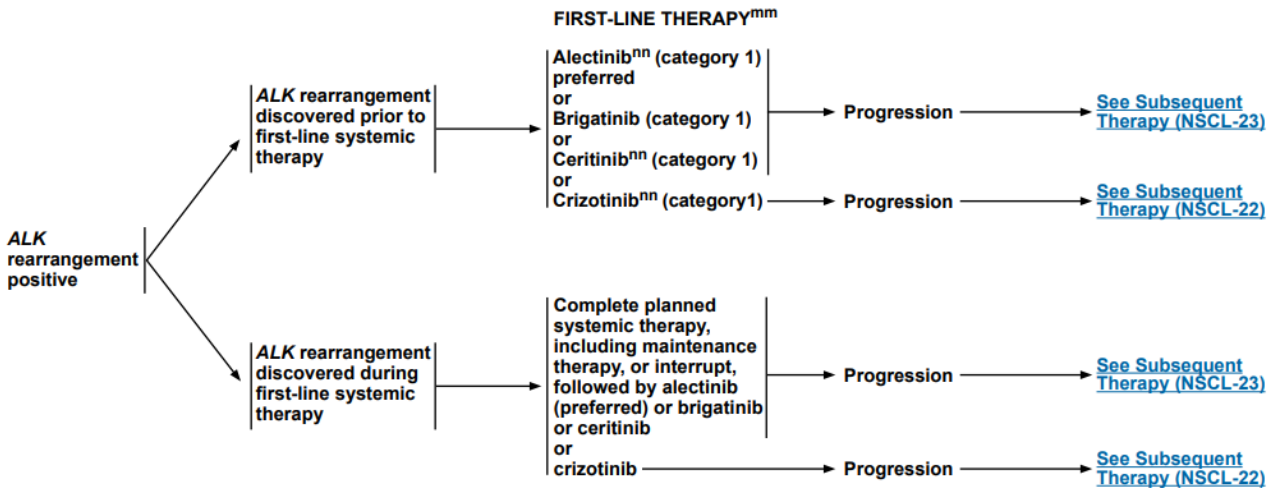
[NCCN Guidelines Index](#)
[Table of Contents](#)
[Discussion](#)



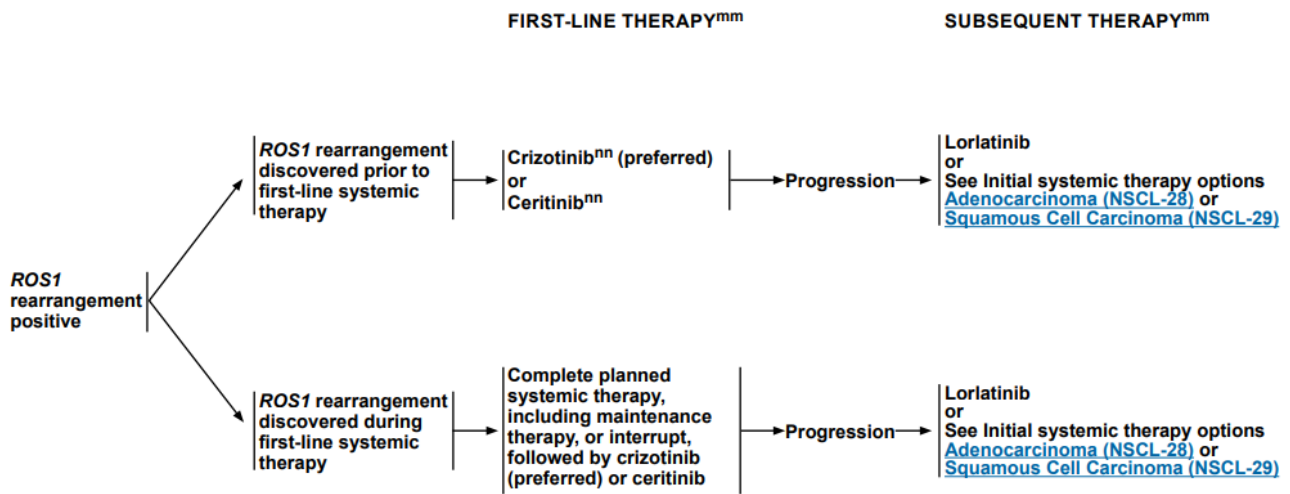
SENSITIZING EGFR MUTATION POSITIVE^{hh}



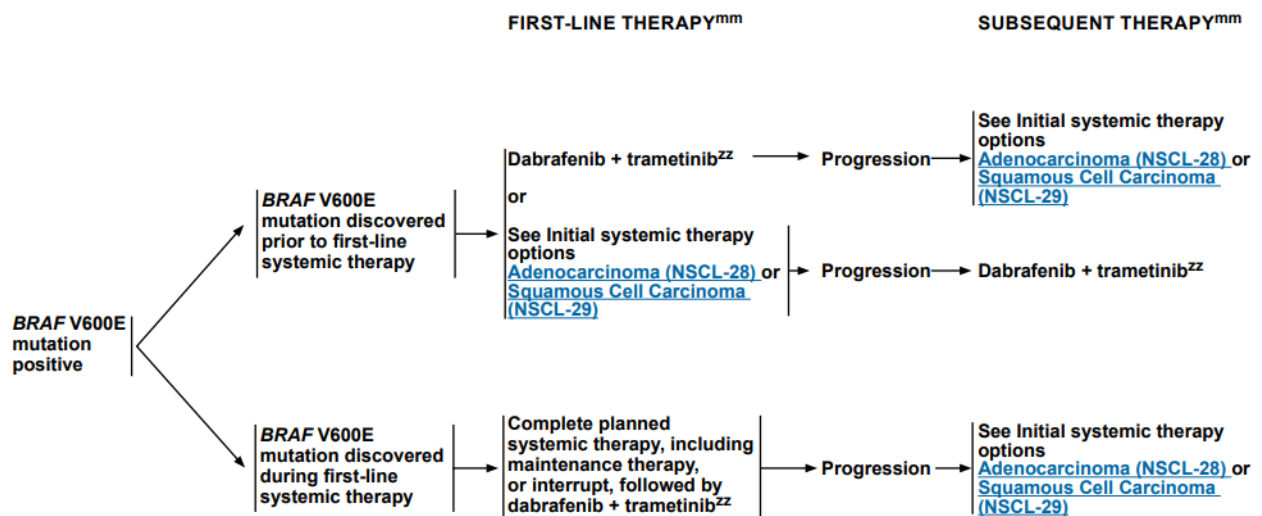
ALK REARRANGEMENT POSITIVE^{hh}



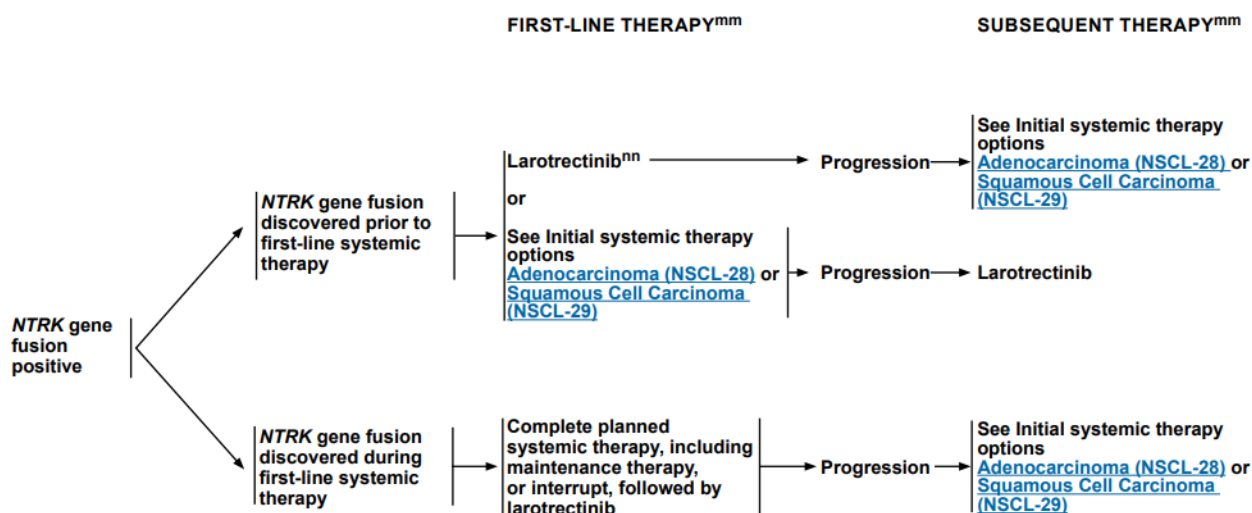
ROS1 REARRANGEMENT POSITIVE^{hh}



BRAF V600E MUTATION POSITIVE^{hh}



NTRK GENE FUSION POSITIVE



Γενικά, η βιοψία ιστού θεωρείται το gold standard, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και η ετερογένεια του όγκου. Η ανάλυση της υγρής βιοψίας επιτρέπει τη δημιουργία μιας πιο αντιπροσωπευτικής εικόνας του όγκου, καθώς ανιχνεύονται μεταλλάξεις που βρίσκονται σε οποιοδήποτε μέρος του. Επίσης, καθιστάται δυνατή η αξιολόγηση της εξέλιξης και της επιθετικότητας του όγκου, καθώς είναι δυνατή η ανίχνευση μεταστάσεων ακόμη και σε πρώιμο στάδιο, πριν εμφανιστεί δηλαδή κλινικά. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για να ελέγχεται ο κίνδυνος υποτροπής μετά από το χειρουργείο.

Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή έδειξε πως η αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) σε πλάσμα αποτελεί μια ευαίσθητη τεχνική η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί κλινικά για την διαχείριση των ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Η ανίχνευση των θεραπευτικών στοχεύσιμων μεταλλάξεων, καθώς και αναδυόμενων βιοδεικτών οδηγεί στο γεγονός ότι η υγρή βιοψία αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο για τη θεραπευτική μεταχείριση των ασθενών με ΜΜΚΠ και τη λήψη αποφάσεων.

Βιβλιογραφικές παραπομπές

1. Questions, G. Lung Cancer Biomarkers Guideline. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2017 **31**, 13–29 (2017).
2. Shukla, K. K., Sharma, P. & Misra, S. Molecular diagnostics in cancer patients. *Mol. Diagnostics Cancer Patients* 1–341 (2019) doi:10.1007/978-981-13-5877-7.
3. Aberle, D. R. *et al.* Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N. Engl. J. Med.* (2011) doi:10.1056/NEJMoa1102873.
4. Lim, W., Ridge, C. A., Nicholson, A. G. & Mirsadraee, S. The 8th lung cancer TNM classification and clinical staging system: Review of the changes and clinical implications. *Quant. Imaging Med. Surg.* **8**, 709–718 (2018).
5. Chirieac, L. R. & Dacic, S. Targeted therapies in lung cancer. *Surgical Pathology Clinics* (2010) doi:10.1016/j.path.2010.04.001.
6. Kobayashi, S. *et al.* EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* (2005) doi:10.1056/NEJMoa044238.
7. Wang, S., Cang, S. & Liu, D. Third-generation inhibitors targeting EGFR T790M mutation in advanced non-small cell lung cancer. *J. Hematol. Oncol.* **9**, 1–7 (2016).
8. Maheswaran, S. *et al.* Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N. Engl. J. Med.* (2008) doi:10.1056/NEJMoa0800668.
9. Sequist, L. V. *et al.* Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci. Transl. Med.* (2011) doi:10.1126/scitranslmed.3002003.
10. Sato, Y., Matoba, R. & Kato, K. Recent advances in liquid biopsy in precision oncology research. *Biol. Pharm. Bull.* **42**, 337–342 (2019).
11. Heitzer, E., Ulz, P. & Geigl, J. B. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clinical Chemistry* (2015) doi:10.1373/clinchem.2014.222679.
12. Lianidou, E. & Hoon, D. *Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA. Principles and Applications of Molecular Diagnostics* (Elsevier Inc., 2018). doi:10.1016/b978-0-12-816061-9.00009-6.
13. Heitzer, E., Haque, I. S., Roberts, C. E. S. & Speicher, M. R. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nature Reviews Genetics* (2019) doi:10.1038/s41576-018-0071-5.
14. Li, X. & Zhou, C. Comparison of cross-platform technologies for EGFR T790M testing in patients with non-small cell lung cancer. *Oncotarget* (2017) doi:10.18632/oncotarget.19007.
15. Yates, L. R. *et al.* The European Society for Medical Oncology (ESMO) Precision Medicine Glossary. *Ann. Oncol.* (2018) doi:10.1093/annonc/mdx707.
16. Horak, P., Fröhling, S. & Glimm, H. Integrating next-generation sequencing into clinical oncology: Strategies, promises and pitfalls. *ESMO Open* **1**, (2016).
17. Papadopoulou, E. *et al.* Clinical feasibility of NGS liquid biopsy analysis in NSCLC patients. *PLoS One* **14**, 1–21 (2019).

18. Aggarwal, C. *et al.* Clinical Implications of Plasma-Based Genotyping with the Delivery of Personalized Therapy in Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol.* **5**, 173–180 (2019).
19. Yang, N. *et al.* The characteristics of ctDNA reveal the high complexity in matching the corresponding tumor tissues. *BMC Cancer* **18**, 1–12 (2018).
20. Presley, C. J. *et al.* Association of broad-based genomic sequencing with survival among patients with advanced non–small cell lung cancer in the community oncology setting. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **320**, 469–477 (2018).
21. Francis, G. & Stein, S. Circulating cell-free tumour DNA in the management of cancer. *International Journal of Molecular Sciences* (2015) doi:10.3390/ijms160614122.
22. Cabel, L. *et al.* Circulating tumor cells and circulating tumor DNA: What surgical oncologists need to know? *European Journal of Surgical Oncology* (2017) doi:10.1016/j.ejso.2017.01.010.
23. Khatami, F. & Tavangar, S. M. Circulating tumor DNA (ctDNA) in the era of personalized cancer therapy. *J. Diabetes Metab. Disord.* **17**, 19–30 (2018).
24. Said, R., Guibert, N., Oxnard, G. R. & Tsimberidou, A. M. Circulating tumor DNA analysis in the era of precision oncology. *Oncotarget* **11**, 188–211 (2020).
25. Komatsubara, K. M. & Sacher, A. G. Circulating Tumor DNA as a Liquid Biopsy: Current Clinical Applications and Future Directions. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* (2017).
26. Hoang, T., Xu, R., Schiller, J. H., Bonomi, P. & Johnson, D. H. Clinical model to predict survival in chemo-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with third-generation chemotherapy regimens based on Eastern Cooperative Oncology Group data. *J. Clin. Oncol.* (2005) doi:10.1200/JCO.2005.04.177.
27. Garinet, S., Laurent-Puig, P., Blons, H. & Oudart, J.-B. Current and Future Molecular Testing in NSCLC, What Can We Expect from New Sequencing Technologies? *J. Clin. Med.* **7**, 144 (2018).
28. Whiteside, T. L. Exosomes and tumor-mediated immune suppression Find the latest version : Exosomes and tumor-mediated immune suppression. *J. Clin. Invest.* **126**, 1216–1223 (2016).
29. Ioannidis, J. P. A. Is Molecular Profiling Ready for Use in Clinical Decision Making? *Oncologist* **12**, 301–311 (2007).
30. Crowley, E., Di Nicolantonio, F., Loupakis, F. & Bardelli, A. Liquid biopsy: Monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature Reviews Clinical Oncology* (2013) doi:10.1038/nrclinonc.2013.110.
31. Chu, D. & Park, B. H. Liquid biopsy: unlocking the potentials of cell-free DNA. *Virchows Arch.* **471**, 147–154 (2017).
32. Morgan, T. M. Liquid biopsy: Where did it come from, what is it, and where is it going? *Investig. Clin. Urol.* **60**, 139–141 (2019).
33. Shackcloth, M. Lung and Pleura. *Radiology Key.* 249–270.
34. Quint, L. E. Lung cancer: Assessing resectability. *Cancer Imaging* **4**, 15–18 (2003).
35. Bartels, S. *et al.* Molecular Analysis of Circulating Cell-Free DNA from Lung Cancer Patients in Routine Laboratory Practice: A Cross-Platform Comparison of Three Different Molecular Methods for Mutation Detection. *J. Mol. Diagnostics* (2017) doi:10.1016/j.jmoldx.2017.05.008.

36. Nagahashi, M. *et al.* Next generation sequencing-based gene panel tests for the management of solid tumors. *Cancer Sci.* **110**, 6–15 (2019).
37. Lai, J., Du, B., Wang, Y., Wu, R. & Yu, Z. Next-generation sequencing of circulating tumor DNA for detection of gene mutations in lung cancer: Implications for precision treatment. *Onco. Targets. Ther.* **11**, 9111–9116 (2018).
38. Kawaguchi, T. *et al.* Performance status and smoking status are independent favorable prognostic factors for survival in non-small cell lung cancer: A comprehensive analysis of 26,957 patients with NSCLC. *J. Thorac. Oncol.* (2010) doi:10.1097/JTO.0b013e3181d2dcd9.
39. Mathai, R. *et al.* Potential Utility of Liquid Biopsy as a Diagnostic and Prognostic Tool for the Assessment of Solid Tumors: Implications in the Precision Oncology. *J. Clin. Med.* (2019) doi:10.3390/jcm8030373.
40. Elazezy, M. & Joosse, S. A. Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management. *Computational and Structural Biotechnology Journal* (2018) doi:10.1016/j.csbj.2018.10.002.
41. Herbst, R. S., Morgensztern, D. & Boshoff, C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature* **553**, 446–454 (2018).
42. Detterbeck, F. C., Boffa, D. J., Kim, A. W. & Tanoue, L. T. The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. *Chest* **151**, 193–203 (2017).
43. Wang, S., Cang, S. & Liu, D. Third-generation inhibitors targeting EGFR T790M mutation in advanced non-small cell lung cancer. *Journal of Hematology and Oncology* (2016) doi:10.1186/s13045-016-0268-z.
44. Bernicker, E. H., Allen, T. C. & Cagle, P. T. Update on emerging biomarkers in lung cancer. *J. Thorac. Dis.* **11**, S81–S88 (2019).
45. Graeme J. Poston, Lynda Wyld, Riccardo A. Audisio. *The Textbook on Surgical Oncology Theory and Multidisciplinary Practice Surgical Oncology. Theory and Multidisciplinary Practice, Second Edition, 2nd Edition.* 2016.
46. <https://radiologyassistant.nl/chest/lung-cancer/tnm-classification-8th-edition>
47. <https://www.cancer.gov/>