

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ



**« Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ RCAS1
ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ »**

Νικόλαος Γ. Τσουκαλάς

Ιατρός

Παθολόγος - Ογκολόγος

Διδακτορική Διατριβή

Αθήνα 2013

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑΣ



« Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ RCAS1 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ »

Νικόλαος Γ. Τσουκαλάς

Ιατρός

Παθολόγος - Ογκολόγος

Διδακτορική Διατριβή

Αθήνα 2013

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών - Ιατρική Σχολή
Εργαστήριο Ιστολογίας Εμβρυολογίας, Διευθυντής: Καθηγητής Χρήστος Κίττας

Υποψήφιος Διδάκτορας: Νικόλαος Τσουκαλάς, Ιατρός, Παθολόγος - Ογκολόγος

Επιβλέπων Καθηγητής: Χρήστος Κίττας, Καθηγητής Ιστολογίας Εμβρυολογίας

Τόπος εκπόνησης Διδακτορικής Διατριβής: Εργαστήριο Ιστολογίας Εμβρυολογίας

Γνωστικό Αντικείμενο: «Η σημασία της έκφρασης του RCAS1 στον καρκίνο του πνεύμονα»

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

1. Χρήστος Κίττας, Καθηγητής Ιστολογίας Εμβρυολογίας
2. Ευάγγελος Μανώλης, Καθηγητής Ανατομικής Ιστολογίας Εμβρυολογίας
3. Σταμάτιος Θεοχάρης, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής

Ημερομηνία Υποβολής Αίτησης Διδακτορικής Διατριβής: 01/11/2004

Ημερομηνία Ορισμού Τριμελούς Επιτροπής: 22/11/2004

Ημερομηνία Υποβολής Πρωτοκόλλου Έρευνας: 08/12/2004

Ημερομηνία Υποβολής 1ης Έκθεσης Προόδου: 02/11/2005

Ημερομηνία Υποβολής 2ης Έκθεσης Προόδου: 10/12/2010

Ημερομηνία Υποβολής 3ης Έκθεσης Προόδου: 28/01/2013

Ημερομηνία Ορισμού Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής: 28/01/2013

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

1. Χρήστος Κίττας, Καθηγητής Ιστολογίας Εμβρυολογίας
2. Εμμανουήλ Αγαπητός, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής
3. Ευάγγελος Μανώλης, Καθηγητής Ανατομικής Ιστολογίας Εμβρυολογίας
4. Σταμάτιος Θεοχάρης, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής
5. Νικόλαος Καβατζάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής
6. Ανδρέας Λάζαρης, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής
7. Ειρήνη Θυμαρά, Λέκτορας Παθολογικής Ανατομικής

Στους Γονείς μου...

στον Άνθρωπο που υπήρξε ανεκτίμητος βοηθός και συμπαραστάτης στο εγχείρημα αυτό...

και στον Νικόλα, το Γιώργο και τον Παναγιώτη...



Στους Καθηγητές και Δασκάλους μου και...

στους Ασθενείς μου που δεν σταμάτησαν ποτέ να Ελπίζουν

και να Αγωνίζονται...

ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

« Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἱητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἵστορας ποιεύμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε.

Ἥγησασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωυτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρῃσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἱητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί.

Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἰρξέειν.

Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ὁσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν.

Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε.

Ἐς οἰκίας δὲ ὁκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισιῶν ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων.

Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἦ ἴδω, ἦ ἀκούσω, ἦ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρῶντα ἡγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα.

Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποίεοντι, καὶ μὴ ξυγχέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιορκοῦντι, τάναντία τουτέων. »



ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

« Ορκίζομαι στο θεό Απόλλωνα τον ιατρό και στο θεό Ασκληπιό και στην Υγεία και στην Πανάκεια και επικαλούμενος τη μαρτυρία όλων των θεών ότι θα εκτελέσω κατά τη δύναμη και την κρίση μου τον όρκο αυτόν και τη συμφωνία αυτή.

Να θεωρώ τον διδάσκαλό μου της ιατρικής τέχνης ίσο με τους γονείς μου και την κοινωνία του βίου μου. Και όταν χρειάζεται χρήματα να μοιράζομαι μαζί του τα δικά μου. Να θεωρώ την οικογένειά του αδελφία μου και να τους διδάσκω αυτήν την τέχνη αν θέλουν να την μάθουν χωρίς δίδακτρα ή άλλη συμφωνία.

Να μεταδίδω τους κανόνες ηθικής, την προφορική διδασκαλία και όλες τις άλλες ιατρικές γνώσεις στους γιους μου, στους γιους του δασκάλου μου και στους εγγεγραμμένους μαθητές που πήραν τον ιατρικό όρκο, αλλά σε κανέναν άλλο.

Θα χρησιμοποιώ τη θεραπεία για να βοηθήσω τους ασθενείς κατά τη δύναμη και την κρίση μου, αλλά ποτέ για να βλάψω ή να αδικήσω. Ούτε θα δίνω θανατηφόρο φάρμακο σε κάποιον που θα μου το ζητήσει, ούτε θα του κάνω μια τέτοια υπόδειξη.

Παρομοίως, δεν θα εμπιστευτώ σε έγκυο μέσο που προκαλεί έκτρωση. Θα διατηρώ αγνή και άσπιλη και τη ζωή και την τέχνη μου. Δεν θα χρησιμοποιώ νυστέρι ούτε σε αυτούς που πάσχουν από λιθίαση, αλλά θα παραχωρώ την εργασία αυτή στους ειδικούς της τέχνης.

Σε όσα σπίτια πηγαίνω, θα μπαίνω για να βοηθήσω τους ασθενείς και θα απέχω από οποιαδήποτε εσκεμμένη βλάβη και φθορά, και ιδίως από γενετήσιες πράξεις με άνδρες και γυναίκες, ελεύθερους και δούλους. Και όσα τυχόν βλέπω ή ακούω κατά τη διάρκεια της θεραπείας ή και πέρα από τις επαγγελματικές μου ασχολίες στην καθημερινή μου ζωή, αυτά που δεν πρέπει να μαθευτούν παραέξω δεν θα τα κοινοποιώ, θεωρώντας τα θέματα αυτά μυστικά.

Αν τηρώ τον όρκο αυτό και δεν τον παραβώ, ας χαίρω πάντοτε υπολήψεως ανάμεσα στους ανθρώπους για τη ζωή και για την τέχνη μου. Αν όμως τον παραβώ και επιορκήσω, ας πάθω τα αντίθετα. »



ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Νικολάου Γ. Τσουκαλά MD, MSc

Στρατιωτικού Ιατρού

Παθολόγου - Ογκολόγου

ΑΤΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ:

Τόπος Γέννησης	: Θεσσαλονίκη
Ημερομηνία Γέννησης	: 07/04/1974
Οικογενειακή Κατάσταση	: Άγαμος
Τηλέφωνο	: 6977366056
E-mail	: tsoukn@yahoo.gr

ΠΑΡΟΥΣΑ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΘΕΣΗ:

2010-Σήμερα. Επιμελητής Παθολογικής-Ογκολογικής Κλινικής 401 Γενικό Στρατιωτικό Νοσοκομείο Αθηνών (401 ΓΣΝΑ).

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΕΣ ΣΠΟΥΔΕΣ:

1986-1992. Γυμνασιακές-Λυκειακές σπουδές στο Γυμνάσιο-Λύκειο Ν. Τρίγλιας Χαλκιδικής.

1993-1999. Μαθητής της Στρατιωτικής Σχολής Αξιωματικών Σωμάτων (ΣΣΑΣ).

1993-1999. Πανεπιστημιακές σπουδές στο τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης με βαθμό πτυχίου (Λίαν Καλώς, 8).

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΕΣ ΣΠΟΥΔΕΣ - ΕΠΕΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

1999-2000. Εκπαιδευόμενος Ιατρός στο 401 ΓΣΝΑ.

2000-2003. Αξιωματικός Ιατρός- Διευθυντής Στρατιωτικής Ιατρικής Υπηρεσίας Κομοτηνής και Σερρών (XXI ΤΘΤ, Χ ΜΠ).

2003-2005. Ειδικευόμενος Ιατρός στην Παθολογία, Γ' Παθολογική Κλινική 417 ΝΙΜΤΣ.

2005-2006. Ειδικευόμενος Ιατρός στην Αιματολογία, Αιματολογικό Τμήμα Α.Ο.Ν.Α. «Ο Άγιος Σάββας».

2006-2009. Ειδικευόμενος Ιατρός στην Παθολογική-Ογκολογία, Β' Ογκολογική Κλινική Α.Ο.Ν.Α. «Ο Άγιος Σάββας».

2009. Ειδικευόμενος Ιατρός στην Παθολογική-Ογκολογία, Τμήμα Παθολογικής-Ογκολογίας Νοσοκομείο «Αλεξάνδρα», Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

2006-2007. Μεταπτυχιακό πρόγραμμα εκπαίδευσης στις Λοιμώξεις και στα Αντιβιοτικά, Ελληνική Εταιρεία Λοιμώξεων.

2007-2009. Μεταπτυχιακό πρόγραμμα εκπαίδευσης στην Κλινική Ογκολογία, Ελληνική Ακαδημία Ογκολογίας Ε.ΑΚ.Ο.

23/06/2009. Τίτλος Ιατρικής Ειδικότητας στην Παθολογική-Ογκολογία.

2009. European Certification in Medical Oncology, ESMO examination.

2006-2009. Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης (ΜΔΕ) στη Βιοπληροφορική, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

2009-2010. Διευθυντής ιατρικής υπηρεσίας του Κέντρου Εκπαίδευσης Τεθωρακισμένων ΚΕΤΘ Αυλώνας Αττικής και παράλληλα επιστημονικός συνεργάτης στα Α.Ο.Ν.Α. «Ο Άγιος Σάββας» και 401 ΓΣΝΑ.

2009-2010. Clinical fellow in Medical Oncology at Guy's and St Thomas' Hospital NHS London UK.

2009-2011. Μεταπτυχιακό πρόγραμμα εκπαίδευσης στην Μαστολογία, Ελληνική Ακαδημία Μαστολογίας.

2010-Σήμερα. Επιμελητής Παθολογικής-Ογκολογικής Κλινικής 401 ΓΣΝΑ.

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ:

Α) Δημοσιεύσεις σε Διεθνή Περιοδικά

1. **Tsoukalas Nikolaos**, Tolia Maria, Kostakis Ioannis, Pistamaltzian Nikolaos, Tryfonopoulos Dimitrios, Lypas Georgios, Koumakis Georgios, Barbounis Vasileios, Goutas Nikolaos, Efremidis Anna. Coexistence of intracranial germ cell tumor and craniopharyngioma in an adolescent: case report and review of the literature. Int J Clin Exp Med. (Ahead of print).

2. **Tsoukalas Nikolaos**, Tolia Maria, Kostakis D Ioannis, Lypas Georgios, Pistamaltzian Nikolaos, Demiri Stamatina, Panopoulos Christos, Koumakis Georgios, Barbounis Vasileios, Efremidis Anna. Dermatomyositis as an early manifestation and a significant clinical precursor of lung cancer: report of a rare case and review of the current literature. Int J Clin Exp Med. 2013;6(2):105-9.

3. Kostakis ID, **Tsoukalas NG**, Aravantinos DC, Gkizis IG, Cholidou KG, Papadopoulos DP. A Case Report of Gordon's Syndrome in a 20-Year-Old Male with Free Medical Family History. Hellenic J Cardiol. 2013 Jan;54(1):64-8.

4. Tolia M, **Tsoukalas N**, Platoni K, Dilvoi M, Pantelakos P, Kelekis N, Kouloulas V. Metastatic bone involvement in vulvar cancer: report of a rare case and review of the literature. Eur J Gynaecol Oncol. 2012;33(4):411-3. Review.

5. **Tsoukalas N**, Tzovaras AA, Tolia M, Kostakis ID, Papakostidi A, Pistamaltzian N, Ardavanis A. Meta-analysis of the predictive value of KRAS mutations in treatment response using cetuximab in colorectal cancer. J BUON. 2012 Jan-Mar;17(1):73-8.

6. **Nikolaos Tsoukalas**, Ioannis Kostakis, Spiros Siakavellas, Maria Tolia, Aristoula Papakostidi, Andreas Karameris, Alexandros Tzovaras, Ioannis Sfiniadakis, Evangelos Tsiambas, Alexandros Ardavanis, Evangelos Manolis, Christos Kittas, Stamatios Theocharis. The value of RCAS1 as a potential biomarker in non-small cell lung cancers. J Clin Oncol 30, 2012 (suppl; abstr e21098).

7. Kleita Michaelidou, Alexandros Tzovaras, **Nikolaos Tsoukalas**, Konstantinos Mavridis, Gregory Tsoukalas, Nikos Tsapralis, Sofia Stamatopoulou, Dimosthenis Zylis, Ioannis Misitzis, Alexandros Ardavanis, Andreas Scorilas. Evaluation of the clinical utility of kallikrein-related peptidase 6 gene (KLK6) downregulation in breast cancer J Clin Oncol 30, 2012 (suppl; abstr 10606).

8. Alexandros Tzovaras, Iordanis Mourouzis, Nikos Tsapralis, Gregory Tsoukalas, **Nikolaos Tsoukalas**, Sofia Stamatopoulou, Georgios Oikonomopoulos, Ioannis Misitzis, Christos Pantos, Alexandros Ardavanis. Correlation between triiodothyronine levels and cancer cell proliferation in high Ki-67 estrogen receptor-positive breast cancer patients J Clin Oncol 30, 2012 (suppl; abstr e11073).

9. Tolia M, Platoni K, Foteineas A, Kalogeridi MA, Zygogianni A, **Tsoukalas N**, Caimi M, Margari N, Dilvoi M, Pantelakos P, Kouvaris J, Kouloulas V. Assessment of contralateral mammary gland dose in the treatment of breast cancer using accelerated hypofractionated radiotherapy. World J Radiol. 2011 Sep 28;3(9):233-40.

10. Tzovaras A.A, Karagiannis A, **Tsoukalas N**, Florou K, Ardavanis A. Cutaneous metastasis resembling herpes-zoster as an early presentation of stomach cancer. Forum of Clinical Oncology (FCO) Volume 2, Issue 2, 2011, pages 44-45.

11. **N Tsoukalas**, T Oikonomaki, A Papakostidi, N Pistamaltzian, E Tsiambas, A Karameris, A Ardavanis, E Manolis, S Theocharis, C Kittas. The Clinical Significance of RCAS1 Expression in Primary Lung Neoplasms. *European Journal of Cancer - EUR J CANCER* , vol. 47, pp. S117-S117, 2011.
12. **Nikolaos Tsoukalas**, Dimitrios Tryfonopoulos, Maria Tolia, Christos Panopoulos, Stamatina Demiri, Georgios Koumakis, Vasilios Barbounis, Anna Efremidis. Male breast cancer: a single centre experience. *International Journal of Cancer Volume 128, Issue Supplement 1*, 2011, pages 35–49.
13. A. P. Efremidis, F. Fostira, C. Panopoulos, K. Papademitriou, N. Pistalmazian, **N. Tsoukalas**, D. Yannoukakos. CDH-1 germ line mutations in diffuse gastric and infiltrating ductal breast cancer. *J Clin Oncol* 27, 2009 (suppl; abstr e22218).
14. F. Fostira, C. Panopoulos, K. Papademitriou, G. Lypas, **N. Tsoukalas**, V. Barbounis, A. Efremidis, D. Yannoukakos. A novel mutation in MUTYH-associated polyposis (MAP) syndrome. *J Clin Oncol* 27, 2009 (suppl; abstr e15022).
15. Koumakis G., **Tsoukalas N.**, Tryfonopoulos D., Demiri S., Vassilomanolakis M., Barbounis, V., Droufakou S., Filis I., Moraki M., Efremidis A. High-dose sequential chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in relapsed and refractory lymphomas. Sixteen years experience of a single centre. *EJC Supplements*, Vol: 5, issue: 4 (September, 2007), p: 353-353.
16. Koumakis G., Tryfonopoulos D., Vassilomanolakis M., Barbounis V., Res E., Demiri S., **Tsoukalas N.**, Droufakou S., Filis I., Efremidis A. Sequential high dose chemotherapy with paclitaxel and etoposide, carboplatin, melphalan and autologous stem cell support in patients with germ cell tumors; a phase II study. *EJC Supplements*, Vol: 5, issue 4 (September, 2007), p. 305.

B) Δημοσιεύσεις σε Ελληνικά Περιοδικά και Βιβλία

1. Author of the Greek National Guidelines regarding Testicular cancer and co-author for Breast cancer and Nutrition in cancer patients (2012).
2. Co-author of a Greek book - manual for Colorectal Cancer (2011).
3. **Tsoukalas N.**, Papakostidi A., Tolia M. Colorectal cancer: Adverse effects of antineoplastic treatment. *Arch Hellen Med*, 29(3), May-June 2012, 319-324.
4. A. Papakostidi, **N. Tsoukalas**. Quality in health care and its evaluation. *Arch Hellen Med*, 29(4), July-August 2012, 480-488.
5. A. Papakostidi, **N. Tsoukalas**, M.Tolia, E. Sygkounas. The necessity of quality assurance in radiotherapy. *Galenus* 2012; 54 (3): 131-140.
6. **N. Tsoukalas**, A. Tzovaras, M. Tolia, A. Papakostidi, I. Kostakis, A. Ardavanis, V. Barbounis. The efficacy of cetuximab and mutations of the *KRAS* gene in colorectal cancer. *Arch Hellen Med*, 28(5), September-October 2011, 674-679.
7. Papakostidi Ar, **Tsoukalas N**, Sygkounas E. Accidents in radiotherapy and quality control. *Galenus* 2011; 53 (6): 381-392.
8. **N. Tsoukalas**, M. Tolia, I. Kostakis, A. Papakostidi, A. Tzovaras, E. Politou, P. Sigounis. Data base for tumor markers. *Galenus* 2011; 53 (3):140-149.
9. **Nikolaos Tsoukalas**, Aristoula Papakostidi. Biological targeted treatments in colorectal cancer and their adverse events. *Galenus* 2010; 52(4):337-350.

10. Vasilomanolakis M., **Tsoukalas N.** A case of retroperitoneal fibrosis treated with tamoxifen and review of the literature. Hellenic Oncology 2007, 43:139-141.

Γ) Ανακοινώσεις σε Συνέδρια

Συνολικά 123 προφορικές και αναρτημένες ανακοινώσεις σε 81 Ελληνικά και 42 Διεθνή Συνέδρια.

Δ) Παρακολουθήσεις Συνεδρίων

Συνολικά 95 παρακολουθήσεις Συνεδρίων, Ημερίδων, Συμποσίων, Σεμιναρίων (65 Ελληνικά και 30 Διεθνή).

Ε) Λοιπό Επιστημονικό Έργο

Συγγραφή κεφαλαίων σε Ιατρικά Βιβλία.

Μέλος οργανωτικής επιτροπής Επιστημονικών Συνεδρίων.

Συμμετοχή σε προεδρεία Επιστημονικών Συνεδρίων.

Εισηγητής σε στρογγυλές τράπεζες Ελληνικών Συνεδρίων .

Κριτής εργασιών σε Διεθνή Ιατρικά Περιοδικά.

Ομιλητής σε μετεκπαιδευτικά μαθήματα και Εκπαιδευτής φοιτητών νοσηλευτικής.

ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ - ΒΡΑΒΕΙΑ:

1. 24^ο Ιατρικό Συνέδριο Ενόπλων Δυνάμεων 1^ο Βραβείο για την εργασία με τίτλο: «Η ΚΛΙΝΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ RCAS1 ΣΕ ΜΗ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΠΝΕΥΜΟΝΑ» (Οκτώβριος 2012).

2. 38^ο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο Βραβείο-Έπαινος «Σωτήρη Παπασταμάτη» για την εργασία με τίτλο: «Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ RCAS1 ΣΕ ΠΡΩΤΟΠΑΘΗ ΜΗ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΠΝΕΥΜΟΝΑ» (Μάιος 2012).

3. 17^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας Βραβείο για την εργασία με τίτλο: «Η ΧΡΗΣΗ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΥΝΔΕΕΤΑΙ ΜΕ ΑΥΞΗΜΕΝΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΡΙΠΛΑ ΑΡΝΗΤΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΣΕ ΠΡΟΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΙΑΚΕΣ ΓΥΝΑΙΚΕΣ» (Απρίλιος 2011).

4. "Best Abstract Award - Excellence in Oncology" for the abstract «MALE BREAST CANCER: A SINGLE-CENTRE EXPERIENCE» (November 2010).

5. ESMO Fellowship programme "Clinical Unit Visit" 2009.

6. 15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας Βραβείο για την εργασία με τίτλο: «ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΜΑΣΤΟΥ ΣΕ ΜΟΝΑΔΑ ΠΡΟΛΗΨΗΣ-ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΟΙΚΟΓΕΝΟΥΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ» (Μάρτιος 2009).

7. Υποτροφία Εθνικού Ιδρύματος Υποτροφιών ΙΚΥ για μεταπτυχιακές σπουδές, μετά από επιτυχία στις απαιτούμενες εξετάσεις (Απρίλιος 2004).

8. Εύφημο μνεία από το Διοικητή της Χ Μεραρχίας Πεζικού Σέρρες (Μάρτιος 2003).

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση μιας Διδακτορικής Διατριβής είναι ένα μεγάλο ταξίδι «...ένας μακρύς δρόμος γεμάτος περιπέτειες, γεμάτος γνώσεις...». Στον μακρύ αυτό δρόμο προς την «Ιθάκη»...δεν ήμουν μόνος. Συνοδοιπόροι μου, υπήρξαν σημαντικοί άνθρωποι των οποίων τα λόγια και οι πράξεις συνέβαλαν ουσιαστικά στην περάτωση αυτού του επιστημονικού έργου...

Με σεβασμό εκφράζω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Ιστολογίας Εμβρυολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ κ. Χρήστο Κίττα για την ευκαιρία που μου δόθηκε να διεξάγω την παρούσα μελέτη και για την αμέριστη συμπαράστασή του για την περάτωσή της.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Ανατομικής Ιστολογίας Εμβρυολογίας κ. Ευάγγελο Μανώλη για την εμπιστοσύνη του και τις πολύτιμες συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της Διατριβής ως μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής.

Θερμότερες και Ειλικρινείς Ευχαριστίες οφείλω στον εμπνευστή και επιστημονικό συντονιστή της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής, Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής κ. Σταμάτιο Θεοχάρη, του οποίου η εμπειρία και οι γνώσεις σε συνδυασμό με τα εποικοδομητικά σχόλια και παρατηρήσεις έδρασαν καταλυτικά στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης. Επιπλέον, η πολλαπλή βοήθεια, η αληθινή κατανόηση και η αμέριστη συμπαράστασή του σε κάποιες δύσκολες στιγμές ήταν ανεκτίμητης αξίας.

Ευχαριστώ τους Διευθυντές των Παθολογοανατομικών Εργαστηρίων του 417 ΝΙΜΤΣ κ. Ανδρέα Καραμέρη και του ΝΝΑ κ. Ιωάννη Σφηνιαδάκη για τη θεωρητική και πρακτική βοήθεια, την πλήρη παθολογοανατομική εξέταση του βιοπτικού υλικού και για την παραχώρηση του απαραίτητου χώρου, υλικών και οργάνων για την εκτέλεση του πειραματικού μέρους της εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ τον κ. Ευάγγελο Τσιάμπα Λέκτορα Κυτταρολογίας-Μοριακής Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, την κ. Παναγιώτα Τσουμακάρη και τον κ. Γεώργιο Βηλαρά για την συνεργασία.

Επιπλέον, ευχαριστώ για τη βοήθεια την συμπαράσταση και την υποστήριξη, τους Διευθυντές, Επιμελητές και Ειδικευόμενους Ιατρούς καθώς και το Νοσηλευτικό Προσωπικό των παρακάτω κλινικών: της Γ' Παθολογικής, της Πνευμονολογικής και της Θωρακοχειρουργικής Κλινικής του 417 ΝΙΜΤΣ, της Πνευμονολογικής και της Θωρακοχειρουργικής Κλινικής του ΝΝΑ και βέβαια της Β' Παθολογικής-Ογκολογικής

Κλινικής του Α.Ο.Ν.Α. «Ο Άγιος Σάββας» και της Παθολογικής-Ογκολογικής Κλινικής του 401 ΓΣΝΑ στην οποία ανήκω την περίοδο αυτή.

Ευχαριστώ πολύ τον συνάδελφο κ. Ιωάννη Παναγιώτου Χειρουργό Θώρακος στο 401 ΓΣΝΑ για τις χρήσιμες συμβουλές του και τους συναδέλφους ειδικευόμενους Ιατρούς κ. Σπυρίδωνα Σιακαβέλλα και κ. Ιωάννη Κωστάκη για την πολύτιμη συμβολή τους στην στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων και στην συγγραφή και διόρθωση του τελικού κειμένου της μελέτης.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω τον κ. Παναγιώτη Μακρή τελειόφοιτο φοιτητή του τμήματος Ναυπηγών Μηχανολόγων Μηχανικών του ΕΜΠ για την γραφιστική επιμέλεια του κειμένου της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής και για την εν γένει συμπαράσταση του την δύσκολη αυτή περίοδο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου όλους όσους βοήθησαν με οποιονδήποτε τρόπο και μέσο στο να περατωθεί η παρούσα Διδακτορική Διατριβή και ιδιαίτερα την Εταιρεία Παθολόγων Ογκολόγων Ελλάδος (ΕΟΠΕ).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	17
--------------------	-----------

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	21
-----------------	-----------

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	25
-----------------------------	-----------

1.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	25
-------------------------------------	----

1.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΚΑΙ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	26
--	----

1.3 ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	27
---	----

1.4 ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	27
--	----

1.5 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	32
---	----

1.6 ΠΑΡΑΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	35
---	----

1.7 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	39
---	----

1.8 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	45
------------------------------------	----

1.9 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	48
--------------------------------	----

1.10 ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	52
---	----

1.11 ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	53
--	----

1.12 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	56
---	----

1.13 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	60
---------------------------------------	----

2. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	62
-----------------------------------	-----------

2.1 ΑΝΟΣΙΑ ΞΕΝΙΣΤΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	62
---------------------------------	----

2.2 ΜΟΡΙΑΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΚΑΙ ΑΝΟΣΙΑΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ	65
--	----

2.3 ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ	66
--	----

2.4 ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΕΝΑΝΤΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	67
---	----

2.5 ΑΝΟΣΟΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ (CANCER IMMUNOEDITING)	68
---	----

3. ΠΡΩΤΕΪΝΗ RCAS1	71
3.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ RCAS1	71
3.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ RCAS1	72
3.3 ΠΡΩΤΕΪΝΗ RCAS1 ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	74
3.3.1 ΠΡΩΤΕΪΝΗ RCAS1 ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΔΙΑΦΥΓΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	74
3.3.2 ΠΡΩΤΕΪΝΗ RCAS1 ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ	75
3.3.3 ΠΡΩΤΕΪΝΗ RCAS1 ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΟΙ ΤΥΠΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	77
3.3.4 ΠΡΩΤΕΪΝΗ RCAS1 ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	82
3.4 ΠΡΩΤΕΪΝΗ RCAS1 ΚΑΙ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ	84
4. ΔΕΙΚΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ Ki-67	86
5. ΑΝΤΙΓΟΝΟ ΚΑΙ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ CD3	88
6. ΙΣΤΙΚΕΣ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ (Tissue MicroArraysTMAs)	90
6.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΙΣΤΙΚΕΣ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ (TMAs)	90
6.2 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΙΣΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ (TMAs)	91
6.3 ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΙΣΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ (TMAs)	94
7. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ	96
7.1 ΑΡΧΕΣ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ - ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	96
7.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ	99
7.2.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΟΣΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ	99
7.2.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΒΙΔΙΝΗΣ-ΒΙΟΤΙΝΗΣ-ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ (ABC)	100
7.2.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΚΑΛΙΚΗΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ	101
7.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ	101
8. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΕΙΚΟΝΑΣ	102
8.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΕΙΚΟΝΑΣ - ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ	103

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

9. ΣΚΟΠΟΣ	107
10. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	107
10.1 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	107
10.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	109
10.3 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	111
10.3.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΙΣΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	111
10.3.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ – IHC	112
10.3.3 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΕΙΚΟΝΑΣ (CIA)	115
10.4 ΜΕΤΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ	116
11. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	117
11.1 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	117
11.2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΤΑΓΕΓΡΑΜΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΩΝ	117
12. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	120
13. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	148
14. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	152
15. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	153
16. SUMMARY	154
17. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	157
18. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	177

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί ένα σημαντικότερο πρόβλημα υγείας δεδομένου ότι σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) είναι η πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο και στα δύο φύλα. Μια σειρά παραγόντων έχουν συσχετισθεί με την ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα από τους οποίους το κάπνισμα είναι ο πιο σημαντικός. Η διάγνωση του νεοπλασματος στηρίζεται κυρίως στην εμφάνιση της κλινικής συμπτωματολογίας καθώς δεν υπάρχει ακόμη κάποιος προληπτικός πληθυσμιακός έλεγχος (screening test).

Είναι γνωστό ότι κατά τη διάρκεια της ζωής του ανθρώπου στα κύτταρα του λαμβάνουν χώρα ένα πλήθος αυτόματων μεταλλάξεων. Αποτέλεσμα του γεγονότος αυτού είναι η κακοήθης εξαλλαγή των κυττάρων, η οποία παρότι συμβαίνει αρκετά συχνά τις περισσότερες φορές δεν καταλήγει στην ανάπτυξη κάποιου όγκου. Αυτό οφείλεται σε ένα βαθμό στην ύπαρξη του ανοσοποιητικού συστήματος το οποίο διαθέτει μηχανισμούς για την αντιμετώπιση και την καταστροφή των κακοήθως εξαλλασσόμενων κυττάρων. Το θεωρητικό υπόβαθρο αυτής της δράσης του ανοσοποιητικού συστήματος βασίζεται στη θεωρία της ανοσοεπιτήρησης του καρκίνου (cancer immunosurveillance), που προτάθηκε αρχικά από τον Ehrlich το 1909 και διατυπώθηκε τελικά στα μέσα της δεκαετίας του 1950 από τους M. Burnet και L. Thomas. Οι όγκοι λοιπόν δημιουργούνται όταν τα νέα καρκινικά κύτταρα που προκύπτουν συνεχώς με τη διαδικασία της κακοήθους εξαλλαγής (malignant transformation) κατορθώσουν να διαφύγουν από την επιτήρηση του ανοσοποιητικού συστήματος (immunoescape).

Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί που φαίνεται να συμβάλουν στη διαφυγή των καρκινικών κυττάρων από την ανοσοεπιτήρηση. Πολλοί τύποι καρκινικών κυττάρων για παράδειγμα εκλύουν παράγοντες ικανούς να τροποποιήσουν το μικροπεριβάλλον και να επηρεάσουν την επιβίωση τους με αποτέλεσμα την γρήγορη εξέλιξη της νόσου. Κάποια καρκινικά κύτταρα εκφράζουν παράγοντες που αναστέλλουν την ανάπτυξη ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων ή εκφράζουν στην επιφάνεια τους προσδέτες που προκαλούν απόπτωση σε κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα, κύτταρα φυσικούς φονείς, ουδετερόφιλα και μακροφάγα. Ένας από αυτούς πιθανολογείται ότι είναι και η έκφραση του αντιγόνου RCAS1 στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων.

Επιπλέον, γνωρίζουμε ότι η μοριακή ιατρική έχει επιφέρει μεγάλες αλλαγές στη διαγνωστική και θεραπευτική προσέγγιση πολλών ογκολογικών νοσημάτων. Διάφορα μόρια και κυρίως πρωτεΐνες έχουν τη δυνατότητα να αποτελέσουν δείκτες της νόσου - βιοδείκτες (biomarkers) αναλύοντας το μοριακό φαινότυπο του όγκου κάθε ασθενούς. Η κλινική σημασία των βιοδεικτών είναι μεγάλη και συμπληρωματική στην επίσης σημαντική αξία των διαφόρων συστημάτων σταδιοποίησης των όγκων όπως π.χ. του συστήματος TNM. Ειδικότερα, η χρήση τους θα μας βοηθήσει όχι μόνο στο να επιλέξουμε την καταλληλότερη θεραπεία αλλά επίσης θα μας επιτρέψει να καθορίσουμε ποιοι ασθενείς χρειάζονται θεραπεία ή όχι (πρόγνωση). Συνεπώς, μελέτες οι οποίες διερευνούν την αξία νέων μορίων ως πιθανών βιοδεικτών, για όλους τους όγκους αλλά και για τον καρκίνο του πνεύμονα ειδικότερα, είναι πολύ ενδιαφέρουσες και σημαντικές για την καθημερινή κλινική πράξη.

Με βάση όλα τα ανωτέρω, το ερευνητικό πρωτόκολλο της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής σχεδιάστηκε με γνώμονα τη διερεύνηση της σημασίας της έκφρασης του μορίου RCAS1 στον καρκίνο του πνεύμονα και η εκτίμηση της αξίας του ως ενός νέου πιθανού βιοδείκτη για τη νόσο ή ακόμη και ενός ενδεχόμενου νέου θεραπευτικού στόχου για το μέλλον. Λαμβάνοντας λοιπόν υπόψιν και τα δεδομένα της υπάρχουσας βιβλιογραφίας για το συγκεκριμένο θέμα, ευελπιστούμε τα αποτελέσματα αυτής της Διδακτορικής Διατριβής να συμβάλουν στην υπάρχουσα διαδικασία ανεύρεσης και τυποποίησης νέων βιοδεικτών για τον καρκίνο του πνεύμονα. Απώτερος σκοπός της έρευνας στο πεδίο αυτό είναι η καλύτερη κατηγοριοποίηση των ασθενών και τελικά η επίτευξη της εξατομικευμένης ιατρικής προσέγγισης για κάθε μεμονωμένο ασθενή (personalized medicine and treatment or tailored medicine and treatment).

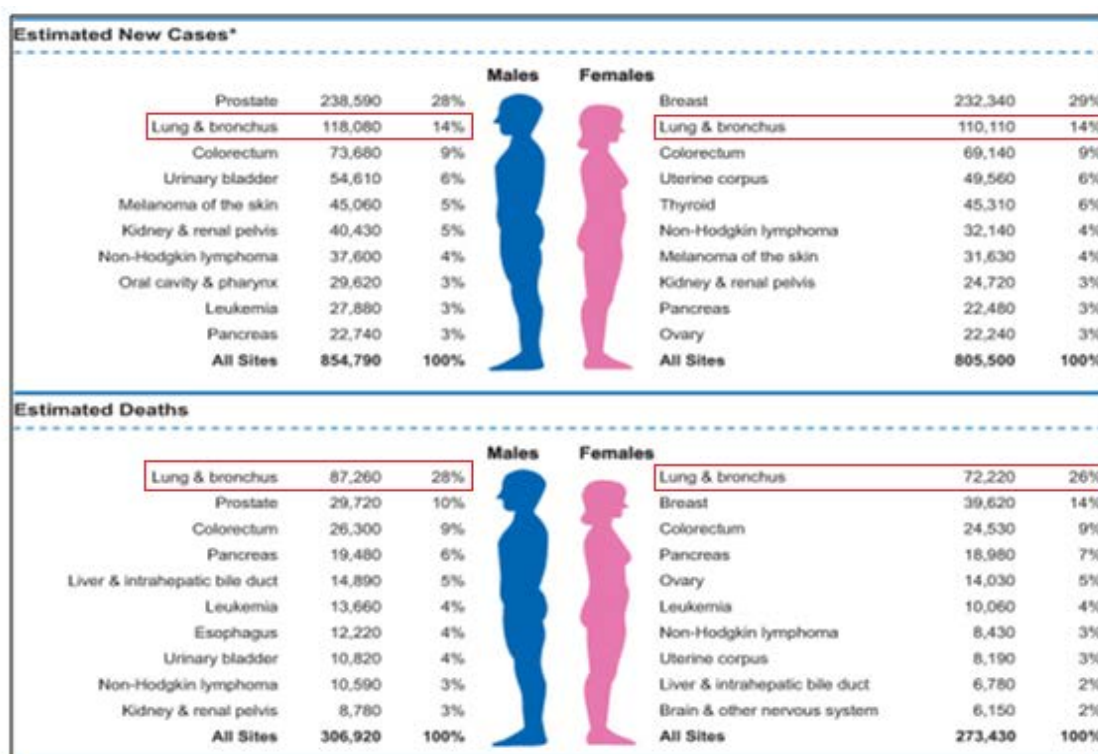
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

1.1 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί σημαντικό πρόβλημα υγείας παγκοσμίως, με περίπου 1.600.000 νέα περιστατικά και 1.380.000 θανάτους το 2008 [1]. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, θα υπάρχουν περίπου 228.190 νέες περιπτώσεις καρκίνου του πνεύμονα και 159.480 θάνατοι το 2013 [2,3]. Περίπου το 1953, ο καρκίνος του πνεύμονα έγινε η πιο κοινή αιτία των θανάτων από καρκίνο στους άνδρες και το 1985 έγινε η κύρια αιτία των θανάτων από καρκίνο στις γυναίκες. Οι θάνατοι από καρκίνο του πνεύμονα έχουν αρχίσει να μειώνονται στους άνδρες, γεγονός που αντανακλά μια μείωση του καπνίσματος [4]. Η αύξηση του ποσοστού θανάτου στις γυναίκες φαίνεται να έχει φτάσει σε ένα οριακό επίπεδο και πλέον περίπου το 50% του συνόλου των θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα συμβαίνουν σε γυναίκες.



Εικόνα 1: Εκτιμώμενοι δέκα πιο συχνοί τύποι καρκίνου αναφορικά με τα νέα περιστατικά και τους θανάτους ανά φύλο στις ΗΠΑ το 2013 (τροποποίηση από Siegel R et al, CA Cancer J Clin. 2013).

1.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΚΑΙ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Μια σειρά περιβαλλοντικών και σχετιζόμενων με τον τρόπο ζωής παραγόντων έχουν συσχετισθεί με την ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα, από τους οποίους το κάπνισμα είναι ο πιο σημαντικός. Ο πρωταρχικός λοιπόν παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα είναι το κάπνισμα, το οποίο εκτιμάται ότι σχετίζεται περίπου με το 90% όλων των καρκίνων του πνεύμονα [5]. Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα για κάποιον που καπνίζει ένα πακέτο την ημέρα για 40 χρόνια είναι περίπου 20 φορές μεγαλύτερος από κάποιον που δεν έχει καπνίσει ποτέ. Παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα σε καπνιστές περιλαμβάνουν την έκταση του καπνίσματος (χρόνος, ποσότητα, είδος) και την έκθεση σε άλλους καρκινογόνους παράγοντες, όπως ο αμύαντος. Έτσι, οι πιο σημαντικές πτυχές της πρόληψης του καρκίνου του πνεύμονα αφορούν στην διακοπή του καπνίσματος ή ακόμη καλύτερα στη μη έναρξή του ποτέ. Σε άτομα που έχουν διακόψει το κάπνισμα, ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα μειώνεται σταδιακά για περίπου 15 χρόνια και τελικά παραμένει περίπου διπλάσιος από κάποιον που δεν είχε καπνίσει ποτέ [6].

Η ακτινοθεραπεία (RT) μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο ενός δεύτερου πρωτοπαθούς καρκίνου του πνεύμονα σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία για άλλες κακοήθειες. Σε γυναίκες που λαμβάνουν RT μετά από μαστεκτομή για καρκίνο του μαστού, φαίνεται να υπάρχει αυξημένος κίνδυνος καρκίνου του πνεύμονα μεταξύ των καπνιστών [7]. Παρομοίως, η RT για λέμφωμα Hodgkin έχει συσχετισθεί με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα δευτερογενώς [8,9]. Βελτιωμένες τεχνικές RT περιορίζουν την δόση της ακτινοβολίας στο πεδίο του όγκου και ο σύγχρονος εξοπλισμός και ο προγραμματισμός της δόσης θεωρείται ότι μειώνουν σημαντικά τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα σε δεύτερο χρόνο.

Μια σειρά από άλλους παράγοντες μπορεί να επηρεάσει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα δύο από αυτούς είναι οι ακόλουθοι: α) Οι περιβαλλοντικές τοξίνες και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα. Αυτοί περιλαμβάνουν την έκθεση σε παθητικό κάπνισμα, αμύαντο, ραδόνιο, μέταλλα (αρσενικό, χρώμιο και νικέλιο), ιονίζουσα ακτινοβολία και πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες [5]. β) Η πνευμονική ίνωση όπου αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι ο κίνδυνος για καρκίνο του πνεύμονα αυξάνεται περίπου επτά φορές σε ασθενείς με πνευμονική ίνωση [10]. Αυτός ο αυξημένος κίνδυνος φαίνεται να είναι ανεξάρτητος από το κάπνισμα.

Αποδεδειγμένες	Ύποπτες
Αρσενικό	Βηρύλλιο
Αμίαντος	Acrylonitrile
Χρώμιο	Vinyl Chloride
Νικέλιο	Πυρίτιο
Αρωματικοί υδρογονάνθρακες	
Ακτινοβολίες	
Bischloromethyl ether	

Πίνακας 1: Περιβαλλοντικές και επαγγελματικές καρκινογόνες ουσίες.

1.3 ΠΡΟΛΗΠΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Η διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα βασίζεται κατά κύριο λόγο στην αξιολόγηση των ατόμων με κλινικά συμπτώματα. Προληπτικός πληθυσμιακός έλεγχος (screening test) για τον καρκίνο του πνεύμονα δεν έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως, επειδή η ακτινογραφία θώρακα και η κυτταρολογική εξέταση των πτυέλων δεν έχουν αποδειχθεί ότι μειώνουν τη θνητότητα από καρκίνο του πνεύμονα.

Προοπτικές μελέτες παρατήρησης έχουν δείξει ότι ένα μεγάλο ποσοστό των καρκίνων πνεύμονα που έχουν ανιχνευθεί με αξονική τομογραφία CT είναι όγκοι πρώιμου σταδίου, οι οποίοι έχουν μια καλύτερη πρόγνωση. Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στην διενέργεια μιας τυχαιοποιημένης μελέτης που συνέκρινε την CT θώρακος με την απλή ακτινογραφία θώρακος στην έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα [11]. Αυτή η μελέτη έδειξε μείωση κατά 20% στη θνητότητα από καρκίνο του πνεύμονα στους βαρείς καπνιστές που εξετάστηκαν ετησίως για τρία χρόνια. Μελλοντικά λοιπόν θα μπορούσε υπό κάποιες προϋποθέσεις η χαμηλής έντασης CT θώρακος να χρησιμοποιηθεί ως μια εξέταση μαζικού προσυμπτωματικού πληθυσμιακού ελέγχου (screening test) π.χ. στους βαρείς καπνιστές.

1.4 ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Ο όρος καρκίνος του πνεύμονα, ή βρογχογενές καρκίνωμα, αναφέρεται σε κακοήθειες που προέρχονται από τους αεραγωγούς ή το πνευμονικό παρέγχυμα. Περίπου 95% όλων των καρκίνων του πνεύμονα χαρακτηρίζονται είτε ως μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα

(Small Cell Lung Cancer - SCLC) ή ως μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (Non Small Cell Lung Cancer - NSCLC). Η διάκριση αυτή είναι απαραίτητη για τη σταδιοποίηση, τη θεραπεία και την πρόγνωση. Άλλοι τύποι κυττάρων περιλαμβάνουν περίπου 5% των κακοηθειών που αναπτύσσονται στον πνεύμονα.

<u>I. Επιθηλιακά νεοπλάσματα</u> A. Καλοήγη 1. Θηλώματα 2. Αδενώματα B. Κακοήγη καρκινώματα 1. Ακανθοκυτταρικό ή επιδερμοειδές (squamous cell) 2. Αδιαφοροποίητο μικροκυτταρικό (small cell undifferentiated) 3. Αδενοκαρκίνωμα (adenocarcinoma) 4. Αδιαφοροποίητο μεγαλοκυτταρικό (large cell undifferentiated) 5. Καρκινοειδές (carcinoid) 6. Κυλίνδρωμα (cylindroma) 7. Βλεννοεπιδερμοειδές (mucoepidermoid) <u>II. Νεοπλάσματα συνδετικού ιστού</u> A. Καλοήγη 1. Λίπωμα, 2. Ίνωμα, 3. Νευρίνωμα, 4. Λεμφαγγείωμα, 5. Αιμαγγείωμα, 6. Μυοβλάστωμα, 7. Χόνδρωμα κ.ά. B. Κακοήγη 1. Σαρκώματα (αγγειοσάρκωμα, χονδροσάρκωμα, ινοσάρκωμα, λειομυοσάρκωμα, λιποσάρκωμα, νευροϊνοσάρκωμα, οστεοσάρκωμα) 2. Αιμαγγειοπερικύττωμα 3. Πλασματοκύττωμα	<u>III. Μεσοθηλιακά νεοπλάσματα</u> A. Καλόηθες μεσοθηλίωμα B. Κακόηθες μεσοθηλίωμα <u>IV. Διάφορα</u> A. Καλοήγη B. Κακοήγη 1. Καρκινωσάρκωμα 2. Πνευμονικό βλάστωμα 3. Κακόηθες μελάνωμα 4. Κακόηθες λέμφωμα <u>V. Μεταστατικά νεοπλάσματα</u> <u>VI. Αμαρτώματα</u>
--	---

Πίνακας 2: Ιστολογική ταξινόμηση των νεοπλασμάτων του πνεύμονα κατά WHO.

Το σύστημα ταξινόμησης των όγκων του πνεύμονα του World Health Organization (WHO 2004) αποτελεί το θεμέλιο για την ταξινόμηση του καρκίνου του πνεύμονα [12]. Σε αυτό το σύστημα ενσωματώθηκαν μια σειρά επιτευγμάτων, στα οποία περιλαμβάνονται η αναγνώριση της ετερογένειας των καρκινωμάτων του πνεύμονα, η εισαγωγή διαγνωστικών ανοσοϊστοχημικών τεχνικών (IHC) για την τυπική διάγνωση μερικών νευροενδοκρινικών όγκων καθώς και η αναγνώριση νεοπεριγραφόμενων κλινικών οντοτήτων όπως είναι το εμβρυϊκό αδενοκαρκίνωμα, οι κυστικοί βλεννώδεις όγκοι και τα εκ μεγάλων κυττάρων νευροενδοκρινικά καρκινώματα.

Η ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO) για τον πρωτοπαθή καρκίνο του πνεύμονα αναγνωρίζει τέσσερις μεγάλους ιστολογικούς τύπους κυττάρων [12]. Ενδεικτικές συχνότητες εμφάνισης αυτών είναι οι εξής:

- α) Αδενοκαρκίνωμα (συμπεριλαμβανομένου του βρογχοκυψελιδικού καρκινώματος) 38%,
- β) Καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων 20%,
- γ) Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα 5%,
- δ) Μικροκυτταρικό καρκίνωμα 13%,
- ε) Άλλα μη μικροκυτταρικά καρκινώματα που δεν μπορούν να ταξινομηθούν περαιτέρω 18%,
- στ) Άλλοι ιστολογικοί τύποι 6%.

Το αδενοκαρκίνωμα (Adenocarcinoma) αποτελεί τον πιο συχνό τύπο καρκίνου του πνεύμονα, αποτελώντας περίπου το 50% των περιπτώσεων. Η σχετική συχνότητα του αδενοκαρκινώματος έχει αυξηθεί και υπήρξε μια αντίστοιχη μείωση στη συχνότητα εμφάνισης άλλων τύπων NSCLC και SCLC. Η αυξημένη επίπτωση του αδενοκαρκινώματος πιθανολογείται ότι οφείλεται στην εισαγωγή τσιγάρων με χαμηλή περιεκτικότητα πίσσας τη δεκαετία του 1960, ωστόσο αυτή η υπόθεση δεν έχει αποδειχθεί [13]. Η ιστολογική του διάγνωση απαιτεί την απόδειξη ύπαρξης είτε νεοπλασματικών αδενωματοδών σχηματισμών είτε ενδοκυττάριας βλέννης. Υπάρχει μία σημαντική ετερογένεια στην έκταση και την αρχιτεκτονική των νεοπλασματικών αδενωματοδών σχηματισμών, η οποία κυμαίνεται από καλώς σχηματισμένες κυψελίδες έως θηλοειδείς ή ακόμα και διάτρητους τύπους. Ο συμπαγής τύπος του αδενοκαρκινώματος δεν εμφανίζει τα αρχιτεκτονικά χαρακτηριστικά των καλά διαφοροποιημένων όγκων και δεν μπορεί να διακριθεί από το αδιαφοροποίητο μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα εκτός από την παρουσία ενδοκυττάριας βλέννης. Η αναγνώριση ενδοκυττάριας βλέννης απαιτεί ειδικές ιστοχημικές χρώσεις, όπως είναι η mucicarmine ή η Periodic Acid-Schiff (PAS).

Το επιδερμοειδές καρκίνωμα (Squamous cell carcinoma) ήταν ο πιο συχνός ιστολογικός τύπος καρκίνου του πνεύμονα σχεδόν σε όλες τις μελέτες που έγιναν πριν από τα μέσα της δεκαετίας του 1980. Σήμερα, το αδενοκαρκίνωμα είναι συχνότερο από το επιδερμοειδές καρκίνωμα, ιδιαίτερα στις γυναίκες. Η ιστολογική διάγνωση του επιδερμοειδούς καρκινώματος τίθεται επί της παρουσίας κερατίνης η οποία παράγεται από τα κύτταρα του όγκου και/ή από την παρουσία ενδοκυτταρικών δεσμοσωματίων (οι αναφερόμενες ως «ενδοκυτταρικές γέφυρες»). Ορισμένοι όγκοι οι οποίοι έχουν κυρίως ατρακτοειδή εικόνα (τα ατρακτοειδή

κύτταρα είναι παραλλαγή του πλειομορφικού καρκινώματος) ή έχουν χαρακτηριστική εικόνα περιφερικά ως επί πασαλωτών κυττάρων μπορούν να ταξινομηθούν ως επιδερμοειδές καρκίνωμα. Τα περισσότερα επιδερμοειδή καρκινώματα (60-80%) εμφανίζονται σε κεντρικές δομές του τραχειοβρογχικού δένδρου, ωστόσο τα τελευταία χρόνια ένα αυξανόμενο ποσοστό εμφανίζεται περιφερικά. Η μειονότητα των περιπτώσεων που εμφανίζονται περιφερικά μπορεί να σχετίζονται με βρογχεκτατικά σπήλαια ή ουλές. Τα κεντρικά και τα περιφερικά επιδερμοειδή καρκινώματα μπορεί να εμφανίζουν εκτεταμένη κεντρική νέκρωση με αποτέλεσμα την σπηλαιοποίηση. Ένα μικρό υποσύνολο του κεντρικά ευρισκόμενου και καλά διαφοροποιημένου επιδερμοειδούς καρκινώματος εμφανίζονται ως εξωφυτικές, ενδοβρογχικές θηλώδεις εξεργασίες. Οι ασθενείς με αυτή την ασυνήθιστη παραλλαγή του επιδερμοειδούς καρκινώματος παρουσιάζουν επίμονο βήχα, επαναλαμβανόμενη αιμόπτυση ή υποτροπιάζουσες πνευμονικές λοιμώξεις λόγω απόφραξης των αεραγωγών. Οι περισσότεροι ασθενείς με εξωφυτικό ενδοβρογχικό επιδερμοειδές καρκίνωμα έχουν χαμηλού σταδίου νόσο τη στιγμή της διάγνωσης, με αντίστοιχα καλή πρόγνωση, όπου τα ποσοστά πενταετούς επιβίωσης είναι πάνω από 60% [12].

Το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (Large cell carcinoma-LCC) είναι ένα κακόηθες επιθηλιακό νεόπλασμα στο οποίο εκλείπει η παρουσία αδеноματώδους ή επιδερμοειδούς διαφοροποίησης κατά την μικροσκόπηση ενώ απουσιάζουν και τα κυτταρολογικά χαρακτηριστικά του μικροκυτταρικού καρκινώματος. Όπως ορίζεται από την ονομασία του, το LCC αποτελεί διάγνωση εξ' αποκλεισμού με σκοπό να συμπεριλάβει όλους τους NSCLC οι οποίοι δεν ταξινομούνται πλέον μέσω της απλής μικροσκόπησης ρουτίνας. Ο συνδυασμός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και IHC θα καταδείξει στοιχεία επιδερμοειδούς, αδеноματώδους και νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης σχεδόν στο 90% των περιπτώσεων. Ιστοπαθολογικά, το LCC χαρακτηρίζεται από στοιβάδες στρογγυλών έως και πολυγωνικών κυττάρων με έντονα χρωματισμένο πυρήνα και πλούσιο, ωχρής χρώσης, κυτταρόπλασμα με απουσία χαρακτηριστικών διαφοροποίησης. Επειδή το LCC τίθεται ως διάγνωση εξ' αποκλεισμού, δεν θα ήταν ορθό να χαρακτηρίζονται έτσι μικρές ενδοσκοπικές βιοψίες ή κυτταρολογικά δείγματα, καθώς και τα δύο μπορεί να έχουν δειγματοληπτικά σφάλματα. Ο όρος NSCLC είναι ορθότερος σε περιπτώσεις που διαγιγνώσκονται κατ' αυτό τον τρόπο. Το LCC συνήθως παρουσιάζεται ως μία μεγάλη περιφερική μάζα με έντονα στοιχεία νέκρωσης. Η συμπεριφορά αυτών των όγκων ομοιάζει αυτής των φτωχά διαφοροποιημένων NSCLC. Έχουν αναγνωριστεί αρκετές παραλλαγές όπως π.χ. το μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα το οποίο έχει σημαντικές ομοιότητες με το μικροκυτταρικό καρκίνωμα [12].

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ NSCLC	
ΠΛΑΚΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ	Θηλώδες, Διαυγοκυτταρικό Μικροκυτταρικό, Βασικοειδές
ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ	Αδενοκαρκίνωμα μικτού υπότυπου Κυψελιδικό αδενοκαρκίνωμα Θηλώδες αδενοκαρκίνωμα Βρογχιολοκυψελιδικό καρκίνωμα Μη βλεννώδες, Βλεννώδες, Μικτό ή ακαθόριστο Συμπαγές αδενοκαρκίνωμα με παραγωγή βλέννης Εβρυϊκό αδενοκαρκίνωμα, Βλεννώδες (κολλοειδές) καρκίνωμα Βλεννώδες κυσταδενοκαρκίνωμα, Αδενοκαρκίνωμα «signet ring» Διαυγοκυτταρικό αδενοκαρκίνωμα
ΜΕΓΑΛΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ	Μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα Σύνθετο μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό Βασικοειδές Καρκίνωμα τύπου λεμφοεπιθηλιώματος Διαυγοκυτταρικό καρκίνωμα Μεγαλοκυτταρικό με ραβδοειδή φαινότυπο
ΑΔΕΝΟΠΛΑΚΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ	
ΣΑΡΚΩΜΑΤΟΕΙΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ	Πλειόμορφο καρκίνωμα, Ατρακτοκυτταρικό καρκίνωμα Γιγαντοκυτταρικό καρκίνωμα, Καρκινοσάρκωμα Πνευμονικό βλάστωμα
ΚΑΡΚΙΝΟΕΙΔΕΙΣ ΟΓΚΟΙ	Τυπικό καρκινοειδές, Άτυπο καρκινοειδές
ΟΓΚΟΙ ΤΥΠΟΥ ΣΙΕΛΟΓΟΝΩΝ ΑΔΕΝΩΝ	Βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα, Αδενοκυστικό καρκίνωμα Μυοεπιθηλιακό καρκίνωμα
ΠΡΟΔΙΗΘΗΤΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ	Πλακώδες καρκίνωμα in situ, Άτυπη αδενοματώδης υπερπλασία, Διάχυτη ιδιοπαθής πνευμονική νευροενδοκρινική υπερπλασία

Πίνακας 3: Ιστολογική ταξινόμηση του NSCLC κατά WHO/IASLC.

Το 2011, ένα επιτελείο αποτελούμενο από ειδικούς επιστήμονες διαφόρων κλάδων εκπροσωπώντας την International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), την American Thoracic Society (ATS) και την the European Respiratory Society (ERS) πρότειναν μία μείζονα αναθεώρηση του παραπάνω συστήματος ταξινόμησης [14]. Οι αλλαγές που έγιναν κυρίως επηρεάζουν την ταξινόμηση του αδενοκαρκινώματος και τον διαχωρισμό του από το καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων.

1.5 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Η πλειονότητα των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα έχουν προχωρημένη νόσο κατά τη διάγνωση. Αυτό μπορεί να αντανακλά την επιθετική βιολογία της νόσου, τη συχνή απουσία συμπτωμάτων μέχρι την εμφάνιση τοπικά προχωρημένης ή μεταστατικής νόσου και την έλλειψη αποτελεσματικών προληπτικών διαγνωστικών παρακλινικών εξετάσεων. Τα συμπτώματα μπορούν να προκύψουν από τις τοπικές εκδηλώσεις του όγκου, από την περιοχική ή απομακρυσμένη εξάπλωση ή από απομακρυσμένες συστηματικές επιδράσεις που δεν σχετίζονται με μεταστάσεις (παρανεοπλασματικά σύνδρομα). Περίπου τα τρία τέταρτα (75%) των ασθενών έχουν ένα ή περισσότερα συμπτώματα κατά τη διάγνωση της νόσου.

Υπάρχει ένα ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων λόγω των ενδοθωρακικών επιπτώσεων του όγκου, τα πιο συνηθισμένα εκ των οποίων είναι ο βήχας, η αιμόπτυση, ο πόνος στο στήθος και η δύσπνοια.

Ο βήχας είναι παρών στο 50 έως 75% των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα κατά την διάγνωση και εμφανίζεται πιο συχνά σε ασθενείς με καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων και μικροκυτταρικό καρκίνωμα, λόγω της τάσης τους να διηθούν τους κεντρικούς αεραγωγούς [15]. Η νέα ξαφνική εμφάνιση βήχα σε έναν καπνιστή ή πρώην καπνιστή πρέπει να εγείρει την υποψία του καρκίνου του πνεύμονα. Παραγωγικός βήχας με πολλές, λεπτές, βλεννώδεις εκκρίσεις μπορεί να είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα του βρογχοκυψελιδικό καρκινώματος και συνήθως δείχνει προχωρημένο στάδιο της νόσου. Τόσο το NSCLC όσο και το SCLC προκαλούν συχνά μετά-αποφρακτική πνευμονία. Ωστόσο, βρογχεκτασίες είναι ασυνήθιστες, γιατί ο καρκίνος του πνεύμονα εξελίσσεται συνήθως πολύ γρήγορα και δεν προλαβαίνουν να αναπτυχθούν βρογχεκτασίες. Αντίθετα, νεοπλάσματα με βραδύτερη ανάπτυξη όπως τα καρκινοειδή ή τα αμαρτώματα είναι πιο πιθανό να εμφανίσουν βρογχεκτασίες.

ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ - ΣΗΜΕΙΑ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ
Βήχας	50-75%
Απώλεια βάρους	0-68%
Δύσπνοια	25%
Θωρακικό άλγος	20%
Διόγκωση υπερκλειδίων λεμφαδένων	26-42%
Αιμόπτυση	25-50%
Οστικό άλγος	6-25%
Νευρολογικές εκδηλώσεις	4-21%
Πληκτροδακτυλία	0-20%
Πυρετός	0-20%
Βράγχος φωνής	3-13%
Αδυναμία	0-10%
Σύνδρομο άνω κοίλης φλέβας	0-4%
Δυσφαγία	0-2%
Συριγμός	0-2%

Πίνακας 4: Κλινικές εκδηλώσεις καρκίνου πνεύμονα κατά την διάγνωση.

Η αιμόπτυση έχει αναφερθεί στο 25 έως 50% ασθενών που έχουν διαγνωστεί με καρκίνο του πνεύμονα, παρόλο που η βρογχίτιδα είναι η πιο κοινή αιτία αυτού του συμπτώματος [15]. Οποιαδήποτε ποσότητα αιμόπτυσης μπορεί να είναι ανησυχητική για έναν ασθενή και μεγάλοι όγκοι αιμόπτυσης μπορεί να προκαλέσουν ασφυξία. Σε έναν ασθενή με αιμόπτυση, η πιθανότητα του καρκίνου του πνεύμονα κυμαίνεται από 3 έως 34% σε διαφορετικές σειρές ασθενών ανάλογα με την ηλικία και το ιστορικό καπνίσματος [16]. Σε καπνιστές με αιμόπτυση και φυσιολογική ακτινογραφία θώρακα, η βρογχοσκόπηση θα διαγνώσει τον καρκίνο του πνεύμονα σε περίπου 5% των περιπτώσεων [17].

Ο πόνος στο στήθος είναι παρών σε περίπου 20% των ασθενών που εμφανίζουν καρκίνο του πνεύμονα [15,18]. Μπορεί να έχει αρκετά μεταβλητό χαρακτήρα και είναι πιο συχνός στους νεότερους ασθενείς σε σύγκριση με τους μεγαλύτερους. Ο πόνος τυπικά εμφανίζεται στην ίδια πλευρά του θώρακα, με τον πρωτοπαθή όγκο. Αμβλύς, επίμονος πόνος μπορεί να προκύψει από το μεσοθωράκιο, τον υπεζωκότα ή επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα. Σημειωτέον ότι η παρουσία του πόνου δεν αποκλείει κατ' ανάγκη την εξαιρεσιμότητα του όγκου. Παρά το γεγονός ότι ο πλευριτικός πόνος μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της άμεσης συμμετοχής του υπεζωκότα, αποφρακτική πνευμονοπάθεια ή πνευμονική εμβολή που σχετίζονται με κατάσταση υπερπηκτικότητας μπορεί επίσης να προκαλέσει πόνο στο στήθος.

Η δύσπνοια είναι ένα κοινό σύμπτωμα σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα κατά τη στιγμή της διάγνωσης και εμφανίζεται σε περίπου 25% των ασθενών [15]. Δύσπνοια μπορεί να οφείλεται σε εξωγενή ή ενδοαυλική απόφραξη των αεραγωγών, αποφρακτική πνευμονοπάθεια ή ατελεκτασία, λεμφαγγειακή εξάπλωση του όγκου, εμβολή, πνευμοθώρακα, υπεζωκοτική συλλογή ή περικαρδιακή συλλογή με επιπωματισμό. Μερική απόφραξη των βρόγχων μπορεί να προκαλέσει εντοπισμένο συριγμό, αντιληπτό από τον ασθενή ή από τον ιατρό κατά την ακρόαση, ενώ συριγμός μπορεί να προκύψει και από απόφραξη των μεγαλύτερων αεραγωγών.

Μονόπλευρη παράλυση του διαφράγματος μπορεί να οφείλεται σε βλάβη του φρενικού νεύρου. Οι ασθενείς μπορεί να είναι ασυμπτωματικοί ή να αναφέρουν δύσπνοια. Σε μια σειρά ασθενών, ο καρκίνος του πνεύμονα είναι το πιο κοινό νεόπλασμα που επηρεάζει το φρενικό νεύρο, αν και η κακοήθεια αντιπροσωπεύει μόνο το 4% των ασθενών που παρουσιάζουν παράλυση του διαφράγματος [19].

Το βράγχος φωνής είναι μια άλλη σημαντική κλινική εκδήλωση και η διαφορική διάγνωση της σε έναν καπνιστή περιλαμβάνει τόσο τον καρκίνο του λάρυγγα όσο και τον καρκίνο του πνεύμονα. Σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, αυτό οφείλεται στην διήθηση του παλίνδρομου λαρυγγικού νεύρου κατά μήκος της διαδρομής του κάτω από το αορτικό τόξο και πίσω από το λάρυγγα [20,21].

Το σύνδρομο και η απόφραξη της άνω κοίλης φλέβας (SVC), προκαλεί συμπτώματα που περιλαμβάνουν συνήθως μια αίσθηση πληρότητας στο κεφάλι και δύσπνοια. Βήχας, πόνος και δυσφαγία είναι λιγότερο συχνά. Φυσικά ευρήματα περιλαμβάνουν διατεταμένες φλέβες στον τράχηλο, μια εξέχουσα φλεβική εμφάνιση στο στήθος, οίδημα του προσώπου, καθώς και μια πληθωρική εμφάνιση. Η ακτινογραφία θώρακος δείχνει συνήθως διεύρυνση του μεσοθωρακίου ή δεξιά πυλαία μάζα. Η CT μπορεί να εντοπίσει συχνά την αιτία, το επίπεδο της απόφραξης, και την έκταση της παράπλευρης φλεβικής παροχέτευσης [22]. Το σύνδρομο άνω κοίλης

φλέβας είναι πιο συχνό σε ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα από ότι με NSCLC. Για τους περισσότερους ασθενείς που έχουν το σύνδρομο αυτό εξαιτίας καρκίνου του πνεύμονα, τα συμπτώματα υποχωρούν μετά τη θεραπεία του όγκου.

Όγκοι του πνεύμονα που αναπτύσσονται στην ανώτερη αύλακα προκαλούν το χαρακτηριστικό σύνδρομο Pancoast που εκδηλώνεται με πόνο (συνήθως στον ώμο και λιγότερο συχνά στο αντιβράχιο, την ωμοπλάτη και τα δάκτυλα), σύνδρομο Horner, οστική καταστροφή, και ατροφία των μυών του χεριού. Το σύνδρομο Pancoast πιο συχνά προκαλείται από NSCLC (τυπικά πλακώδη κύτταρα) και σπάνια από SCLC.

Ο καρκίνος του πνεύμονα μπορεί να εξαπλωθεί και σε οποιοδήποτε σημείο και όργανο του σώματος. Μεταστατική εξάπλωση μπορεί να οδηγήσει στα αρχικά συμπτώματα εμφάνισης και διάγνωσης της νόσου ή μπορεί να συμβεί αργότερα κατά την πορεία αυτής. Οι πιο συχνές θέσεις απομακρυσμένων μεταστάσεων είναι το ήπαρ, τα επινεφρίδια, τα οστά και ο εγκέφαλος.

1.6 ΠΑΡΑΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Τα παρανεοπλασματικά φαινόμενα και οι παρανεοπλασματικές εκδηλώσεις των νεοπλασμάτων είναι οι συστηματικές εκδηλώσεις που δε σχετίζονται με άμεση διήθηση, απόφραξη ή μετάσταση από τον όγκο.

Η υπερασβεστιαμία σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα μπορεί να προκύψει από μια οστική μετάσταση ή λιγότερο συχνά από έκκριση από τον όγκο μιας πρωτεΐνης σχετιζόμενη με την παραθορμόνη (PTHrP), καλσιτριόλης ή άλλων κυτταροκινών, συμπεριλαμβανομένων των παραγόντων ενεργοποίησης των οστεοκλαστών. Περίπου το 6% ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα είχαν υπερασβεστιαμία και μεταξύ αυτών το πλακώδες καρκίνωμα, το αδenoκαρκίνωμα, και το SCLC ήταν υπεύθυνα στο 51, 22, και 15% των περιπτώσεων, αντιστοίχως [23]. Οι περισσότεροι ασθενείς με υπερασβεστιαμία έχουν προχωρημένη νόσο (στάδιο III ή IV) και μια μέση επιβίωση μερικών μηνών μόνο [23]. Τα συμπτώματα της υπερασβεστιαμίας περιλαμβάνουν ανορεξία, ναυτία, έμετο, δυσκοιλιότητα, λήθαργο, πολυουρία, πολυδιψία και αφυδάτωση. Σύγχυση και κόμα αποτελούν καθυστερημένες εκδηλώσεις, όπως και η νεφρική ανεπάρκεια και η νεφρασβέστωση. Συμπτωματικοί ασθενείς που έχουν ασβεστίου ορού >12 mg/dL (3 mmol/L) απαιτούν θεραπεία που περιλαμβάνει την ενυδάτωση και διφωσφονικά [24].

Το σύνδρομο απρόσφορης έκκρισης αντιδιουρητικής ορμόνης (SIADH) συχνά προκαλείται από SCLC και οδηγεί σε υπονατριάμια. Περίπου 10% των ασθενών που έχουν SCLC εμφανίζουν SIADH [25,26]. Το μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα αντιπροσωπεύει περίπου το 75% του συνόλου των κακοηθειών που σχετίζονται με το SIADH. Η σοβαρότητα των συμπτωμάτων σχετίζονται με το βαθμό της υπονατριάμιας και την ταχύτητα της πτώσης του νατρίου του ορού. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν ανορεξία, ναυτία και έμετο. Εγκεφαλικό οίδημα μπορεί να συμβεί με την ταχεία διόρθωση της υπονατριάμιας. Τα συμπτώματα που προκαλούνται από το εγκεφαλικό οίδημα μπορεί να περιλαμβάνουν ευερεθιστότητα, ανησυχία, αλλαγές στην προσωπικότητα, σύγχυση, κώμα, σπασμούς και αναπνευστική ανακοπή. Η θεραπεία του SIADH βασίζεται στην θεραπεία της κακοήθειας. Στην πλειοψηφία των ασθενών με SCLC, η υπονατριάμια θα υποχωρήσει εντός εβδομάδων από την έναρξη της χημειοθεραπείας [27].

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η πιο κοινή μορφή καρκίνου που σχετίζεται με παρaneoπλασματικά νευρολογικά σύνδρομα. Χαρακτηριστικά αυτά συνδέονται κυρίως με το SCLC. Τα παρaneoπλασματικά νευρολογικά σύνδρομα πιστεύεται ότι σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα και σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν εντοπιστεί και αυτοαντισώματα. Αυτές οι ποικίλες νευρολογικές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν το σύνδρομο μυασθένειας Lambert-Eaton (LEMS), την παρεγκεφαλιδική αταξία, την αισθητική νευροπάθεια, την μεταιχμιακή εγκεφαλίτιδα, την εγκεφαλομυελίτιδα, την αυτόνομη νευροπάθεια και την αμφιβληστροειδοπάθεια [28]. Η πιο κοινή από αυτές είναι το LEMS, το οποίο μπορεί να εμφανιστεί σε περίπου 3% των ασθενών με SCLC [29]. Τα νευρολογικά συμπτώματα του LEMS προηγούνται της διάγνωσης του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα σε περισσότερο από το 80% των περιπτώσεων, συχνά από μήνες έως χρόνια. Το 70% των ασθενών που έχουν SCLC και ένα σχετικό παρaneoπλασματικό νευρολογικό σύνδρομο έχουν συνήθως νόσο περιορισμένου σταδίου [30]. Η διαπίστωση ενός παρaneoπλασματικού αυτοαντισώματος σε ασθενείς που παρουσιάζουν ένα νευρολογικό σύνδρομο θα πρέπει να οδηγήσει σε διερεύνηση για κακοήθεια. Μια αξονική τομογραφία θώρακος ενδείκνυται σε καπνιστές που έχουν μια υποψία παρaneoπλασματικού νευρολογικού συνδρόμου. Εάν η αξονική τομογραφία θώρακος είναι αρνητική, τότε το PET μπορεί να είναι χρήσιμο στον προσδιορισμό της θέσης ενός νεοπλασματος. Ακόμη και ήπιες ανωμαλίες των πνευμόνων ή του μεσοθωρακίου απαιτούν βιοψία σε αυτή την περίπτωση [31]. Τα παρaneoπλασματικά νευρολογικά σύνδρομα γενικά δεν βελτιώνονται με την ανοσοκατασταλτική θεραπεία. Ωστόσο, τα συμπτώματα μπορούν να σταθεροποιηθούν μετά την ανταπόκριση του υποκείμενου νεοπλασματος στη χημειοθεραπεία.

Ενδοκρινικά Σύνδρομο Cushing Μη μεταστατική υπερασβεστιαμία Σύνδρομο άμετρης έκκρισης ADH Γυναικομαστία Αυξημένη καλσιτονίνη* Αυξημένη FSH, LH* Υπογλυκαιμία* Υπερθυρεοειδισμός* Καρκινοειδές σύνδρομο*	Δερματικά Επίκτητη χνοώδης υπερτρίχωση Γυροειδές ερύθημα Ερυθροδερμία (αποφολιδωτική δερματίτιδα) Μελανίζουσα ακάνθωση* Επίκτητη ιχθύωση Επίκτητη κερατοδερμία παλαμών και πελμάτων* Κνησμός, κνίδωση*
Νευρολογικά Υποξεία αισθητική νευροπάθεια Πολλαπλή μονονευρίτιδα Εντερική ψευδοαπόφραξη* Εγκεφαλομυελίτιδα* Νεκρωτική μυελοπάθεια* Παρανεοπλασματική αμφιβληστροειδοπάθεια*	Αιματολογικά Αναιμία Λευκοκυττάρωση, εωσινοφιλία* Λευχαιμοειδείς αντιδράσεις* Θρομβοκυττάρωση Θρομβοκυτταροπενική πορφύρα*
Μεταβολικά Γαλακτική οξέωση* Υπερουριχαιμία* Υπεραμυλσσαιμία*	Διαταραχές πήξης Διάχυτη ενδαγγειακή πήξη* Θρομβοφλεβίτιδα Θρομβωτική μη βακτηριακή ενδοκαρδίτιδα*
Σκελετικά Πληκτροδακτυλία Υπερτροφική οστεοαρθροπάθεια	Συστηματικά Πυρετός Ανορεξία, καχεξία Ορθοστατική υπόταση* Υπέρταση
Νεφρικά Σπειραματονεφρίτιδα* Νεφρωσικό σύνδρομο*	Κολλαγονικά – Αγγειακά Δερματομυοσίτιδα Πολυμυοσίτιδα* Συστηματικός ερυθματώδης λύκος* Αγγειίτιδα*
* Ασυμπίσιμη εκδήλωση	

Πίνακας 5: Παρανεοπλασματικές εκδηλώσεις στον καρκίνο του πνεύμονα.

Οι παρανεοπλασματικές αιματολογικές εκδηλώσεις είναι μια σειρά από αιματολογικές ανωμαλίες που παρατηρούνται σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. Αυτές περιλαμβάνουν τα ακόλουθα: α) η αναιμία είναι συχνή σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και μπορεί να συμβάλλει στην κόπωση και τη δύσπνοια. Η αναιμία μπορεί να οφείλεται σε μια σειρά από αιτίες, συμπεριλαμβανομένης και της θεραπείας [32]. β) η λευκοκυττάρωση σχετιζόμενη με τον όγκο βρέθηκε στο 15% μιας σειράς ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Σχεδόν όλοι είχαν NSCLC και η λευκοκυττάρωση θεωρήθηκε ότι οφείλεται σε υπερπαραγωγή παράγοντα διέγερσης αποικίων κοκκιοκυττάρων (G-CSF) [33]. Η λευκοκυττάρωση σε συσχέτιση με τον καρκίνο του πνεύμονα σχετίζεται με κακή πρόγνωση και έχει επίσης σχετιστεί με

υπερασβεστιασμία [23,33]. γ) η θρομβοκυττάρωση είναι συχνή και ίσως παρούσα στο 14% των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα [34]. Η θρομβοκυττάρωση κατά την εμφάνιση της νόσου έχει αναγνωριστεί ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης μειωμένης επιβίωσης [35]. δ) η ηωσινοφιλία σε κάποιον ιστό ή στο αίμα είναι σπάνια, αλλά έχει αναφερθεί σε ασθενείς με μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα. ε) οι διαταραχές πήξης του αίματος έχουν συσχετισθεί με τον καρκίνο του πνεύμονα αλλά και με άλλες κακοήθειες. Αυτές οι διαταραχές υπερπηκτικότητας περιλαμβάνουν: σύνδρομο Trousseau's (μεταναστευτική επιπολής θρομβοφλεβίτιδα), εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση και θρομβοεμβολή, διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη, θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια και τη μη θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια.

Η υπερτροφική πνευμονική οστεοαρθροπάθεια (HPO) ορίζεται από την παρουσία της πληκτροδακτυλίας (clubbing) και του περιοστεϊκού πολλαπλασιασμού των οστών που σχετίζεται με τον καρκίνο του πνεύμονα ή άλλη ασθένεια των πνευμόνων. Κλινικά, η HPO χαρακτηρίζεται από μια συμμετρική, επώδυνη αρθροπάθεια, που συνήθως περιλαμβάνει τους αστραγάλους, τα γόνατα, τους καρπούς και τους αγκώνες. Τα μετακάρπια, τα μετατάρσια και οι φάλαγγες των οστών μπορεί επίσης να εμπλέκονται. Μια ακτινογραφία των μακρών οστών (δηλαδή κνήμη και περόνη) δείχνει χαρακτηριστικό περιοστικό σχηματισμό νέου οστού σε ασθενείς με HPO. Ένα σπινθηρογράφημα οστών ή PET τυπικά καταδεικνύει διάχυτη πρόσληψη από τα μακρά οστά. Τα συμπτώματα της HPO μπορεί να υποχωρήσουν μετά από θεραπεία του όγκου. Για τους ασθενείς που δε δύναται να χειρουργηθούν, η συνήθης θεραπεία είναι μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη ή διφωσφονικά [36].

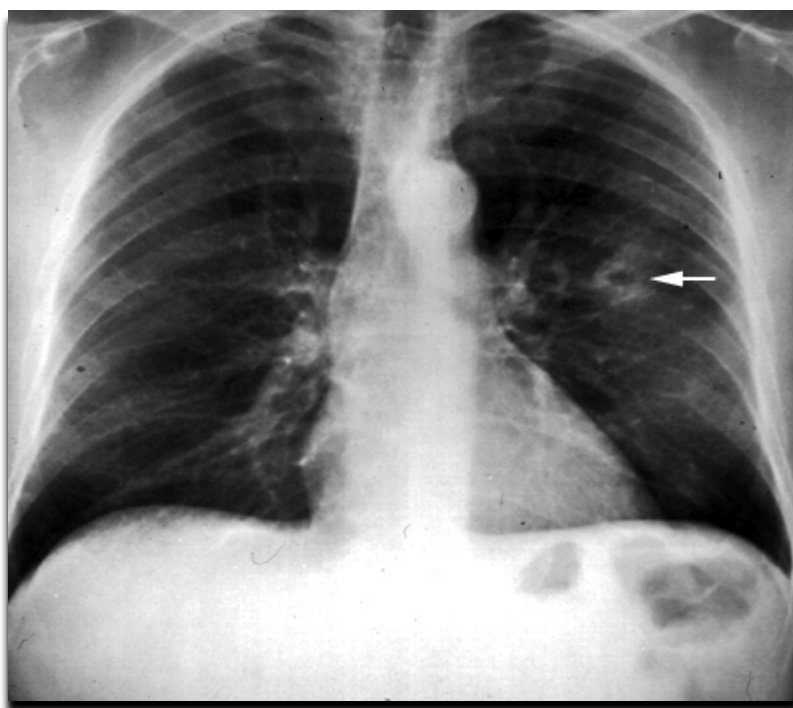
Η δερματομυοσίτιδα και πολυμυοσίτιδα είναι δύο διακριτές μορφές φλεγμονώδους μυοπάθειας, οι οποίες εκδηλώνονται κλινικά με μυϊκή αδυναμία, αμφοτέρως. Αυτές οι φλεγμονώδεις μυοπάθειες μπορεί να είναι το πρώτο κλινικό σύμπτωμα σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα ή μπορεί να αναπτυχθούν αργότερα κατά την πορεία της νόσου. Εκτός από τον καρκίνο του πνεύμονα, άλλοι πρωτοπαθείς όγκοι που συνδέονται συχνά με αυτές τις διαταραχές περιλαμβάνουν την ωοθήκη, τον τράχηλο, το πάγκρεας, την ουροδόχο κύστη και τον στόμαχο.

Η έκτοπη παραγωγή της αδρενοκορτικοτροπικής ορμόνης (ACTH) μπορεί να προκαλέσει το σύνδρομο Cushing. Οι ασθενείς συνήθως παρουσιάζουν μυϊκή αδυναμία, απώλεια βάρους, υπέρταση, υπερτρίχωση, οστεοπόρωση και συνήθως υποκαλιαιμική αλκάλωση και υπεργλυκαιμία. Το σύνδρομο Cushing είναι σχετικά συχνό σε ασθενείς με SCLC και με καρκινοειδές του πνεύμονα καθώς και σε εξωθωρακικές κακοήθειες [37]. Οι ασθενείς με

σύνδρομο Cushing και SCLC φαίνεται να έχουν χειρότερη πρόγνωση από τους ασθενείς με SCLC χωρίς σύνδρομο Cushing [37-39].

1.7 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Όταν είναι πιθανή η διάγνωση του NSCLC θα πρέπει ο ασθενής να υποβληθεί σε ενδελεχή έλεγχο για να επιβεβαιωθεί η διάγνωση, να αναγνωριστεί ο ιστολογικός τύπος και να καθοριστεί το στάδιο της νόσου. Η σταδιοποίηση της νόσου αποτελεί μέτρο της έκτασης της νόσου, το οποίο χρησιμοποιείται για να καθοριστεί η πρόγνωση και ο τρόπος αντιμετώπισης.



Εικόνα 2: Ακτινογραφία θώρακα που δείχνει χωροκατακτητική εξεργασία στον αριστερό πνεύμονα.

Σε όλους του ασθενείς με πιθανό NSCLC, θα πρέπει να υπάρχει ένα πλήρες και λεπτομερές ιστορικό καθώς και μια λεπτομερής και ολοκληρωμένη κλινική εξέταση. Σκοπός του ιστορικού και της κλινικής εξέτασης είναι να αναγνωριστούν συμπτώματα ή σημεία τα οποία να υποδηλώνουν τοπική ή μεταστατική επέκταση της νόσου, να εκτιμηθεί η λειτουργική κατάσταση των πνευμόνων, να εντοπιστούν σημαντικοί παράγοντες συνοσηρότητας και να

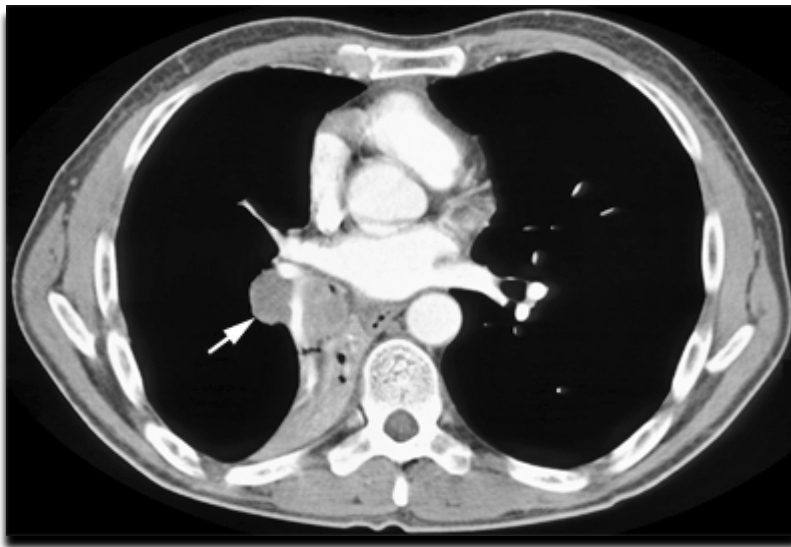
εκτιμηθεί η γενική κατάσταση της υγείας του ασθενούς. Το κάθε ένα από τα παραπάνω επηρεάζει την επιλογή της μεθόδου θεραπευτικής αντιμετώπισης, την ικανότητα του ασθενή να ανεχθεί τη θεραπεία καθώς και την πορεία της νόσου ανεξάρτητα από το στάδιο [40-42].

Τα περισσότερα συμπτώματα και σημεία (π.χ. βήχας, αιμόπτυση, μεταποφρακτική πνευμονία) είναι μη ειδικά: α) συστηματικά συμπτώματα, όπως απώλεια βάρους, ανορεξία, καταβολή, πυρετός ή κατάθλιψη, β) νεοεμφανιζόμενη ή επιδεινούμενη δύσπνοια μπορεί να οφείλεται σε κακοήγη προσβολή του υπεζωκότα (M1a νόσος), γ) πόνος στα οστά (π.χ. πλευρές, ράχη) μπορεί να οφείλεται σε οστικές μεταστάσεις (M1b νόσος) και ο πόνος είναι στην περίπτωση αυτή συνήθως καλά εντοπισμένος, συνεχής και έντονος, δ) δυσφαγία μπορεί να παρουσιαστεί λόγω μεγάλης λεμφαδενικής διήθησης (N2 ή N3 νόσος) ή λόγω προσβολής του οισοφάγου (T4 νόσος), ε) νευρολογικά συμπτώματα (π.χ. κεφαλαλγίες, συγκοπικά επεισόδια, αδυναμία, γνωσιακά ελλείμματα) μπορεί να οφείλονται σε νευρολογική μετάσταση (M1b νόσος), στ) σύνδρομο Horner (ετερόπλευρη βλεφαρόπτωση, ανιδρωσία, μύση) μπορεί να προκληθεί λόγω προσβολής του τελευταίου αυχενικού ή του πρώτου θωρακικού τμήματος του συμπαθητικού στελέχους (T4 νόσος), ζ) βράγχος φωνής μπορεί να οφείλεται σε παγίδευση του αριστερού παλίνδρομου λαρυγγικού νεύρου (T4, N2 ή N3 νόσος), η) περικαρδιακός επιπωματισμός μπορεί να προκληθεί μετά από προσβολή του περικαρδίου (T4 νόσος) ή λόγω κακοήθους περικαρδιακής απόφραξης (M1a νόσος) και η εκδήλωση των συμπτωμάτων περιλαμβάνει δύσπνοια, στηθαγχικά ενοχλήματα ή αίσθημα διάτασης, περιφερικά οιδήματα και υπερκοιλιακή ταχυκαρδία ακολουθούμενα από φλεβική τραχηλική διάταση και παράδοξο σφυγμό, θ) διογκωμένοι υπερκλείδιοι και σκαληνοί λεμφαδένες μπορεί να οφείλονται σε μεταστατική νόσο (N3 νόσος) και ι) ηπατομεγαλία ή άλγος στο δεξιό άνω τεταρτημόριο του κορμού μπορεί να οφείλονται σε ηπατικές μεταστάσεις (M1b νόσος).

Όλοι οι ασθενείς με NSCLC θα πρέπει να ελέγχονται με γενική αίματος, ηλεκτρολύτες ορού, ασβέστιο ορού, αλκαλική φωσφοτάση, αλβουμίνη, ALT, AST, ολική χολερυθρίνη και κρεατινίνη [43]. Σκοπός των εργαστηριακών εξετάσεων είναι να αναγνωρίσουν μεταβολές που μπορεί να οφείλονται σε εντοπισμένη ή μεταστατική νόσο.

Οι καρκινικοί δείκτες του ορού ή στον νεοπλασματικό ιστό έχουν προγνωστική σημασία σε ορισμένες περιπτώσεις [44-46]. Ομοίως, η χρήση γενετικών αναλύσεων και μοριακών εξετάσεων του όγκου για την ανίχνευση συγκεκριμένων μεταλλάξεων ή για τον καθορισμό έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων μπορεί να εκτιμήσει πιθανές βιολογικές συμπεριφορές της νόσου και γενικότερα να συμβάλουν στην μοριακή τυποποίηση της νόσου [47]. Οι καρκινικοί

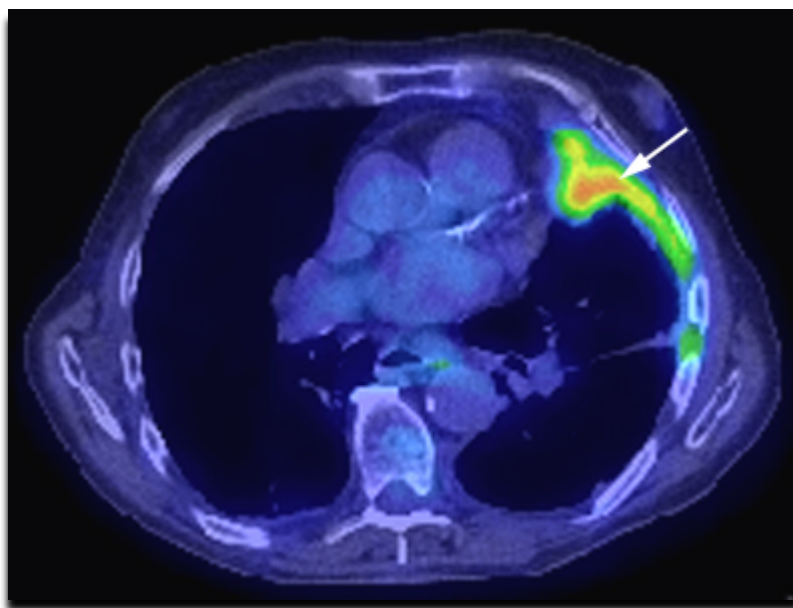
δείκτες τον ορό του αίματος έχει αποδειχτεί ότι δεν έχουν μεγάλη κλινική χρησιμότητα στους ασθενείς με NSCLC και δεν συστήνεται η διενέργειά τους ως εξετάσεις ρουτίνας.



Εικόνα 3: CT θώρακος στην οποία φαίνεται μια χωροκατακτητική εξεργασία στον δεξιό πνεύμονα.

Όλοι οι ασθενείς με πιθανό NSCLC θα πρέπει να υποβάλλονται σε αξονική τομογραφία με χρήση σκιαγραφικού μέσου αντίθεσης (contrast-enhanced CT) η οποία θα περιλαμβάνει τους πνεύμονες, το ήπαρ και τα επινεφρίδια. Η CT αποτελεί την εξέταση εκλογής για την σταδιοποίηση της νόσου με το σύστημα TNM γιατί μπορεί να περιγράψει τον όγκο και να καθορίσει τη σχέση του με το θωρακικό τοίχωμα και τις δομές του μεσοθωρακίου, μπορεί να αναγνωρίσει λεμφαδένες του μεσοθωρακίου οι οποίοι είναι διογκωμένοι και ύποπτοι για συσχέτιση με κακοήθεια και τέλος μπορεί να ανιχνεύσει οζίδια στον άλλο πνεύμονα, στο θωρακικό τοίχωμα ή στην άνω κοιλία οι οποίες αποτελούν πιθανές μεταστατικές εστίες.

Οι περισσότεροι ασθενείς χρειάζεται να υποβληθούν σε περισσότερες απεικονιστικές εξετάσεις. Ανάμεσα σε αυτές περιλαμβάνονται η CT κοιλίας και εγκεφάλου, η μαγνητική τομογραφία (MRI), το σπινθηρογράφημα οστών, η ολοσωματική ποζιτρονική υπολογιστική τομογραφία (PET) και η Ποζιτρονική Αξονική Τομογραφία (PET/CT). Τα ευρήματα των απεικονιστικών εξετάσεων θα πρέπει να επιβεβαιώνονται με λήψη ιστικής βιοψίας [48]. Εξαίρεση αποτελεί όταν από μόνη της η απεικονιστική μέθοδος θέτει διάγνωση μεταστατικής νόσου λόγω ισχυρών απεικονιστικών ενδείξεων και λαμβάνοντας υπόψιν το ήδη γνωστό ιστορικό της διάγνωσης του NSCLC.



Εικόνα 4: PET-CT που δείχνει μια μεταβολικά ενεργή εξεργασία στον αριστερό πνεύμονα.

Το NSCLC δεν μπορεί να διαγνωσθεί ή να σταδιοποιηθεί με ακρίβεια χωρίς τη χρήση επεμβατικών μεθόδων. Τα ιστοπαθολογικά αποτελέσματα μέσω λήψης βιοψίας είναι απολύτως απαραίτητα και η λήψη βιοψίας από τον πρωτοπαθή όγκο αποτελεί βασική διαγνωστική μέθοδο. Επιπλέον, η λήψη ιστού από παθολογικές εστίες που μπορεί να σχετίζονται με μεταστατική επέκταση της νόσου (π.χ. διογκωμένοι λεμφαδένες, προσβολή του υπεζωκότα) μπορεί να είναι διαγνωστική αλλά και να συμβάλει στην σταδιοποίηση της νόσου.

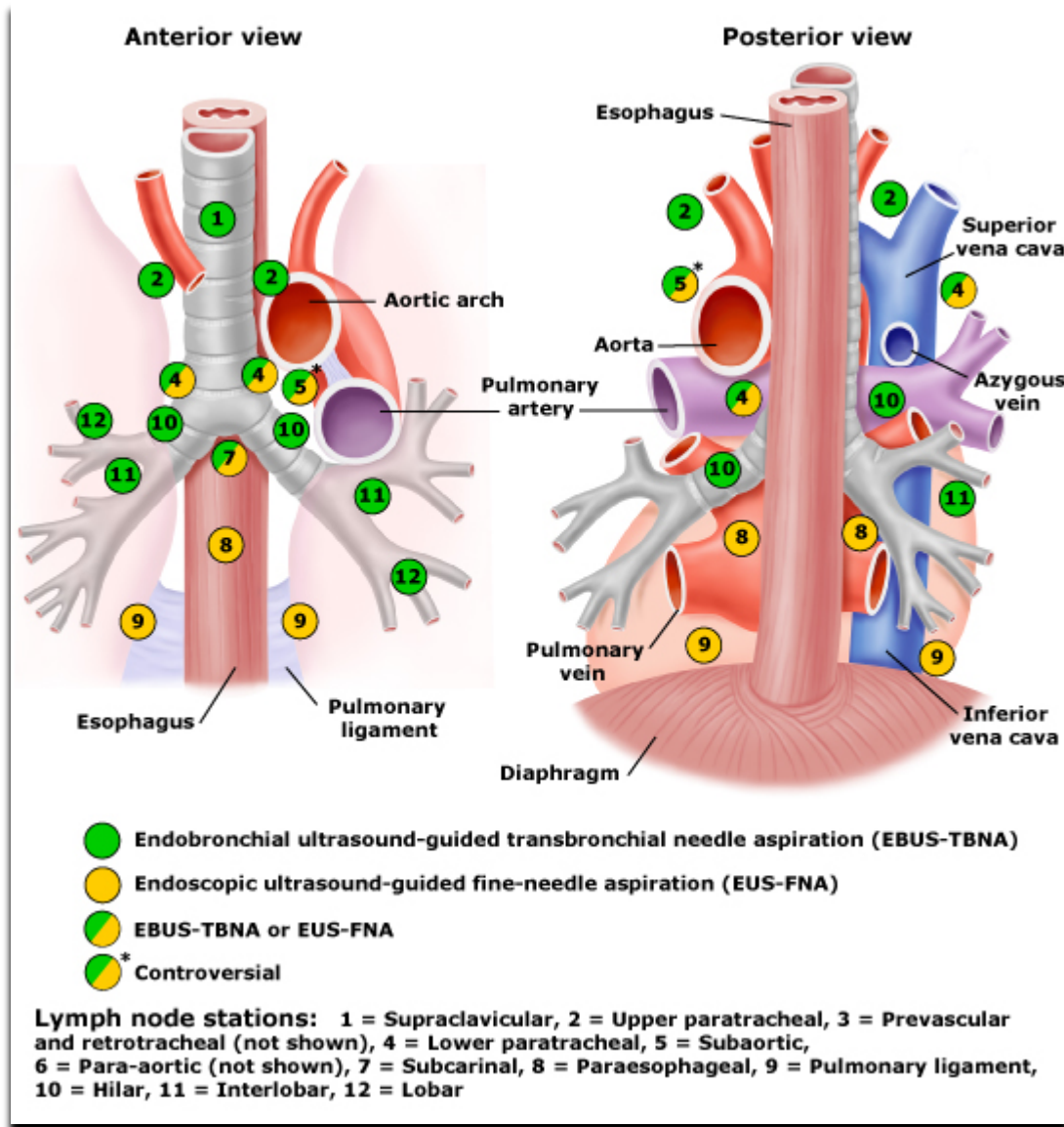
Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για τη λήψη βιοψίας από τον πρωτοπαθή όγκο: α) διαδερμική παρακέντηση ή λήψη βιοψίας υπό ακτινολογική καθοδήγηση, β) υπό ενδοβρογχικό υπερηχογράφημα (EBUS) καθοδηγούμενη δια βελόνης αναρρόφηση, γ) λήψη βιοψίας υπό τη χρήση συμβατικού εύκαμπτου βρογχοσκοπίου, κλειστή διαβρογχική δια βελόνης αναρρόφηση (TBNA) ή συνδυασμός τους και δ) λήψη βιοψίας υπό τη χρήση ηλεκτρομαγνητικά καθοδηγούμενου βρογχοσκοπίου (ENB). Η διαδερμική παρακέντηση ή λήψη βιοψίας υπό ακτινολογική καθοδήγηση έχουν συνήθως μεγαλύτερη διαγνωστική ακρίβεια. Ωστόσο, οι βρογχοσκοπικές τεχνικές επιτρέπουν την εκτίμηση και τη λήψη δειγμάτων από λεμφαδένες του μεσοθωρακίου κατά την διενέργειά τους. Μεταξύ των βρογχοσκοπικών τεχνικών, η υπό ενδοβρογχικό υπερηχογράφημα (EBUS) καθοδηγούμενη δια βελόνης αναρρόφηση φαίνεται να υπερτερεί από την υπό τη χρήση συμβατικού εύκαμπτου βρογχοσκοπίου λήψη βιοψίας για μικρούς όζους (<3cm), αλλά έχουν την ίδια ακρίβεια στους μεγαλύτερους όζους [49]. Η λήψη βιοψίας υπό τη χρήση ηλεκτρομαγνητικά καθοδηγούμενου βρογχοσκοπίου (ENB) είναι μία

πολλά υποσχόμενη τεχνική για τη δειγματοληψία από μικρούς όζους, όταν εκτελείται από έναν έμπειρο ιατρό [50]. Η επιλογή της κατάλληλης τεχνικής δειγματοληψίας θα πρέπει να γίνεται αφού ληφθούν υπόψη η εντόπιση του όγκου (κεντρική ή περιφερική), η ασφαλής προσπέλαση, η ευκολία λήψης του δείγματος, η προσβασιμότητα, η εξειδίκευση ανά κέντρο και η διαγνωστική ακρίβεια.

Ασθενείς που εμφανίζουν πολλαπλή συνοσηρότητα ή έχουν αντενδείξεις για επεμβατική λήψη βιοψίας, θα πρέπει να υποβάλλονται σε κυτταρολογική εξέταση πτυέλων, ειδικά για κεντρικά ευρισκόμενους όγκους. Τα κυτταρολογικά δείγματα θεωρούνται το ίδιο αξιόπιστα όσο και τα ιστοπαθολογικά για την διάγνωση του NSCLC, αλλά είναι θετικά μόνο στο 20-25% των ασθενών με διαγνωσμένο καρκίνο του πνεύμονα [51].

Χειρουργικές και μη χειρουργικές προσεγγίσεις ή και οι δύο μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη λήψη δείγματος ιστού από ασθενείς με πιθανούς μεταστατικά διηθημένους λεμφαδένες. Η επιτυχής εφαρμογή των μη χειρουργικών προσεγγίσεων μπορεί να παρακάμψει την ανάγκη για τη χειρουργική σταδιοποίηση της νόσου. Οι μη χειρουργικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την αναρρόφηση δια βελόνης ή τη βιοψία δια βελόνης για την δειγματοληψία από περιφερικά ευρισκόμενους λεμφαδένες και την EBUS-καθοδηγούμενη TBNA, την ενδοσκοπική διοισοφάγειο υπερηχογραφική δια βελόνης αναρρόφηση (EUS-FNA) ή την συμβατική βρογχοσκόπηση με κλειστή TBNA για τη λήψη δείγματος από λεμφαδένες του μεσοθωρακίου.

Οι χειρουργικές προσεγγίσεις περιλαμβάνουν την μεσοθωρακοσκόπηση και την θωρακοσκόπηση. Η αυχενική μεσοθωρακοσκόπηση αποτελεί μία χειρουργική επέμβαση η οποία μπορεί να εκτελεστεί με ελάχιστες επιπλοκές. Ανιχνεύει πιθανούς μεταστατικούς λεμφαδένες από τις παρακάτω λεμφαδενικές ομάδες με υψηλό ποσοστό ευαισθησίας: άνω, δεξιούς και αριστερούς παρατραχειακούς ύπερθεν του αορτικού τόξου. Δυνητικά μπορεί να είναι προσπελάσιμοι και οι αριστεροί παρατραχειακοί λεμφαδένες, οι πρόσθιοι υποτροπιδικοί και αμφοτερόπλευροι οι πυλαίοι λεμφαδένες [52]. Η πλειονότητα των ασθενών με NSCLC δεν θα χρειαστούν ή δεν χρήζουν μεσοθωρακοσκόπησης [53]. Ωστόσο, η υψηλή διαγνωστική της ακρίβεια, η ασφάλεια και το ότι είναι εύκολα ανεκτή από τον ασθενή κάνουν την αυχενική μεσοθωρακοσκόπηση μια λογική επιλογή στην προσπάθεια της λεμφαδενικής σταδιοποίησης.



Εικόνα 5: Χαρτογράφηση λεμφαδένων σύμφωνα με την International Association for the Study of Lung Cancer – IASLC (τροποποίηση από Karl W Thomas et al, UpToDate 2012).

Η αριστερή παραστερνική πρόσθια μεσοθωρακοσκόπηση (επέμβαση Chamberlain) αποτελεί μία εναλλακτική χειρουργική προσέγγιση για τη σταδιοποίηση των λεμφαδένων του μεσοθωρακίου. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη λήψη δείγματος από τις ακόλουθες λεμφαδενικές ομάδες του μεσοθωρακίου: αριστερά παρατραχειακά, παραορτικά, υποαορτικά και υποτροπιδικά. Η θωρακοσκόπηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη λήψη δειγμάτων από την άζυγο, υποαορτικά, παραορτικά, παραισοφαγικά ή από τους λεμφαδένες του πνευμονικού συνδέσμου. Επιπλέον, η θωρακοσκόπηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της επέκτασης του πρωτοπαθούς όγκου, ιδιαίτερα όταν είναι πιθανή η προσβολή του μεσοθωρακίου, του θωρακικού τοιχώματος ή του υπεζωκότα διότι η άμεση οπτική επισκόπηση

των ύποπτων περιοχών δίνει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα από τις απεικονιστικές εξετάσεις [54,55].

Η ύπαρξη πλευριτικής συλλογής αφορά το 1/3 των ασθενών με NSCLC τη στιγμή της διάγνωσης [43]. Ενώ μερικές συλλογές μπορεί να είναι παραπνευμονικές ή από παρακείμενα όργανα, οι περισσότερες οφείλονται σε κακοήγη επέκταση της νόσου στον υπεζωκότα (νόσος M1a). Η επιβεβαίωση ότι μία πλευριτική συλλογή είναι κακοήγης είναι εξαιρετικά σημαντική σε όλους τους ασθενείς με NSCLC, αν αυτό το εύρημα επηρεάζει το στάδιο της νόσου. Η κυτταρολογική εξέταση 50 με 100ml πλευριτικού υγρού το οποίο έχει ληφθεί από θωρακοκέντηση θα αναγνωρίσει περίπου το 65% των κακοήθων συλλογών [43].

1.8 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Απαραίτητα για τον καθορισμό του σταδίου της νόσου είναι το ιστορικό, η κλινική εξέταση, οι εργαστηριακές εξετάσεις, οι απεικονιστικές και ιστολογικές εξετάσεις. Η σταδιοποίηση βασίζεται στο σύστημα σταδιοποίησης TNM (Tumor Node Metastasis – TNM), το οποίο αξιολογεί τα χαρακτηριστικά του πρωτοπαθούς όγκου (T), την παρουσία ή απουσία επιχώριων μεταστατικά διηθημένων λεμφαδένων (N) και την παρουσία ή απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (M) [56,57]. Ο συνδυασμός της βαθμολογίας για το T, το N και το M καθορίζει το τελικό στάδιο της νόσου (στάδιο I ως IV).

Η 7^η έκδοση του συστήματος σταδιοποίησης TNM είναι η πιο πρόσφατη εκδοχή του, η οποία αντικατέστησε την 6^η έκδοση από το 2010 [58]. Η βασική αλλαγή της 7^{ης} έκδοσης είναι η επανακατηγοριοποίηση των κακοήθων πλευριτικών συλλογών και των μεμονωμένων δορυφόρων ενδοπνευμονικών εστιών. Οι υπόλοιπες αλλαγές περιλαμβάνουν διαφορετικές τιμές στα μεγέθη και νέες υποκατηγοριοποιήσεις των T1 (σε T1a και T1b), T2 (σε T2a και T2b) και M1 (σε M1a και M1b).

ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΟΓΚΟΣ (T)	
T_x	Πρωτοπαθής όγκος που δεν απεικονίζεται αλλά διαπιστώνεται με κυτταρολογική πτυέλων ή brushing ή washing.
T₀	Χωρίς παρουσία πρωτοπαθούς όγκου.
T_{is}	Καρκίνωμα in situ.
T₁	Όγκος με διάμετρο ≤ 3 εκ ενδοπαρεγχυματικός χωρίς επέκταση κεντρικότερα από λοβαίο βρόγχο.
T_{1a}	Όγκος με μέγιστη διάμετρο ≤ 2 εκ.
T_{1b}	Όγκος με διάμετρο > 2 εκ και ≤ 3 εκ.
T₂	Όγκος με διάμετρο > 3 εκ και ≤ 7 εκ που είτε καταλαμβάνει κύριο βρόγχο σε απόσταση > 2 εκ από την καρίνα, είτε διηθεί τον σπλαχνικό υπεζωκότα.
T_{2a}	Όγκος με μέγιστη διάμετρο > 3 εκ και ≤ 5 εκ.
T_{2b}	Όγκος με μέγιστη διάμετρο > 5 εκ και ≤ 7 εκ.
T₃	Όγκος > 7 εκ ή μικρότερος που όμως διηθεί είτε το τοίχωμα είτε το διάφραγμα είτε το μεσοθωρακικό υπεζωκότα είτε το περικάρδιο ή καταλαμβάνει κύριο βρόγχο σε απόσταση < 2 εκ από την καρίνα χωρίς όμως συμμετοχή της καρίνας ή εμφανίζει επιπλέον εστίες στον ίδιο λοβό ή προκαλεί ατελεκτασία σε ολόκληρο τον πνεύμονα.
T₄	Όγκος οιοδήποτε μεγέθους που διηθεί είτε το μεσοθωράκιο είτε την καρδιά είτε μεγάλα αγγεία, τραχεία, οισοφάγο, σπονδυλικά σώματα, καρίνα, είτε όγκος με επιπλέον εστίες σε άλλο λοβό του ίδιου πνεύμονα.

ΕΠΙΧΩΡΙΟΙ ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ (N)	
N_x	Χωρίς δεδομένα για ύπαρξη λεμφαδένων.
N₀	Χωρίς λεμφαδένες.
N₁	Μετάσταση σε σύστοιχους λεμφαδένες πυλαίους, περιβρογχικούς ή ενδοπνευμονικούς (θέσεις 10,11,12,13,14).
N₂	Μετάσταση σε σύστοιχους μεσοθωρακικούς λεμφαδένες (θέσεις 2,3,4,5,6,7,8,9).
N₃	Μετάσταση σε απέναντι λεμφαδένες στις θέσεις 2,3,4,5,6,7,8,9,10 ή σε σύστοιχους ή αντίστοιχους σκαληγούς ή υπερκλειδίους.

ΑΠΟΜΑΚΡΥΣΜΕΝΕΣ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ (M)	
M_x	Χωρίς δεδομένα για ύπαρξη μεταστάσεων.
M₀	Χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις.
M₁	Με απομακρυσμένες μεταστάσεις.
M_{1a}	Μεταστάσεις στον άλλο πνεύμονα ή παρουσία καρκινικής πλευριτικής ή περικαρδιακής συλλογής.
M_{1b}	Μεταστάσεις σε όργανα εκτός πνεύμονα.

Πίνακας 6: Σταδιοποίηση του NSCLC με το σύστημα TNM (7^η έκδοση).

T/M		N0	N1	N2	N3
T1	T1a	Ia	IIa	IIIa	IIIb
	T1b	Ia	IIa	IIIa	IIIb
T2	T2a	Ib	IIa	IIIa	IIIb
	T2b	IIa	IIb	IIIa	IIIb
T3		IIb	IIIa	IIIa	IIIb
T4		IIIa	IIIa	IIIb	IIIb
M1	M1a	IV	IV	IV	IV
	M1b	IV	IV	IV	IV

Πίνακας 7: Σταδιοποίηση του NSCLC με το σύστημα TNM (7^η έκδοση).

Τέσσερις τύποι σταδιοποίησης μπορούν να πραγματοποιηθούν στους ασθενείς με NSCLC. Όλοι βασίζονται πάνω στο σύστημα σταδιοποίησης TNM. Το κλινικο-διαγνωστικό στάδιο βασίζεται πάνω στο ατομικό ιατρικό ιστορικό, την κλινική εξέταση, τις εργαστηριακές εξετάσεις, τις απεικονιστικές εξετάσεις, την ιστική βιοψία και σε οποιαδήποτε άλλη διαγνωστική μέθοδο εφαρμοστεί πριν την αρχική θεραπευτική αντιμετώπιση. Σε αυτή τη σταδιοποίηση δίνεται το πρόθεμα c (π.χ. cT3N2M0). Ένας περιορισμός της κλινικο-διαγνωστικής σταδιοποίησης είναι ότι το στάδιο πολύ συχνά σχετίζεται με την εντατικότητα της διερεύνησης. Το χειρουργο-παθολογοανατομικό στάδιο βασίζεται στο κλινικο-διαγνωστικό στάδιο και επιπροσθέτως στο αποτέλεσμα της ιστοπαθολογικής εξέτασης του εξαιρεθέντος όγκου. Παρέχει επιβεβαίωση για τα περιγραφέντα T και N καθώς και για τον ιστολογικό τύπο. Επιπλέον, αξιολογεί την ιστολογική βαθμονόμηση, τα όρια εκτομής και την παρουσία ή την απουσία λεμφαγγειακής διήθησης. Στο χειρουργο-παθολογοανατομικό στάδιο δίνεται το πρόθεμα p (π.χ. pT3N2M0). Σε περίπτωση υποτροπής της νόσου και όταν ένα καινούργιο πλάνο θεραπευτικής αντιμετώπισης έχει σχεδιαστεί, τότε εφαρμόζεται το στάδιο επανεκτίμησης-επαναξιολόγησης της νόσου. Τέλος το στάδιο αυτοψίας καταγράφεται όταν ένας ασθενής καταλήξει και υποβληθεί σε νεκροτομή.

ΠΟΣΟΣΤΑ 5ΕΤΟΥΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	
ΣΤΑΔΙΟ	ΠΟΣΟΣΤΟ %
IA	68
IB	53
IIA	52
IIB	35
IIIA	25
IIIB	5
IV	4

Πίνακας 8: Ποσοστά 5ετούς επιβίωσης ανάλογα με το στάδιο της νόσου.

1.9 ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Η θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα μπορεί να περιλαμβάνει χειρουργική επέμβαση, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία είτε συνηθέστερα συνδυασμό αυτών. Ωστόσο, ασθενείς με μεγάλη επιβάρυνση της γενικής τους κατάστασης, η οποία μπορεί να οφείλεται είτε στην ίδια τη νόσο είτε στην ύπαρξη συνοδών παθολογικών καταστάσεων, μπορεί να μην είναι σε θέση να υποβληθούν σε χειρουργική αφαίρεση της νόσου ή ακόμη και σε εναλλακτική χορήγηση επιθετικής χημειο-ακτινοθεραπείας.

Η γενική σωματική κατάσταση του κάθε ασθενή μπορεί να εκτιμηθεί με μια ποικιλία μεθόδων αξιολόγησης, όπως είναι το KPS σύστημα (Karnofsky Performance Status) ή η κλίμακα του ECOG PS (Eastern Cooperative Oncology Group Performance Scale - ECOG PS). Το KPS σύστημα εισήχθη στη δεκαετία του 1940 και περιλαμβάνει μία κλίμακα 100 βαθμών βάσει 11 παραμέτρων και χρησιμοποιείται για να περιγράψει την ικανότητα του ασθενούς να συμμετέχει στις καθημερινές δραστηριότητες αλλά και να εργασθεί [59]. Η κλίμακα του ECOG PS ταξινομεί τους ασθενείς σε πέντε κατηγορίες και μέσω μιας σχετικής συγκριτικής μελέτης έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί καλό δείκτη πρόγνωσης της νόσου [60].

Καθορισμός λειτουργιών	%	Κριτήρια
Ικανός για εργασία και καθημερινές δραστηριότητες	100	Φυσιολογικός, δεν υπάρχουν ενδείξεις νόσου
Δεν χρειάζεται βοήθεια	90 80	Ικανός για όλες τις δραστηριότητες. Ελάχιστα σημεία νόσου Φυσιολογική δραστηριότητα κατά την άσκηση. Υπάρχουν σημεία της νόσου
Ανίκανος για εργασία. Ικανός να ζει στο σπίτι με σχετική βοήθεια	70 60 50	Αυτοεξυπηρετείται· έκπτωση ικανότητας άσκησης και εργασίας Συχνά έχει ανάγκη βοήθειας, αλλά καταφέρνει να αυτοεξυπηρετείται Απαιτεί βοήθεια στα καθημερινά· συχνές νοσηλείες
Ανίκανος να αυτοεξυπηρετείται στο σπίτι.	40	Ανίκανος· απαιτεί ειδική φροντίδα και περίθαλψη
Απαιτεί νοσοκομειακή περίθαλψη.	30	Σοβαρή ανικανότητα· χρειάζεται νοσοκομειακή περίθαλψη
Η νόσος εξελίσσεται γρήγορα	20	Πολύ άρρωστος· στο νοσοκομείο για θεραπεία υποστήριξης
	10	Ετοιμοθάνατος· ταχεία επιδείνωση των ζωτικών λειτουργιών

Πίνακας 9: Το KPS σύστημα αξιολόγησης της σωματικής κατάστασης (Karnofsky Performance Status).

Η χειρουργική εξαίρεση προσφέρει την καλύτερη πιθανότητα για μακρά επιβίωση και πιθανή ίαση σε ασθενείς με NSCLC. Η επιλογή των κατάλληλων υποψηφίων ασθενών με γνωστό ή πιθανό NSCLC για χειρουργική εξαίρεση της νόσου περιλαμβάνει την προεγχειρητική σταδιοποίηση καθώς και την εκτίμηση της γενικής κατάστασης του ασθενή, βάσει της ύπαρξης συνοδών νοσημάτων και της λειτουργικής κατάστασης στην οποία βρίσκονται οι πνεύμονες προεγχειρητικά, με σκοπό την πρόβλεψη της λειτουργικότητάς τους μετεγχειρητικά [61].

Σε ασθενή με NSCLC πρώιμου σταδίου, η συνύπαρξη κακής πνευμονικής λειτουργίας ή άλλων συνοδών νοσημάτων ενδέχεται να αποκλείουν τη δυνατότητα για χειρουργική αντιμετώπιση της νόσου. Η ανάπτυξη όμως νέων χειρουργικών τεχνικών, η καθιέρωση της περιορισμένης χειρουργικής εξαίρεσης και η υψηλή μετεγχειρητική φροντίδα παρέχουν τη δυνατότητα για χειρουργική αντιμετώπιση σε ασθενείς που δεν θα ήταν κατάλληλοι για χειρουργική θεραπεία τα προηγούμενα χρόνια.

Ασθενείς με NSCLC σταδίου I ή II πρέπει να αντιμετωπίζονται με πλήρη χειρουργική εξαίρεση όποτε αυτό είναι δυνατόν. Μετεγχειρητική επικουρική χημειοθεραπεία έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει την επιβίωση σε ασθενείς σταδίου II ενώ μπορεί να έχει θέση και στους ασθενείς με NSCLC σταδίου IB [61].

Ασθενείς σταδίου I ή II που δεν είναι υποψήφιοι για χειρουργική εξαίρεση ή αρνούνται χειρουργική επέμβαση μπορεί να είναι υποψήφιοι για ακτινοθεραπεία [61]. Η ακτινοθεραπεία μπορεί να εφαρμοστεί με συμβατικά μέσα, με στερεοτακτική ακτινοχειρουργική ή ως καυτηρίαση με ραδιοσυχνότητες. Η φωτοδυναμική θεραπεία μπορεί επίσης να αποτελέσει πρωταρχική μορφή θεραπείας σε προσεκτικά επιλεγμένους ασθενείς με επιφανειακή βλάβη στο βλεννογόνο των αεραγωγών.

Σε ασθενείς με νόσο σταδίου III ενδείκνυται, πριν την οριστική θεραπεία, μια συνδυασμένη προσέγγιση με ταυτόχρονη χορήγηση χημειοθεραπείας. Ο ρόλος της χειρουργικής επέμβασης μετά την ακτινο-χημειοθεραπεία αποτελεί πεδίο συνεχούς έρευνας. Η χειρουργική εξαίρεση μπορεί επίσης να έχει τη θέση της σε προσεκτικά επιλεγμένους ασθενείς με T3 ή T4 όγκους χωρίς διήθηση των λεμφαδένων του μεσοθωρακίου [61].

Σε ασθενείς κλινικά σταδίου I ή II, στους οποίους τεκμηριώνεται η συμμετοχή των λεμφαδένων του μεσοθωρακίου στη νόσο (στάδιο IIIA) με την ιστολογική εξέταση του χειρουργικού παρασκευάσματος, η χορήγηση επικουρικής χημειοθεραπείας έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει την επιβίωση [61].

- | |
|---|
| <p>1) Cisplatin 80-100 mg/m², day 1 + Vinorelbine 25-30mg/m² day 1,8,15,22,
κάθε 28 ημέρες, 4 κύκλοι</p> <p>2) Cisplatin 75-80 mg/m², day 1 + Vinorelbine 25-30mg/m², day 1,8,
κάθε 21 ημέρες, 4 κύκλοι</p> <p>3) Cisplatin 80 mg/m² ή Carboplatin AUC6, day 1 + Gemcitabine 1000-1200 mg/m² day 1, 8,
κάθε 21 ημέρες, 4-6 κύκλοι</p> <p>4) Cisplatin 80 mg/m² ή Carboplatin AUC6 + Paclitaxel 175mg/m² ή Docetaxel 75mg/m²
κάθε 21 ημέρες, 4-6 κύκλοι</p> |
|---|

Πίνακας 10: Σχήματα επικουρικής (adjuvant) χημειοθεραπείας στο NSCLC.

Η ταχεία πρόοδος στην κατανόηση της μοριακής παθογένεσης του NSCLC οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για μια ετερογενή ομάδα ιστολογικών τύπων. Αν και η αρχική αντιμετώπιση της μονήρους μη μεταστατικής νόσου είναι η ίδια, ο μοριακός χαρακτηρισμός του όγκου, σε ασθενείς με προχωρημένο NSCLC, μπορεί να χρησιμεύσει ως οδηγός για τη θεραπεία τόσο στις περιπτώσεις μεταστατικής νόσου όσο και στις περιπτώσεις υποτροπής μετά την αρχική θεραπεία.

Η πρόσφατη αναγνώριση και ταξινόμηση ασθενών με NSCLC σε συγκεκριμένες υποκατηγορίες οδήγησε στην δυνατότητα χορήγησης στοχεύουσας θεραπείας στις περιπτώσεις αυτές. Δυο τέτοια παραδείγματα αποτελούν η ύπαρξη μεταλλάξεων στον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) σε ασθενείς με NSCLC και η ύπαρξη του γονιδίου σύντηξης EML4-ALK.

Ασθενείς σταδίου IV κατά κανόνα αντιμετωπίζονται είτε με χορήγηση συστηματικής θεραπείας είτε παρηγορητικά. Σε επιλεγμένους ασθενείς η χημειοθεραπεία ή/και η μοριακά στοχεύουσα θεραπεία μπορεί να παρατείνουν την επιβίωση, χωρίς σοβαρές επιπτώσεις στην ποιότητα ζωής. Σε ορισμένους ασθενείς η ακτινοθεραπεία και η χειρουργική επέμβαση μπορεί επίσης να είναι χρήσιμες για ανακούφιση από διάφορα συμπτώματα της νόσου [61].

<u>Vinorelbine/Cisplatin</u>		
Vinorelbine	25mg/m ²	D1, 8 q21d
Cisplatin	80 mg/m ²	D1, q21d
<u>Gemcitabine/Cisplatin</u>		
Gemcitabine	1250 mg/m ²	D1, 8q21d
Cisplatin	75/mg/m ²	D1, q21d
<u>Docetaxel/Cisplatin</u>		
Docetaxel	75 mg/m ²	D1, q21d
Cisplatin	75 mg/m ²	D1, q21d
<u>Pemetrexed/Cisplatin</u>		
Pemetrexed	500 mg/m ²	D1, q21d
Cisplatin	75 mg/m ²	D1, q21d
<u>Docetaxel/Carboplatin</u>		
Docetaxel	75 mg/m ²	D1, q21d
Carboplatin	AUC 6	D1, q21d
<u>Paclitaxel/Carboplatin</u>		
Paclitaxel	200mg/m ²	D1, q21d
Carboplatin	AUC 6	D1, q21d

Πίνακας 11: Σχήματα χημειοθεραπείας στη μεταστατική νόσο στο NSCLC.

Ασθενείς σταδίου IV με τη παρουσία μίας μόνο μεταστατικής εστίας (π.χ. εγκέφαλος, επινεφρίδια) μπορεί να επωφεληθούν από την χειρουργική εξαίρεση της μετάστασης, καθώς και από επιθετική χημειοθεραπεία [62].

Εφαρμογή τοπικών μέτρων ανακούφισης μπορεί να είναι χρήσιμη σε ασθενείς με μη ελεγχόμενη πνευμονική νόσο [63]. Η δύσπνοια η οποία οφείλεται σε απόφραξη των κεντρικών αεραγωγών από τη νόσο, μπορεί να υφεθεί κατόπιν βρογχοσκοπικής αφαίρεσης του όγκου, με τη χρήση laser για την επίτευξη τήξης του όγκου ή με κρυοθεραπεία. Η τοποθέτηση stent μπορεί να είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της βατότητας των αεραγωγών ενώ παράλληλα επιτρέπει την χορήγηση εξωτερικής ακτινοβολίας. Βραχυθεραπεία μπορεί να εφαρμοσθεί τοπικά, με τη τοποθέτηση ενός βρογχοσκοπικά κατευθυνόμενου καθετήρα και μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη σε υποτροπιάζουσα ή επίμονη νόσο των αεραγωγών. Η προσέγγιση αυτή επιχειρείται συνήθως μετά από χορήγηση μέγιστης εξωτερικής ακτινοβολίας.

Το SCLC εμφανίζεται ως γενικευμένη νόσος στους περισσότερους ασθενείς, ακόμη και κατά τη διάγνωση. Έτσι η συστηματική χημειοθεραπεία αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της αρχικής θεραπείας. Οι ασθενείς που βρίσκονται σε μη προχωρημένο στάδιο της νόσου αντιμετωπίζονται καλύτερα με ένα συνδυασμό χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας, δεδομένου ότι η συμπληρωματική αγωγή με ακτινοθεραπεία έχει αποδειχθεί ότι παρατείνει την επιβίωση σε σύγκριση με τη χορήγηση μόνο χημειοθεραπείας [61]. Χειρουργική επέμβαση δεν ενδείκνυται εκτός από τις σπάνιες εκείνες περιπτώσεις όπου η νόσος παρουσιάζεται ως μονήρης πνευμονικός όζος χωρίς μεταστάσεις ή περιφερειακή λεμφαδενική συμμετοχή. Για ασθενείς με SCLC προχωρημένου σταδίου, η χημειοθεραπεία χρησιμοποιείται μόνη της ως αρχική θεραπεία. Η προφυλακτική ακτινοβολία του ΚΝΣ έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τη συχνότητα των μεταστάσεων στον εγκέφαλο και παρατείνει την επιβίωση των ασθενών με SCLC τόσο του περιορισμένου σταδίου όσο και του προχωρημένου, όταν οι ασθενείς ανταποκρίνονται στην αρχική θεραπεία [61].

1.10 ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΕΣ ΕΝΕΡΓΕΙΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις του καρκίνου του πνεύμονα περιλαμβάνουν μια ποικιλία χειρισμών όπως είναι η χειρουργική επέμβαση, η ακτινοθεραπεία και η χορήγηση συστηματικής θεραπείας με κυτταροτοξικά φάρμακα ή μοριακά στοχευτικούς παράγοντες. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες της συστηματικής θεραπείας είναι συχνά ιδιαίτερα ανησυχητικές, λόγω

των αρνητικών τους επιπτώσεων στην ποιότητα ζωής του ασθενή, τόσο κατά τη διάρκεια όσο και μετά τη θεραπεία [61]. Η τοξικότητα ποικίλει ανάλογα με το θεραπευτικό σχήμα.

Κοινές ανεπιθύμητες ενέργειες που παρατηρούνται σε ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία για καρκίνο του πνεύμονα είναι οι εξής [61]: α) Ναυτία-έμετος, ποικίλης βαρύτητας μπορεί να προκληθεί με τα περισσότερα χημειοθεραπευτικά σχήματα και τις περισσότερες φορές μπορεί να προληφθεί ή να αντιμετωπισθεί επιτυχώς με τη χορήγηση της κατάλληλης αντιεμετικής αγωγής. β) Αιματολογικές διαταραχές, κυρίως αναιμία και ουδετεροπενία με αυξημένο κίνδυνο λοίμωξης, ειδικά στις πιο κυτταροτοξικές φαρμακευτικές αγωγές. γ) Νεφροτοξικότητα, ειδικά σε χημειοθεραπευτικά σχήματα που περιέχουν σισπλατίνη (cisplatin). Εντατική ενυδάτωση απαιτείται για να αποτραπεί αυτή η επιπλοκή. δ) Νευροτοξικότητα, η οποία είναι ιδιαίτερα συχνή σε χημειοθεραπευτικά σχήματα που περιέχουν σισπλατίνη και ταξάνες (paclitaxel, docetaxel) και είναι συνήθως τουλάχιστον μερικώς αναστρέψιμη μετά τη διακοπή της θεραπείας. ε) Αίσθημα κόπωσης, είναι συχνό και μπορεί να οφείλεται είτε στη χημειοθεραπεία, είτε στην ακτινοθεραπεία, είτε στην ίδια τη νόσο. στ) Δερματικές εκδηλώσεις, με τη μορφή ακμοειδούς εξανθήματος, κυρίως μετά τη χορήγηση των αντί-EGFR θεραπειών (erlotinib, gefitinib). Αν και η εμφάνιση του εξανθήματος αυτού είναι ιδιαίτερα ενοχλητική, ωστόσο σχετίζεται με καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία. ζ) Οπτικές διαταραχές (φωτοφοβία, φωταψίες, μειωμένη οπτική οξύτητα, θόλωση της όρασης) είναι οι πιο συχνές ανεπιθύμητες ενέργειες κατά τη θεραπεία στόχευσης του EML4-ALK (crizotinib) η οποία συνήθως είναι καλά ανεκτή. η) Ανορεξία και απώλεια βάρους, είναι συνήθεις σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και μπορεί να οφείλονται είτε στην ίδια την ασθένεια είτε στη θεραπεία.

1.11 ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Το στάδιο της νόσου κατά TNM σε ασθενείς με NSCLC παρέχει τη μεγαλύτερη προγνωστική αξία. Τα πιο εκτενή στοιχεία σχετικά με το στάδιο της νόσου και τη πρόγνωση, προέρχονται από μια μελέτη 31.000 περιπτώσεων του SEER, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την επικύρωση του 7^{ου} συστήματος σταδιοποίησης κατά TNM [64]. Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή παρατηρείται μια προοδευτική μείωση της μέσης επιβίωσης από περίπου 59 μήνες για τους ασθενείς με νόσο σταδίου ΙΑ στους τέσσερις μήνες για εκείνους με νόσο σταδίου ΙV.

Διάφοροι κλινικοί παράγοντες παρόντες κατά τη διάγνωση της νόσου μπορούν να αξιοποιηθούν για την πρόβλεψη του προσδόκιμου επιβίωσης των ασθενών. Οι περισσότεροι από τους παράγοντες αυτούς είναι ανεξάρτητοι από το στάδιο της νόσου και μελετήθηκαν κυρίως σε ασθενείς με προχωρημένο ή ανεγχείρητο NSCLC.

α) Κλινική εικόνα - Κακή γενική κατάσταση και απώλεια βάρους έχουν συσχετιστεί με μικρότερο προσδόκιμο επιβίωσης [65-70]. Η μειωμένη όρεξη, ένα σύμπτωμα πρόδρομο της απώλειας βάρους, αποτελεί επίσης αρνητικό προγνωστικό παράγοντα [65].

β) Εθνικότητα - Οι Αφρικανοί της Αμερικής δεν φαίνεται να αποτελούν πληθυσμιακή ομάδα με δυσμενές προσδόκιμο επιβίωσης. Μερικές μελέτες αρχικά είχαν δείξει ότι οι Αφροαμερικανοί έχουν χειρότερη πρόγνωση, ακόμη και μετά τη διόρθωση των παραγόντων του σταδίου της νόσου και της επιλογής της θεραπείας. Ωστόσο, μια πιο πολυπαραγοντική ανάλυση των μελετών αυτών, έδειξε πως η μη σωστή προσμέτρηση της γενικής κατάστασης και της απώλειας βάρους στις μελέτες αυτές ευθύνονταν για το παραπάνω αποτέλεσμα [66].

γ) Ιστοπαθολογία - Μελέτες ασθενών με NSCLC έδωσαν αντικρουόμενα αποτελέσματα για το αν η διάκριση μεταξύ αδenoκαρκινώματος και καρκινώματος εκ πλακώδους επιθηλίου επηρεάζει την πρόγνωση [71-75]. Άλλοι ιστο-παθολογικοί παράγοντες που έχουν συσχετισθεί με την πρόγνωση είναι ο ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης (grade) [76,77] και η ύπαρξη λεμφαγγειακής διήθησης (LVI) [78-81]. Κάθε ιστολογικός τύπος μπορεί να ποικίλει στο βαθμό διαφοροποίησης. Η επίδραση της διαφοροποίησης του όγκου στην δυνατότητα για χειρουργική εξαίρεση είναι αβέβαιη. Ορισμένες μελέτες δείχνουν ότι όγκοι με χαμηλή διαφοροποίηση έχουν χειρότερη πρόγνωση από αυτούς με υψηλή διαφοροποίηση [76,77]. Ωστόσο, το εύρημα αυτό δεν έχει καθολική αποδοχή και χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση [73].

δ) Διήθηση λεμφαδένων - Η ύπαρξη μεταστάσεων στους λεμφαδένες έχει αρνητική προγνωστική αξία στην έκβαση της νόσου [78-80]. Σε μια μελέτη 244 ασθενών με NSCLC σταδίου I οι οποίοι υπεβλήθησαν σε χειρουργική εκτομή, η πενταετής επιβίωση χωρίς νόσο ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς χωρίς προσβολή των λεμφαδένων (74% έναντι 54%) [79].

ε) Λεμφαγγειακή και αγγειακή διήθηση - Η ύπαρξη μικροσκοπικής διήθησης των αγγείων από τη νόσο σε ασθενείς σταδίου T1/T2 N0 οι οποίοι έχουν υποβληθεί σε χειρουργική εξαίρεση του όγκου επίσης φαίνεται να έχει αρνητική επίπτωση στην επιβίωση των ασθενών αυτών [82,83]. Η παραπάνω διαπίστωση αφορά μελέτη 746 ασθενών, στην οποία η μικροσκοπική διήθηση των αγγείων ήταν παρούσα σε 257 ασθενείς (34 %) [82]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας

το ποσοστό της πενταετούς επιβίωσης ήταν σημαντικά αυξημένο στους ασθενείς χωρίς μικροσκοπική διήθηση των αγγείων από τη νόσο (65% έναντι 55 %). Η ύπαρξη μη εμφανούς μετάστασης (μικρομεταστάσης) στους λεμφαδένες μπορεί να αποκαλυφθεί με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους και μια μεγάλη μελέτη πάνω στο θέμα αυτό έχει συσχετίσει την παρουσία τέτοιων μικρομεταστάσεων, με μικρότερο προσδόκιμο επιβίωσης σε ασθενείς σταδίου I [84]. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR) έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση καρκινικών δεικτών σε λεμφαδένες ασθενών με NSCLC [85]. Ωστόσο, τη διεξαγωγή τέτοιων μελετών δυσχεραίνει η έλλειψη των απαραίτητων εργαστηριακών μέσων και η χρησιμότητα της RT-PCR στη εκτίμηση του NSCLC αναμένεται να τεκμηριωθεί στο μέλλον.

στ) Γονοτυπικός διαχωρισμός - Σύγχρονες μελέτες έχουν προσδιορίσει διάφορες μοριακές ανωμαλίες που επιτρέπουν την ταξινόμηση των ασθενών με NSCLC σε συγκεκριμένες υποκατηγορίες. Αυτή η διαίρεση επιτρέπει την παροχή εξατομικευμένης θεραπείας ενώ ενδέχεται να συμμετάσχει και στην εκτίμηση της πρόγνωσης. Ειδικά, στοχεύουσες θεραπείες είναι ήδη διαθέσιμες για δύο διαφορετικές υποκατηγορίες ασθενών με NSCLC. Πρώτον ασθενείς με μεταλλάξεις στον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) που αποτελούν μια υποομάδα ασθενών συνήθως με αδενοκαρκίνωμα που τυπικά αφορά γυναίκες ασιατικής καταγωγής μη καπνίστριες. Οι ασθενείς αυτοί γενικά ανταποκρίνονται πολύ καλά σε αναστολείς της τυροσινικής κινάσης του EGFR (erlotinib, gefitinib) και φαίνεται να έχουν μια καλύτερη πρόγνωση από τους ασθενείς χωρίς μεταλλάξεις στον EGFR [86]. Δεύτερον, ασθενείς με παρουσία του EML4 ALK-ογκογονιδίου σύντηξης αποτελούν ένα άλλο υποσύνολο του NSCLC που αφορά συνήθως μη καπνιστές ή πρώην καπνιστές και τείνει να εμφανίζεται σε άτομα νεότερης ηλικίας. Αυτοί οι ασθενείς ανταποκρίνονται θετικά στη θεραπεία με crizotinib, ενός αναστολέα της κινάσης του αναπλαστικού λεμφώματος (ALK).

ζ) PET και PET-CT - Η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET), μόνη της ή σε συνδυασμό με αξονική τομογραφία (CT), αποτελεί χρήσιμο μέσο στην αρχική σταδιοποίηση της νόσου. Η PET-CT υπερέχει έναντι της PET στη σταδιοποίηση της νόσου [87]. Η μεταβολική δραστηριότητα ενός όγκου μπορεί να εκτιμηθεί μετρώντας την πρόσληψη της σεσημασμένης γλυκόζης από τον όγκο (SUV). Μια μετά-ανάλυση, 21 αναδρομικών μελετών που περιλάμβαναν 2637 ασθενείς σταδίου I έως IV με NSCLC, έδειξε ότι ένα υψηλό SUV σχετίζεται με κακή πρόγνωση [88]. Μια δεύτερη μετά-ανάλυση, η οποία περιορίζεται σε ασθενείς με NSCLC σταδίου I, διαπίστωσε ότι μια χαμηλότερη τιμή SUV από τον όγκο

σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση [89]. Η PET-CT μπορεί επίσης να φανεί χρήσιμη στην πρόβλεψη της ανταπόκρισης στην χημειοθεραπεία [90]. Επιπρόσθετες μελέτες είναι αναγκαίες προκειμένου να εξακριβωθεί πλήρως ο ρόλος του SUV ως προγνωστικό εργαλείο και ως μέσο πρόβλεψης της ανταπόκρισης στη θεραπεία.

η) Υποτροπή μετά από πλήρη χειρουργική εξαίρεση - Οι ασθενείς που υποβάλλονται σε πλήρη χειρουργική εξαίρεση για NSCLC μπορεί να εμφανίσουν υποτροπή ή/και μεταστατική νόσο. Πολλαπλοί είναι οι παράγοντες που επηρεάζουν την επιβίωση μετά από μια τέτοια υποτροπή. Σε μελέτη 1.073 ασθενών με NSCLC οι οποίοι υποβλήθηκαν σε πλήρη χειρουργική εξαίρεση, 445 εξ αυτών (41%) εμφάνισαν υποτροπή της νόσου σε ένα απώτερο χρόνο [91]. Ο μέσος χρόνος έως την υποτροπή μετά από τη χειρουργική επέμβαση ήταν 11,5 μήνες και η μέση επιβίωση των ασθενών αυτών ήταν 8,1 μήνες. Σε μια πολυπαραγοντική ανάλυση που ακολούθησε, ένα πλήθος παραγόντων (κακή γενική κατάσταση, διάστημα ελεύθερο νόσου μικρότερο του ενός έτους, εξ'αρχής χορήγηση επικουρικής χημειοθεραπείας ή ακτινοθεραπείας, απομακρυσμένη εστία μετάστασης σε αντίθεση με ενδοθωρακική υποτροπή μόνο) ενοχοποιήθηκαν για το μειωμένο αυτό ποσοστό επιβίωσης.

Γενικά ο πιο σημαντικός προγνωστικός παράγοντας σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα είναι το στάδιο της νόσου κατά τη στιγμή της διάγνωσης. Ο πρωταρχικός καθοριστικός παράγοντας της επιβίωσης σε ασθενείς με SCLC είναι η έκταση της νόσου κατά το χρόνο της διάγνωσης. Σε ασθενείς με πρώιμο στάδιο νόσου, η μέση επιβίωση ποικίλει από 15 έως 20 μήνες και η πενταετής επιβίωσης από 10 ως 13%, ενώ για τους ασθενείς με προχωρημένο στάδιο νόσου η μέση επιβίωση κυμαίνεται μεταξύ 8 έως 13 μηνών και το ποσοστό πενταετούς επιβίωσης δε ξεπερνά το 1 με 2%. Διάφοροι κλινικοί παράμετροι έχουν επίσης προγνωστική αξία σε ασθενείς με SCLC [70]. Κακή γενική κατάσταση και/ή απώλεια βάρους έχουν συσχετιστεί με κακή επιβίωση.

1.12 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

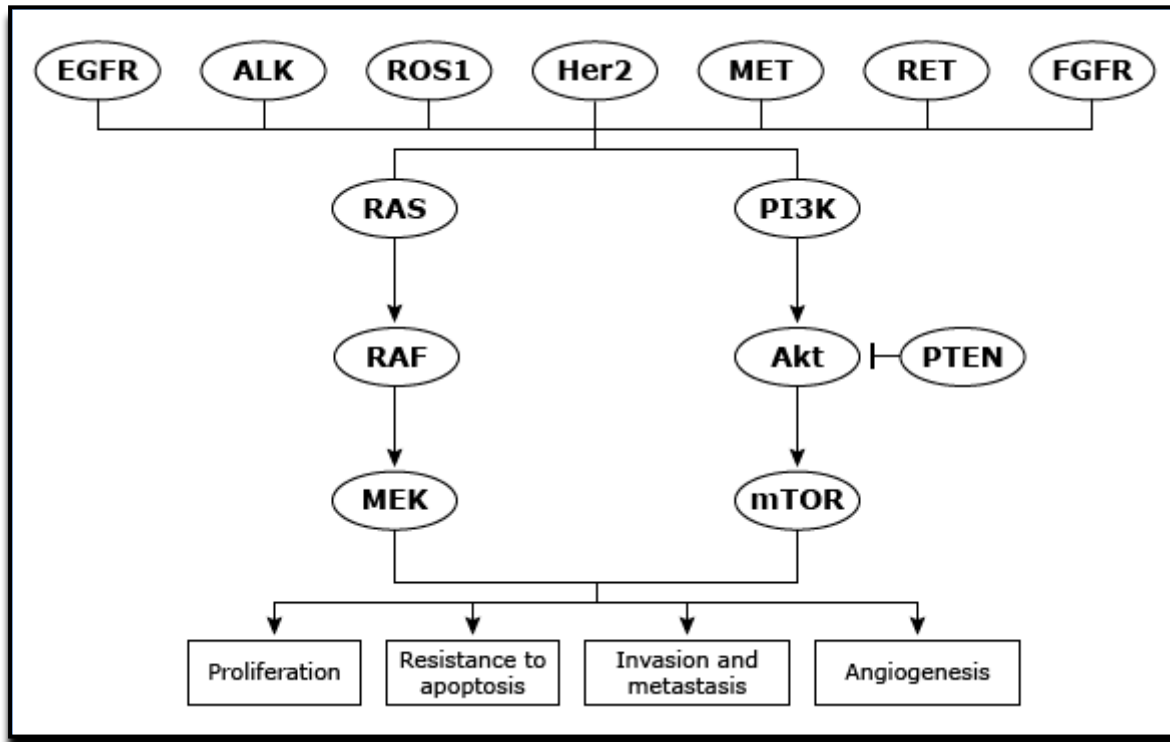
Η αντιμετώπιση ασθενών που πάσχουν από μεταστατικό NSCLC γίνεται κυρίως με συστηματική κυτταροτοξική χημειοθεραπεία. Η χημειοθεραπεία έχει ως στόχο την καταστροφή και θάνατο κυττάρων που βρίσκονται στο στάδιο της ανάπτυξης ή της διαίρεσης, ελαττώνει την κλινική συμπτωματολογία, βελτιώνει την ποιότητα ζωής και παρατείνει την επιβίωση σε ορισμένους ασθενείς με NSCLC.

Η καλύτερη κατανόηση των μοριακών διεργασιών που σχετίζονται με την βιολογία των καρκινικών κυττάρων στο NSCLC, καθώς και σε άλλα νεοπλάσματα, οδήγησε στην ανάπτυξη παραγόντων που στοχεύουν σε συγκεκριμένες μοριακές διεργασίες στα κακοήθη κύτταρα. Με την ελπίδα οι παράγοντες αυτοί να μπορούν να καταστρέψουν επιλεκτικά τα κακοήθη κύτταρα, αφήνοντας σχετικά ανεπηρέαστα τα φυσιολογικά. Πολλές στοχεύουσες θεραπείες περιλαμβάνουν per os χορηγούμενους αναστολείς τυροσινικών κινασών ή άλλων μικρών μορίων, αλλά και ενδοφλέβια χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων ή άλλων βιολογικών παραγόντων.

Η αναγνώριση της ογκογενετικής ενεργοποίησης συγκεκριμένων τυροσινικών κινασών σε ορισμένα προχωρημένα NSCLC, κυρίως μεταλλάξεις του EGFR ή αναδιατάξεις στο γονίδιο της κινάσης του αναπλαστικού λεμφώματος (ALK), οδήγησε στην ανάπτυξη εξειδικευμένων μοριακών θεραπειών για τους ασθενείς αυτούς. Επιπλέον, η ταυτοποίηση ομάδων τέτοιων ασθενών συνέβαλε σε μια συνεχή προσπάθεια αναγνώρισης βιοδεικτών και θεραπειών, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε άλλες κατηγορίες ασθενών με προχωρημένο NSCLC.

Οι πιο χρήσιμοι δείκτες για την πρόβλεψη της αποτελεσματικότητας της στοχεύουσας θεραπείας σε προχωρημένο NSCLC είναι οι σωματικές γονιδιακές εξαλλαγές γνωστές ως «οδηγές μεταλλάξεις». Αυτές οι μεταλλάξεις συμβαίνουν στο γονιδίωμα καρκινικών κυττάρων, το οποίο κωδικοποιεί πρωτεΐνες σημαντικές για την ανάπτυξη και επιβίωση των κυττάρων. Πολλές άλλες επαναλαμβανόμενες μοριακές εξαλλαγές έχουν αναγνωριστεί στο NSCLC, που είναι πολύ λιγότερο απαραίτητες στη διατήρηση του ογκογενετικού φαινοτύπου και συχνά αναφέρονται ως μεταλλάξεις «επιβάτες». Οι οδηγές μεταλλάξεις δεν ανευρίσκονται τυπικά στο γονιδίωμα των φυσιολογικών κυττάρων του ξενιστή και είναι συνήθως αποκλειστικές στα καρκινικά κύτταρα μόνο.

Οι οδηγές μεταλλάξεις είναι μετασχηματιστικές, που σημαίνει ότι πυροδοτούν την εξέλιξη-εξαλλαγή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό. Επιπρόσθετα, συχνά προσδίδουν μια εμμένουσα ογκογενετική βιολογία - συμπεριφορά στο μετασχηματισμένο κύτταρο, πράγμα που σημαίνει ότι η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη κάνει το καρκινικό κύτταρο να εξαρτάται από το σήμα της οδηγού μετάλλαξης για επιβίωση.



Εικόνα 6: Μοριακά μονοπάτια (pathways) εξαλλαγής-επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων στο NSCLC (τροποποίηση από Lecia V Sequist et al, UpToDate 2012).

Ένα συχνό παράδειγμα είναι πως ένα φυσιολογικό κύτταρο μπορεί να έχει ένα συγκεκριμένο «διακόπτη» στο κύκλωμα ανάπτυξης και διαίρεσης του, ο οποίος πότε είναι ανοικτός και πότε κλείνει, αλλά γενικότερα ρυθμίζεται από κύκλους ανασταλτικής ανατροφοδότησης και ειδικούς διεγέρτες. Ωστόσο, σε ένα εμμένον ογκογενετικό καρκινικό κύτταρο, ο διακόπτης αυτός είναι μόνιμως ανοικτός και δεν υπόκειται πια σε καμία ρύθμιση.

Στο NSCLC, καθώς και σε άλλες κακοήθειες, με το συνδυασμό ενός συγκεκριμένου στοχευτικού φαρμάκου με μια ταυτοποιημένη οδηγό μετάλλαξη, επιτεύχθηκε σημαντικά βελτιωμένη θεραπευτική αποτελεσματικότητα, συχνά σε συνδυασμό με μειωμένη τοξικότητα. Για το λόγο αυτό, ο έλεγχος για οδηγές μεταλλάξεις έγινε απαραίτητος στη διαγνωστική προσέγγιση του NSCLC και η προκύπτουσα πληροφορία είναι χρήσιμη στην επιλογή μεταξύ της συνήθους χημειοθεραπείας στην περίπτωση απουσίας μιας στοχοποιημένης οδηγού μετάλλαξης έναντι των στοχευουσών θεραπειών στην περίπτωση ανεύρεσης της κατάλληλης οδηγού μετάλλαξης.

Οι τεχνικές και μέθοδοι για τον έλεγχο ασθενών με NSCLC για οδηγές μεταλλάξεις και άλλες ανωμαλίες συνεχώς εξελίσσονται και δεν υπάρχει κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο εξέτασης. Γενικώς έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες τεχνικές.

Οι μεταλλάξεις τις τυροσινικής κινάσης του EGFR παρατηρούνται στο 15% ασθενών με NSCLC αδenoκαρκίνωμα στις ΗΠΑ και είναι πιο συχνές στους μη καπνιστές. Σε προχωρημένο NSCLC η παρουσία μια μετάλλαξης του EGFR προσδίδει μια καλύτερη πρόγνωση και μεγαλύτερη ευαισθησία στους αναστολείς της τυροσινικής κινάσης όπως το erlotinib. Η χρήση των αναστολέων της τυροσινικής κινάσης του EGFR βασίζεται στην ανίχνευση αυτών των μεταλλάξεων [92].

Οι μεταθέσεις της τυροσινικής κινάσης του ALK είναι παρούσες στο 4% των ασθενών με NSCLC αδenoκαρκίνωμα στις ΗΠΑ και εμφανίζονται πιο συχνά σε μη καπνιστές και νέους ασθενείς. Σε προχωρημένου σταδίου NSCLC, η παρουσία μετάθεσης του ALK υποδεικνύει ευαισθησία σε αναστολείς της τυροσινικής κινάσης όπως το crizotinib και η θεραπεία με crizotinib παρατείνει σημαντικά την επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου [92].

Η οικογένεια των RAS ογκογονιδίων αναγνωρίστηκε αρχικά σε μελέτη σαρκώματος αρουραίου προκαλούμενου από ρετροϊό, με το καθένα από τα KRAS, NRAS και HRAS να αντιπροσωπεύει διαφορετικά ανθρώπινα ομόλογα γονίδια. Ως μια ενδοκυττάρια μεμβρανική GTPάση, η οικογένεια των πρωτεϊνών RAS αποτελεί ένα κεντρικό μεσολαβητή για τη MAPK (mitogen-activated protein kinase), τη STAT (signal transducer and activator of transcription) και τη PI3K (phosphoinositide3-kinase), τα οποία μαζί ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Οι ογκογενετικές μεταλλάξεις του RAS, συνηθέστερα αυτές που αντιστοιχούν σε λανθασμένες αντικαταστάσεις στα κωδικόνια 12 και 13, προκαλούν ενεργοποίηση του RAS μη ελεγχόμενη από άλλα σήματα παρακωλύοντας έτσι τη λειτουργία της RAS GTPάσης. Ενεργοποίηση των KRAS μεταλλάξεων παρατηρείται στο 20-25% περίπου των αδenoκαρκινωμάτων του πνεύμονα στις ΗΠΑ και γενικώς συνδέονται με ιστορικό καπνίσματος. Το NRAS είναι ομόλογο με το KRAS, σχετίζεται με το κάπνισμα και μεταλλάξεις παρατηρούνται στο 1% περίπου των NSCLC. Η κλινική σημασία της NRAS μετάλλαξης δεν έχει ξεκαθαριστεί και δεν έχουν ανακαλυφθεί στοχεύουσες θεραπείες [92].

Το MET είναι ένας υποδοχέας τυροσινικής κινάσης για τον ηπατοκυτταρικό αυξητικό παράγοντα (HGF). Παρά το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις MET είναι αρκετά ασυνήθεις και άγνωστης κλινικής σημασίας στο NSCLC, αυξημένη έκφραση του MET παρατηρείται στο 25-75% ασθενών με NSCLC και σχετίζεται με φτωχή πρόγνωση [92]. Ένας αριθμός αναστολέων MET δοκιμάζονται για το NSCLC.

1.13 ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Η μοριακή ιατρική έχει φέρει μεγάλες αλλαγές στη προσέγγιση πολλών ογκολογικών νοσημάτων και ο καρκίνος του πνεύμονα δεν αποτελεί εξαίρεση. Ωστόσο, η επιβίωση των ασθενών με NSCLC αρχικού ή προχωρημένου σταδίου εξακολουθεί να είναι φτωχή. Καθώς η μοριακή ιατρική έχει αναγνωρίσει και στοχοποιήσει συγκεκριμένους ογκογενετικούς μηχανισμούς, έχει επίσης τη δυνατότητα να ταυτοποιήσει ορισμένες πρωτεΐνες, των οποίων η έλλειψη έκφρασης ή η υπερέκφραση έχει συσχετιστεί με τη πρόγνωση και την απάντηση της νόσου στη χρήση ορισμένων θεραπευτικών παραγόντων.

Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν τη δυνατότητα να αποτελέσουν δείκτες της νόσου - βιοδείκτες (biomarkers) αναλύοντας το μοριακό φαινότυπο του όγκου του κάθε επιμέρους ασθενούς [93]. Κατά αυτό τον τρόπο θα μπορούμε να παρέχουμε μια «εξατομικευμένη» θεραπεία, αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες για επίτευξη καλύτερης απάντησης στη θεραπεία και άρα μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης. Για παράδειγμα, οι αναστολείς τυροσινικών κινασών (tyrosine kinase inhibitor – TKI) gefitinib και erlotinib που χορηγούνται στο μεταστατικό NSCLC έχουν ως στόχο οδούς παθογένεσης όγκων που σχετίζονται με μεταλλάξεις στον EGFR [94]. Συνεπώς οι μεταλλάξεις του EGFR αποτελούν ένα βιολογικό δείκτη (βιοδείκτη-biomarker), που συμμετέχει τόσο στη πρόγνωση όσο και στη πρόβλεψη της απάντησης της νόσου στη χρήση αυτών των νέων φαρμάκων TKIs [94].

Είναι σημαντικό να κατανοήσουμε τη διαφορά μεταξύ της προγνωστικής (prognostic) και της προβλεπτικής (predictive) ικανότητας-αξίας ενός βιοδείκτη. Ο προγνωστικός βιοδείκτης (prognostic biomarker) εστιάζεται στην έκβαση της νόσου ανεξάρτητα από τη θεραπευτική παρέμβαση, ενώ ο προβλεπτικός βιοδείκτης (predictive biomarker) αφορά τη θετική ή μη απάντηση της νόσου σε ένα συγκεκριμένο θεραπευτικό παράγοντα. Ένα πλήθος παραγόντων σχετιζόμενοι με τα καρκινικά κύτταρα, όπως οι πρωτεΐνες, τα γονίδια (π.χ. το γονιδιακό προφίλ έκφρασης) κ.α., τείνουν να γίνουν προγνωστικοί ή προβλεπτικοί βιοδείκτες.

Η κλινική σημασία των βιοδεικτών είναι τεράστια. Η χρήση τους θα μας βοηθήσει όχι μόνο στο να επιλέξουμε την καταλληλότερη θεραπεία αλλά επίσης θα μας επιτρέψει να καθορίσουμε ποιοι ασθενείς χρειάζονται θεραπεία ή και ποιοι όχι (πρόγνωση). Ως εκ τούτου, με τον προσδιορισμό του προφίλ-ταυτότητας κάθε όγκου βάσει βιοδεικτών, θα μπορούμε να επιλέξουμε τη σωστή θεραπεία (προσαρμογή της διαχείρισης του NSCLC) και τελικά να αποφεύγονται ανεπιθύμητες ενέργειες από θεραπείες που δεν έχουν να προσφέρουν κάτι στο συγκεκριμένο ασθενή. Είναι επιτακτική λοιπόν ανάγκη να αξιοποιήσουμε αυτούς τους

βιοδείκτες στο NSCLC καθώς τελικά δεν υπάρχει διαφορά ανάμεσα στη θεραπεία με ένα στοχευτικό παράγοντα και τη συμβατική χημειοθεραπεία αν δε γνωρίζουμε το κατάλληλο προβλεπτικό βιοδείκτη βάσει του οποίου θα επιλέξουμε τους ασθενείς για την κάθε μορφή θεραπείας [93,94].

2. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

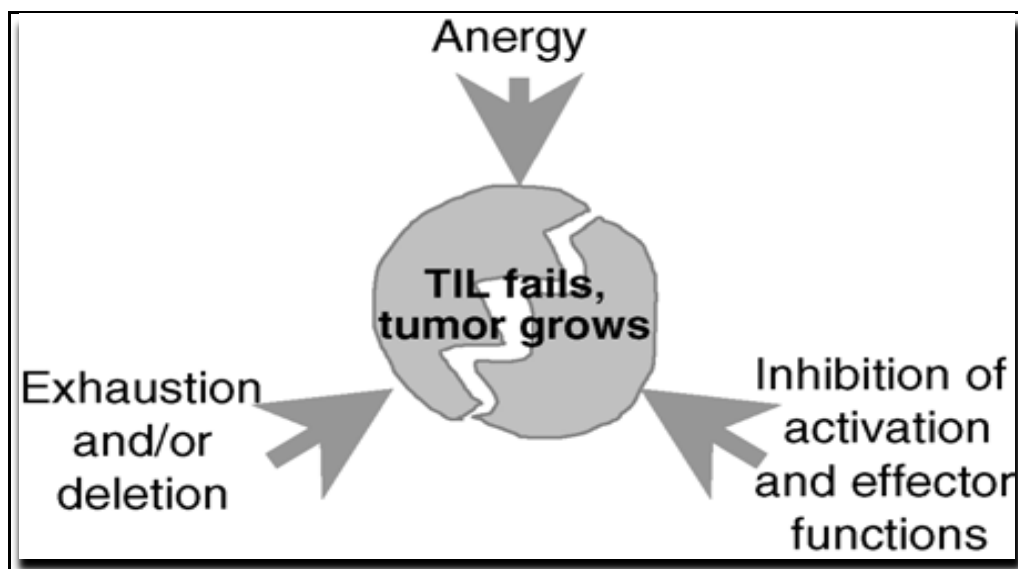
2.1 ΑΝΟΣΙΑ ΞΕΝΙΣΤΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης τα καρκινικά κύτταρα αλληλεπιδρούν με ένα πολύπλοκο μικροπεριβάλλον που αποτελείται από εξωκυττάρια ουσία και τα μη-νεοπλασματικά κύτταρα του ξενιστή, συμπεριλαμβανομένων μεσεγχυματικών κυττάρων, αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων και φλεγμονωδών ή ανοσιακών κυττάρων [95]. Τα φλεγμονώδη και τα ανοσιακά κύτταρα είναι παρόντα σε άλλοτε διαφορετικό βαθμό στο καρκινικό μικροπεριβάλλον (από πλήρη απουσία ως έντονη παρουσία), το οποίο παρατηρείται συχνά και σε παθολογοανατομική βάση. Το μικροπεριβάλλον του όγκου παρέχει στα καρκινικά κύτταρα θρεπτικές ουσίες, οξυγόνο, αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες και άλλους χημικούς διαμεσολαβητές που προωθούν τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, τη διήθηση και τη μετάσταση του όγκου [95]. Οι επίμονες φλεγμονώδεις αντιδράσεις μπορεί να έχουν σημαντική συμμετοχή στην εξέλιξη του όγκου, καθώς υπάρχουν ενδείξεις ότι π.χ. η συχνή χρήση του αντιφλεγμονώδους φαρμάκου ασπιρίνη μειώνει τον κίνδυνο για ορθοκολικό καρκίνο, αποκλείοντας μία νεοπλασματική οδό που εξαρτάται από τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις [96]. Στον αντίποδα, η ανοσιακή αντίδραση του οργανισμού έναντι των νεοπλασματικών κυττάρων μπορεί να εμποδίσει την εξέλιξη της νόσου, όπως φαίνεται από την παρατεταμένη επιβίωση ασθενών που εμφανίζουν ισχυρή ανοσιακή απάντηση έναντι του όγκου τους [97-100]. Αυτά τα ευρήματα υπογραμμίζουν ότι αντιδράσεις του ξενιστή έναντι του όγκου μπορεί να αποδειχθούν καθοριστικής σημασίας όσο αφορά την επίδραση τους στην ανάπτυξη του όγκου.

Οι αλληλεπιδράσεις του ξενιστή με τον όγκο διαμεσολαβούνται έμμεσα από μόρια της εξωκυττάριας ουσίας και διαλυτά βιοενεργά μόρια, τα οποία απελευθερώνονται από τα καρκινικά ή άλλα κύτταρα του ξενιστή αλλά και άμεσα από μόρια της επιφάνειας των κυττάρων του ξενιστή ή του όγκου [95]. Επομένως οι αλληλεπιδράσεις αυτές επηρεάζονται πιθανότατα από το γονιδίωμα και το επιγονιδίωμα τόσο των νεοπλασματικών όσο και των μη νεοπλασματικών κυττάρων. Η σχέση μεταξύ της ανοσιακής απόκρισης του ξενιστή και των μοριακών χαρακτηριστικών των καρκινικών κυττάρων μπορεί να αποδειχθεί καθοριστική στην εξέλιξη της νόσου.

Ειδικότερα, μελέτες αλληλεπιδράσεων καρκίνου-ανοσιακού συστήματος έχουν αποκαλύψει ότι κάθε γνωστός εγγενής και προσαρμοστικός ανοσιακός εκτελεστικός μηχανισμός συμμετέχει στην αναγνώριση και τον έλεγχο του όγκου [101,102]. Τα πρώτα, λίγα μεταλλαγμένα κύτταρα

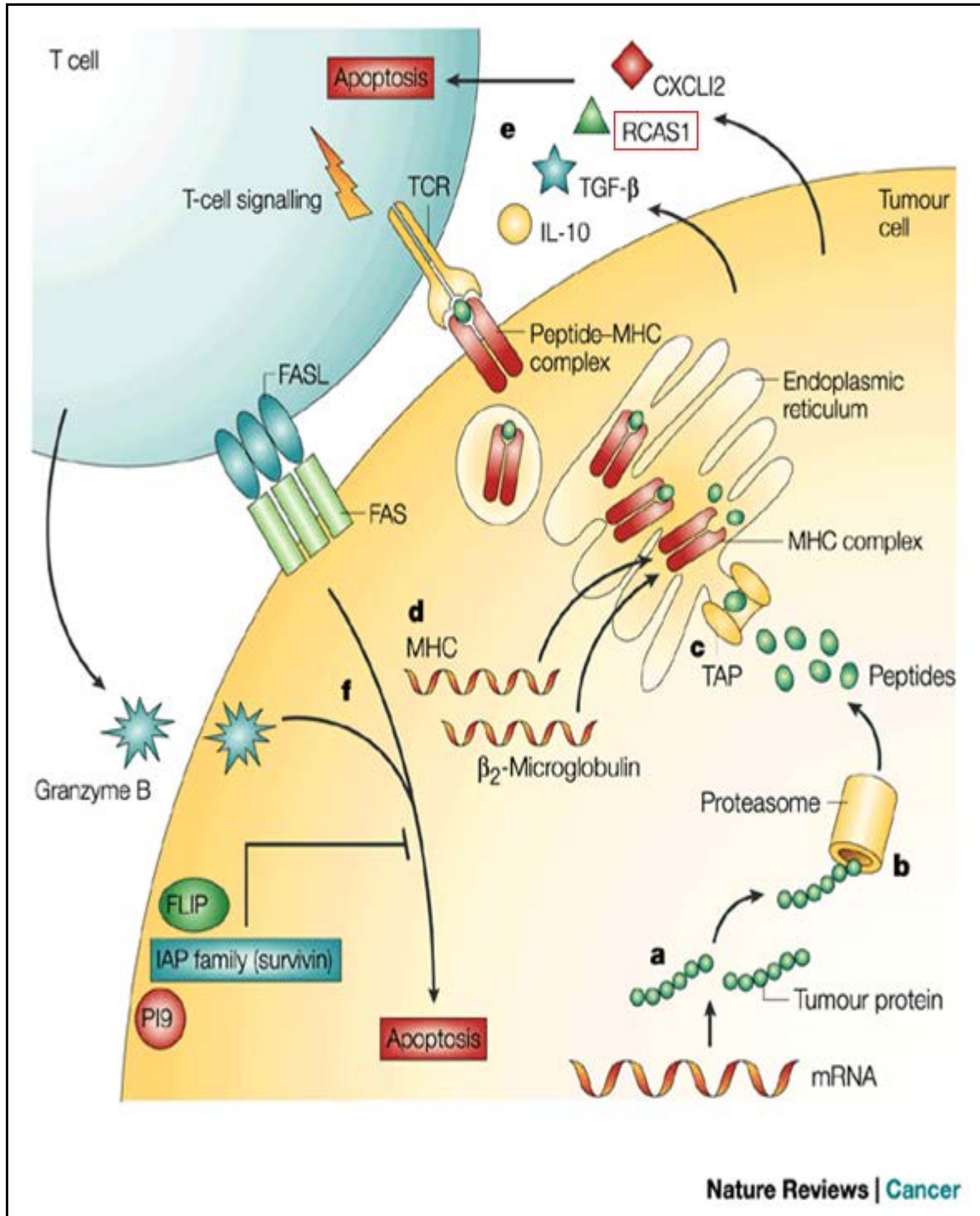
εντοπίζονται από τα NK κύτταρα, μέσω σύνδεσής τους με ειδικούς συνδέτες στα καρκινικά κύτταρα. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην καταστροφή μερικών μεταλλαγμένων κυττάρων και την πρόσληψη και επεξεργασία των θραυσμάτων τους από τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα. Στη συνέχεια, αυτά τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα ενεργοποιούνται εκκρίνοντας πολλές φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και παρουσιάζουν τα προερχόμενα από τα καρκινικά κύτταρα μόρια στα T και B κύτταρα. Η ενεργοποίηση των T και B κυττάρων οδηγεί στην παραγωγή επιπλέον κυτταροκινών, οι οποίες προάγουν περαιτέρω ενεργοποίηση της εγγενούς ανοσίας και υποστηρίζουν την εξάπλωση και παραγωγή ογκο-ειδικών T κυττάρων και αντισωμάτων, αντίστοιχα [102]. Η πλήρης ισχύς του προσαρμοστικού ανοσιακού συστήματος οδηγεί στην εξάλειψη των υπολειπόμενων καρκινικών κυττάρων και κυρίως, στη δημιουργία ανοσιακής μνήμης σε ειδικά καρκινικά στοιχεία, που θα βοηθήσει να αποτραπεί υποτροπή του όγκου [101,102].



Εικόνα 7: Οι προτεινόμενοι μηχανισμοί ελαττωμένης βιολογικής δράσης των TILs (tumor-infiltrating lymphocytes) είναι 3 και ο ένας δεν αποκλείει την ύπαρξη του άλλου (τροποποίηση από Shin-Heng Chiou et al, Journal of Reproductive Immunology 2005).

Εκτελεστές της επίκτητης ανοσίας, όπως τα $CD4^+$ βοηθητικά T κύτταρα, τα $CD8^+$ κυτταροτοξικά T κύτταρα και τα αντισώματα, επιτίθενται ειδικά σε καρκινικά αντιγόνα, π.χ. μόρια που εκφράζονται στα καρκινικά κύτταρα, αλλά όχι σε φυσιολογικά κύτταρα. Τα καρκινικά αντιγόνα είναι φυσιολογικές κυτταρικές πρωτεΐνες, που εκφράζονται παθολογικά ως αποτέλεσμα γενετικών μεταλλάξεων, ποσοτικών διαφορών στην έκφραση ή διαφορών στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις [101,102]. Σε τύπους καρκίνων, οι οποίοι έχουν σαφώς

καθορισμένη ιϊκή προέλευση, όπως ο καρκίνος του τραχήλου της μήτρας με τον ανθρώπινο ιό των θηλωμάτων και το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα με τον ιό της ηπατίτιδας Β, οι ιϊκές πρωτεΐνες αναγνωρίζονται ως καρκινικά αντιγόνα και γίνονται στόχοι της αντικαρκινικής ανοσιακής αντίδρασης [101].



Εικόνα 8: Πιθανοί μηχανισμοί ανοσοδιαφυγής των όγκων - tumour immune escape (τροποποίηση από Yee C. et al, Nature Reviews Cancer 2002).

2.2 ΜΟΡΙΑΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΚΑΙ ΑΝΟΣΙΑΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ

Ο καρκίνος δεν είναι μια ενιαία κλινική οντότητα, αλλά μία ετερογενής ομάδα ασθενειών με διάφορες γενετικές και επιγενετικές μεταβολές [103]. Παρά το γεγονός ότι όλοι οι όγκοι έχουν κοινά χαρακτηριστικά (όπως ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διήθηση και η μετάσταση) κατηγοριοποιούμε τους καρκίνους με βάση τον τύπο του οργάνου, γιατί αυτή η κατηγοριοποίηση μας βοηθά να προβλέψουμε τη συμπεριφορά του εκάστοτε νεοπλασματος. Για να επιτύχουμε όμως την εξατομικευμένη αντιμετώπιση του καρκίνου θα πρέπει εκτός από αυτή την κατηγοριοποίηση να χρησιμοποιήσουμε και μία μοριακή κατηγοριοποίηση.

Κάθε άνθρωπος διαθέτει ένα ξεχωριστό σύνολο γενετικών και επιγενετικών μεταβλητών και κάθε όγκος εμφανίζεται ως αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μοναδικών αυτών μεταβλητών-χαρακτηριστικών του ξενιστή και των μεταλλαγμένων κυττάρων. Η διαδικασία της καρκινογένεσης που οδηγεί στην εμφάνιση ενός συγκεκριμένου όγκου είναι μοναδική και είναι εξαιρετικά απίθανο κάποιος όγκος να μιμηθεί την πορεία οποιουδήποτε άλλου όγκου [103-105]. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα [106] υποστηρίζουν τη μοναδικότητα στη διαδικασία της καρκινογένεσης κάθε όγκου [103-105]. Παρά το γεγονός ότι κάθε όγκος υπόκειται στην δική του μοναδική νεοπλασματική μετάλλαξη, κατατάσσουμε τους όγκους με βάση εξέχοντα κλινικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά, καθώς και με μοριακά αποτυπώματα, με βάση την προϋπόθεση ότι όγκοι με παρόμοια χαρακτηριστικά διέπονται από κοινούς παθογενετικούς μηχανισμούς και πρότυπα εξέλιξης [103-105]. Χρησιμοποιώντας μοριακή κατηγοριοποίηση, μπορούμε να κατανοήσουμε καλύτερα την παθογένεση του όγκου, να προβλέψουμε τη συχνότητα και συμπεριφορά κάθε όγκου και να βελτιστοποιήσουμε τις προληπτικές και θεραπευτικές μεθόδους για την εξατομικευμένη αντιμετώπιση του καρκίνου [103-105].

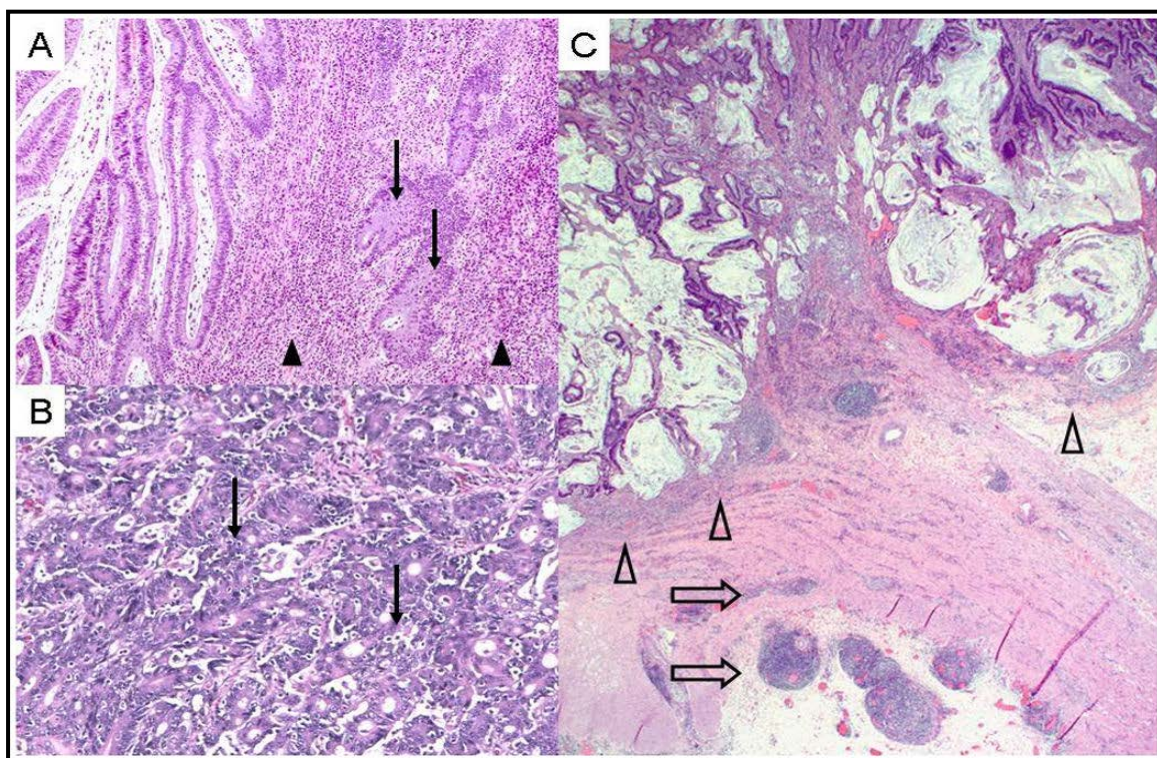
Τα μοριακά χαρακτηριστικά του καρκίνου μπορούν να επηρεάσουν την ανοσιακή απόκριση έναντι του όγκου [107,108]. Έρευνες έχουν δείξει ότι μία λεμφοειδής αντίδραση σχετίζεται συχνά με υψηλή MSI-high (MicroSatellite Instability) στον ορθοκολικό καρκίνο [109-114]. Τα κύτταρα των MSI-high όγκων έχουν μεταλλάξεις αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης σε κωδικόνια κατά μήκος του γονιδιώματος, οι οποίες μπορεί να περιλαμβάνουν γονιδιακά παράγωγα για τη ρύθμιση της ανοσίας [115-117]. Η λεμφοκυτταρική αντίδραση έναντι του όγκου συνδέεται με πολλές από αυτές τις μοριακές μεταβλητές υποδεικνύοντας τη σημασία της ανοσιακής απόκρισης του ξενιστή σε συγκεκριμένα στάδια της καρκινογένεσης [107,108,111-

113,118,119]. Η σχέση μεταξύ ανοσιακής απόκρισης του ξενιστή και των καρκινικών μοριακών μεταβλητών επηρεάζει σημαντικά την συνολική επιβίωση των ασθενών. Μία προφανής προγνωστική επίδραση της ανοσιακής αντίδρασης δυνατόν να αντανakλά τις μοριακές μεταβλητές ή η παρουσία ανοσιακής απόκρισης μπορεί απλά να είναι σημάδι ενός όγκου βραδείας εξέλιξης.

2.3 ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΙΑΚΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

Η παθολογοανατομική εξέταση των διηθήσεων από ανοσιακά κύτταρα σε τμήμα καρκινικού ιστού αποτελεί μία πολύ καλή προσέγγιση για την εκτίμηση της αντίδρασης του ξενιστή έναντι του όγκου. Άλλες μέθοδοι όπως οι μετρήσεις βιολογικών δεικτών στο πλάσμα και ανοσιακών κυττάρων στο περιφερικό αίμα μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως υποκατάστατα για την ανοσιακή απόκριση [120]. Παρόλ'αυτά, οι βιολογικοί δείκτες του πλάσματος μπορεί να αντιπροσωπεύουν τη συστηματική ανοσία και όχι την τοπική ανοσιακή αντίδραση στο μικροπεριβάλλον του όγκου.

Η ανοσοϊστοχημική και παθολογοανατομική εκτίμηση των ανοσιακών κυττάρων στον καρκινικό ιστό έχει αποτελέσει πρόκληση και δεν υπάρχει κάποια τυποποιημένη μέθοδος. Υπάρχουν όχι μόνο γενικές προκλήσεις όσον αφορά τις παθολογοανατομικές εκτιμήσεις των δεικτών καρκινικών ιστών, αλλά και προκλήσεις ειδικά στην εκτίμηση των ανοσιακών κυττάρων. Οι γενικές προκλήσεις στην παθολογοανατομική εκτίμηση των δεικτών καρκινικών ιστών περιλαμβάνουν προαναλυτικές μεταβλητές, όπως η λήψη του ιστού και η παρασκευή του και μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά την αντιγονικότητα των πρωτεϊνών του ιστού. Η ανοσοδραστικότητα των αντιγόνων του ιστού μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά από μικρές διαφορές στις συνθήκες των ανοσοϊστοχημικών διαδικασιών. Οι αναλυτικές μεταβλητές, όπως η συγγένεια και η ειδικότητα του αντισώματος και η εκτίμηση της χρώσης με αντισώματα, βασισμένη σε υπολογιστές ή μη, μπορεί να είναι σημαντικές. Η υποκειμενικότητα του παρατηρητή ανάμεσα στους παθολογοανατόμους είναι ένα υπαρκτό ζήτημα σε κάθε παθολογοανατομική εξέταση και ακόμα μεγαλύτερη πρόκληση στην εκτίμηση των ανοσιακών κυττάρων λόγω της πολυπλοκότητάς της. Για την καθημερινή κλινική πράξη, πρέπει να αναπτυχθούν ικανές μέθοδοι για την αξιόπιστη ανίχνευση ή τον ποσοτικό προσδιορισμό κάθε ιστοικού βιολογικού δείκτη. Όσον αφορά τη χρησιμοποίηση των ανοσιακών κυττάρων ως βιοδείκτες, πρέπει να ληφθούν υπόψη διάφορες παράμετροι τόσο στην κλινική πράξη, όσο και στον τομέα της έρευνας.



Εικόνα 9: Παθολογοανατομική εικόνα ανοσιακής απάντησης ξενιστή έναντι του όγκου, ο βαθμός διήθησης από τα ανοσιακά κύτταρα ποικίλει από όγκο σε όγκο (τροποποίηση από Shuji Ogino et al, Nat Rev Clin Oncol. 2011).

2.4 ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΕΝΑΝΤΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

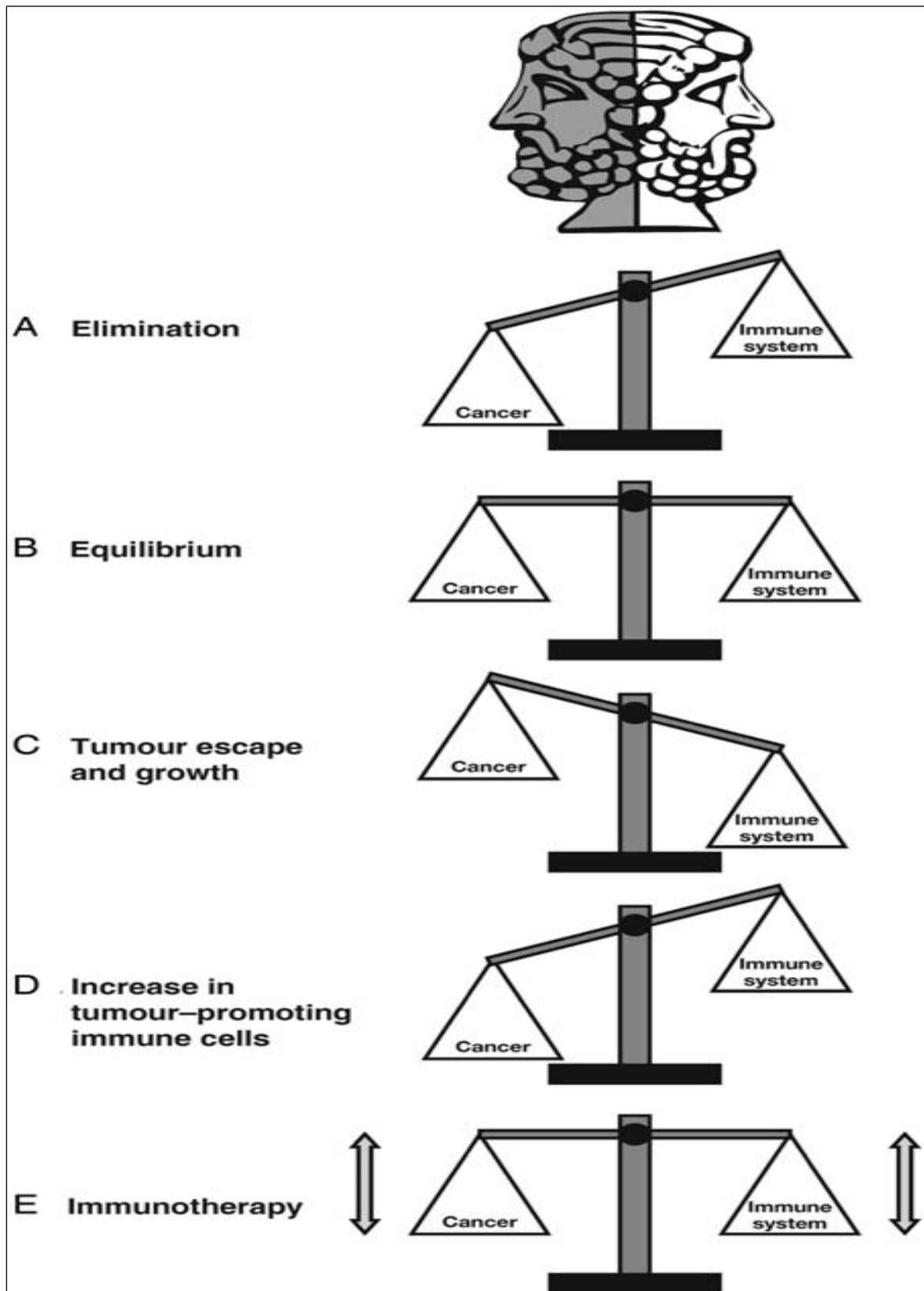
Η εκτίμηση ενός παθολογοανατόμου πρέπει να επικυρωθεί από ένα δεύτερο ανεξάρτητο παθολογοανατόμο και πρέπει να γίνει καθορισμός του ποσοστού συμφωνίας αυτών. Η χρήση απεικονιστικών αναλύσεων από υπολογιστές μπορεί να παρέχει σημαντικά πλεονεκτήματα για την εκτίμηση των διηθήσεων από ανοσιακά κύτταρα. Σε σύγκριση με τη διάγνωση ενός παθολογοανατόμου, η απεικονιστική ανάλυση από υπολογιστή προσφέρει πιο αντικειμενικές και ποσοτικές μετρήσεις, ειδικά σε μελέτες που χρησιμοποιούν ιστικές μικροσυστοιχίες (Tissue MicroArrays - TMAs) [121]. Παρόλα αυτά η χρήση προγραμμάτων υπολογιστή δεν αποκλείει αυτόματα την προδιάθεση του παρατηρητή. Πράγματι, κατά τη διάρκεια εξέτασης τμημάτων ολόκληρου ιστού, ο ερευνητής συχνά απαιτείται να επιλέξει συγκεκριμένα πεδία για λεπτομερή απεικονιστική ανάλυση. Σε αυτή την περίπτωση η επιλογή περιοχών του ιστού για εξέταση μπορεί να υπόκειται σε υποκειμενικά κριτήρια. Θα είναι απαραίτητο να διενεργηθούν μελέτες επικύρωσης, για να καθοριστεί συμφωνία των παθολογοανατόμων όσον αφορά την επιλογή των περιοχών ιστού για ανάλυση.

2.5 ΑΝΟΣΟΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ (CANCER IMMUNOEDITING)

Είναι γνωστό ότι κατά τη διάρκεια της ζωής του ανθρώπου στα κύτταρα του λαμβάνουν χώρα πλήθος αυτόματων μεταλλάξεων. Αποτέλεσμα του γεγονότος αυτού είναι η κακοήθης εξαλλαγή των κυττάρων, η οποία παρότι συμβαίνει αρκετά συχνά τις περισσότερες φορές δεν καταλήγει στην ανάπτυξη κάποιου όγκου. Αυτό οφείλεται σε ένα βαθμό στην ύπαρξη του ανοσοποιητικού συστήματος το οποίο διαθέτει μηχανισμούς για την αντιμετώπιση και την καταστροφή των κακοήθως εξαλλασσόμενων κυττάρων.

Το θεωρητικό υπόβαθρο αυτής της δράσης του ανοσοποιητικού συστήματος βασίζεται στη θεωρία της ανοσοεπιτήρησης του καρκίνου (cancer immunosurveillance), που προτάθηκε αρχικά από τον Ehrlich το 1909 και διατυπώθηκε τελικά στα μέσα της δεκαετίας του 1950, από τους M. Burnet και L. Thomas [122]. Τα τελευταία χρόνια ο R. Schreiber διατύπωσε μια πιο ολοκληρωμένη θεωρία για τη σχέση ανοσοποιητικού συστήματος και καρκίνου, εισάγοντας τον όρο ανοσοδιαμόρφωση του καρκίνου (cancer immunoediting) [123-126]. Σύμφωνα με αυτή η σχέση ανοσοποιητικού συστήματος και καρκίνου ακολουθεί μια εξελικτική πορεία τριών φάσεων, η οποία οδηγεί τελικά στην καρκινογένεση και αυτές είναι: **εξάλειψη - ισορροπία - διαφυγή (elimination - equilibrium - escape)**. Οι όγκοι λοιπόν δημιουργούνται όταν τα νέα καρκινικά κύτταρα που προκύπτουν συνεχώς με τη διαδικασία της κακοήθους εξαλλαγής (malignant transformation) κατορθώσουν να διαφύγουν από την επιτήρηση του ανοσοποιητικού συστήματος (immunoescape).

Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί που φαίνεται να συμβάλουν στη διαφυγή των καρκινικών κυττάρων από την ανοσοεπιτήρηση. Πολλοί τύποι καρκινικών κυττάρων για παράδειγμα εκλύουν παράγοντες ικανούς να τροποποιήσουν το μικροπεριβάλλον και να επηρεάσουν την επιβίωση τους με αποτέλεσμα την γρήγορη εξέλιξη της νόσου. Κάποια καρκινικά κύτταρα εκφράζουν παράγοντες που αναστέλλουν την ανάπτυξη ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων ή εκφράζουν στην επιφάνεια τους προσδέτες που προκαλούν απόπτωση σε κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα, NK κύτταρα, ουδετερόφιλα και μακροφάγα. Ένας από τους τελευταίους παράγοντες πιθανολογείται ότι είναι και το μόριο RCAS1 του οποίου η έκφραση στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την διαφυγή των κακοήθων αυτών κυττάρων από την επιτήρηση του ανοσοποιητικού συστήματος (immunoescape), προκαλώντας κυρίως απόπτωση στα ανοσιακά κύτταρα που υπάρχουν στο μικροπεριβάλλον του όγκου.



Εικόνα 10: Θεωρία ανοσοδιαμόρφωσης του καρκίνου - cancer immunoediting (τροποποίηση από O. J. Finn, Annals of Oncology 2012).

Συμπερασματικά, λοιπόν το ανοσιακό σύστημα κατέχει μεγάλη ικανότητα για ειδική καταστροφή των όγκων με μηδενική τοξικότητα στο φυσιολογικό ιστό και διατηρώντας μακροχρόνια μνήμη η οποία πιθανότατα θα αποτρέψει την μελλοντική υποτροπή της νόσου. Οι μεγάλες εξελίξεις στον τομέα της ανοσολογίας του καρκίνου τα τελευταία έτη έχουν προσφέρει τη γνώση και τις τεχνικές για να αναπτυχθούν καινοτόμες ανοσοθεραπευτικές προσεγγίσεις στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Οι τελευταίες περιλαμβάνουν μεθόδους που ενισχύουν την ανοσία έναντι του όγκου, αναστέλλοντας ανασταλτικές οδούς και ανασταλτικά κύτταρα στο μικροπεριβάλλον του όγκου ή άλλες μεθόδους που μπορούν να βελτιώσουν την ειδικότητα της αντικαρκινικής ανοσίας, προάγοντας την εξάπλωση των T κυττάρων και αντισωμάτων έναντι καλά καθορισμένων καρκινικών αντιγόνων (π.χ. αντικαρκινικά εμβόλια).

3. ΠΡΩΤΕΪΝΗ RCAS1

3.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ RCAS1

Το RCAS1 (Receptor-binding Cancer Antigen expressed on SiSo cells) αποτελεί ένα νέο σχετικά καρκινικό αντιγόνο το οποίο εκφράζεται σε νεοπλάσματα διαφόρων οργάνων. Το αντίσωμα mAb 22-1-1 παρασκευάστηκε και απομονώθηκε από ποντίκια που είχαν εμβολιαστεί με κύτταρα από την ανθρώπινη κυτταρική σειρά SiSo, η οποία αποτελείται από καρκινικά κύτταρα αδενοκαρκινώματος τραχήλου της μήτρας [127]. Ακολούθως το cDNA που κωδικοποιεί το αντιγόνο 22-1-1 απομονώθηκε και ονομάστηκε RCAS1 [128]. Το RCAS1 cDNA έχει κλωνοποιηθεί και η λειτουργία της πρωτεΐνης έχει αναλυθεί. Η πρωτεΐνη RCAS1 εκφράζεται από τα κύτταρα SiSo και επάγει την απόπτωση των κυττάρων που φέρουν τον RCAS1-υποδοχέα [128].

RCAS1 (Receptor-binding Cancer Antigen expressed on SiSo cells)

protein sequence:

MAITQFRLFKFCTCLATVFSFLKRLICRSGRGRKLSGDQITLPTTVDYSSVPKQTDVEEW
TSWDEADAPTSVKIEGGNGNVATQQNSLEQLEPDYFKDMTPITIRKTQKIVIKKREPLNFG
IPDGSTGFSSRLAATQDLPIHQSSSELGDLDTWQENTNAWEEEEEDAAWQAEEVLRQQK
LADREKRAAEQQRKKMEKEAQRLMKKEQNKIGVKLS (213 aa)

subunit: homodimer

domain: the coiled coil domain is necessary for the homodimerization

structure: is predicted to have an N-terminal transmembrane segment (residues 2-29) and a coiled-coil structure in the C-terminal protein

induction: by estrogen

subcellular organization: Golgi apparatus membrane, single-pass type II membrane protein

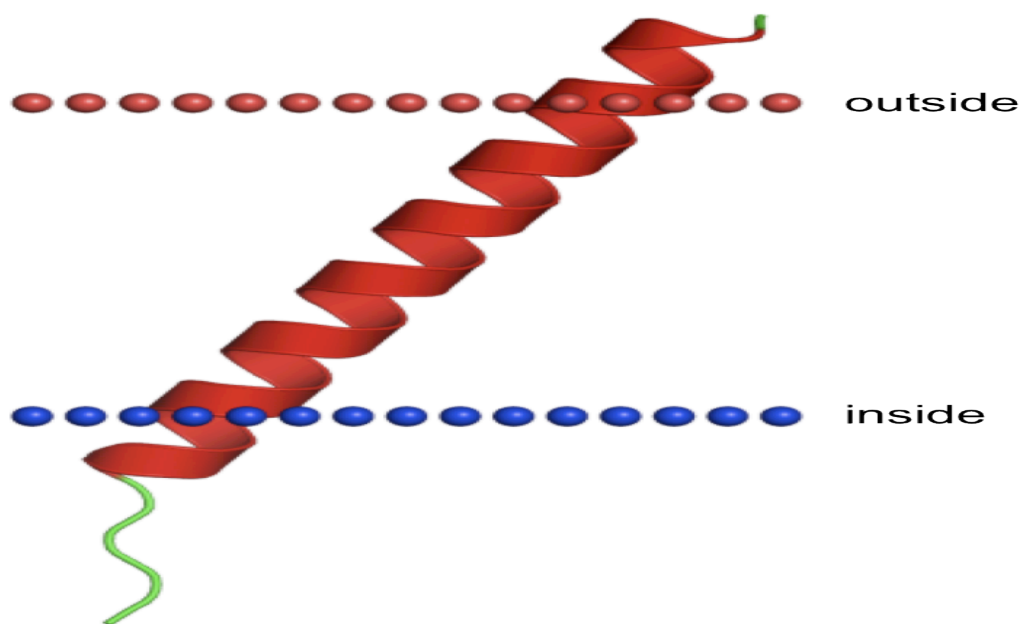
localization: Golgi apparatus membrane (transmembranebitopic protein)

organisms: human and higher vertebrates

Πίνακας 12: Γενικά στοιχεία για την πρωτεΐνη RCAS1 αμινοξικά κατάλοιπα, δομή, εντόπιση κ.α. (στοιχεία από τις βάσεις δεδομένων για πρωτεΐνες π.χ. Swiss-Prot, UniProt, www.uniprot.org).

Πρόκειται λοιπόν για μια μεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II που αποτελείται από 213 αμινοξικά κατάλοιπα (RCAS1, 213aa, type II membrane protein) και έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει ολιγομερή μέσω C-τερματικών σπειροειδών δομών (coiled-coil δομών). Εντοπίζεται κυρίως στη μεμβράνη της συσκευής Golgi, έχει μοριακό βάρος περίπου 40-Kd και είναι μια πρωτεΐνη τύπου II που σχηματίζει ομο-ολιγομερή στην τριτοταγή της δομή. Συχνά υπάρχει και σε διαλυτή μορφή, πιθανότατα μέσω εναλλακτικού τρόπου διασύνδεσης των ολιγομερών της (splicing) [128,129]. Το EBAG9, κομμάτι του οιστρογονικού υποδοχέα τύπου αντιγόνου 9, το οποίο είναι ταυτόσημο με το RCAS1, αναγνωρίστηκε επίσης ως ένα γονιδιακό προϊόν σχετιζόμενο με την επίδραση των οιστρογόνων στο ανθρώπινο γονιδίωμα, από μια cDNA βιβλιοθήκης της ανθρώπινης κυτταρικής γραμμής MCF-7 από καρκινικά κύτταρα του μαστού [130]. Επίσης έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη RCAS1 έχει ένα ανάλογο γονίδιο στο 8q23 [131].

Topology in Golgi apparatus membrane

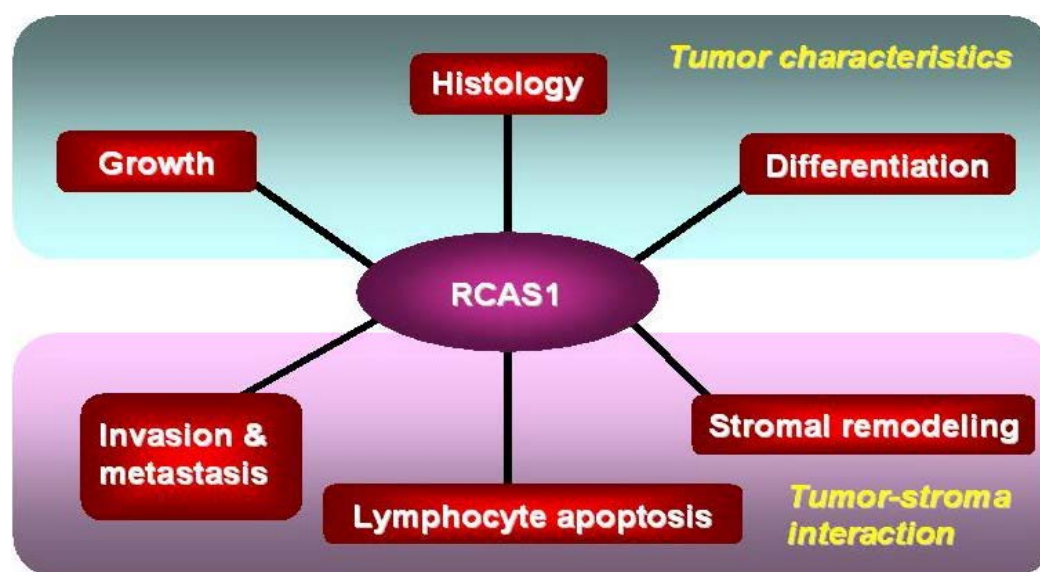


Εικόνα 11: Προτεινόμενη δομή για την πρωτεΐνη RCAS1 (στοιχεία από τις βάσεις δεδομένων για πρωτεΐνες π.χ. Swiss-Prot, UniProt, www.uniprot.org).

3.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ RCAS1

Το RCAS1 όπως προαναφέρθηκε είναι μία μεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II που δρα ως ένας προσδέτης για έναν υποθετικό υποδοχέα (RCAS1_R) που είναι παρών σε διάφορες ανθρώπινες κυτταρικές σειρές και σε φυσιολογικά περιφερικά λεμφοκύτταρα και NK κύτταρα (T, B και

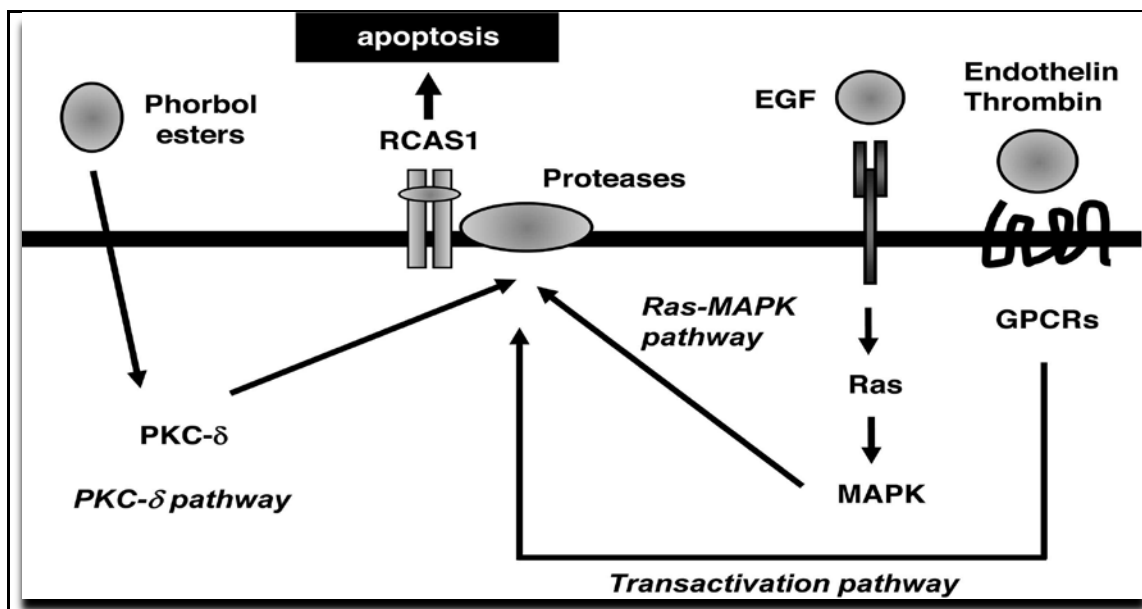
NK κύτταρα), ιδιαίτερα μετά την ενεργοποίησή τους από το ανοσοποιητικό σύστημα [128]. Το RCAS1 αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη και προκαλεί την απόπτωση μέσω της σύνδεσης του με τον υποδοχέα (RCAS1_R) του οποίου η έκφραση επάγεται από την παρουσία του προσδέτη του δηλαδή του RCAS1 [128]. Η εξουδετέρωση της έκφρασης του RCAS1 με την παρεμβολή RNA αποκαθιστά την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων αναστέλλοντας την απόπτωση και αναστρέφοντας μερικώς την έκκριση IFN- γ από τα T κύτταρα [132].



Εικόνα 12: Σχηματική παρουσίαση των βιολογικών λειτουργιών του RCAS1 (τροποποίηση από Kenzo Sonoda, Front Biosc 2008).

Μελέτες έδειξαν ότι το RCAS1 προκαλεί απόπτωση μέσω της απώλειας της μιτοχονδριακής διαμεμβρανικής διαφοράς δυναμικού (transmembrane mitochondrial potential) και της ενεργοποίησης των κασπασών και κυρίως της κασπάσης 3 [128,132]. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι το RCAS1 έχει και ρυθμιστικές επιδράσεις στην απόπτωση των προγονικών ερυθροβλαστών (erythroid progenitor cells) [133]. Ωστόσο, δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο με ποιό τρόπο το RCAS1 προκαλεί την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και την απόπτωση στα κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα RCAS1_R. Μολονότι λοιπόν το RCAS1 επάγει την απόπτωση σε κύτταρα που εκφράζουν τον υποθετικό υποδοχέα του RCAS1_R, οι μηχανισμοί με τους οποίους πραγματοποιείται αυτό παραμένουν ασαφείς, επειδή ο υποθετικός αυτός υποδοχέας του δεν έχει απομονωθεί. Το RCAS1 έχει επίσης εντοπιστεί στον ορό του αίματος σε διαλυτή

μορφή sRCAS1 και μπορεί πιθανότατα να απελευθερωθεί από την μεμβρανική μορφή με την απόπτωση ή την απόσπαση του εξωτερικού τμήματος του μορίου (ectodomain shedding). Αυτή η διαλυτή μορφή του sRCAS1 έχει αποδειχθεί πως διατηρεί σημαντικά την ίδια δραστηριότητα όπως η μεμβρανική μορφή [134,135].



Εικόνα 13: Το RCAS1 προκαλεί απόπτωση μέσω ectodomain shedding (τροποποίηση από Kenzo Sonoda, *Histol Histopathol* 2011).

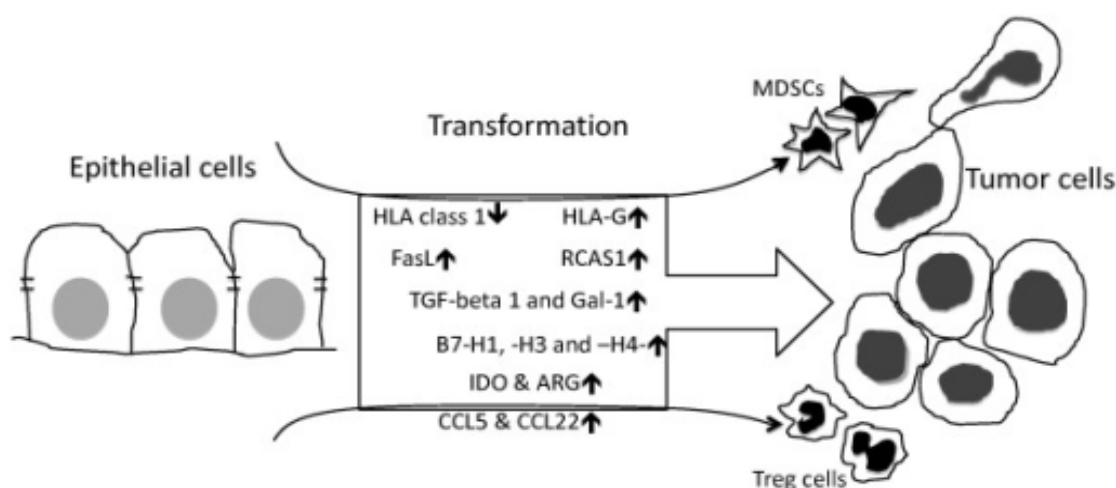
3.3 ΠΡΩΤΕΪΝΗ RCAS1 ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

3.3.1 ΠΡΩΤΕΪΝΗ RCAS1 ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΔΙΑΦΥΓΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Οι όγκοι θεωρούνται συστηματικές παθήσεις που προκαλούνται από το μη ελεγχόμενο πολλαπλασιασμό των κακοηθών κυττάρων. Σημαντικό ρόλο στη νεοπλασματική αυτή διαδικασία παίζει η αλληλεπίδραση μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και του γύρω από αυτά μικροπεριβάλλοντος (microenvironment). Το ανοσοποιητικό σύστημα παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην προστασία ενός οργανισμού από την καρκινογένεση και τη δημιουργία ενός όγκου, εντοπίζοντας και εξουδετερώνοντας διάφορα καρκινικά κύτταρα. Είναι γνωστό ότι η εξουδετέρωση του υποδοχέα της INF- γ στα ποντίκια σχετίζεται με αυξημένη συχνότητα όγκων [136]. Επιπλέον, η συμβολή των εξειδικευμένων στα αντιγόνα T κυττάρων στην καταπολέμηση των όγκων είναι σημαντική [136]. Αυτές οι αναφορές υποδεικνύουν την ύπαρξη ανοσολογικών μηχανισμών παρακολούθησης που λειτουργούν ενάντια στην καρκινογένεση και την ανάπτυξη

όγκων στο ανθρώπινο οργανισμό. Ωστόσο, οι ανοσολογικές απαντήσεις στους όγκους δεν είναι πάντοτε ολοκληρωμένες και τα καρκινικά κύτταρα που καταφέρνουν να διαφύγουν της ανοσολογικής επιτήρησης επιβιώνουν και εξελίσσονται.

Όπως προαναφέρθηκε τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος όπως T, B και NK με τη παρουσία του προσδέτη RCAS1 εκφράζουν στην επιφάνεια τους τον υποδοχέα RCAS1_R, ιδιαίτερα όταν είναι ενεργοποιημένα. Με τον τρόπο αυτό προκαλείται πρώτον η αναστολή της κυτταρικής τους ανάπτυξης και δεύτερον η απόπτωση τους μέσω της σύνδεσης RCAS1-RCAS1_R [128]. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να σχετίζεται με το μηχανισμό διαφυγής των καρκινικών κυττάρων από την ανοσολογική επιτήρηση του ξενιστή (ανοσοδιαφυγή - immunoescape) και έχει προταθεί ότι το RCAS1 μπορεί να παίζει σπουδαίο ρόλο στη διαδικασία αυτή και κατά συνέπεια στην εμφάνιση, εξέλιξη, ανάπτυξη και μετάσταση ενός νεοπλασματος [128,137-140].



Εικόνα 14: Έκφραση ανοσορυθμιστικών-immunoregulatory μορίων κατά το μετασχηματισμό ενός επιθηλιακού κυττάρου σε καρκινικό υπό την πίεση της ανοσοεπιτήρησης-immune surveillance (τροποποίηση από Du C et al, J. Exp. Clin. Cancer Res. 2011).

3.3.2 ΠΡΩΤΕΪΝΗ RCAS1 ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ

Το μικροπεριβάλλον του όγκου (microenvironment) αποτελεί το υπόστρωμα του νεοπλασματος και είναι ο ιστός που καθορίζει την ανάπτυξή του, την εξέλιξή του και την ικανότητά του να οδηγήσει σε μεταστάσεις. Το μικροπεριβάλλον του όγκου μπορεί επίσης να περιορίσει την πρόσβαση των θεραπευτικών παραγόντων στο νεόπλασμα, να μεταβάλλει τον μεταβολισμό αυτών των παραγόντων και να συμμετέχει στην ανάπτυξη της αντίστασης στη

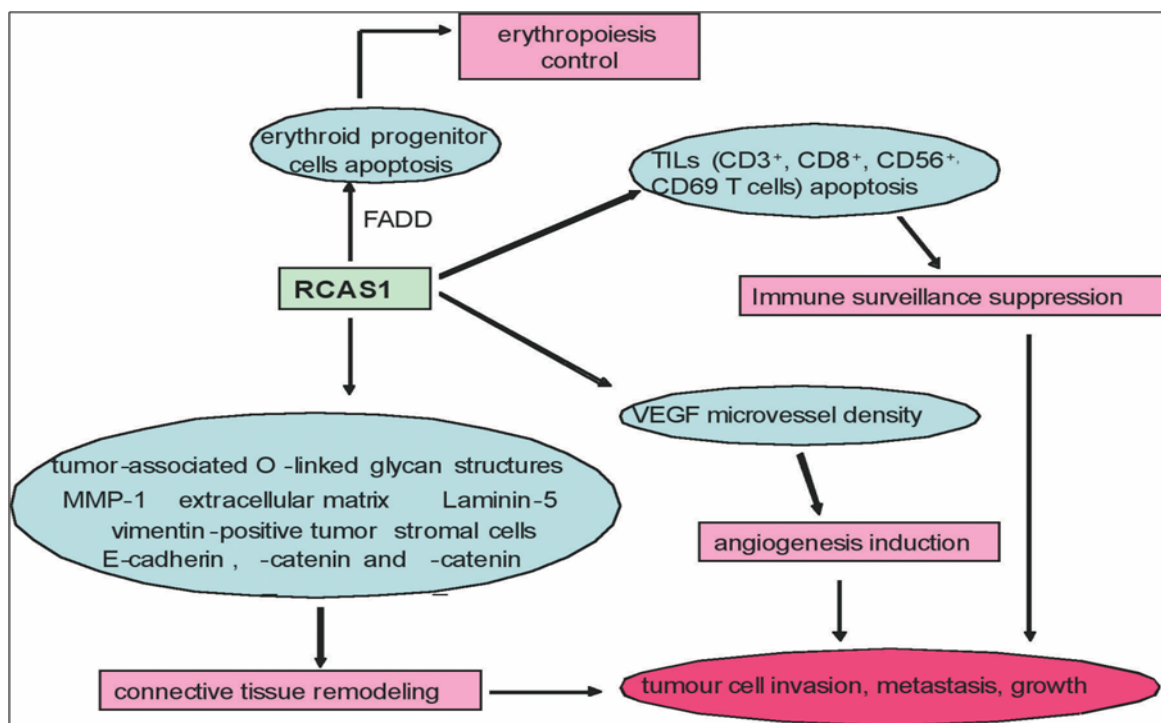
χημειοθεραπεία. Λόγω του ότι το μικροπεριβάλλον του όγκου παίζει ρόλο σε κάθε στάδιο της ανάπτυξης του όγκου, η γνώση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του όγκου και του μικροπεριβάλλοντος του φαίνεται να είναι σημαντική για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών για αποκατάσταση των φυσιολογικών μηχανισμών ελέγχου [141,142].

Το μικροπεριβάλλον του όγκου δημιουργείται από τον ιστό που περιβάλλει τα κύτταρα του όγκου και αποτελείται από κύτταρα, εξωκυττάρια ουσία και τις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας. Πολλοί τύποι κυττάρων μπορούν να αναγνωριστούν στο υπόστρωμα, συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών κυττάρων και των προδρόμων μορφών τους. Ειδικότερα, τα κύτταρα αυτά είναι τα περικύτταρα, οι λείες μυϊκές ίνες, οι ινοβλάστες, οι σχετιζόμενους με τον όγκο ινοβλάστες, οι μυοϊνοβλάστες, τα ουδετερόφιλα, τα βασεόφιλα, τα ηωσινόφιλα, τα ιστιοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα T και B, τα κύτταρα φυσικοί φονείς (natural killers NK), καθώς και τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, όπως τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα [141,142].

Το υπόστρωμα του όγκου μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του όγκου. Τα καρκινικά κύτταρα είναι ικανά να διαπερνούν το περιβάλλον υπόστρωμα, αλλά την ίδια στιγμή, το υπόστρωμα του όγκου είναι αυτό που εξασφαλίζει την απαραίτητη παροχή αίματος και τους παράγοντες ανάπτυξης για τα κύτταρα του όγκου στοιχεία τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξή του. Μερικά νεοπλάσματα χρησιμοποιούν και τροποποιούν το υπάρχον υπόστρωμα για την ανάπτυξή τους, ενώ άλλοι όγκοι επάγουν την ανάπτυξη νέων υποστρωμάτων [143]. Εν ολίγοις, το καρκινικό υπόστρωμα δεν είναι ένας ιστός νεοπλασματικός, αλλά ένας ιστός που έχει τροποποιηθεί από τον όγκο με σκοπό τη δική του ανάπτυξη. Στο μικροπεριβάλλον του όγκου λαμβάνουν πράγματι χώρα πολλές διεργασίες που σχετίζονται με την φλεγμονή και ανοσοαπόκριση και καθορίζουν την ανάπτυξη του όγκου ενώ την ίδια στιγμή εμποδίζουν την αποτελεσματική αντικαρκινική ανοσολογική απάντηση.

Έχει προταθεί ότι το RCAS1 εμπλέκεται στην αναδιαμόρφωση-remodeling του μικροπεριβάλλοντος του όγκου στην περίπτωση του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας [134]. Ειδικότερα, η έκφραση του RCAS1 συνδέεται σημαντικά με την έκφραση της μεταλλοπρωτεΐνης-1 (MMP-1) και της λαμινίνης-5 στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας [134]. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η έκφραση του RCAS1 σε περιπτώσεις καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σχετίζεται με την έκφραση του VEGF και την πυκνότητα των μικρών αγγείων (MVD) και έτσι είναι δυνατόν να εξηγηθεί η πιθανή συμμετοχή του RCAS1 στην αναδιαμόρφωση του μικροπεριβάλλοντος μέσω της ρύθμισης της αγγειογένεσης [132,144]. Σε περιπτώσεις επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών, η ένταση της έκφρασης του RCAS1 ήταν

αντιστρόφως ανάλογη με τον αριθμό των θετικών κυττάρων στη βιμεντίνη (vimentin) στο υπόστρωμα και με το δεδομένο αυτό, έχει προταθεί ότι το RCAS1 εμπλέκεται στην αναδιαμόρφωση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου [145,146]. Επιπλέον, σε μια πρόσφατη μελέτη φάνηκε ότι το RCAS1 σε συνδυασμό με τη vimentin και τη MT είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανοί δείκτες της αναδιαμόρφωσης που συντελείται στο μικροπεριβάλλον των όγκων (tumor microenvironment remodelling) [147]. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι το RCAS1 μπορεί να παίζει έναν κεντρικό ρόλο στην εξέλιξη του όγκου κατά την τροποποίηση των χαρακτηριστικών του συνδετικού ιστού και γενικότερα του μικροπεριβάλλοντος που υπάρχει γύρω από τα καρκινικά κύτταρα.



Εικόνα 15: Δράσεις του RCAS1 σε σχέση με τον καρκίνο (τροποποίηση από Giaginis C et al, Histol Histopathol. 2009).

3.3.3 ΠΡΩΤΕΪΝΗ RCAS1 ΚΑΙ ΔΙΑΦΟΡΟΙ ΤΥΠΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Με βάση το γεγονός ότι η πρωτεΐνη RCAS1 διαδραματίζει πιθανότατα ένα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ενός όγκου, επιτρέποντας στα καρκινικά κύτταρα να διαφεύγουν της ανοσολογικής επιτήρησης *in vitro*, αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί για να αξιολογήσουν τη σημασία της *in vivo* έκφρασης της πρωτεΐνης RCAS1 στους ιστούς και τη σχέση που ενδέχεται να έχει αυτή με τα διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών και την

απόπτωση των κυττάρων TILs (Tumor Infiltrating Lymphocytes-TILs). Τα κύτταρα TILs είναι λεμφοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, όπως για παράδειγμα τα κανονικά ενεργοποιημένα T-κύτταρα, τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK) και τα μη T- ή μη B-λεμφοκύτταρα, τα οποία ανιχνεύονται μέσα στον νεοπλασματικό ιστό. Τα TILs είναι το αποτέλεσμα της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή έναντι των καρκινικών κύτταρων [148]. Η παρουσία των TILs έχει επίσης προγνωστική σημασία και η ύπαρξη CD8 + T-κυττάρων εντός του όγκου αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη πρόγνωσης για αρκετούς τύπους όγκων [149,150]. Τα διαθέσιμα μέχρι τώρα δεδομένα όσον αφορά την κλινική σημασία της έκφρασης της πρωτεΐνης RCAS1 σε διάφορα νεοπλάσματα παρουσιάζονται παρακάτω.

Type of Neoplasia	Sample Size	Age	Gender	Grade	Stage	pT	pN	pM	Type	TILs	apoptosis	Survival	Ref
Oral	130	-	-	-	-	-	-	-			+	-	Toyoshima et al., 2006
	84	-	-	-	+	+	+					+	Tsai et al., 2008
	40				+						+		Fukuda et al., 2004
Esophageal	95	+	-	-	+	±	-	-				+	Nakakubo et al., 2002
	107	-	-	-	+	-	+				-	+	Tsujitani et al., 2007
	114	-	-	-	+	-	+	-				+	Kato et al., 2005
	67					-	-					-	Ikeguchi et al., 2003
Gastrointestinal													
Gastric	129	-	-	+		-	+				±	+	Fukuda et al., 2002
	54	-	-			+	+		+		+		Nakamura et al., 2004
Colorectal	58	-	-	-	+	-	+				+	+	Okada et al., 2003
	60	-	-	+	+	-	+	-					Leelawat et al., 2003
	105	-	-	-	+		+					+	Tsujitani et al., 2007
	105				+			-				+	Tsujitani et al., 2003
GIMT	70											+	Naito et al., 2005
Liver and Gallbladder													
HCC	68	-	-	-	-	-							Noguchi et al., 2001
	60			-	-							-	Ikeguchi et al., 2003
	143	-	-	+		-		-				-	Aoki et al., 2003
EBDC	60	-	-	-	-	-	-	-				+	Suzuoki et al., 2002
Gallbladder	46	-	-	-	+		+		-			+	Oshikiri et al., 2001
Pancreatic	76	-	-	+	-	±	-	-				-	Giaginis et al., 2008
	80	-	-	-	±	-	±					+	Hiraoka et al., 2002

Πίνακας 13: Συσχετίσεις της ιστικής έκφρασης του RCAS1 με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με νεοπλάσματα διαφόρων οργάνων (τροποποίηση από Giaginis C et al, Histol Histopathol. 2009).

Υπάρχουν πλέον δεδομένα ότι η πρωτεΐνη RCAS1 υπερεκφράζεται σε διάφορους όγκους και συνεπώς ενδέχεται να συμμετέχει σε πολλές πτυχές της βιολογίας του καρκίνου, όπως είναι η διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός, η επέκταση, η μετάσταση και η αγγειογένεση των όγκων. Αυξημένη ιστική έκφραση του RCAS1 αναφέρθηκε σε κακοήθεις όγκους από διάφορα όργανα, όπως είναι η μήτρα, το δέρμα, το ήπαρ, η χοληδόχος κύστη, ο στόμαχος, ο πνεύμονας, το παχύ έντερο, ο μαστός, ο οισοφάγος, το πάγκρεας, η γλώσσα, ο θυρεοειδής, η υπόφυση κ.α. [151-

163]. Παρά τη ποικιλία των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν οι περισσότερες μελέτες έδειξαν ότι το RCAS1 εμπλέκεται σε πολλές ανθρώπινες κακοήθειες. Η έκφραση του RCAS1 στους καρκινικούς ιστούς συσχετίστηκε με σημαντικές κλινικοπαθολογικές παραμέτρους.

Ειδικότερα, στον καρκίνο του στόματος και του οισοφάγου, στο καρκίνο του παχέος εντέρου, της χοληδόχου κύστης, του πνεύμονα και του προστάτη καθώς και στα γλοιώματα, η έκφραση του RCAS1 συσχετίστηκε με το στάδιο της νόσου [164-174,156]. Στα καρκινώματα της γαστρεντερικής οδού, όπως τον καρκίνο του στομάχου, τα GITs (gastrointestinal tumors - GITs) ή GIMTs (gastrointestinal mesenchymal tumors - GIMTs) και τον καρκίνο του παχέος εντέρου η έκφραση του RCAS1 συσχετίστηκε με την ύπαρξη μετάστασης στους λεμφαδένες [169-171,175,176].

Έχει δειχθεί ότι τα κύτταρα των όγκων μπορούν να αποκτήσουν την ικανότητα να διαφεύγουν της επιτήρησης του ανοσοποιητικού συστήματος με ποικίλους μηχανισμούς, όπως είναι και η έκφραση του RCAS1. Τα καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν το RCAS1 μπορούν να επάγουν την απόπτωση των TILs κυττάρων που βρίσκονται γύρω τους στο μικροπεριβάλλον. Πάνω στο θέμα αυτό, αρκετές μελέτες απέδειξαν μια πιθανή συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του RCAS1 και της απόπτωσης των κυττάρων TILs στα ανθρώπινα νεοπλάσματα. Στην πραγματικότητα, η αναλογία των αποπτωτικών TILs ήταν σημαντικά υψηλότερη στους RCAS1-θετικούς όγκους σε σχέση με τους RCAS1-αρνητικούς όγκους της στοματικής κοιλότητας, του στομάχου, του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, του μαστού, του τραχήλου της μήτρας και του εγκεφάλου [165,175-177,169,137,132,174]. Τα ευρήματα αυτά αποτελούν σημαντική ένδειξη ότι η προερχόμενη από τον όγκο RCAS1 πρωτεΐνη μπορεί να επάγει την απόπτωση των TILs μέσω ενός RCAS1-υποδοχέα (RCAS1_R), οδηγώντας σε ανοσοκυτταρική ανεπάρκεια και ανοσοδιαφυγή των καρκινικών κυττάρων σε αρκετούς τύπους νεοπλασιών.

Η ιστική έκφραση του RCAS1 αποδείχθηκε επίσης ότι σχετίζεται με το ποσοστό επιβίωσης και την πρόγνωση των ασθενών σε αρκετούς τύπους κακοηθειών, όπως στο πλακώδες καρκίνωμα του οισοφάγου, τον καρκίνο του στομάχου, τα GIMTs, τον καρκίνο της χοληδόχου κύστης, του παχέος εντέρου, του μαστού, του πνεύμονα, του τραχήλου της μήτρας και στα γλοιώματα [166-168,175,180,156,181,169-171,178,137,172,182,179,132,174]. Σε αυτούς τους τύπους καρκίνου, πολυπαραγοντικές αναλύσεις έδειξαν ότι η αυξημένη έκφραση του RCAS1 αποτελεί ανεξάρτητο αρνητικό προγνωστικό παράγοντα για την επιβίωση των ασθενών. Τα δεδομένα φαίνεται να είναι αμφιλεγόμενα στην περίπτωση του καρκίνου της στοματικής

κοιλότητας, του καρκίνου του παγκρέατος και του προστάτη [177,183,187,173,], ενώ δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση για το καρκίνο του ήπατος και των ωοθηκών [184-186,188].

Type of neoplasia	Sample size	Age	Gender	Grade	Stage	pT	pN	pM	Type	TILs Apoptosis	Surv	Ref
Lung	66	-	+Ad,SCC	+Ad-SCC	±Ad,SCC -Ad-SCC	+Ad,SCC +Ad-SCC	-Ad,SCC -Ad-SCC		+	+	+	Iwasaki et al.,2000
	102	-	-	+	+				-		+	Izumi et al.,2001
	73										-	Timotheadou et al., 2007
	102	-	-	-	-						+	Oizumi et al., 2002
	38	-	-		-				-		+	Wicherek et al., 2005
Breast	91	-		-	-	-	-			+		Suzuki et al., 2001
	37	-		+			-					Rousseau et al., 2002
	79	-		+	-	±	-	+	-			Theocharis et al., 2006
Ovarian	90	-	-	-	+	-			+		-	Akahira et al., 2004
Endometrial	50			-	-		-					Zhou et al., 2008
	121			+	-		-		+			Sonoda et al., 2000
Cervical	154	-			-	+	+		±		+	Sonoda et al., 2005a
	120				-		+		-	+	+	Sonoda et al., 2007
Prostatic	81	-			+						±	Takahashi et al., 2003
Neurological	57	-	-	+	+					+	+	Nakabayashi et al., 2007
	50					-			-			Umeoka et al., 2001
Skin	61				+							Takahashi et al., 2001

Πίνακας 14: Συσχετίσεις της ιστικής έκφρασης του RCAS1 με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με νεοπλάσματα διαφόρων οργάνων (τροποποίηση από Giaginis C et al, Histol Histopathol. 2009).

Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι διαθέσιμες μέχρι σήμερα μελέτες δεν χρησιμοποίησαν τα ίδια κριτήρια για να αξιολογήσουν την έκφραση του RCAS1 στους διάφορους ιστούς. Οι περισσότερες μελέτες αξιολόγησαν την ανοσοϊστοχημική έκφραση του RCAS1 με βάση το ποσοστό των RCAS1-θετικών καρκινικών κυττάρων, χρησιμοποιώντας όμως διαφορετικά όρια για τον καθορισμό της έκφρασης του RCAS1. Ένας μικρότερος αριθμός μελετών χρησιμοποίησε την ένταση της χρώσης για την μελέτη της έκφρασης του RCAS1, ενώ άλλοι χρησιμοποίησαν τόσο την έκταση όσο και την ένταση της RCAS1 χρώσης εξάγοντας ένα συνολικό βαθμό, με διαφορετικά όμως όρια αξιολόγησης μεταξύ του συνόλου των μελετών. Έτσι, είναι εξαιρετικά σημαντικό να ορισθούν κοινά όρια και κριτήρια για την

μέτρηση της έκφρασης του RCAS1, προκειμένου αυτή να μπορέσει να αποκτήσει διαγνωστική και προγνωστική αξία στην καθημερινή κλινική πράξη. Επιπλέον, ορισμένες από τις μελέτες διεξήχθησαν σε έναν περιορισμένο αριθμό ασθενών, γεγονός που αυξάνει περαιτέρω την πιθανότητα σφάλματος κατά τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων, ενώ τα στοιχεία που προκύπτουν από μελέτες που διεξήχθησαν από μεγάλα δείγματα ασθενών είναι πολύ πιο αξιόπιστα.

Τέλος, υπάρχουν δεδομένα ότι οι συγκεντρώσεις του διαλυτού τμήματος του RCAS1 (sRCAS1) στον ορό ασθενών, μετρημένες με την ανοσοενζυμική μέθοδο Elisa, ενδεχομένως θα μπορούσαν να αποτελέσουν στο μέλλον χρήσιμους δείκτες για το screening διάφορων κακοηθειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του παγκρέατος, των πνευμόνων, των ωοθηκών, του ενδομητρίου και του τραχήλου της μήτρας [135,145,189,190]. Ο προσδιορισμός του διαλυτού τμήματος του RCAS1 στο πλευριτικό υγρό φαίνεται επίσης να αποτελεί ένα χρήσιμο δείκτη τόσο για τη διάγνωση του κακοήθους μεσοθηλιώματος όσο και για τις νεοπλασματικές πλευριτικές συλλογές γενικότερα είτε αυτές οφείλονται σε καρκίνο πνεύμονα είτε όχι [191-193]. Ωστόσο, η κλινική εφαρμογή των κυκλοφορούντων συγκεντρώσεων του RCAS1 στα βιολογικά υγρά, ως δείκτη για τη διαχείριση και τη πρόγνωση των ασθενών με κακοήθεια πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω, διότι τα μέχρι στιγμής διαθέσιμα δεδομένα είναι εξαιρετικά περιορισμένα.

Type of neoplasia	Sample size	Sample Type	Age	Gender	Grade	Stage	pT	pN	pM	Type	Survival	Ref
Gastrointestinal	82	Serum					-	+	-	+	+	Coban et al., 2006
Lung	45	Pleural Fluid	-	-					-	-	+	Aoe et al 2006
Ovarian	54	Serum			-	-				+		Sonoda et al., 2007
Endometrial	50	Serum	-			-		-		-		Sonoda et al., 2006
Cervical	63	Serum	-			+		-		+		Sonoda et al., 2006

Πίνακας 15: Συσχετίσεις των τιμών του διαλυτού RCAS1 με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με νεοπλάσματα διαφόρων οργάνων (τροποποίηση από Giaginis C et al, Histol Histopathol. 2009).

3.3.4 ΠΡΩΤΕΪΝΗ RCAS1 ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Στον καρκίνο του πνεύμονα, το RCAS1 εκφράζεται έντονα και μάλιστα ανιχνεύεται διάχυτα τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στη κυτταρική μεμβράνη των νεοπλασματικών κυττάρων. Το RCAS1 ανιχνεύθηκε επίσης στα φυσιολογικά κροσσωτά επιθηλιακά κύτταρα, ιδιαίτερα σε αυτά των βρόγχων και των βρογχιολίων [137,172,182].

Σε δύο μελέτες σε ασθενείς με NSCLC, η έκφραση του RCAS1 συσχετίστηκε σημαντικά με το μέγεθος του όγκου και το στάδιο της νόσου [137,172]. Στην πραγματικότητα, η έκφραση του RCAS1 σε περιπτώσεις NSCLC με μεγάλο μέγεθος όγκου ή προχωρημένο στάδιο νόσου ήταν σημαντικά ή οριακά σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με τις περιπτώσεις με μικρό μέγεθος όγκου ή με πρώιμο στάδιο νόσου [137]. Επιπλέον, το RCAS1 εκφράζονταν πιο συχνά σε αδενοκαρκινώματα χαμηλής διαφοροποίησης σε σχέση με τα μετρίως ή καλώς διαφοροποιημένα αδενοκαρκινώματα [137]. Από την άλλη πλευρά, ο Oizumi et al. δεν αναφέρουν καμία σημαντική συσχέτιση της έκφρασης RCAS1 με το μέγεθος του όγκου και το στάδιο της νόσου. Ωστόσο, η μελέτη αυτή διεξήχθη σε αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα και δεν περιλαμβάνουν πλακώδη νεοπλάσματα [182]. Σχετικά με την έκφραση του RCAS1 μεταξύ των διαφόρων ιστοπαθολογικών τύπων, ο Iwasaki et al. έδειξαν ότι ήταν σημαντικά υψηλότερη στα πλακώδη νεοπλάσματα σε σχέση με τα αδενοκαρκινώματα [137], ενώ ο Izumi et al. δεν βρήκαν οποιαδήποτε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του RCAS1 και του ιστοπαθολογικού τύπου του όγκου [172].

Σε περιπτώσεις NSCLC με αυξημένη έκφραση του RCAS1, ο αποπτωτικός δείκτης των TILs ήταν σημαντικά υψηλότερος από ότι στις περιπτώσεις με χαμηλή έκφραση του RCAS1, γεγονός που υποδηλώνει ότι το RCAS1 που εκφράζεται από τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να διεγείρει την απόπτωση των κυττάρων TILs και έτσι να συμβάλλει στην διαφυγή του όγκου από το ανοσοποιητικό σύστημα [137].

Όσον αφορά στην προγνωστική αξία της έκφρασης του RCAS1, οι ασθενείς με NSCLC που παρουσιάζουν υψηλή έκφραση του RCAS1, χαρακτηρίζονται από σημαντικά χαμηλότερη συνολική επιβίωση από ότι οι ασθενείς με χαμηλή έκφραση του RCAS1 [137,172]. Πολυπαραγοντικές αναλύσεις αναδεικνύουν την έκφραση του RCAS1, ως ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα [137]. Σύμφωνα με την μελέτη του Oizumi et al., η οποία διεξήχθη σε 70 ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα και δεν περιλάμβανε άλλους ιστολογικούς τύπους καρκίνου, η έκφραση της πρωτεΐνης RCAS1 ήταν ένας σημαντικός και ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας [182].

Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι τα καρκινώματα του πνεύμονα που εκφράζουν το RCAS1 μπορεί να εμφανίζουν μια πιο επιθετική βιολογική συμπεριφορά σε σχέση με εκείνα τα οποία είναι αρνητικά για το RCAS1. Αποτέλεσμα λοιπόν αυτής της βιολογικής επιθετικότητας είναι η κακή πρόγνωση των ασθενών. Συνεπώς, διατυπώθηκε η υπόθεση ότι οι ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και ισχυρή έκφραση του RCAS1 όπως αυτή αποκαλύπτεται σε μία προεγχειρητική βιοψία, πιθανότατα να χρήζουν είτε περαιτέρω διερεύνησης για ύπαρξη μεταστάσεων είτε η απόφαση για χορήγηση επικουρικής θεραπείας να είναι πιο εύκολη και άμεση [172]. Μία ανοσοϊστοχημική ανάλυση λοιπόν που πραγματοποιήθηκε σε 35 περιπτώσεις NSCLC αρχικού σταδίου II, επιβεβαίωσε περαιτέρω την σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του RCAS1 και του σταδίου της νόσου, της διαφοροποίησης του όγκου και της φτωχής πρόγνωσης [194]. Ωστόσο, σε μια πιο πρόσφατη μελέτη η οποία αφορά ασθενείς με NSCLC σταδίου IB-IIIΑ, καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του RCAS1 και των παραμέτρων επιβίωσης (OS, PFS) δεν παρατηρήθηκε [195].

Αναφορικά με τα υπάρχοντα δεδομένα για το διαλυτό τμήμα του RCAS1 και τον καρκίνο του πνεύμονα έχει βρεθεί ότι ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και κακοήγη πλευριτική συλλογή εμφάνισαν σημαντικά υψηλή συγκέντρωση του RCAS1 στο πλευριτικό υγρό [192]. Επιπλέον, οι ασθενείς με υψηλά επίπεδα του RCAS1 στο πλευριτικό υγρό χαρακτηρίζονται από βραχύτερη μέση επιβίωση σε σχέση με τους ασθενείς με χαμηλότερα επίπεδα [192]. Τα στοιχεία αυτά χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής, αφού ο διαχωρισμός της κακοήθους από την καλοήγη πλευριτική συλλογή είναι ένα δύσκολο πρόβλημα και οι συμβατικές μέθοδοι έχουν αποδειχθεί ανεπαρκείς [191,192]. Επιπλέον, η κυτταρολογική εξέταση του υπεζωκοτικού υγρού αποτυγχάνει να ανιχνεύσει καρκινικά κύτταρα στο 40-50% των περιπτώσεων με κακοήθεις πλευριτικές συλλογές, ενώ η λήψη τυφλής βιοψίας από τον υπεζωκότα προσφέρει μικρή επιπρόσθετη ευαισθησία [191-193]. Από την άποψη αυτή, ο προσδιορισμός του RCAS1 στις υπεζωκοτικές συλλογές θα μπορούσε να βελτιώσει τη διαγνωστική ακρίβεια.

Διαπιστώνουμε λοιπόν ότι τα υπάρχοντα δεδομένα σχετικά με την κλινική σημασία της έκφρασης της πρωτεΐνης RCAS1 στο NSCLC είναι καταρχήν περιορισμένα. Ειδικότερα, πρώτον οι περισσότερες από τις μελέτες αυτές έγιναν σε μικρό σχετικά αριθμό ασθενών συνήθως μικρότερος του 100. Δεύτερον και σημαντικότερο κάποιες από τις μελέτες αυτές κατέληξαν σε αντικρουόμενα μεταξύ τους αποτελέσματα. Ήταν προφανές λοιπόν η ανάγκη μιας νέας μελέτης η οποία θα προσπαθούσε να διερευνήσει και να επαναξιολογήσει την κλινική

σημασία της έκφρασης του RCAS1 σε ένα μεγαλύτερο πληθυσμό ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα.

3.4 ΠΡΩΤΕΪΝΗ RCAS1 ΚΑΙ ΕΓΚΥΜΟΣΥΝΗ

Η φυσιολογική εγκυμοσύνη αντιστοιχεί σε μια ελεγχόμενη κατάσταση συστηματικής φλεγμονής και αποπτωτικά ή νεκρωτικά κύτταρα προερχόμενα από τη συγκυτιακή επιφάνεια του πλακούντα συνιστούν παράγοντες φλεγμονής σε όλες τις εγκυμοσύνες [196]. Κατά τη μετάπτωση του ενδοθηλίου σε φθαρτό υμένα τα NK κύτταρα παρουσιάζουν δραματικές αλλαγές και ο αριθμός τους αυξάνεται σημαντικά και ενεργοποιούνται [197]. Έχει παρατηρηθεί ότι τα ανθρώπινα T και NK κύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα για το καρκινικό αντιγόνο RCAS1 σε υψηλό βαθμό μετά την ενεργοποίησή τους και ότι το RCAS1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και προάγει την απόπτωση των ανοσιακών κυττάρων που εκφράζουν τον αντίστοιχο υποδοχέα [198]. Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στη διερεύνηση της συσχέτισης της πρωτεΐνης RCAS1 με την πορεία της φυσιολογικής εγκυμοσύνης.

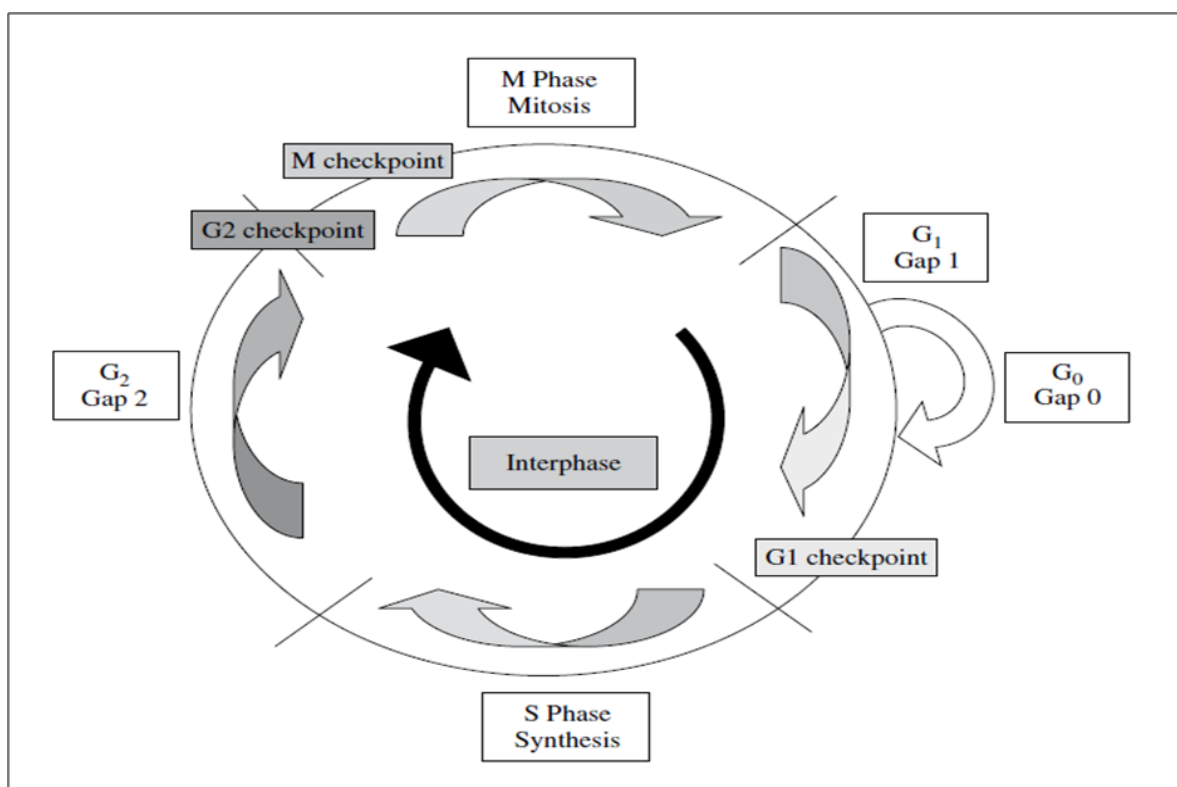
Διάφορες μελέτες έχουν διερευνήσει την έκφραση και την ανοσολογική ανοχή του RCAS1 κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και τη συσχέτιση αυτού με την ωρίμανση του εμβρύου, τη θνησιγένεια και την αποκόλληση του πλακούντα [199-204]. Πρόσφατες σχετικές μελέτες ανέδειξαν στενή σχέση μεταξύ του αντιγόνου RCAS1 με το σακχαρώδη διαβήτη της κύησης και την προεκλαμψία και ερευνήθηκε ο ρόλος του στη συνέχιση της φυσιολογικής κύησης στα ποντίκια [205-207].

Ειδικότερα, το RCAS1, μία από τις πρωτεΐνες του φθαρτού υμένα, είναι υπεύθυνο για την αναστολή των ενεργοποιημένων κυτταροτοξικών ανοσιακών κυττάρων στο φθαρτό κατά τη διάρκεια του τοκετού καθώς και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η αποκόλληση του πλακούντα και η προεκλαμψία [200,206,208-210]. Επιπλέον, λόγω της ικανότητας του να αναστέλλει την ανάπτυξη και ενεργοποίηση των NK κυττάρων και των T και B λεμφοκυττάρων το RCAS1 έχει αποδειχθεί να είναι υπεύθυνο για την απόδραση από την ανοσολογική επιτήρηση του ξενιστή [128,134,135,144,179,211]. Έχει αποδειχθεί επίσης ότι η αλληλεπίδραση του RCAS1 με τον υποδοχέα του εκτελεστή κυττάρου δύναται να οδηγήσει σε Fas-σχετιζόμενη ενεργοποίηση της περιοχής θανάτου και επαγωγή της απόπτωσής του μέσω του καταρράκτη των κασπασών [133].

Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι το RCAS1 μπορεί αναστρέψιμα να αναστείλει τη δραστηριότητα των κυτταροτοξικών ανοσιακών κυττάρων *in vitro*, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι αλλαγές έκφρασής του στο φθαρτό και στον πλακούντα μπορεί να σχετίζονται με τον αναστρέψιμο περιορισμό της δραστηριότητας του ανοσιακού συστήματος κατά τον τοκετό [139]. Επίσης, η εμφάνιση αυτόματης έναρξης θνησιγένειας έχει συσχετιστεί με μείωση της έκφρασης του RCAS1 από τον πλακούντα [203]. Αλλαγές λοιπόν στην έκφραση του RCAS1 στον πλακούντα και στο φθαρτό, καθώς και η παρουσία του στον ορό εγκυμονουσών γυναικών μπορεί να σχετίζονται με τη ρύθμιση της ανοσιακής ανοχής εναντίον εμβρυϊκών αντιγόνων κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης [208]. Αυτός φαίνεται να είναι ένας από τους φυσιολογικούς ομοιοστατικούς μηχανισμούς στο αναπαραγωγικό σύστημα της γυναίκας, υπεύθυνος για την κατάλληλη ενεργοποίηση του ανοσιακού συστήματος κατά τον τοκετό.

4. ΔΕΙΚΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ Ki-67

Αρκετοί μοριακοί βιοδείκτες έχουν διερευνηθεί για τον πιθανό προγνωστικό και προβλεπτικό τους ρόλο στο NSCLC. Ένας από αυτούς είναι ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 (Ki-67 Labeling Index - LI), ο οποίος παρόλο που ανακαλύφθηκε πριν 30 χρόνια και μελετήθηκε αρκετά η συσχέτιση του με διάφορα κακοήγη νοσήματα, ωστόσο παραμένει διφορούμενη η κλινική του χρησιμότητα ως πιθανού βιοδείκτη. Η πρωτεΐνη Ki-67 προσδιορίστηκε για πρώτη φορά από ένα μονοκλωνικό αντίσωμα το Ki-67 το οποίο δημιουργήθηκε μέσω της ανοσοποίησης επιμύων με πυρήνες κυττάρων λεμφώματος Hodgkin γραμμή L428 [212]. Το όνομα Ki-67 προέρχεται από το Κίελο που είναι η πόλη προέλευσης του και ο αριθμός του αρχικού κλώνου. Η βιολογική λειτουργία της πρωτεΐνης Ki-67, η οποία ουσιαστικά είναι μια πυρηνική πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από ένα γονίδιο που βρίσκεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 10 (10q25), δεν έχει καλά προσδιορισθεί. Φαίνεται όμως ότι το Ki-67 συνδέεται με το ριβοσωματικό RNA μεταγραφής και ως εκ τούτου, η απενεργοποίηση του Ki-67 οδηγεί σε αναστολή της σύνθεσης του ριβοσωμιακού RNA [213,214].



Εικόνα 16: Ο Κυτταρικός Κύκλος (τροποποίηση από Knight ZA et al, Biochem Soc Trans. 2007).

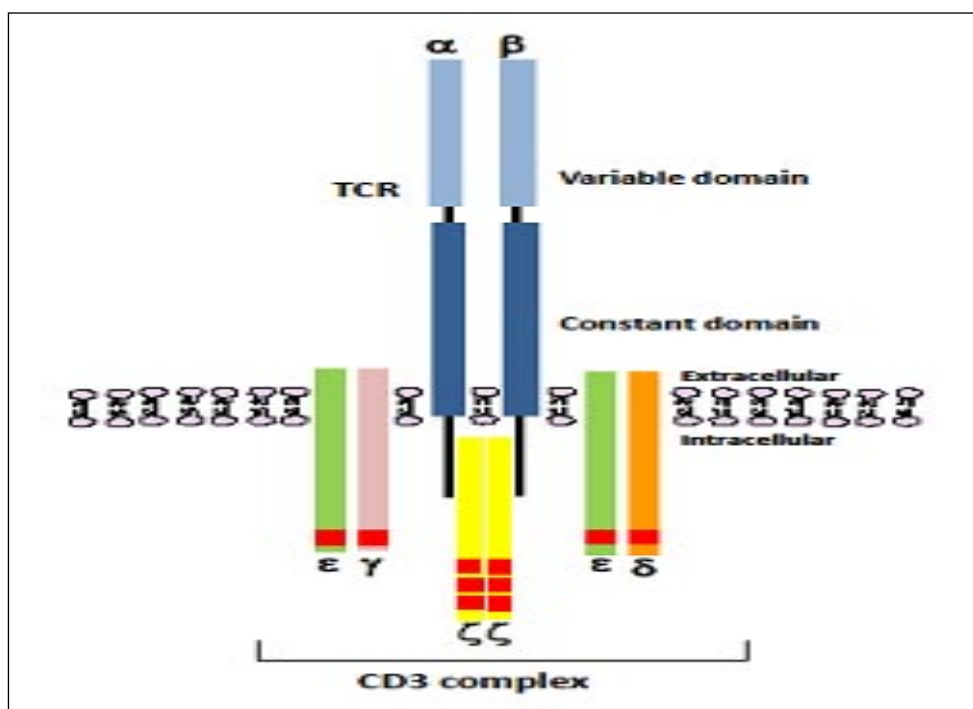
Το Ki-67 θεωρείται ευρέως ως ένας δείκτης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κατά συνέπεια εκφράζεται κυρίως κατά τη διάρκεια της ενεργού φάσης του κυτταρικού κύκλου, δηλαδή των φάσεων του κυτταρικού κύκλου G1, S, G2 και της φάσης της μίτωσης M ενώ δεν υπάρχει στα κύτταρα που βρίσκονται σε φάση ηρεμίας G0 [215]. Επίσης, κατά τη διάρκεια της μεσόφασης το Ki-67 είναι δυνατό να ανιχνευτεί αποκλειστικά εντός του πυρήνα, ενώ στη μίτωση το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης αλλάζει θέση στην επιφάνεια των χρωμοσωμάτων [215].

Ο δείκτης λοιπόν κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 φαίνεται να έχει κάποια προγνωστική αξία στο NSCLC με τις υψηλότερες τιμές να σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση των ασθενών [216]. Παρόλ'αυτά, μέχρι σήμερα ο δείκτης Ki-67 δεν έχει κάποια κλινική χρησιμότητα στη διαχείριση των ασθενών με NSCLC [217]. Πιθανότατα, η χρήση του δείκτη Ki-67 σε συνδυασμό και με άλλους βιολογικούς δείκτες (π.χ. μεταλλάξεις του EGFR), θα ήταν πιο αποτελεσματική συμβάλλοντας στην καλύτερη διαστρωμάτωση των ασθενών με NSCLC σύμφωνα με τα ιδιαίτερα κλινικό-ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους, με απώτερο βέβαια σκοπό την επιλογή της βέλτιστης εξατομικευμένης θεραπείας για τον κάθε ασθενή (personalized treatment - personalized medicine).

5. ΑΝΤΙΓΟΝΟ ΚΑΙ ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΟ ΑΝΤΙΣΩΜΑ CD3

Το σύστημα των cluster διαφοροποίησης (cluster of differentiation-CD) αποτελεί ουσιαστικά ένα πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση και διερεύνηση των διαφόρων μορίων επιφανείας των κυττάρων παρέχοντας παράλληλα στόχους-αντιγόνα για τον ανοσοφαινοτυπικό χαρακτηρισμό των κυττάρων. Φυσιολογικά, τα CD αντιγόνα δρουν στα κύτταρα με διάφορους τρόπους, συχνότερα όμως λειτουργούν είτε ως υποδοχείς (receptors) είτε ως προσδέτες υποδοχέων (ligands) σημαντικών για το κύτταρο. Αποτέλεσμα των λειτουργιών αυτών είναι συνήθως είτε η πυροδότηση μηχανισμών μεταγωγής κυτταρικών σημάτων (signal cascade) είτε η εξασφάλιση κυτταρικών συνδέσεων-προσκολλήσεων (cell adhesion) [218].

Ειδικότερα, το CD3 (cluster of differentiation 3) των T-λεμφοκυττάρων είναι ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που αποτελείται από τέσσερις διαφορετικές αλυσίδες. Στα θηλαστικά το σύμπλεγμα αυτό αποτελείται από μία CD3γ αλυσίδα, μία CD3δ αλυσίδα και δύο CD3ε αλυσίδες. Αυτές οι αλυσίδες σχετίζονται με ένα μόριο γνωστό ως ο υποδοχέας των T-κυττάρων (T-cell receptor-TCR). Οι αλυσίδες CD3γ, CD3δ και CD3ε ομοιάζουν πολύ με τις κυτταρικές πρωτεΐνες επιφανείας της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών [219].



Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση του CD3 αντιγονικού συμπλέγματος (τροποποίηση από www.abdserotec.com).

Το αντιγόνο CD3 αρχικά εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα των προ-θυμοκυττάρων τα οποία αποτελούν τα προγονικά κύτταρα από τα οποία προέρχονται τα T-λεμφοκύτταρα στο θύμο. Τα προ-θυμοκύτταρα διαφοροποιούνται στα κοινά κύτταρα του θύμου και ακολούθως στα μυελλοειδή κύτταρα του θύμου και στο στάδιο αυτό το αντιγόνο CD3 μεταναστεύει στην κυτταρική μεμβράνη τους. Το αντιγόνο CD3 λοιπόν ανιχνεύεται στη κυτταρική μεμβράνη όλων των ώριμων T-λεμφοκυττάρων και θεωρητικά σχεδόν σε κανένα άλλο τύπο κυττάρου [218,219]. Η υψηλή λοιπόν ειδικότητα του αντιγόνου CD3, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι είναι παρόν σε όλα τα στάδια ανάπτυξης και ωρίμανσης των T-λεμφοκυττάρων το καθιστά πολύ χρήσιμο ανοσοϊστοχημικό δείκτη των T-λεμφοκυττάρων σε ιστικά δείγματα [219].

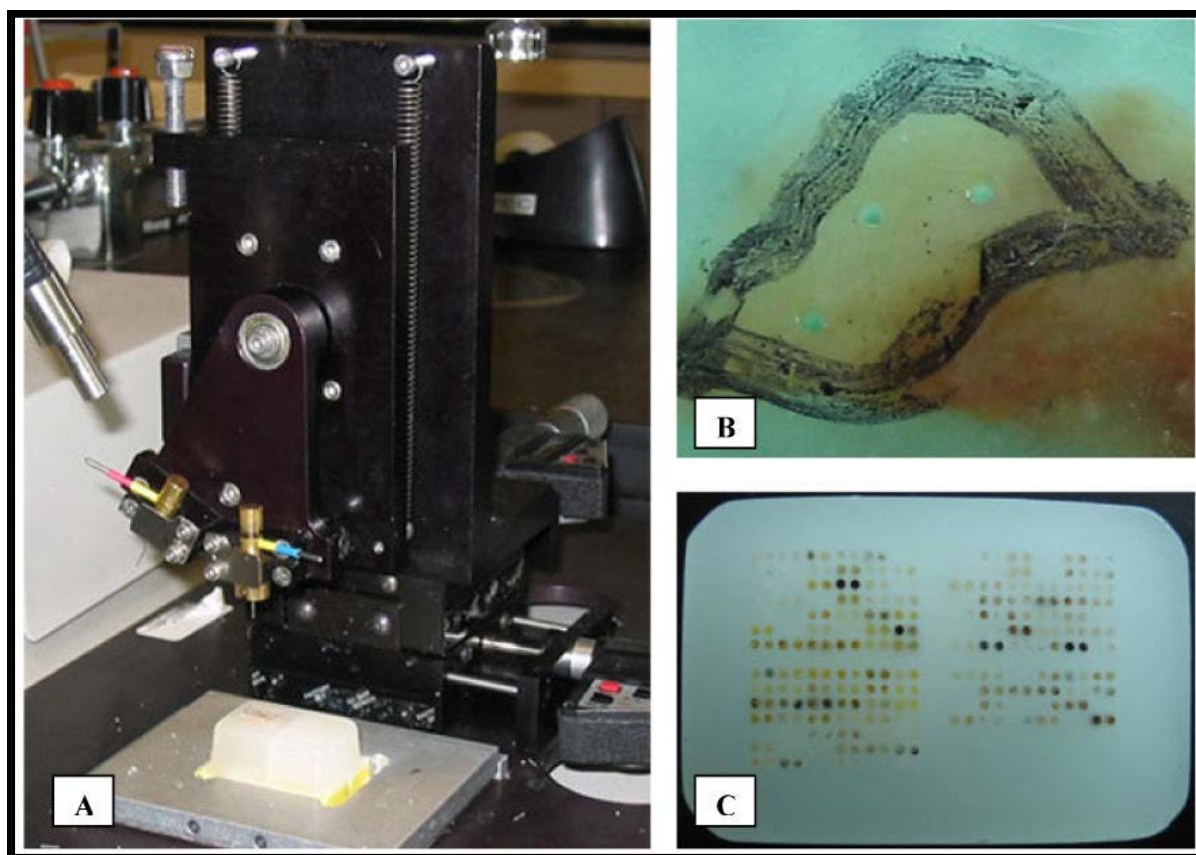
6. ΙΣΤΙΚΕΣ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ (Tissue MicroArrays-TMAs)

6.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ΙΣΤΙΚΕΣ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΕΣ (TMAs)

Η τεχνολογία των ιστικών μικροσυστοιχειών (Tissue MicroArrays-TMAs) περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Wan et al το 1987 [220]. Ωστόσο, τελικά 10 χρόνια αργότερα οι Kononen et al κατάφεραν να αναπτύξουν μια συσκευή η οποία μπορούσε γρήγορα και επαναλαμβανόμενα να παράγει ποιοτικά TMAs [221]. Εκείνη την περίοδο το ενδιαφέρον για την τεχνολογία των TMAs επηρεάστηκε από την τότε πρόσφατη ανάπτυξη της διάταξης των συστοιχιών νουκλεϊκού οξέος και της αναμενόμενης δυναμικής τους στην ανάλυση πολυσύνθετων βιοδεικτών.

Το βασικό πλεονέκτημα της τεχνολογίας των TMAs είναι η ικανότητα ποσοτικού ή ποιοτικού προσδιορισμού ιστών εκατοντάδων ασθενών τοποθετημένων σε ένα ενιαίο πλακάκι μικροσκοπίου. Στην πιο κοινή μορφή, ένας πυρήνας ιστού (δείγμα ιστού) έχει αρθεί, με ειδικό μηχανήμα ακριβείας από ένα συνηθισμένο δείγμα ιστού μονιμοποιημένο σε κύβο παραφίνης και ακολούθως έχει τοποθετηθεί σε μια οπή ενός νέου συγκεντρωτικού κύβου-μπλοκ παραφίνης. Κατά το διαχωρισμό, κάθε ιστικό δείγμα αναπαρίσταται ως ένα μικρό (0,6 έως 2mm σε διάμετρο) ιστοσημείο (histospot) τοποθετημένο σε ένα πλέγμα ιστών που επιτρέπει την εύκολη διασύνδεση με κλινικό-παθολογανατομικά δεδομένα. Η διασύνδεση-αντιστοίχιση αυτή εξασφαλίζεται με την κατασκευή κατάλληλων χαρτών για κάθε TMA οι οποίοι μας βοηθούν στην εκτίμηση και διαχείριση των ιστικών δειγμάτων. Το αποτέλεσμα είναι ένα μοναδικό πλακάκι που μπορεί να περιέχει δείγματα από 40 έως 800 ασθενείς (ανάλογα με το μέγεθος του πυρήνα ιστού κάθε δείγματός).

Μια νεότερη εναλλακτική μέθοδος δημιουργίας TMA (cutting edge matrix assembly array) βασίζεται στην κοπή και τοποθέτηση τμημάτων ιστών σε στοίβες με συνεχή τρόπο, ώστε να παράγονται συστοιχίες που αντιπροσωπεύουν χιλιάδες δείγματα [222]. Άλλοι ερευνητές έχουν προσαρμόσει την τεχνολογία των TMAs σε κατεψυγμένους ιστούς, σειρές κυττάρων και βιοπτικά υλικά [223-226]. Οι περισσότερες μελέτες χρησιμοποιούν την τεχνολογία των TMAs για προσδιορισμό βιοδεικτών με τη χρήση τεχνικών ανοσοϊστοχημείας (ImmunoHistoChemistry-IHC). Επίσης, ορισμένοι ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει με επιτυχία άλλες μεθόδους, συμπεριλαμβανομένου του in situ υβριδισμού (π.χ. φθορίζων in situ υβριδισμός).



Εικόνα 18: Μεθοδολογία κατασκευής των Tissue MicroArrays-TMAs (τροποποίηση από David Voduc et al, Semin Radiat Oncol. 2008).

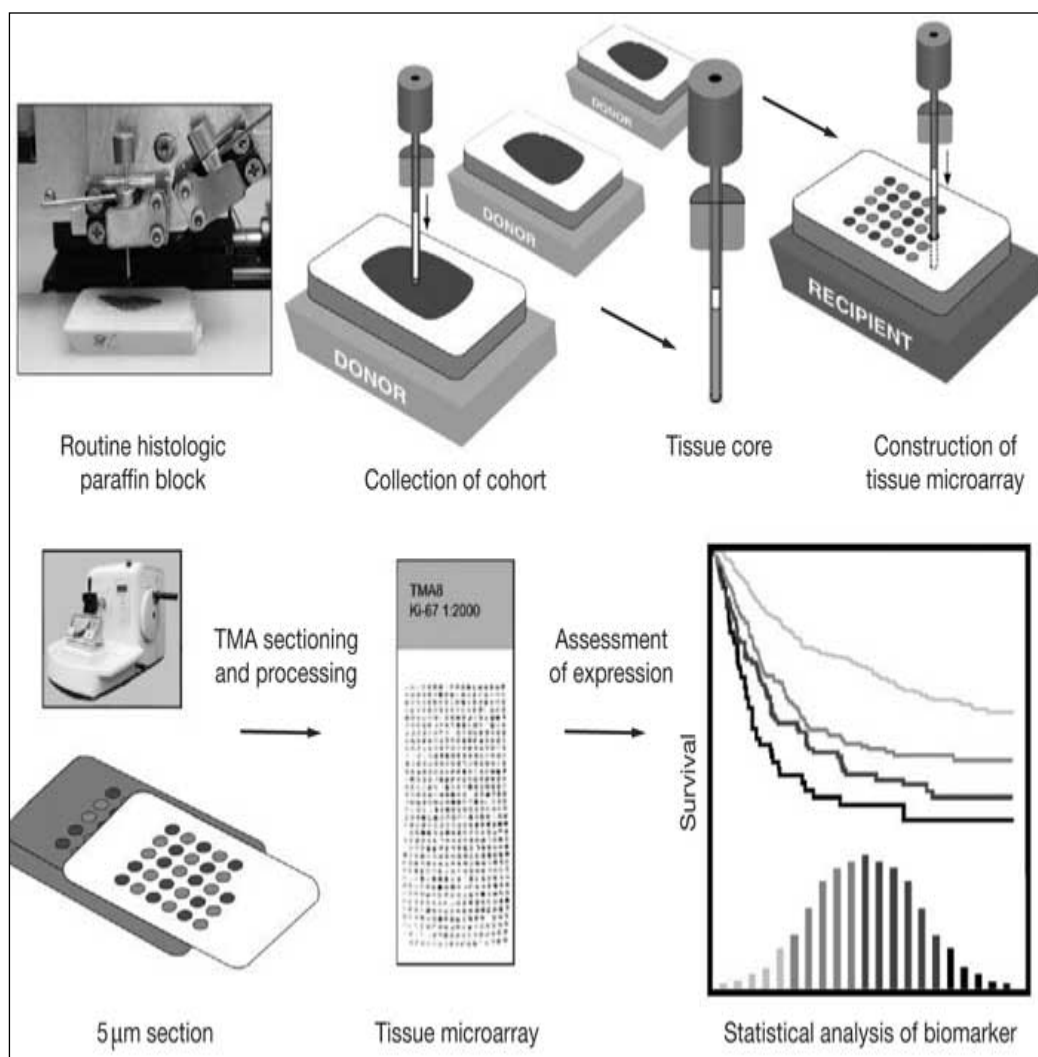
6.2 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΙΣΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ (TMAs)

Η δύναμη της τεχνολογίας των TMAs αποδεικνύεται σαφώς όταν αναλογιστούμε την εναλλακτική λύση. Πριν τα TMAs, οι ερευνητές που επιθυμούσαν να μελετήσουν βιοδείκτες σε ανθρώπινους ιστούς θα έπρεπε να συλλέξουν αρχειοθετημένα μπλοκ παραφίνης από δυνητικά εκατοντάδες ασθενείς και να κόψουν ιστολογικά τομές από το καθένα. Αυτά τα τμήματα θα αποθηκεύονταν μέχρι να σημανθούν ανοσολογικά σε ευμεγέθεις δέσμες, συχνά για μια περίοδο εβδομάδων. Ένας παθολογοανατόμος στη συνέχεια θα εξέταζε κάθε πλακάκι, θα εντόπιζε περιοχές του όγκου, καθώς και θα αξιολογούσε το επίπεδο της σήμανσης. Μια διαδικασία που οι περισσότεροι παθολογοανατόμοι θα συμφωνήσουν ότι είναι αρκετά κουραστική και η οποία τους υποχρεώνει να στηρίζονται στον ανθρώπινο παράγοντα ώστε να αξιολογήσουν ανεπαίσθητες διαφορές στην ένταση. Από την αρχή μέχρι το τέλος, όλη η διαδικασία γενικά θα διαρκούσε αρκετούς μήνες και προκειμένου να εξεταστεί κάθε νέος μεταγενέστερος δείκτης απαιτείται μια πλήρης επανάληψη της διαδικασίας. Επιπλέον, ο χρόνος που περνάει κατά τη

διάρκεια όλων των βημάτων της διαδικασίας καθιστά δύσκολο να τυποποιηθούν πολλές από τις μεταβλητές που υπεισέρχονται στη διαχείριση των ιστών.

Τα TMAs, αντίθετα, παρέχουν μια σημαντικά διαφορετική και τελικά πολύ πιο αποτελεσματική ροή εργασίας. Με τα TMAs, το έργο του παθολογοανατόμου λαμβάνει χώρα μόνο μία φορά στην αρχή της διαδικασίας. Τμήματα του όγκου σεσημασμένα με αιματοξυλίνη-εωσίνη (hematoxylin-eosin) αναλύονται, και περιοχές του όγκου κυκλώνονται από τον παθολογοανατόμο. Έτσι, οι διαγνωστικές δεξιότητες του παθολογοανατόμου χρησιμοποιούνται με εποικοδομητικό τρόπο, αποφεύγοντας το ενδεχόμενο μεροληψίας στην ανάλυση που μπορεί να συμβεί με τη συμβατική ανάλυση ολόκληρου τμήματος. Οι διαφάνειες αυτές χρησιμοποιούνται τότε ως ένα πρότυπο για τη λήψη αποφάσεων σχετικά με την περιοχή που θα λαμβάνονται οι πυρήνες των ιστών από το αντίστοιχο μπλοκ παραφίνης. Κάθε πυρήνας είναι ενσωματωμένος σε ένα μπλοκ παραφίνης και σε έναν πίνακα (χάρτη), έτσι ώστε να διατηρείται η ταυτότητα του δείγματος. Όταν κατασκευαστεί, το TMA μπλοκ τότε μπορεί δυνητικά να κοπεί σε τομές εκατοντάδες φορές (ή ακόμη και χιλιάδες φορές για την περίπτωση του cutting edge matrix assembly array), με το κάθε τμήμα (τομή) να παρέχει ένα υποσύνολο νεοπλασιών που είναι έτοιμο για ανάλυση βιοδεικτών. Επειδή οι πυρήνες λαμβάνονται από περιοχές ενδιαφέροντος επισημασμένες από παθολογοανατόμους, χρώση με IHC μπορεί συχνά να βαθμολογείται με αξιόπιστο τρόπο από άτομα με μόνο στοιχειώδη εκπαίδευση ή από ένα μηχάνημα με ένα αυτόματο τρόπο. Μετά την προσπάθεια παραγωγής των TMAs για πρώτη φορά, κάθε μεταγενέστερη ανάλυση για βιοδείκτες, συμπεριλαμβανομένης της χρώσης, της ανάγνωσης και της εκτίμησης, χρειάζεται μόνο λίγες μέρες.

Εκτός από την εξοικονόμηση χρόνου, τα TMAs παρέχουν πολλά συμπληρωματικά πλεονεκτήματα. Πρώτον, επειδή κάθε TMA χρησιμοποιεί μόνο ένα μικρό πυρήνα από τον κύβο παραφίνης του ασθενή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε κύβος σε δεκάδες (ή δυνητικά εκατοντάδες) περιπτώσεις δημιουργίας TMAs. Αυτό πολλαπλασιάζει αποτελεσματικά τον αριθμό τέτοιων πινάκων ανά ασθενή-όγκο από 75 ως 100 σε 75.000 ως 100.000 [227]. Δεύτερον, τα TMAs μπορεί να οδηγήσουν στη σημαντική μείωση του κόστους τόσο των αντιδραστηρίων όσο και στον τεχνικό χρόνο που απαιτείται να σημειωθεί μία τομή αντί για εκατοντάδες. Τρίτον, εξαιτίας την εγγενούς αποτελεσματικότητας στην επεξεργασία εκατοντάδων έως χιλιάδων νεοπλασιών με μία μόνο φορά, τα TMAs μπορούν να αυξήσουν δραματικά τον αριθμό των νεοπλασιών που μπορούν να αναλυθούν σε μια δεδομένη κλάση, σε σύγκριση με την παραδοσιακή μελέτη του συνολικού τμήματος.



Εικόνα 19: Μεθοδολογία κατασκευής των Tissue MicroArrays-TMAs (τροποποίηση από Jena M Giltane et al, Nature Clinical Practice Oncology 2004).

Επειδή στα TMAs τα ιστικά δείγματα παρατάσσονται δίπλα-δίπλα σε μια μεμονωμένη τομή, το σύνολο των δειγμάτων του όγκου είναι βαμμένα ομοιόμορφα, την ίδια στιγμή, υπό τις ίδιες συνθήκες και με ακριβώς την ίδια αραιώση του αντισώματος. Συστοιχίες μπορεί να βάφονται με ιστοχημικές χρώσεις ή πιο συχνά, χρώσεις IHC με φθορίζουσα ή χρωμογόνο απεικόνιση. Η τυποποίηση και η ομοιογένεια είναι μια σημαντική διαφοροποίηση έναντι των παραδοσιακών μεθόδων όπου μεταβλητότητα από παρτίδα σε παρτίδα (και χρόνος που μεσολαβεί ανάμεσα στις παρτίδες) μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση στην αποτελεσματικότητα και την ποιότητα της χρώσης [228,229]. Επίσης, τα TMAs ενσωματώνουν εύκολα εσωτερικά πρότυπα όπως κυτταρικές σειρές, πρωτεΐνες ή πεπτίδια, μη νεοπλασματικό ιστό ως μάρτυρα και αντίγραφα του όγκου, τα οποία μπορεί να παράσχουν ένα μέσο για

τιτλοποίηση αποτελεσμάτων μεταξύ πειραμάτων [230,231]. Τέλος, επειδή η μορφή των TMAς είναι φορητή, τα TMAς μπορούν εύκολα να μοιραστούν-αποσταλούν παρέχοντας μια νέα διέξοδο για διενέργεια πολυκεντρικών μελετών χρησιμοποιώντας κατάρτιση και σύνολα επικύρωσης, τα οποία αποτελούν ίσως τις καλύτερες μεθόδους προκειμένου να διασφαλιστεί η στατιστική ακρίβεια.

6.3 ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΙΣΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΟΙΧΙΩΝ (TMAς)

Αν και το μέγεθος των ιστοσημείων των TMA παρουσιάζει προκλήσεις για την αξιολόγηση της ετερογένειας του όγκου, παρέχει επίσης μια νέα ευκαιρία για την ανάπτυξη αυτοματοποιημένων μεθόδων ανάλυσης. Πράγματι, τα ιστοσημεία είναι αρκετά μικρά ώστε αυστηρή μοριακή ποσοτικοποίηση είναι εφικτή. Επειδή τα TMAς είναι προεπικυρωμένα από παθολογοανατόμο κατά την κατασκευή τους, τα αυτοματοποιημένα συστήματα θα πρέπει μόνο να εκτιμήσουν την ένταση της χρώσης και δε χρειάζεται να προσδιορίσουν κατά πόσον η χρώση ήταν από περιοχές του όγκου. Εξαιτίας του δυναμικού αυτού, αριθμός εταιρειών ανέπτυξε μηχανές για αυτοματοποιημένη ανάλυση TMA [232].

Εκτός από την εξάλειψη του κουραστικού και υποκειμενικού καθήκοντος της βαθμολόγησης της ανοσοχρώσης σε κάθε ιστοσημείο, η αυτοματοποιημένη ανάλυση επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό βιοδεικτών με τρόπο που ταιριάζει με τη βιολογική τους έκφραση, δηλαδή, σε μία συνεχή κλίμακα. Πριν από την ανάπτυξη της αυτοματοποιημένης ανάλυσης, μη αυτοματοποιημένα συστήματα βαθμολόγησης όπως η βαθμολόγηση «H» επιχείρησε να αντιπροσωπεύσει τον συνεχή χαρακτήρα της έκφρασης βιοδεικτών, αλλά αυτό συνήθως κατέληξε σε σχετικά υποκειμενικές ονομαστικές κατηγοριοποιήσεις συγγενείς με κλινικές κλίμακες για χαρακτηριστικά όπως ο πόνος ή η γενική σωματική κατάσταση [233,234]. Η προσέγγιση αυτή έχει γίνει αποδεκτή διότι επιτυγχάνεται εύκολα από τους παθολογοανατόμους χωρίς ακριβά εργαλεία. Ωστόσο, όσο η τυποποίηση γίνεται σημαντική και οι στοχεύουσες θεραπείες γίνονται πιο σύνθετες, θα δούμε πιθανότατα νέους δείκτες όπου θα απαιτείται η ακριβής ανάλυση της ποσοτικής τους έκφρασης.

Η ακριβής ανάλυση της έκφρασης βιοδεικτών στα ιστοσημεία των TMAς δεν είναι ένα ασήμαντο εγχείρημα, λαμβάνοντας υπόψη ότι πολλές νεοπλασίες έχουν πρόσμειξη άφθονου και μεταβλητού δεσμοπλαστικού στρώματος με κύτταρα του όγκου. Το αυτοματοποιημένο σύστημα AQUA (HistoRx, New Haven, CT), χρησιμοποιεί πολύχρωμη ανοσοφθορίζουσα ιστοχημεία για τη διάκριση μεταξύ όγκου και στοιχείων στρώματος. Άλλα συστήματα

αντιμετωπίζουν αυτό το θέμα χρησιμοποιώντας τη δυνατότητα εξαγωγής ή/και μεθόδους με βάση την τεχνητή νοημοσύνη για να ξεχωρίσουν όγκο από στρώμα που έχουν βαφτεί με χρωμογόνα αντιδραστήρια (π.χ. hematoxylin). Αυτές οι μη φθορίζουσες μέθοδοι έχουν το πλεονέκτημα ότι χρησιμοποιούν τεχνικές χρώσης που οι παθολογοανατόμοι είναι εξοικειωμένοι και που μπορούν να επικυρωθούν με το μάτι χρησιμοποιώντας ένα παραδοσιακό οπτικό μικροσκόπιο. Η ανάλυση φθορισμού παρέχει άλλα σημαντικά οφέλη, συμπεριλαμβανομένης της δυνατότητας να καθοριστούν και να αναλυθούν διαφορετικά στοιχεία εντός των νεοπλασιών (π.χ. πυρήνες, συσκευή Golgi, στρώμα, μικροαγγεία, κ.α.) με βάση το συνδυασμό συναφών δεικτών (π.χ. DAPI, 58 K, κολλαγόνο και CD31 αντίστοιχα). Αυτός ο τύπος υποκυτταρικής τοπογραφίας μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες, ιδίως για βιοδείκτες που λειτουργούν διαφορετικά σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα [235]. Συστήματα που βασίζονται στον φθορισμό παρέχουν επίσης ένα ευρύτερο δυναμικό εύρος για ανάλυση λόγω των εγγενών πλεονεκτημάτων στη χρήση μεθόδων αντίχνευσης από εκπομπή παρά μάλλον από απορρόφηση [236].

7. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ

7.1 ΑΡΧΕΣ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ - ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Η ανοσοϊστοχημεία αποτελεί πλέον βασική μεθοδολογία στην Παθολογική Ανατομική και τη Κυτταρολογία συμβάλλοντας καταλυτικά στη διαφορική διάγνωση των νόσων και στη σωστή τελική διάγνωση. Ιδιαίτερα στη διαγνωστική προσέγγιση των νεοπλασμάτων η εφαρμογή της αποτέλεσε πραγματική επανάσταση καθώς αύξησε τις δυνατότητες ανεύρεσης και τυποποίησης νέων προγνωστικών και προβλεπτικών βιοδεικτών (prognostic and predictive biomarkers) και της επιλογής κατάλληλων εξατομικευμένων θεραπειών για τους ογκολογικούς ασθενείς [237].

Η ανοσοϊστοχημική τεχνική αποσκοπεί στην αναγνώριση φυσιολογικών ή παθολογικών συστατικών των κυττάρων και ιστών. Η αρχή που διέπει τις ανοσοϊστοχημικές τεχνικές είναι η ακόλουθη: ένα αντίσωμα οδηγείται σε ένα ειδικό αντιγόνο-στόχο, που όταν είναι παρόν, μια χημική αντίδραση λαμβάνει χώρα και καθιστά το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος ορατό [238].

Οι τεχνικές της ανοσοϊστοχημείας είναι απόρροια της αρχικής ιδέας του Coons να σημάνει με φθορίζοντα δείκτη ένα αντίσωμα που ανέπτυξε σε πειραματόζωο και κατόπιν να αναζητήσει σε ιστική τομή το αντιγόνο εναντίον του οποίου είχε αναπτυχθεί το αντίσωμα, εξετάζοντας τον ιστό με φθορίζον μικροσκόπιο [239]. Η πορεία της ανοσοϊστοχημείας στον χρόνο έχει ως σημαντικούς σταθμούς την εισαγωγή των σεσημασμένων με ένζυμα αντισωμάτων που κατέστησαν την τεχνική απλή, αποδεκτή και πρακτική και αργότερα την εισαγωγή των μονοκλωνικών αντισωμάτων που προσέφεραν στον παθολογοανατόμο μια ανεξάντλητη πηγή ειδικών αντιδραστηρίων μεγάλης εξειδίκευσης για την ανίχνευση διαφόρων αντιγόνων σε ιστούς και κύτταρα.

Τα πλεονεκτήματα των ανοσοϊστοχημικών τεχνικών είναι πολλά και σημαντικά. Ικανοποιητική ευαισθησία και ειδικότητα, επαναληψιμότητα, δυνατότητα εφαρμογής σε αρχειακό υλικό ακόμη και μετά παρέλευση μεγάλου χρονικού διαστήματος, εφαρμογή με πολύ καλά αποτελέσματα σε κυτταρολογικό υλικό και δυνατότητα συνδυασμού με άλλες ιστοχημικές χρώσεις στην ίδια τομή [240-244].

Τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν διαφορετική βιολογική συμπεριφορά με αποτέλεσμα την έκκριση μεταλλαγμένων βιολογικών προϊόντων, ειδικού ή όχι τύπου, για το συγκεκριμένο είδος κυττάρων προέλευσης του όγκου (βιολογικοί ή βιοχημικοί ή καρκινικοί δείκτες-tumor markers). Η αναγνώριση αυτή επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων εναντίον των

αντιγόνων-στόχων, τα οποία είναι συνδεδεμένα με ειδικές χρωστικές, καθιστώντας κατ' αυτό τον τρόπο ορατές τις θέσεις εντοπισμού των αντιγόνων αυτών. Ο ανοσοφθορισμός, μία πρόδρομη τεχνική ανίχνευσης πρωτεϊνών μέσω μιας διαδικασίας σύνδεσης αντισωμάτων με φθορίζουσα χρωστική, την ισοθιοκυανική φλουροσκεΐνη, υπήρξε για μεγάλο χρονικό διάστημα η μοναδική μέθοδος αναγνώρισης στους ιστούς ειδικών αντιγόνων, ανοσοσφαιρινών και διαφόρων κλασμάτων του συμπληρώματος. Στην πορεία όμως αναπτύχθηκαν πιο αξιόπιστες και εξειδικευμένες τεχνικές για άμεση και ορατή, με συμβατική μικροσκόπηση, εκτίμηση του αποτελέσματος.

Οι τεχνικές αυτές βασίζονται στη χρησιμοποίηση ενζύμων ή ενζυμικών συστημάτων που εφαρμόζονται στους ιστούς ή σε κυτταρικά επιχρίσματα, μετά τη σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος, χρωματίζοντας έντονα τις θέσεις εντόπισής τους, καθιστώντας τις έτσι ορατές με το κοινό μικροσκόπιο. Οι τεχνικές αυτές ονομάζονται ανοσοενζυμικές και οι πιο σημαντικές είναι οι μέθοδοι ανοσοϋπεροξειδάσης, αβιδίνης-βιοτίνης, στρεπταβιδίνης καθώς και νέες μέθοδοι παράκαμψης της βιοτίνης με τη χρήση πολυμερούς δεξτράνης. Κομβικό ρόλο στην αύξηση της ευαισθησίας και ειδικότητας των προαναφερθέντων μεθόδων αποτέλεσε η παραγωγή ειδικών αντιορών, δηλαδή ειδικών αντισωμάτων για σύνδεση με τα αντίστοιχα αντιγόνα. Αναπτύχθηκαν έτσι δύο κατηγορίες αντισωμάτων, που ανάλογα με το κριτήριο της στοχευμένης ειδικότητάς τους διακρίνονται σε πολυκλωνικά και μονοκλωνικά αντισώματα. Τα πρώτα είναι λιγότερο εξειδικευμένα, επειδή στοχεύουν περισσότερους του ενός αντιγονικούς επιτόπους, ενώ αντίθετα, τα μονοκλωνικά αντισώματα στοχεύουν συγκεκριμένες αντιγονικές θέσεις προσδίδοντας μεγαλύτερη ειδικότητα από τα προηγούμενα.

Δομικά τα μονοκλωνικά αντισώματα είναι ανοσοσφαιρίνες (Ig), που συγκροτούνται από δύο βαριές (Heavy-H) και δύο ελαφρές (Light-L) αλυσίδες με κριτήριο το μοριακό τους βάρος. Οι βαριές αλυσίδες διακρίνονται σε πέντε διαφορετικούς υπότυπους (α, μ, γ, δ, ε), ενώ οι ελαφρές αλυσίδες σε δύο τύπους. Ο ισότυπος μιας ανοσοσφαιρίνης χαρακτηρίζεται από τον τύπο της βαριάς αλυσίδας της ανοσοσφαιρίνης π.χ IgA, IgG, IgM. Οι τέσσερις αλυσίδες των ανοσοσφαιρινών συνδέονται ομοιοπολικά μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Κάθε ελαφριά αλυσίδα αποτελείται από μία σταθερή (τμήμα Fc) και μία μεταβλητή περιοχή, ενώ κάθε βαριά από μία μεταβλητή και 3-4 σταθερές περιοχές. Οι μεταβλητές περιοχές αποτελούν τη θέση πρόσδεσης των αντιγόνων επί των ανοσοσφαιρινών και ονομάζονται τμήματα Fab (Fragment antigen binding region) [245-247].

Η παραγωγή των αντισωμάτων σχετίζεται με την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού. Η τελευταία είναι πολυκλωνική για κάθε αντιγόνο που εισάγεται στον οργανισμό, δηλαδή πολλοί διαφορετικοί κλώνοι Β-λεμφοκυττάρων διεγείρονται για να παράγουν αντισώματα. Τα αντισώματα αυτά έχουν διαφορετική μοριακή δομή και αναγνωρίζουν αντίστοιχα διαφορετικούς επιτόπους του αντιγόνου. Για την ανοσοποίηση ζωικού οργανισμού χρησιμοποιείται καθαρό αντιγόνο, όμως ο οργανισμός αυτός παράγει ποικιλία αντισωμάτων έναντι πολύ μικρών ποσοτήτων ξένων ουσιών, που περιέχονται υποχρεωτικά στο αντιγόνο. Οι πιο ειδικοί αντιοροί περιέχουν μείγμα αντισωμάτων, τα οποία διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη βιολογική συμπεριφορά. Για τους λόγους αυτούς οι ανοσολόγοι προσπαθούν να παράγουν μεγάλες ποσότητες αντισωμάτων με ομοιογένεια στη συμπεριφορά τους. Οι πρωτεΐνες του πολλαπλού μυελώματος είναι γνωστό ότι αποτελούν ομοιογενείς ανοσοσφαιρίνες (μονοκλωνικές), οι οποίες εμφανίζονται στην περιοχή των γ-σφαιρινών κατά την ηλεκτροφόρηση. Αυτό συμβαίνει γιατί η νεοπλασματική εξαλλαγή πραγματοποιείται μόνο σε ένα κλώνο Β-λεμφοκυττάρων, τα οποία παράγουν μεγάλες ποσότητες ανοσοσφαιρινών, ίδιας βιοχημικής σύστασης.

Οι βιολόγοι ανέπτυξαν τη σύντηξη (fusion) των κυττάρων-πειραματοζώων σε ιστικές καλλιέργειες. Τα κύτταρα αυτά με τα ιδιάζοντα γενετικά χαρακτηριστικά σχηματίζουν ένα νέο κύτταρο, το λεγόμενο υβρίδιο. Η παραγωγή μονοκλωνικού αντισώματος πραγματοποιείται με την ευαισθητοποίηση του πειραματόζου σε ένα συγκεκριμένο αντιγόνο. Μετά από καθορισμένο χρόνο γίνεται θανάτωση του πειραματόζου και εν συνεχεία λήψη κυττάρων σπληνός από τα οποία διαχωρίζονται τα Β-λεμφοκύτταρα και γίνεται σύντηξη τους με άλλα κύτταρα πολλαπλού μυελώματος. Η σύντηξή τους έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή κυττάρων με την ιδιότητα της συνεχούς παραγωγής κυττάρων με τα ίδια γνωρίσματα (υβριδώματα) [248]. Ποσότητες υβριδικών κυττάρων είναι δυνατό να αποθηκευτούν σε βαθιά κατάψυξη, ενώ άλλα κύτταρα ενίονται στην περιτοναϊκή κοιλότητα πειραματόζων, τα οποία παράγουν ασκитικό υγρό. Το υγρό αυτό περιέχει υψηλό τίτλο αντισώματος.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα και οι πολυκλωνικοί αντιοροί χρησιμοποιούνται στην ιστοπαθολογία για τη διαφορική διάγνωση νοσημάτων και κυρίως νεοπλασμάτων. Τα πλεονεκτήματα των μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι ότι παράγονται σε μεγάλες ποσότητες και με μεγάλη καθαρότητα, η εφαρμογή τους είναι εύκολη και γίνεται με το συνδυασμό ανοσοενζυμικών μεθόδων ή ανοσοφθορισμού και η ευαισθησία τους είναι εξαιρετικά μεγάλη. Το πρόβλημα των διασταυρούμενων αντιδράσεων, αν και πολύ μικρότερο σε έκταση απ' αυτό

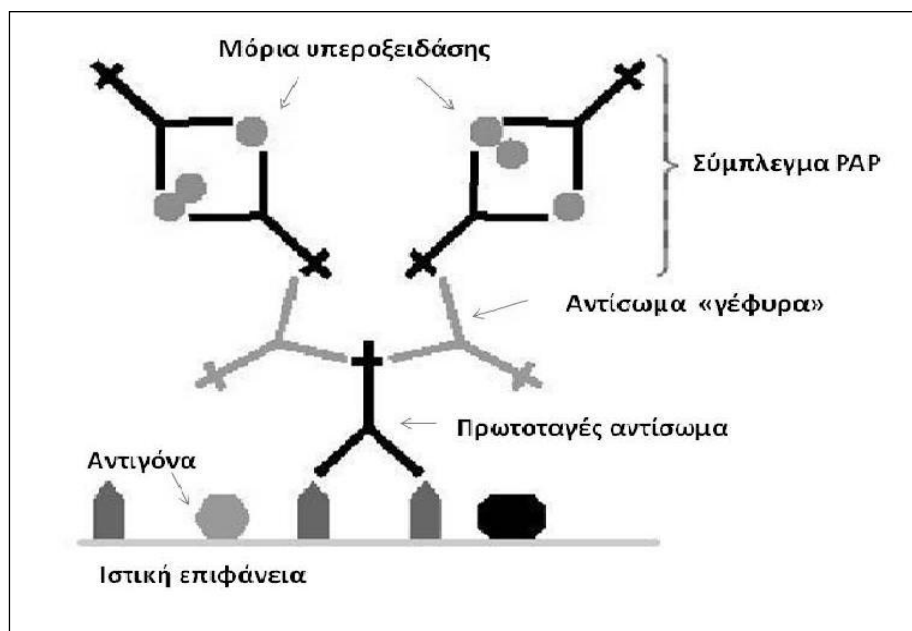
των πολυκλωνικών αντισωμάτων, υπάρχει και οφείλεται στα διάφορα αντιγόνα που έχουν τις ίδιες ή παρόμοιες αντιγονικές ιδιότητες [249].

7.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ

Η ανοσοϊστοχημεία, σε αντίθεση με τις κλασσικές ιστοχημικές μεθόδους, βασίζεται σε αντιδράσεις με εξειδίκευση στην αναγνωρισιμότητα του αντιγονικού στόχου. Οι μη σημασμένες τεχνικές (ενζυμικές) βασίζονται στην ανοσοδραστικότητα των αντισωμάτων και στις χημικές ιδιότητες ενζύμων ή ενζυμικών συμπλεγμάτων. Αυτά αντιδρούν με αχρωμάτιστα υποστρώματα χρωμογόνων ενώσεων προς σχηματισμό ενός χρωματισμένου τελικού προϊόντος. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται κυρίως είναι η υπεροξειδάση του υδρογόνου, η αλκαλική φωσφοτάση και δευτερευόντως η οξειδάση της γλυκόζης. Οι κύριες μέθοδοι παρατίθενται περιληπτικά παρακάτω.

7.2.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΟΣΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ

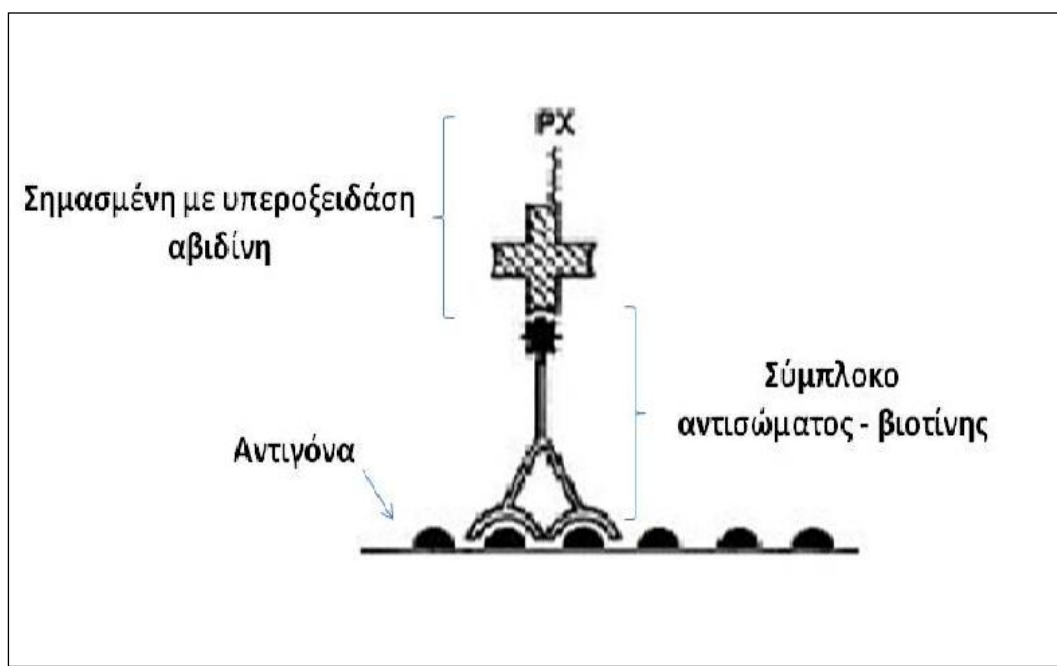
Χαρακτηριστικό γνώρισμα της μεθόδου αποτελεί η σύνδεση των αντισωμάτων με το ένζυμο υπεροξειδάση. Η εφαρμογή της μεθόδου πραγματοποιείται είτε με άμεσο είτε με έμμεσο τρόπο, αφού προηγηθεί σειρά μη συνδεδεμένων αντισωμάτων εναντίον του αντιγόνου στόχου για την έμμεση μέθοδο [250-252]. Η αναγνώριση των εναποθέσεων (αντιγόνων) με το κοινό μικροσκόπιο επιτυγχάνεται τελικά με τη χρήση χρωμογόνων, συνηθέστερα με την επίθεση της διαμινιβενζιδίνης (DAB). Η DAB πολυμερίζεται με την παρουσία υπεροξειδάσης και υπεροξειδίου του υδρογόνου σχηματίζοντας αδιάλυτο πολυμερές στα συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος αποδίδοντας μια καφέ απόχρωση στο κοινό οπτικό μικροσκόπιο. Ακριβώς αυτές οι μοριακές μεταβολές της DAB οδηγούν στο σχηματισμό σταθερού χρώματος που δεν είναι διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες. Εν συνεχεία οι τομές τοποθετούνται σε διάλυμα αιματοξυλίνης (Harris, Mayer's) για να καθοριστούν τα υπόλοιπα μορφολογικά ιστολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων. Υπάρχουν 4 υποκατηγορίες της μεθόδου αυτής : α) η άμεση μέθοδος, β) η έμμεση μέθοδος (τεχνική Sandwich), γ) η μέθοδος της «γέφυρας» (γεφυρική ανοσοϋπεροξειδάση) και δ) η μέθοδος υπεροξειδάσης - αντιυπεροξειδάσης (PAP μέθοδος).



Εικόνα 20: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου ανοσοσυμπλέγματος υπεροξειδάσης-αντιυπεροξειδάσης (PAP method) (τροποποίηση από Ramos Vara JA et al 1999).

7.2.2 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΒΙΔΙΝΗΣ-ΒΙΟΤΙΝΗΣ-ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ (ABC)

Αποτελεί ανοσοενζυμική μέθοδο, ανάλογη της PAP και θεωρείται πιο ευαίσθητη μέθοδος απ' αυτή, λόγω της ισχυρής δεσμευτικής ικανότητας μεταξύ βιοτίνης και αβιδίνης. Η αβιδίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη προερχόμενη από το λευκό του αυγού και έχει μεγάλη τάση σύνδεσης (4 συνδετικές θέσεις ανά μόριο). Η βιοτίνη αποτελεί βιταμίνη με χαμηλό μοριακό βάρος και βρίσκεται στη λέκιθο του αυγού, συνδέεται δε με το δεύτερο αντιγόνο με τον ίδιο τρόπο που συνδέεται η υπεροξειδάση. Εν συνεχεία, ο τρίτος αντιτορός αποτελείται από ένα σύμπλεγμα αβιδίνης και ενζύμου συνδεδεμένου με βιοτίνη, το οποίο έχει μερικές ελεύθερες θέσεις αβιδίνης για σύνδεση με τη βιοτίνη του δεύτερου αντισώματος. Παραλλαγή της μεθόδου αποτελεί η αντικατάσταση της αβιδίνης από τη στρεπταβιδίνη στην προαναφερόμενη τριάδα ABC. Η στρεπταβιδίνη, η οποία παράγεται από το βακτήριο *Streptomyces avidinii*, αποτελεί πρωτεΐνη μοριακού βάρους 60 KD και περιλαμβάνει τέσσερις όμοιες υπομονάδες, η κάθε μία εκ των οποίων έχει μια θέση σύνδεσης με τη βιοτίνη. Η χρήση της έναντι της αβιδίνης προτιμάται διότι δεν περιέχει υδατάνθρακες, οι οποίοι συνδέονται μη ειδικά με τις λεκτίνες των ιστών και επίσης διότι το ισοηλεκτρικό της σημείο είναι ουδέτερο. Η στρεπταβιδίνη βρίσκει εφαρμογή είτε ως σύμπλεγμα με τη βιοτίνη, είτε σημασμένη με ένζυμο (labeled streptavidin) [250,251,253].



Εικόνα 21: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου βιοτίνης-αβιδίνης (Biotin-Avidin procedure) (τροποποίηση από Shields TW et al 2005).

7.2.3 ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΚΑΛΙΚΗΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΗΣ

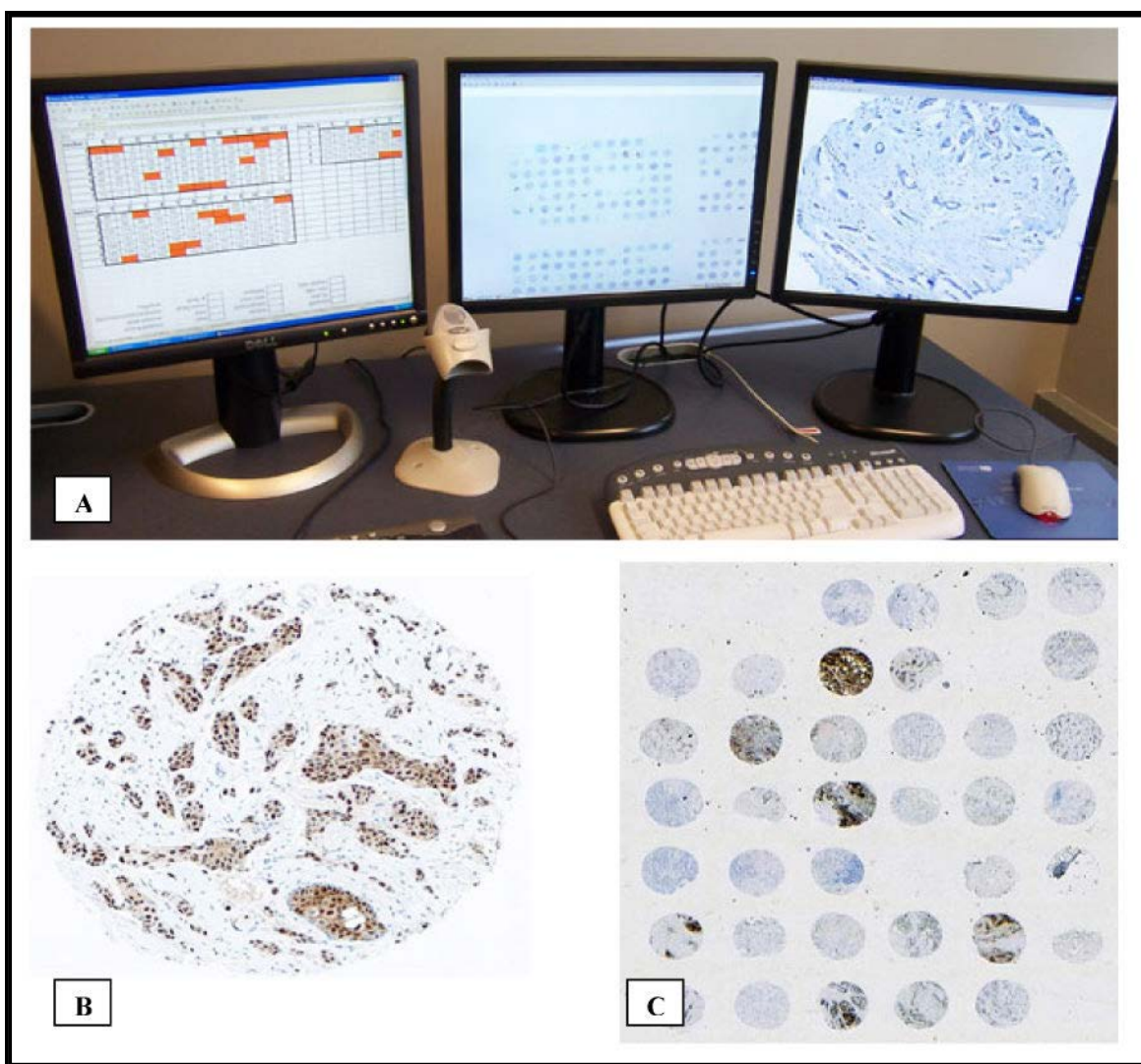
Η αλκαλική φωσφοτάση εφαρμόζεται είτε ως σύμπλεγμα αβιδίνης-βιοτίνης-αλκαλικής φωσφατάσης είτε ως σύμπλεγμα αλκαλικής φωσφατάσης-αντιαλκαλικής φωσφατάσης. Το τελευταίο σύμπλεγμα αποτελείται από δύο μόρια αντιγόνου συνδεδεμένα με ένα μόριο αντισώματος. Η διάταξη αυτή μοιάζει με τη φυσιολογική αντίδραση σύνδεσης ενός δισθενούς αντισώματος και κατά συνέπεια το σύμπλεγμα είναι σταθερό για μεγάλο χρονικό διάστημα.

7.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΝΙΣΧΥΣΗΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ

Σε πολλές περιπτώσεις το υπό εντόπιση αντιγόνο είναι καλυμμένο και για την αποκάλυψή του έπρεπε να επινοηθούν μέθοδοι που ονομάστηκαν μέθοδοι αποκάλυψης ή επανάκτησης του αντιγόνου. Η πέψη του υπό διερεύνηση ιστού με πρωτεολυτικά ένζυμα, η επεξεργασία του με μικροκύματα και η έκθεσή του συγχρόνως σε υψηλή θερμοκρασία και πίεση είναι μερικές από αυτές [254-258].

8. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΕΙΚΟΝΑΣ

Τα συστήματα ανάλυσης εικόνας προέκυψαν ως αποτέλεσμα της αδήριτης ανάγκης για ποιοτικότερους ελέγχους στα προϊόντα υψηλής μικροτεχνολογίας (transistors, microchips) στις αρχές της δεκαετίας του 1980 στον κλάδο της Ηλεκτρονικομηχανικής. Προσφέρουν τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης του ποιοτικού, μέσω μιας ταχείας και ακριβούς εκτίμησης των μετρούμενων παραμέτρων. Οι μορφομετρικές αναλύσεις στο επίπεδο της παθολογικής ανατομικής και κυτταρολογίας αφορούν μετρήσεις απόλυτου αριθμού κυτταρικών χώρων (π.χ. πυρήνων) ή γεωμετρικών χαρακτηριστικών όπως διαμέτρων πυρήνων ή κυττάρων, λόγων διαμέτρων ή χώρων (N/C ratio), καθώς και πυκνομετρικές μελέτες (densitometry), όπου μετρώνται η έκταση και η οπτική πυκνότητα (βαθυχρωματικότητα) πυρηνικών ή κυτταροπλασματικών ιστοχημικών ή ανοσοϊστοχημικών χρώσεων.



Εικόνα 22: Μεθοδολογία υπολογιστικής ανάλυσης της εικόνας (τροποποίηση από David Voduc et al, Semin Radiat Oncol. 2008).

Αναγνωρίζονται δύο ειδών συστήματα ανάλυσης εικόνας ανάλογα με την ανεξαρτησία της δραστηριότητάς τους: τα αυτόματα (full automated), τα οποία με ρομποτικούς μηχανισμούς και βάση τροποποιημένων μακροεντολών εκτελούν τη διαχείριση και μέτρηση των επιθυμούμενων χαρακτηριστικών με απόλυτα αυτοματοποιημένο τρόπο και εκείνα τα οποία χαρακτηρίζονται ως ημιαυτόματα (semi automated) στα οποία ο χειριστής-ιατρός επεμβαίνει αποκόπτοντας ή ενσωματώνοντας χώρους ενδιαφέροντος.

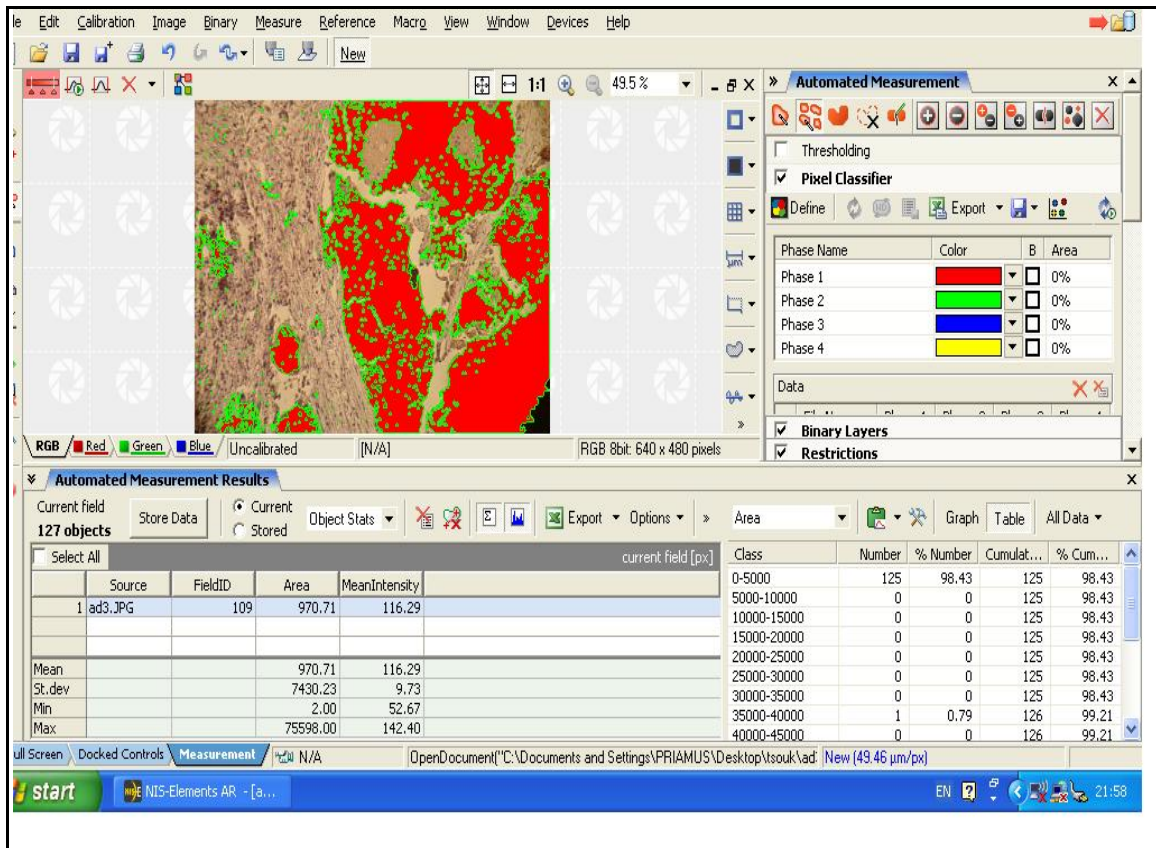
8.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΕΙΚΟΝΑΣ - ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Σε κάθε ιστολογικό ή κυτταρολογικό πλακίδιο επιλέγονται αντιπροσωπευτικά πεδία υπό την επιθυμητή μεγέθυνση και υπό σταθερή ένταση φωτός και μετράται ο απόλυτος αριθμός των πυρήνων και η οπτική πυκνότητα (optical density) ή η ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης (staining intensity) στα επιλεγμένα κυτταρικά υποσυστήματα (π.χ. μεμβράνη, κυτταρόπλασμα), αφού προηγουμένως κατασκευάζονται οι αντίστοιχες μακροεντολές δομημένες σε γλώσσα Basic για τον καθορισμό του χρωματικού εύρους (στην προκειμένη περίπτωση αποχρώσεις του καφέ) λόγω DAB κατά το πρότυπο RGB (red/green/blue).

Η ψηφιοποιημένη εικόνα του μικροσκοπίου καταλαμβάνει σταθερό πλαίσιο μέτρησης στην οθόνη του υπολογιστή (ενεργό κάδρο-active window) εκτάσεως $16848\mu\text{m}^2$ σε μεγέθυνση 400x, δηλαδή το 25% του οπτικού πεδίου του μικροσκοπίου. Κάθε εικονοστοιχείο (pixel) λαμβάνει μια τιμή του χρωματικού φάσματος, που αποτελεί τη συνισταμένη των προαναφερθέντων βασικών χρωμάτων. Το εύρος της οπτικής πυκνότητας στο συγκεκριμένο σύστημα καλύπτει το εύρος των τιμών από 0 (απόλυτο μαύρο) έως 255 (απόλυτο λευκό). Κατ' αυτόν τον τρόπο μεταφράζεται σε κλινικό επίπεδο η συσχέτιση της έντασης της χρώσης (μειούμενες τιμές - βαθυχρωματικότητα) με τη βιολογική συμπεριφορά του νεοπλάσματος (διαφοροποίηση - σταδιοποίηση).

Κατά τη διαδικασία της μέτρησης η αναλογική εικόνα του μικροσκοπίου φιλτράρεται ψηφιακά (σχηματισμός προσωρινού ή αποθηκευμένου ψηφιακού αρχείου τύπου jpeg ή TIFF) και μετά την ακινητοποίησή της, μέσω της προκατασκευασμένης μακροεντολής, αποτυπώνονται οι χώροι της μέτρησης σημεινόμενοι με κάποιο χρώμα (π.χ. κόκκινο), ώστε στο τελικό στάδιο, πριν δηλαδή σχηματιστεί η τελική κάρτα αποτελεσμάτων (τύπου Excel sheet), να επιτραπεί στο χειριστή η παρέμβαση μέσω ενσωμάτωσης ή αποκοπής χώρων ενδιαφέροντος,

τους οποίους αγνόησε ή υπερεκτίμησε το σύστημα. Ο συνδυασμός τόσο σωστής μακροεντολής, και καλής ποιότητας χρωσμένο πλακιδίο (καθαρότητα - ειδικότητα ανοσοϊστοχημικής χρώσης) όσο και εμπειρίας του χρήστη μειώνουν δραματικά το στατιστικό σφάλμα σε επίπεδα $<5\%$.



Εικόνα 23: Τελική εικόνα αποτελεσμάτων του προγράμματος υπολογιστικής ανάλυσης της εικόνας (output of programme CIA).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



9. ΣΚΟΠΟΣ

Αντικείμενο του ειδικού μέρους της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής ήταν η διερεύνηση και εκτίμηση της βιολογικής και κλινικής σημασίας της έκφρασης του RCAS1 στο NSCLC. Ειδικότερα, αξιοποιήθηκαν όλα τα δημογραφικά, κλινικά και ιστοπαθολογικά δεδομένα ασθενών με πρωτοπαθή NSCLC, που συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη αυτή και η αρχική τους αντιμετώπιση περιελάμβανε χειρουργική αφαίρεση του νεοπλάσματος. Η αξιολόγηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RCAS1 και η κλινική της σημασία αποτέλεσε αντικείμενο αρκετών μελετών τα τελευταία χρόνια για διάφορους τύπους καρκίνου. Ωστόσο, για το NSCLC υπάρχουν περιορισμένα και αντικρουόμενα δεδομένα [137,172,182,195]. Η επαναξιολόγηση λοιπόν της αξίας του RCAS1 ως ενός νέου βιοδείκτη στο NSCLC θα μπορούσε να φανεί ιδιαίτερα χρήσιμη στην καθημερινή κλινική ογκολογική πράξη.

10. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

10.1 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Στην παρούσα πειραματική μελέτη συμμετείχαν 117 ασθενείς με διαγνωσμένο πρωτοπαθή NSCLC που αντιμετωπίστηκαν αρχικά χειρουργικά σε δύο Νοσοκομεία της Αθήνας (417 ΝΙΜΤΣ και ΝΝΑ) κατά το χρονικό διάστημα 2005-2008. Η εισαγωγή των ασθενών στη μελέτη ήταν συνεχής και στα δύο νοσοκομεία, με βάση το καθημερινό πρόγραμμα των χειρουργείων, χωρίς κάποια άλλη διαλογή ή επιλογή των ασθενών. Για όλους τους ασθενείς συλλέχθηκαν πληροφορίες σχετικά με δημογραφικές μεταβλητές καθώς και με παραμέτρους οι οποίες πιθανότατα να μπορούσαν να σχετιστούν άμεσα ή έμμεσα με την έκβαση της νόσου.

Όλοι οι ασθενείς ήταν ενήλικες (>18 ετών) και υποβλήθηκαν αρχικά σε λοβεκτομή ή πνευμονεκτομή με ιστολογικά ελεύθερο νόσου βρογχικό κολόβωμα και ταυτόχρονο συστηματικό λεμφαδενικό καθαρισμό του μεσοθωρακίου (systematic lymph node sampling) που σημαίνει αφαίρεση παθολογικών και μη λεμφαδένων από όλες τις προσβάσιμες λεμφαδενικές θέσεις αναλόγως του ημιθωρακίου. Σε κανέναν ασθενή δεν είχε πραγματοποιηθεί προεγχειρητική-εισαγωγική (neoadjuvant) χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία. Η έρευνα έγινε σύμφωνα με τις υπάρχουσες διατάξεις κανονισμούς και οδηγίες περί ηθικής και δεοντολογίας

και μετά από ενδελεχή ενημέρωση για το ερευνητικό πρωτόκολλο της μελέτης και έγγραφη συγκατάθεση όλων των ασθενών.

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ

- 1) Ασθενείς και των δύο φύλων με ηλικία >18 έτη.
- 2) Διάγνωση πρωτοπαθούς μη μικροκυτταρικού καρκίνου πνεύμονα (NSCLC).
- 3) Χειρουργική αφαίρεση του νεοπλάσματος ως πρώτη θεραπευτική παρέμβαση.
- 4) Μη χορήγηση προεγχειρητικής (neoadjuvant) χημειοθεραπείας ή ακτινοθεραπείας.
- 5) Μη ύπαρξη γνωστής ανοσοανεπάρκειας ή άλλου νεοπλασματικού νοσήματος.
- 6) Ενημέρωση και έγγραφη συγκατάθεση όλων των ασθενών.

Σε όλους τους χειρουργικά αφαιρεθέντες ιστούς έγινε πλήρης τυποποιημένη παθολογοανατομική εξέταση στα Παθολογοανατομικά Εργαστήρια των Νοσοκομείων που προαναφέρθηκαν. Η βαθμονόμηση (όσον αφορά τη διαφοροποίηση) έγινε σύμφωνα με τα ιστολογικά κριτήρια της WHO και η σταδιοποίηση σύμφωνα με το σύστημα TNM. Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν ιστικά δείγματα 10 φυσιολογικών βλεννογόνων πνεύμονα. Από τις παθολογοανατομικές εκθέσεις καταγράφηκε ο ιστολογικός τύπος του νεοπλάσματος, ο ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης (grade), το μέγεθος του όγκου (T), ο αριθμός των διηθημένων λεμφαδένων (N) και το στάδιο της νόσου. Επιπλέον, καταγράφηκαν στοιχεία αναφορικά με την ύπαρξη λεμφαγγειακής διήθησης, φλεγμονώδους διήθησης, νέκρωσης και ίνωσης.

Στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του νοσοκομείου 417 ΝΙΜΤΣ ακολούθησε η επεξεργασία των κύβων παραφίνης για τη δημιουργία των ιστικών μικροσυστοιχιών (Tissue MicroArrays – TMAs) και η ανοσοϊστοχημική μελέτη των μικροτομημένων ιστών για την ανάδειξη της πρωτεϊνικής έκφρασης της πρωτεΐνης RCAS1, του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 και της παρουσίας CD3 θετικών T-λεμφοκυττάρων εντός των όγκων.

Η τελική καταγραφή όλων των διαθέσιμων δεδομένων έγινε σε φύλλα διαχείρισης δεδομένων (Excel) για στατιστική ανάλυση. Από τη μελέτη αποκλείστηκαν συνολικά 5 ασθενείς (5 ασθενείς που τελικά χάθηκαν κατά την παρακολούθηση). Στη μελέτη παρέμειναν τελικά συνολικά 112 ασθενείς.

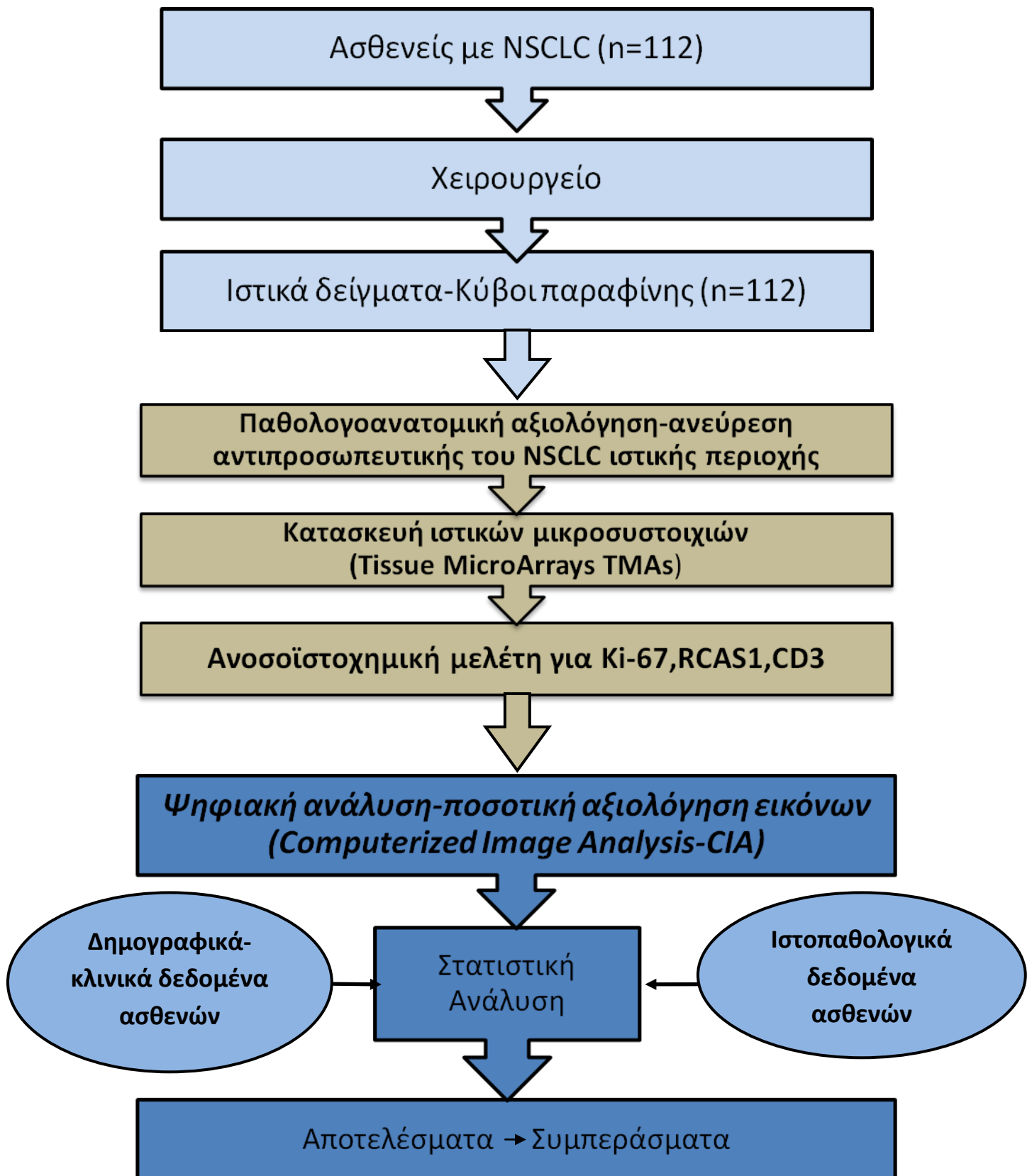
ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΥ ΑΣΘΕΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ

- 1) Ασθενείς και των δύο φύλων με ηλικία <18 έτη.
- 2) Διάγνωση πρωτοπαθούς μικροκυτταρικού καρκίνου πνεύμονα (SCLC).
- 3) Αδύνατη η χειρουργική αφαίρεση του νεοπλάσματος ως πρώτη θεραπευτική παρέμβαση.
- 4) Χορήγηση προεγχειρητικής (neoadjuvant) χημειοθεραπείας ή ακτινοθεραπείας.
- 5) Ύπαρξη γνωστής ανοσοανεπάρκειας ή άλλου νεοπλασματικού νοσήματος.
- 6) Αδύνατη η μετεγχειρητική παρακολούθηση των ασθενών.

10.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΑΛΓΟΡΙΘΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Αρχικά εφαρμόστηκε η συνήθης διαδικασία μονιμοποίησης των χειρουργικών παρασκευασμάτων, ο εγκλεισμό τους σε συμβατικούς κύβους παραφίνης, η μικροτόμηση και η χρώση τους για τη βασική διάγνωση (ταυτοποίηση του τύπου του νεοπλάσματος, διαφοροποίηση και σταδιοποίηση). Η ιστοχημική επεξεργασία των μικροτομημένων, σε πάχος 4μm, κύβων παραφίνης πραγματοποιήθηκε με τη χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης (H&E). Κατά τη μικροσκόπηση πραγματοποιήθηκε η εκτίμηση της επάρκειας του εγκλεισμένου στην παραφίνη νεοπλασματικού ιστού.

Ακολούθησε η επεξεργασία των κύβων παραφίνης για τη δημιουργία αρχικά ιστικών μικροσυστοιχειών (Tissue MicroArrays-TMAs) και στη συνέχεια για την ανοσοϊστοχημική ανάδειξη της έκφρασης της πρωτεΐνης RCAS1, του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 και του δείκτη CD3. Τα ανοσοχρωσμένα (IHC) πλακίδια εκτιμήθηκαν με τη συμβατική μικροσκόπηση και σε δεύτερο βαθμό τέθηκαν υπό το πρίσμα της ψηφιακής ανάλυσης εικόνας (Computerized Image Analysis-CIA) με τελική καταγραφή των μετρήσεων (οπτική πυκνότητα ανοσοχρώσης) σε φύλλα διαχείρισης δεδομένων (Excel) για στατιστική ανάλυση. Ο εργαστηριακός αλγόριθμος που διενεργήθηκε μπορεί σχηματικά να αποδοθεί στο παρακάτω γράφημα.



Γράφημα 1: Ο εργαστηριακός αλγόριθμος της μελέτης.

10.3 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

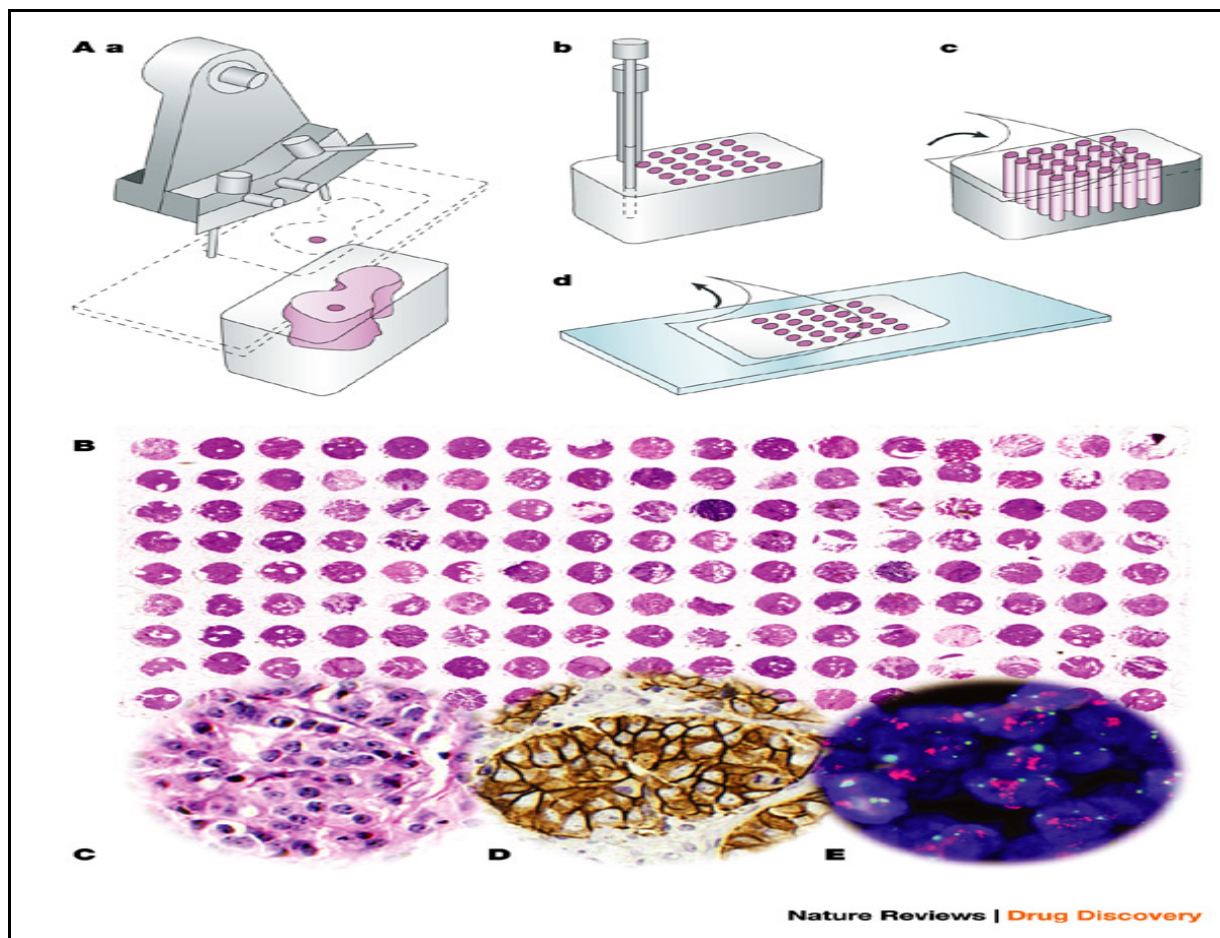
10.3.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΙΣΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Αναφορικά με τους κύβους παραφίνης αυτοί επεξεργάστηκαν αρχικά με τη μέθοδο των ιστικών μικροσυστοιχιών (Tissue MicroArrays Method) με την οποία δημιουργήθηκε τελικά ένας κοινός-αθροιστικός κύβος παραφίνης με δείγματα από κάθε ένα ξεχωριστό παθολογικό ιστολογικό δείγμα κάθε ασθενούς. Ειδικότερα, τμήματα του όγκου σεσημασμένα με αιματοξυλίνη-εωσίνη (hematoxylin-eosin) αναλύθηκαν και περιοχές του όγκου κυκλώθηκαν από έμπειρο παθολογανατόμο. Οι διαφάνειες αυτές χρησιμοποιούνται ως ένα πρότυπο για τη λήψη αποφάσεων σχετικά με το σημείο από το οποίο θα λαμβάνονται οι πυρήνες των ιστών στο αντίστοιχο μπλοκ παραφίνης. Ακολούθως, ένας πυρήνας ιστού (δείγμα ιστού) αίρεται, με ειδικό μηχανήμα ακριβείας, από καθένα από τους αρχικούς κύβους παραφίνης και τοποθετείται σε μια οπή ενός νέου συγκεντρωτικού κύβου-μπλοκ παραφίνης. Κατά το διαχωρισμό, κάθε ιστικό δείγμα αναπαρίσταται ως ένα μικρό (0,6 έως 2mm σε διάμετρο) ιστοσημείο (histospot) τοποθετημένο σε ένα πλέγμα ιστών. Τελικά, κάθε πυρήνας ιστού είναι ενσωματωμένος σε ένα αθροιστικό μπλοκ παραφίνης (TMA) αλλά και σε έναν πίνακα (χάρτη), έτσι ώστε να διατηρείται η ταυτότητα του δείγματος αλλά και η διασύνδεση του με τα κλινικο-παθολογανατομικά δεδομένα του κάθε ασθενούς.

Ακολούθησε ανοσοϊστοχημική μελέτη της πρωτεΐνης RCAS1, του δείκτη Ki-67 και του δείκτη CD3 σε όλους τους ιστολογικά επιβεβαιωμένους καρκίνους πνεύμονα. Για την ανοσοϊστοχημική αυτή μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ιστική μικροσυστοιχία που δημιουργήθηκε (Tissue MicroArray - TMA) και τα κατάλληλα μονοκλωνικά αντισώματα. Τα αντισώματα αυτά είναι ένα anti-RCAS1 μονοκλωνικό αντίσωμα που αντιδρά με την πρωτεΐνη RCAS1 (MBL Int, Nagoya, Japan), ένα (IgG_{1k}) μονοκλωνικό αντίσωμα (MIB-1) που αντιδρά με το αντιγόνο Ki-67 (Dakopatts, Glostrup, Denmark) και ένα (IgG_{2a}) μονοκλωνικό αντίσωμα που αντιδρά με το αντιγόνο CD3 (NCL-L-CD3-PSI, NovocastraTM). Ακολούθησε ανάλυση των εικόνων (image analysis) με ειδικό πρόγραμμα software (Computerized Image Analysis) για την επεξεργασία και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημικής μελέτης.

Επιπλέον μελετήθηκαν όλα τα κλινικοεργαστηριακά δεδομένα των ασθενών από τους ιατρικούς φακέλους και δημιουργήθηκε μια ανάλογη βάση δεδομένων σε πρόγραμμα Excel. Οι ασθενείς μετά το αρχικό χειρουργείο έλαβαν χημειοθεραπεία και/ή ακτινοθεραπεία με βάση τις

ισχύουσες κατευθυντήριες οδηγίες τόσο των ελληνικών όσο και διεθνών οργανισμών Κλινικής Ογκολογίας (ΕΟΠΕ, ESMO, NCCN).



Εικόνα 24: Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου των ιστικών μικροσυστοιχειών (τροποποίηση από Guido Sauter et al, Nature Reviews Drug Discovery 2003).

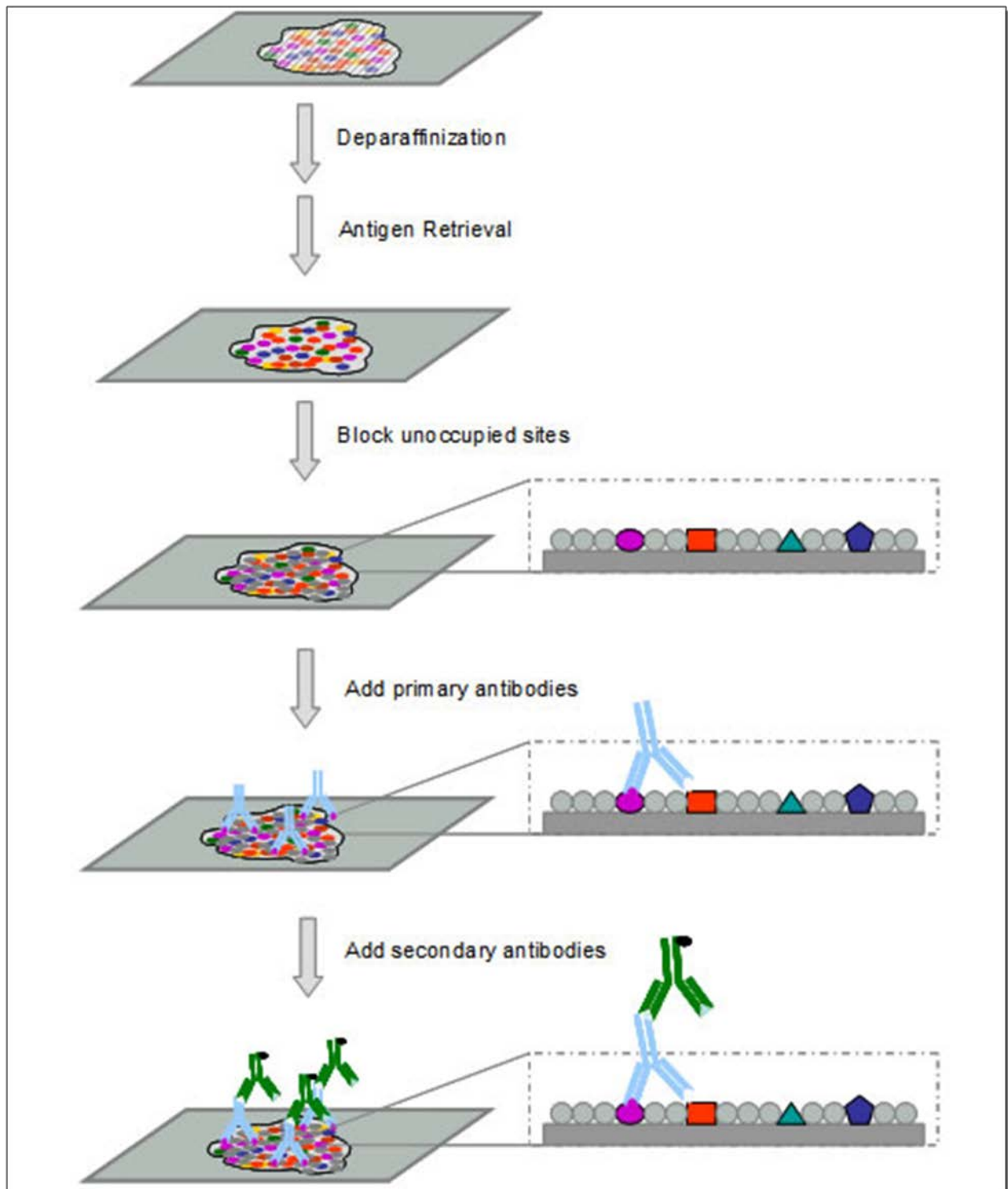
10.3.2 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ – IHC

Για την ανοσοϊστοχημική διερεύνηση επιλέχθηκαν τα ακόλουθα αντισώματα:

- α) ένα anti-RCAS1 μονοκλωνικό αντίσωμα που αντιδρά με την πρωτεΐνη RCAS1 (MBL Int, Nagoya, Japan), σε αραιώση 1-5 µg/ml.
- β) ένα (IgG_{1k}) μονοκλωνικό αντίσωμα (MIB-1) που αντιδρά με το αντιγόνο Ki-67 (Dakopatts, Glostrup, Denmark), σε αραιώση 1/150 (pH 6.0, citrate buffer).
- γ) ένα (IgG_{2α}) μονοκλωνικό αντίσωμα που αντιδρά με το αντιγόνο CD3 (NCL-L-CD3-PSI, NovocastraTM), σε αραιώση 1/200 (pH 6.0, citrate buffer).

Το πρωτόκολλο ανοσοιστοχημείας - IHC (μέθοδος συμπλέγματος αβιδίνης-βιοτίνης ABC) εκτελέστηκε κατά στάδια σε μηχανήμα τύπου Bond III-Leica και περιλάμβανε τις παρακάτω διαδικασίες: Αρχικά τομές πάχους 3 μm τοποθετήθηκαν στον κλίβανο στους 37°C.

- Αποπαραφίνωση των τομών και ενυδάτωση σε αποσταγμένο νερό (ξυλόλη 3 φορές, αιθανόλη 3 φορές και PBS 3 φορές).
- Έκπλυση σε PBS για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απομάκρυνση των τομών από το PBS και επώαση της κάθε τομής με 100-200 μl από 3% H_2O_2 για 10 λεπτά ώστε να πραγματοποιηθεί αδρανοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Έκπλυση των τομών σε PBS.
- Απομάκρυνση των τομών από το PBS, προσεκτική απομάκρυνση των περιττών υγρών και επώαση των τομών με 100-200 μl για αδρανοποίηση της πρωτεΐνης (Ultratech, HRP kit) για 5 λεπτά.
- Απομάκρυνση του buffer, προσεκτική απομάκρυνση των περιττών υγρών και εκ νέου επώαση των τομών με το αρχικό αντίσωμα στη συνιστώμενη διάλυση.
- Παραμονή των τομών σε θερμοκρασία δωματίου για 60 λεπτά.
- Προσεκτική έκπλυση των τομών ώστε να απομακρυνθεί το αντίσωμα με χρήση πιπέτας που περιέχει buffer με πολύ προσοχή να μην καταστραφεί ο ιστός. Έκπλυση 3 φορές με PBS για 5 λεπτά έκαστο.
- Προσεκτική απομάκρυνση των περιττών υγρών από κάθε τομή και στη συνέχεια επώαση των τομών με 100-200 μl Polyvalent Biotinylated Ab (Ultratech HRP kit).
- Παραμονή των τομών για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Έκπλυση όπως στο βήμα 7.
- Προσεκτική απομάκρυνση των περιττών υγρών και στη συνέχεια επώαση των τομών με 100-200 μl Streptavidin HRP.
- Παραμονή των τομών σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
- Έκπλυση όπως στο βήμα 7.
- Προσθήκη 3 σταγόνων διαλύματος χρωμογόνου DAB (20mg DAB σε 400ml PBS με 40 μl από 30% H_2O_2) για 15 λεπτά και στη συνέχεια έκπλυση με αποσταγμένο νερό.
- Εμβάπτιση των τομών σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 1 λεπτό.
- Έκπλυση τομών με προσεκτική απομάκρυνση της αιματοξυλίνης.
- Εμβάπτιση και παραμονή των τομών σε PBS για 5 λεπτά.
- Προοδευτική αφυδάτωση με εμβάπτιση των τομών 3 φορές σε αιθανόλη για 3 λεπτά και έπειτα 3 φορές σε ξυλόλη για επίσης 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Επικόλληση καλυπτρίδων αμέσως μόλις εξατμιστεί η ξυλόλη.



Εικόνα 25: Σχηματική απεικόνιση της εφαρμοσμένης ανοσοϊστοχημικής μεθόδου (τροποποίηση από <http://www.ptglab.com>).

10.3.3 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΕΙΚΟΝΑΣ (CIA)

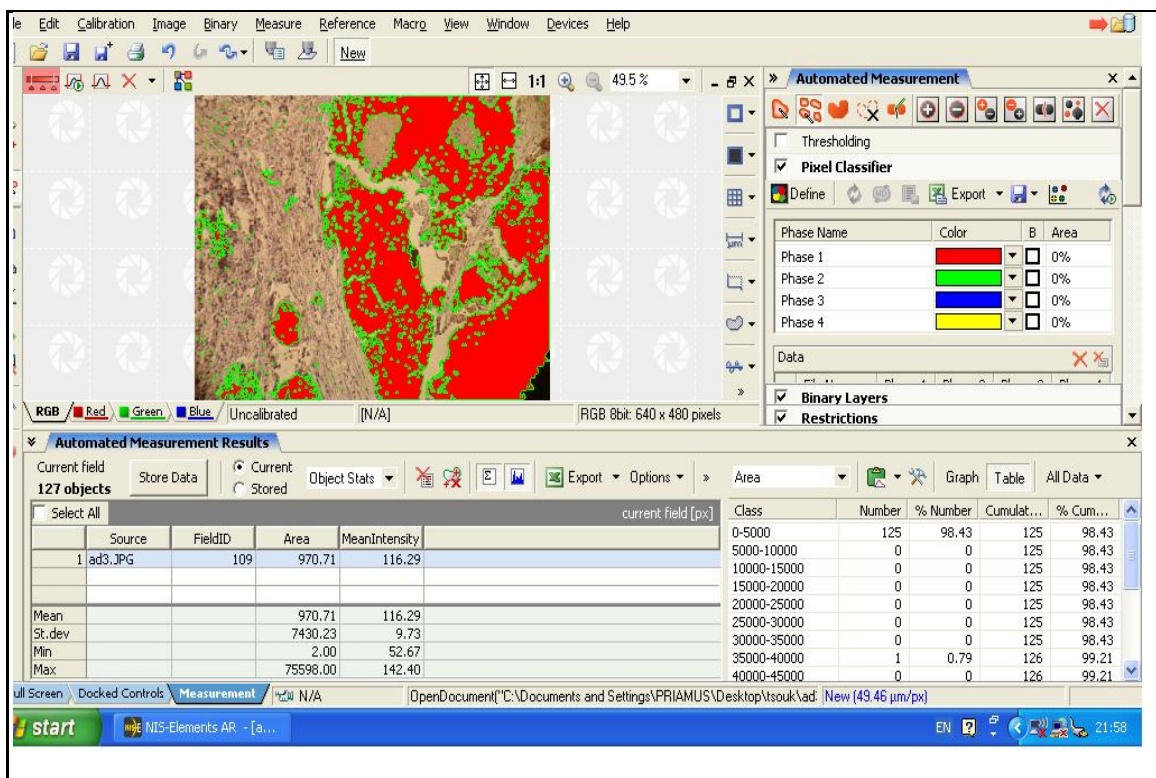
Η ποσοτική μέτρηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του 417 ΝΙΜΤΣ με Ημιαυτόματο Σύστημα Ανάλυσης Εικόνας DIS (Image Analysis System: Intel Pentium IV / CAMERA MICROWAVE SYSTEMS (800x600), Matrox II FRAMEGRABBER, Μικροσκόπιο Olympus BX-50-Λογισμικό: Windows XP/Image Pro Plus version 3.0 Media Cybernetics 1997).

Ειδικότερα, σε κάθε ανοσοϊστοχημικό δείγμα επιλέχθηκαν 5 αντιπροσωπευτικά πεδία, για κάθε ιστικό δείγμα, υπό μεγέθυνση x400. Σε αυτά μετρήθηκε και αξιολογήθηκε, τελικά στατιστικά και ποσοτικά, η ανοσοϊστοχημική πυκνότητα (ένταση) της ειδικής προσροφηθείσας χρώσης (staining intensity) για το δείκτη RCAS1. Προηγουμένως είχε κατασκευασθεί η αντίστοιχη μακροεντολή σε BasicProPlus για τον καθορισμό του χρωματικού εύρους (στην προκειμένη περίπτωση αποχρώσεις του καφέ χρώματος της DAB) κατά το πρότυπο RGB (Red/Green/Blue). Το εύρος της εκτείνεται σε ένα φάσμα 256 συνεχόμενων τιμών (0-255), όπου το 0 αντιπροσωπεύει το απόλυτο μαύρο και το 255 το απόλυτο λευκό στο γκρι φάσμα του υπολογιστικού συστήματος που χρησιμοποιήθηκε (Gray scale BPP 8 bit 0-255). Το κάθε εικονοστοιχείο (pixel) στη μετρούμενη εικόνα λαμβάνει μια τιμή που αντιπροσωπεύει ακριβώς τη συνισταμένη των προαναφερθέντων βασικών χρωμάτων. Η ψηφιοποιημένη εικόνα του μικροσκοπίου καταλάμβανε σταθερό πλαίσιο μέτρησης στην οθόνη του υπολογιστή (active frame) εκτάσεως 16848 μm^2 , δηλαδή το 25% περίπου του οπτικού πεδίου του μικροσκοπίου στη μεγέθυνση x400. Επίσης, για την εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για το δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 χρησιμοποιήθηκε το ίδιο αυτοματοποιημένο πρόγραμμα το οποίο όμως αυτή τη φορά καταμετρούσε τον αριθμό των κεχρωσμένων πυρήνων σε 5 επιλεγμένα αντιπροσωπευτικά πεδία για κάθε ανοσοϊστοχημικό δείγμα.

Τέλος, η αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για το δείκτη CD3 έγινε με τον κλασσικό τρόπο, από έμπειρο παθολογοανατόμο, ο οποίος εκτίμησε και τελικά καταμέτρησε μόνο το ποσοστό των CD3 θετικών T-λεμφοκυττάρων που βρίσκονταν εντός του όγκου. Αυτό έγινε διότι όπως ήταν αναμενόμενο η ιστική αντιπροσώπευση του μικροπεριβάλλοντος κάθε όγκου ήταν περιορισμένη λόγω της μεθοδολογίας των ιστικών μικροσυστοιχιών που χρησιμοποιήθηκε κατά την επεξεργασία των ιστικών δειγμάτων των ασθενών. Παρ'αυτά, τελικά κατέστη δυνατή η διάκριση των ασθενών σε δύο μεγάλες ομάδες με βάση τη θετικότητα της χρώσης για το δείκτη CD3. Ειδικότερα, σε όσους ασθενείς το ποσοστό των CD3 (+) T-

λεμφοκυττάρων εντός του όγκου ήταν >10% χαρακτηρίστηκαν ως CD3 (+) ασθενείς ενώ οι υπόλοιποι ασθενείς χαρακτηρίστηκαν ως CD3 (-).

Σημειώνεται ότι με βάση το ειδικό software (computerized image analysis) που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία και ανάλυση των αποτελεσμάτων της ανοσοϊστοχημικής μελέτης για το RCAS1 έχουμε συνεχή ποσοτική μέτρηση των τιμών έκφρασης του (από 0 ως 256), αλλά όσο αυξάνονται οι τιμές αυτό σημαίνει ότι μειώνεται η έκφραση του π.χ. σύγκριση δυο τιμών 120 και 160 για το RCAS1 σημαίνει ότι η πρώτη τιμή το 120 δείχνει μεγαλύτερη έκφραση του μορίου σε σχέση με τη δεύτερη το 160. Τα βασικά πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η αντικειμενικότητα και η υψηλή ευαισθησία κατά την αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης αλλά και η ποσοτικοποίηση του τελικού αποτελέσματος.



Εικόνα 26: Τελική εικόνα αποτελεσμάτων του προγράμματος υπολογιστικής ανάλυσης της εικόνας (output of programme CIA).

10.4 ΜΕΤΕΓΧΕΙΡΗΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ

Οι ασθενείς μετά το αρχικό χειρουργείο έλαβαν χημειοθεραπεία και/ή ακτινοθεραπεία με βάση τις ισχύουσες κατευθυντήριες οδηγίες. Η παρακολούθηση των ασθενών έγινε με γνώμονα τον καθορισμό του συνολικού χρόνου επιβίωσης και η μέση διάρκεια της ήταν 3 έτη περίπου. Η τελευταία καταγραφή δεδομένων έγινε τον Ιανουάριο του 2012.

11. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

11.1 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Τα αποτελέσματα από τη μέτρηση της έκφραση της πρωτεΐνης RCAS1 στο νεοπλασματικό ιστό των ασθενών συσχετίστηκαν με τα δημογραφικά, κλινικοεργαστηριακά και ιστολογικά χαρακτηριστικά αυτών από την βάση δεδομένων που θα είχε ήδη δημιουργηθεί. Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση, ενώ οι κατηγορικές μεταβλητές ως απόλυτη και σχετική συχνότητα. Αρχικά το κριτήριο Student's t-test χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση συνεχών μεταβλητών σε δύο ανεξάρτητες ομάδες, ενώ ο έλεγχος διασποράς ANOVA για τη σύγκριση συνεχών μεταβλητών σε περισσότερες από δύο ανεξάρτητες ομάδες. Ο έλεγχος των συσχετίσεων μεταξύ κατηγορικών μεταβλητών έγινε με χρήση των κριτηρίων χ^2 και Fisher's Exact test, ανάλογα με τις συχνότητες των κατηγορικών μεταβλητών. Για τον έλεγχο κανονικότητας χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο Kolmogorov-Smirnov.

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων μας χρησιμοποιήσαμε t-test για τις συγκρίσεις μεταξύ δύο ομάδων και one-way ANOVA για τις συγκρίσεις άνω των δύο κατηγοριών. Οι συσχετίσεις μεταξύ ποσοτικών μεταβλητών υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του παραμετρικού συντελεστή συσχέτισης του Pearson. Οι συσχετίσεις με το χρόνο επιβίωσης των ασθενών έγιναν με log-rank test για τις κατηγορικές και με Cox proportional hazards method για τις ποσοτικές μεταβλητές ενώ κατασκευάστηκε και πολυπαραγοντικό Cox survival model. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ήταν $p\text{-value}=0.05$ για όλες τις συγκρίσεις. Όλες οι αναλύσεις έγιναν με τη χρήση των στατιστικών προγραμμάτων SPSS 17 και Stata 11 για Windows.

Τέλος, το $p\text{-value}$ είναι η πιθανότητα να κάνουμε στατιστικό σφάλμα τύπου I (να βρούμε δηλαδή ότι υπάρχει διαφορά μεταξύ δύο ομάδων-μεταβλητών ενώ στην πραγματικότητα δεν υπάρχει διαφορά). Πρακτικά ένα $p\text{-value}$ 0.05 σημαίνει ότι έχουμε 5% πιθανότητα να λέμε ότι υπάρχει διαφορά ενώ στην πραγματικότητα κάτι τέτοιο να μην ισχύει.

11.2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΤΑΓΕΓΡΑΜΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΛΗΤΩΝ

Οι μεταβλητές-δεδομένα των ασθενών που καταγράφηκαν και αξιοποιήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης περιγράφονται στους ακόλουθους δυο πίνακες. Στον πρώτο πίνακα

(ΟΜΑΔΑ Α) καταγράφονται τα γενικά δεδομένα των ασθενών, ενώ στο δεύτερο πίνακα (ΟΜΑΔΑ Β) αναλύονται οι τρεις ειδικές μεταβλητές (RCAS1, Ki-67, CD3) που αποτέλεσαν και το βασικό αντικείμενο της παρούσας Διδακτορική Διατριβής.

ΓΕΝΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ ΑΣΘΕΝΩΝ (ΟΜΑΔΑ Α)	
Ηλικία - (AGE)	Σε έτη
Φύλο - (GEN)	Άνδρες, Γυναίκες
Κάπνισμα - (SMO)	Ναι, Όχι
Αλκοόλ - (ALC)	Ναι , Όχι
Κατάσταση σωματικής ικανότητας Performance status - (PS)	0,1,2
Ιστολογικός τύπος - (PATHOLOGY)	Αδενοκαρκίνωμα, Πλακώδες, Μεγαλοκυτταρικό, Άλλο
Βαθμός διαφοροποίησης - (GRA)	I, II, III
Ύπαρξη φλεγμονής - (INF)	Ναι, Όχι
Ύπαρξη λεμφαγγειακής διήθησης - (LVI)	Ναι, Όχι
Ύπαρξη νέκρωσης - (NEC)	Ναι , Όχι
Ύπαρξη ίνωσης - (FIB)	Ναι, Όχι
Μέγεθος όγκου - (T)	Tx, T0, Tis, T1a, T1b, T2a, T2b, T3, T4
Λεμφαδενική διασπορά - (N)	Nx, N0, N1, N2, N3
Μετάσταση - (M)	Mx, M0, M1a, M1b
Στάδιο - (STAG)	IA ,IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IV
Χημειοθεραπεία	Ναι, Όχι (Αναλόγως του αν οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε μετεγχειρητική χημειοθεραπεία).
Ακτινοθεραπεία	Ναι, Όχι (Αναλόγως του αν οι ασθενείς υποβλήθηκαν σε μετεγχειρητική χημειοθεραπεία).
Συνολική επιβίωση - (OS)	Χρόνος στον οποίο επήλθε ο θάνατος σε μήνες μετά τη χειρουργική επέμβαση.

Πίνακας 16: Γενικές μεταβλητές μελέτης.

ΕΙΔΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ ΑΣΘΕΝΩΝ (ΟΜΑΔΑ Β)	
Ανοσοέκφραση του RCAS1	Τιμές από 0 έως και 255. Η εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για το RCAS1 βασίστηκε σε ένα αυτοματοποιημένο πρόγραμμα το οποίο καταμετρούσε την ανοσοϊστοχημική πυκνότητα (ένταση) της ειδικής προσροφηθείσας χρώσης (staining intensity) για το δείκτη RCAS1. Το εύρος της εκτείνεται σε ένα φάσμα 256 συνεχόμενων τιμών (0-255), όπου το 0 αντιπροσωπεύει το απόλυτο μαύρο και το 255 το απόλυτο λευκό στο γκρι φάσμα του υπολογιστικού συστήματος που χρησιμοποιήθηκε (Gray scale BPP 8 bit 0-255). Λαμβάνοντας ως κριτήριο τη διάμεση τιμή ανοσοέκφρασης του RCAS1 στους 112 ασθενείς της παρούσας μελέτης, η οποία ήταν 126,380 (MEDIAN RCAS1=126,380), διακρίναμε τους ασθενείς σε δύο ομάδες (groups). Ειδικότερα, η ομάδα ασθενών με υπερέκφραση του RCAS1 (RCAS1 high) είχε τιμές RCAS1<126,380 ενώ η άλλη ομάδα με τη υποέκφραση του RCAS1 (RCAS1 low) είχε τιμές RCAS1>126,380.
Ανοσοέκφραση του Ki-67	Τιμές 0,1,2,3 κοκ. Η εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για το δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 βασίστηκε σε ένα αυτοματοποιημένο πρόγραμμα το οποίο καταμετρούσε τον αριθμό των κεχρωσμένων πυρήνων. Λαμβάνοντας τη διάμεση τιμή ανοσοέκφρασης του Ki-67 στους 112 ασθενείς της παρούσας μελέτης, η οποία ήταν 7,000 (MEDIAN Ki-67=7,000), διακρίναμε τους ασθενείς σε δύο ομάδες (groups). Ειδικότερα, η ομάδα ασθενών με υπερέκφραση του Ki-67 (Ki-67 high) είχε τιμές Ki-67 >7,000 ενώ η άλλη ομάδα με τη υποέκφραση του Ki-67 (Ki-67 low) είχε τιμές Ki-67 <7,000.
Ανοσοέκφραση του CD3	Τιμές '0' και '1'. Η εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για το δείκτη CD3 βασίστηκε στο ποσοστό των CD3(+) T-λεμφοκυττάρων εντός του όγκου (επί του συνόλου των ώριμων λεμφοκυττάρων που υπήρχαν εντός του όγκου). Αν αυτό ήταν >10% τότε οι ασθενείς χαρακτηρίστηκαν ως CD3 high ενώ οι υπόλοιποι ως CD3 low.

Πίνακας 17: Ειδικές μεταβλητές μελέτης.

12. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Συνολικά μελετήθηκαν 112 ασθενείς (93 άνδρες και 19 γυναίκες) με μέση ηλικία 63,6 έτη (η διάμεση ηλικία ήταν 64 έτη). Η αναλογία των ιστολογικών τύπων του NSCLC ήταν: 53% (59/112) αδενοκαρκίνωμα (adenocarcinoma), 33% (37/112) πλακώδες καρκίνωμα (squamous cell carcinoma), 9% (10/112) μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (large cell carcinoma) και 5% (6/112) άλλοι τύποι.

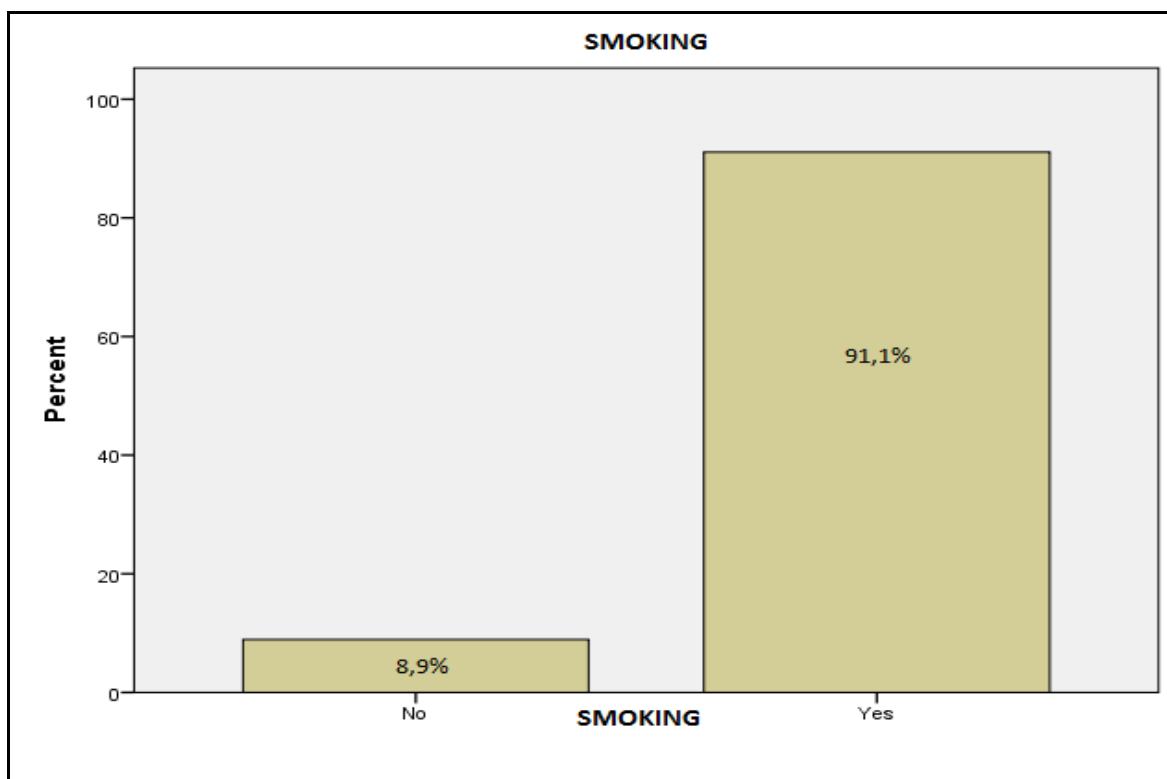
ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ – ΚΛΙΝΙΚΑ – ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	
Ηλικία, έτη (mean $\pm$ SD, range)	63,6 $\pm$ 10,6 (25-83)
Φύλο (n, %)	
Άνδρες	93 (83%)
Γυναίκες	19 (17%)
Κάπνισμα (n, %)	
Ναι	102 (91.1%)
Όχι	10 (8.9%)
Αλκοόλ (n, %)	
Ναι	64 (57.1 %)
Όχι	48 (42.9 %)
Performance status (n, %)	
0	32 (28.6 %)
1	63 (56.3 %)
2	17 (15.2 %)
Ιστολογικός τύπος (n, %)	
Adenocarcinoma	59 (52.7 %)
Squamous	37 (33 %)
Large cell	10 (8.9 %)
Άλλοι τύποι	6 (5.4 %)

Πίνακας 18: Δημογραφικά, κλινικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών.

Στους πίνακες και στα γραφήματα που ακολουθούν φαίνονται τα δημογραφικά, κλινικά και ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης σχηματικά.

SMOKING					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	No	10	8,9	8,9	8,9
	Yes	102	91,1	91,1	100,0
	Total	112	100,0	100,0	

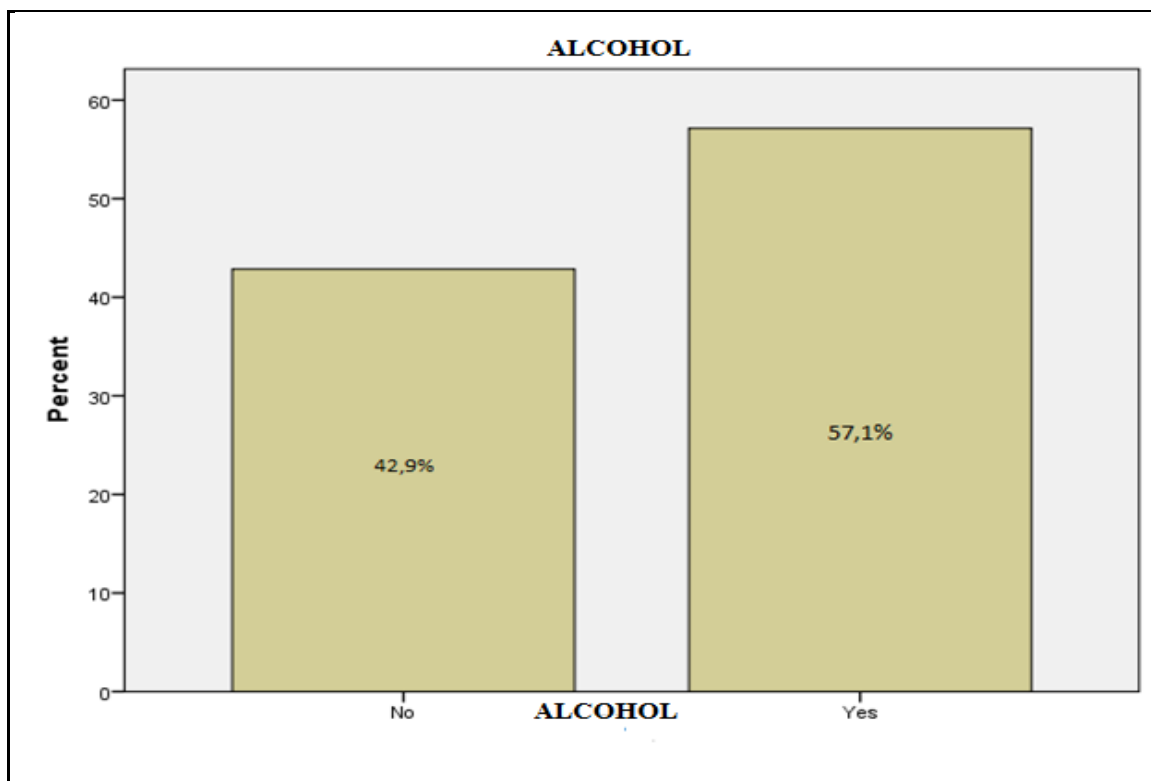
Πίνακας 19: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με το κάπνισμα (SMOKING).



Γράφημα 2: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με το κάπνισμα (SMOKING).

ALCOHOL					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	No	48	42,9	42,9	42,9
	Yes	64	57,1	57,1	100,0
	Total	112	100,0	100,0	

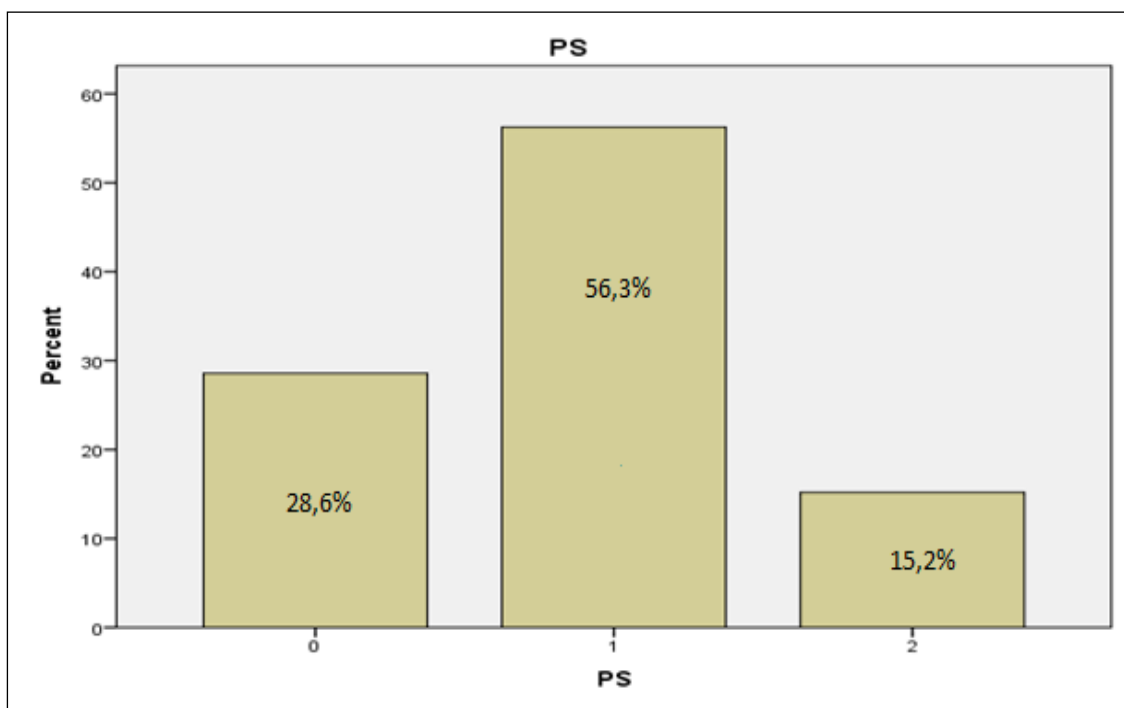
Πίνακας 20: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με τη χρήση αλκοόλ (ALCOHOL).



Γράφημα 3: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με τη χρήση αλκοόλ (ALCOHOL).

PS					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	0	32	28,6	28,6	28,6
	1	63	56,3	56,3	84,8
	2	17	15,2	15,2	100,0
	Total	112	100,0	100,0	

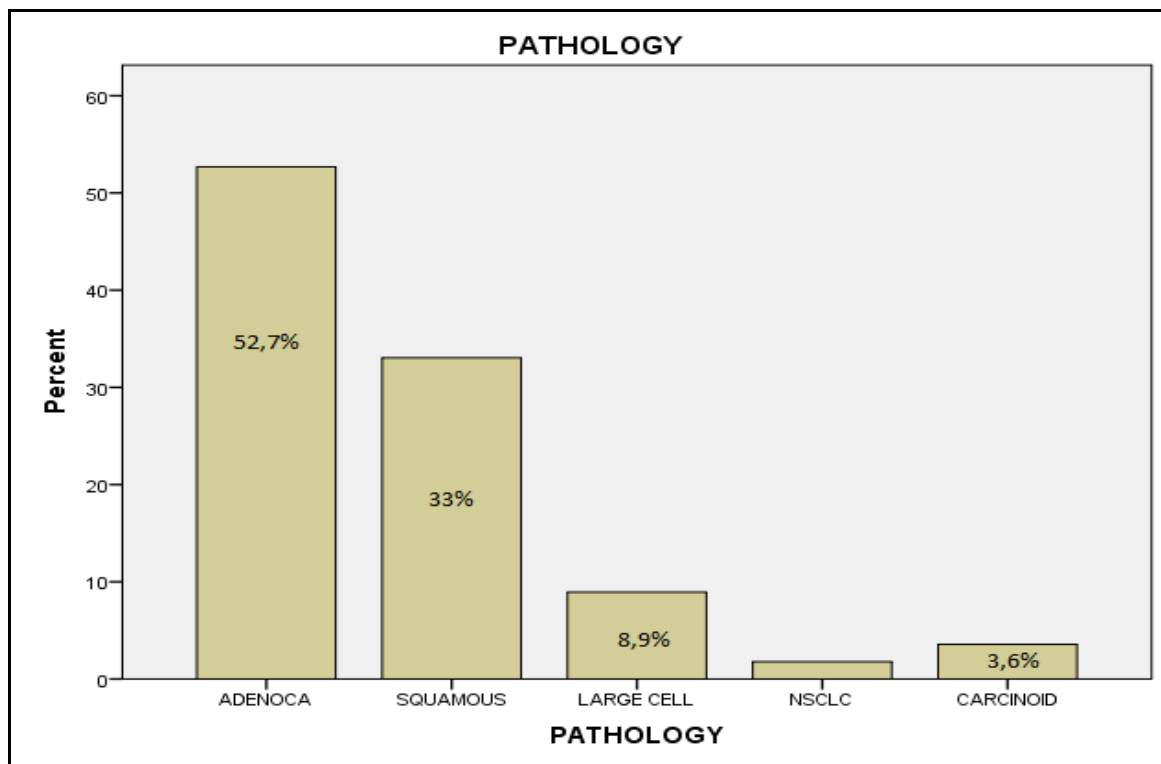
Πίνακας 21: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με τη σωματική τους κατάσταση (Performance Status-PS).



Γράφημα 4: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με τη σωματική τους κατάσταση (Performance Status-PS).

PATHOLOGY					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	ADENOCA	59	52,7	52,7	52,7
	SQUAMOUS	37	33,0	33,0	85,7
	LARGE CELL	10	8,9	8,9	94,6
	NSCLC	2	1,8	1,8	96,4
	CARCINOID	4	3,6	3,6	100,0
	Total	112	100,0	100,0	

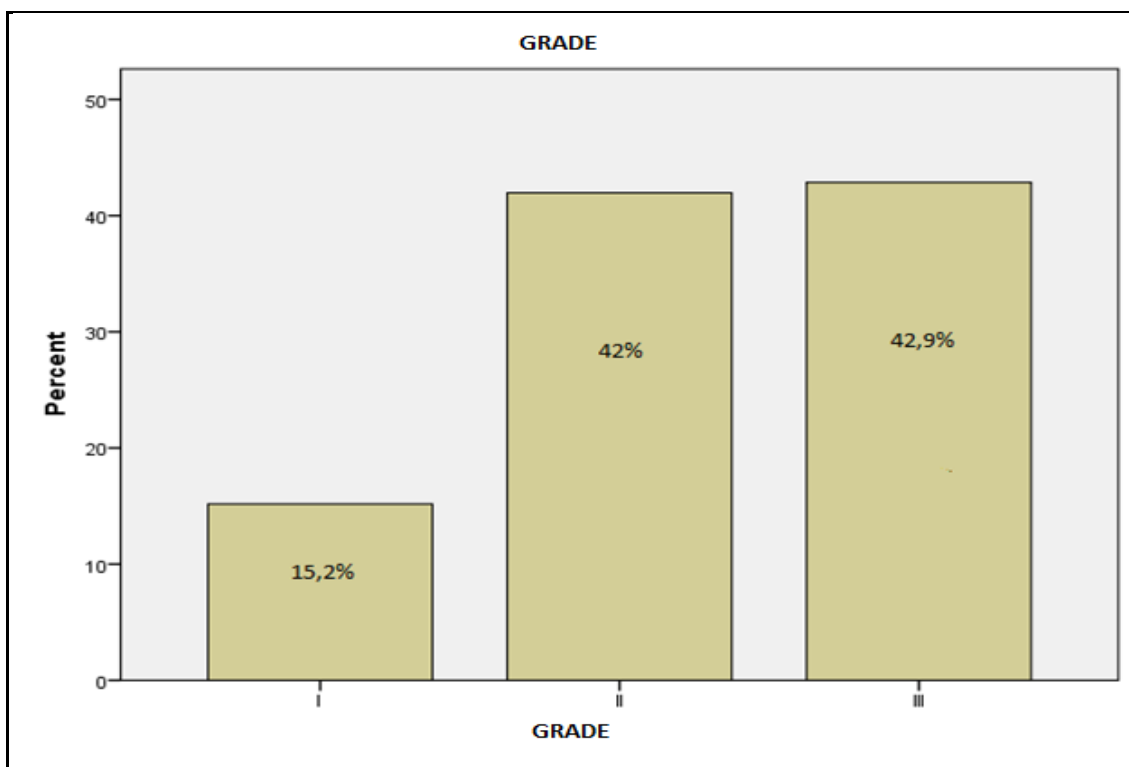
Πίνακας 22: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με τον ιστολογικό τύπο του NSCLC (PATHOLOGY).



Γράφημα 5: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με τον ιστολογικό τύπο του NSCLC (PATHOLOGY).

GRADE					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	I	17	15,2	15,2	15,2
	II	47	42,0	42,0	57,1
	III	48	42,9	42,9	100,0
	Total	112	100,0	100,0	

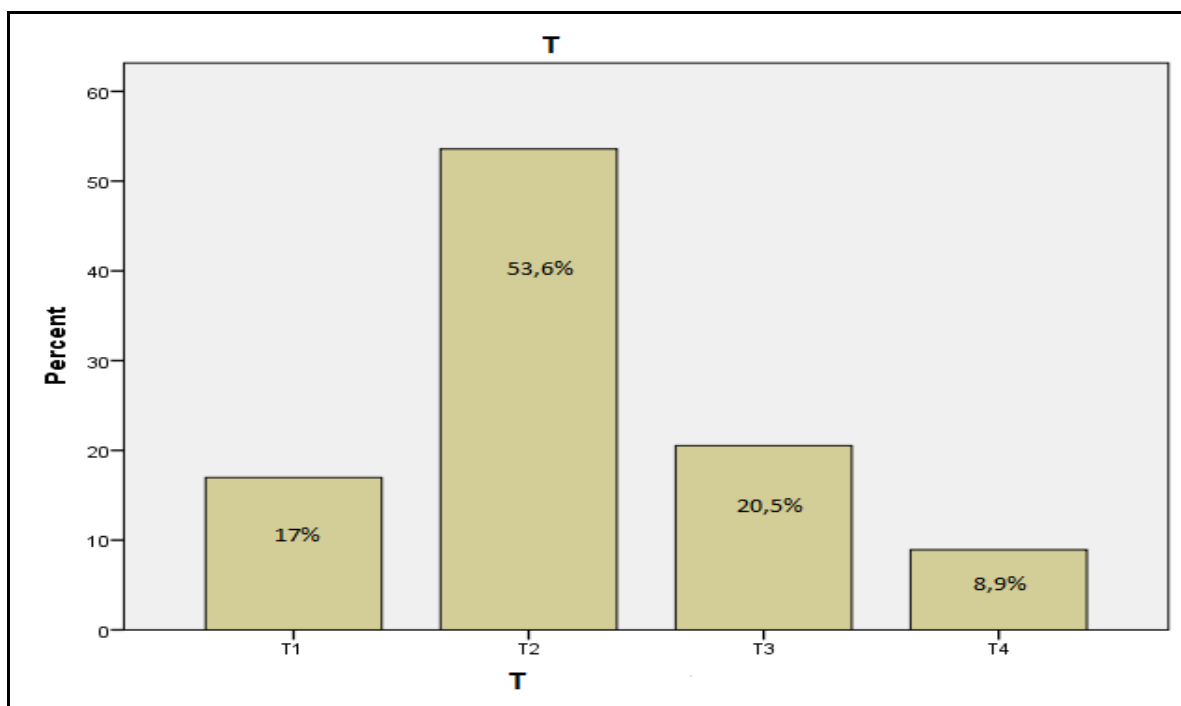
Πίνακας 23: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με το βαθμό διαφοροποίησης του NSCLC (GRADE).



Γράφημα 6: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με το βαθμό διαφοροποίησης του NSCLC (GRADE).

T					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	T1	19	17,0	17,0	17,0
	T2	60	53,6	53,6	70,5
	T3	23	20,5	20,5	91,1
	T4	10	8,9	8,9	100,0
	Total	112	100,0	100,0	

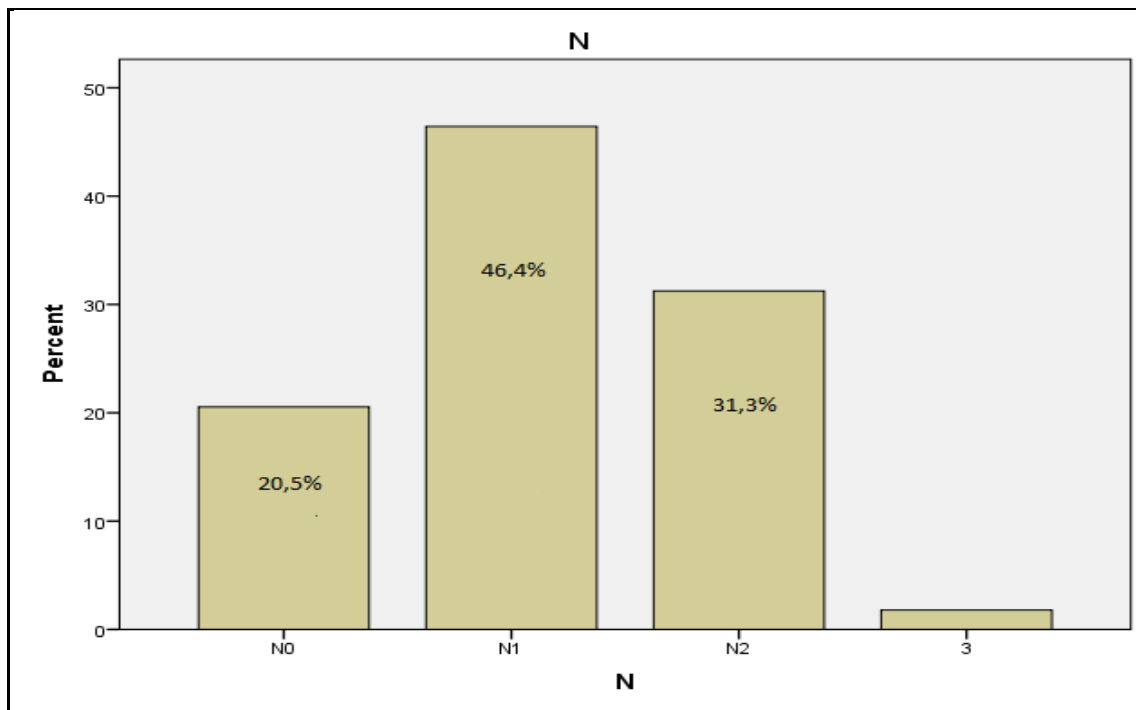
Πίνακας 24: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου (T).



Γράφημα 7: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου (T).

N					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	N0	23	20,5	20,5	20,5
	N1	52	46,4	46,4	67,0
	N2	35	31,3	31,3	98,2
	3	2	1,8	1,8	100,0
	Total	112	100,0	100,0	

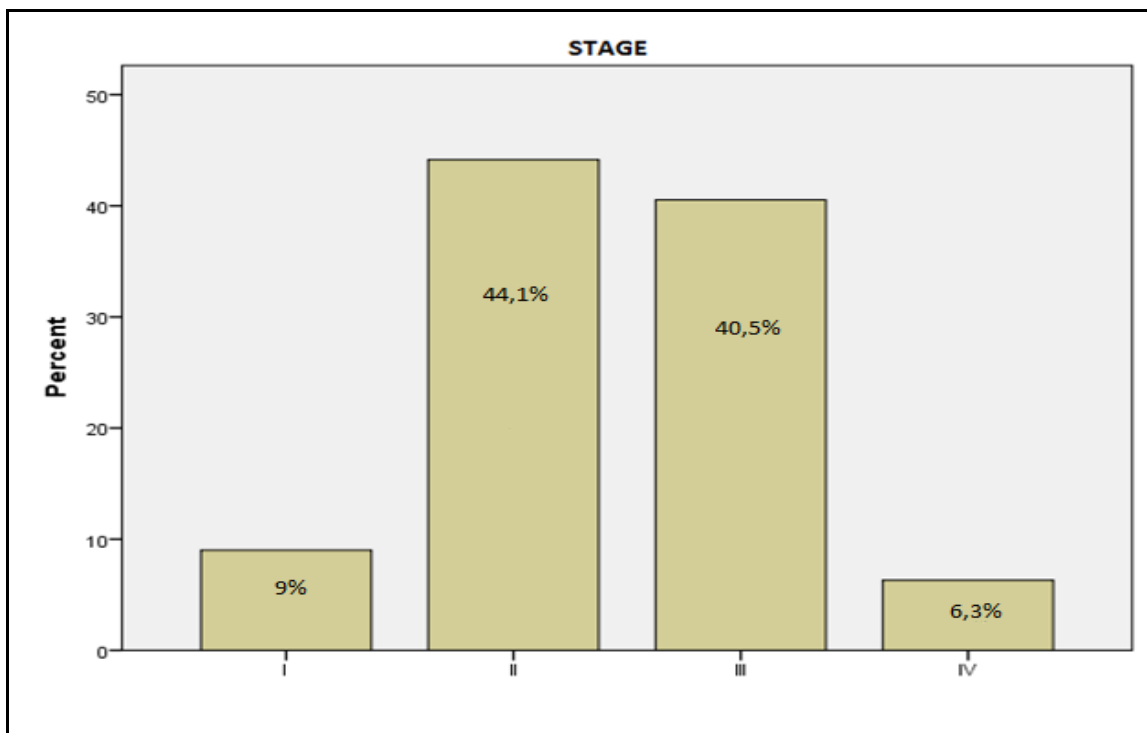
Πίνακας 25: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με την ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων (N).



Γράφημα 8: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με την ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων (N).

STAGE					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	I	10	8,9	9,0	9,0
	II	49	43,8	44,1	53,2
	III	45	40,2	40,5	93,7
	IV	7	6,3	6,3	100,0
	Total	111	99,1	100,0	
Missing	System	1	,9		
Total		112	100,0		

Πίνακας 26: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με το στάδιο της νόσου (STAGE).

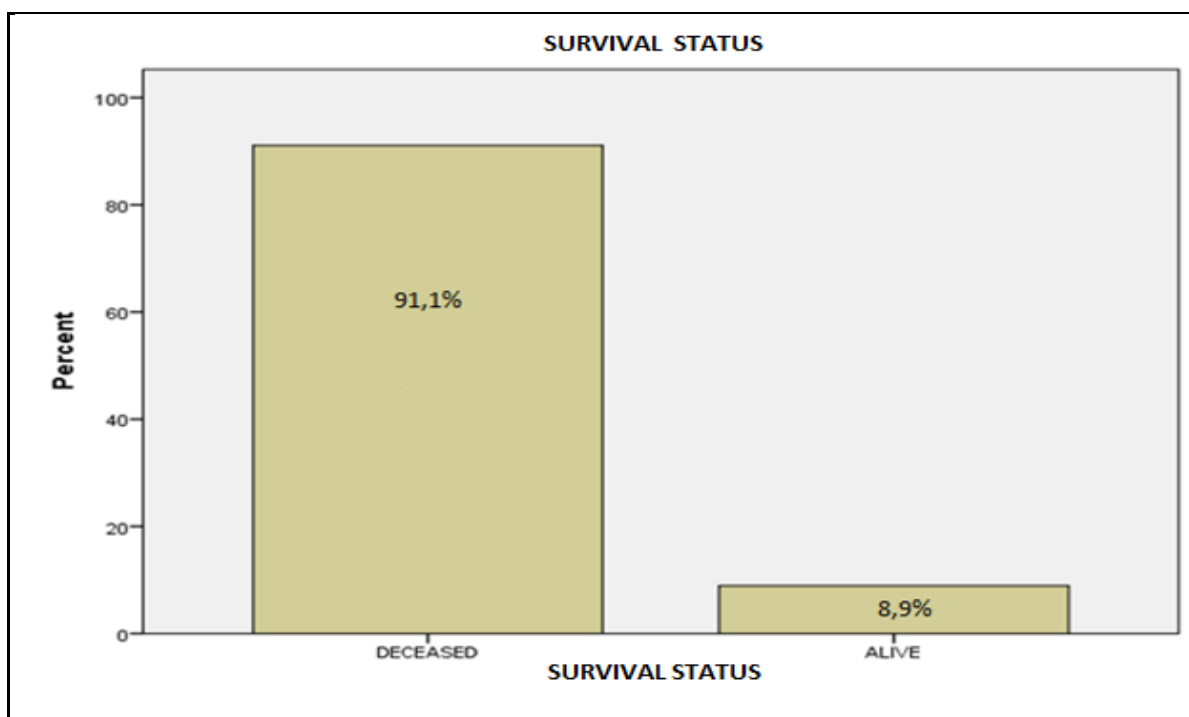


Γράφημα 9: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με το στάδιο της νόσου (STAGE).

Η μετεγχειρητική παρακολούθηση των ασθενών έγινε με γνώμονα τον καθορισμό του συνολικού χρόνου επιβίωσης και η μέση διάρκεια της ήταν περίπου 3 έτη. Η τελευταία καταγραφή δεδομένων έγινε τον Ιανουάριο του 2012. Η μέση συνολική επιβίωση των ασθενών ήταν 27,5 μήνες περίπου 2,3 έτη με διάμεση τιμή 17,5 μήνες (mean OS 27,46 months, median OS 17,53 months, SD 26,53 and range 2,93 - 141,5). Παρακάτω φαίνονται τα ποσοστά των ασθενών που ήταν εν ζωή ή που είχαν αποβιώσει την χρονική στιγμή της τελικής στατιστικής επεξεργασίας των δεδομένων (31/1/2012).

SURVIVAL STATUS					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	DECEASED	102	91,1	91,1	91,1
	ALIVE	10	8,9	8,9	100,0
	Total	112	100,0	100,0	

Πίνακας 27: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με το αν είναι εν ζωή (SURVIVAL STATUS).



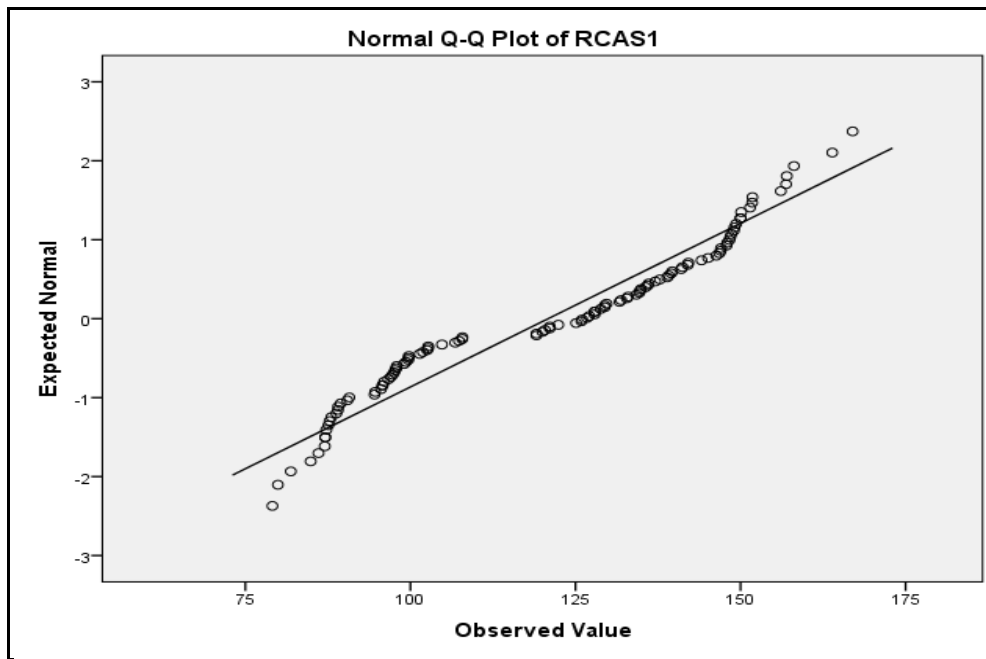
Γράφημα 10: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με το αν είναι εν ζωή (SURVIVAL STATUS).

Στο παρακάτω πίνακα φαίνονται τα δεδομένα περιγραφικής στατιστικής για τις μετρήσεις των RCAS1 και Ki-67. Αναλυτικότερα, για το μόριο RCAS1 αξιολογήθηκαν συνολικά 112 έγκυρες (valid) μετρήσεις από τις οποίες η μέγιστη τιμή ήταν 166,98 (MAX RCAS1) και η ελάχιστη τιμή ήταν 79,09 (MIN RCAS1). Επίσης, η μέση τιμή ήταν 120,864 (MEAN RCAS1), η διάμεση τιμή 126,380 (MEDIAN RCAS1) και η τυπική απόκλιση ήταν 24,132 (SD RCAS1). Επιπλέον, για το δείκτη Ki-67 αξιολογήθηκαν συνολικά 112 έγκυρες (valid) μετρήσεις από τις οποίες η μέγιστη τιμή ήταν 29,00 (MAX Ki-67) και η ελάχιστη τιμή ήταν 1,00 (MIN Ki-67). Επίσης, η μέση τιμή ήταν 8,545 (MEAN Ki-67), η διάμεση τιμή 7,00 (MEDIAN Ki-67) και η τυπική απόκλιση ήταν 6,508 (SD Ki-67).

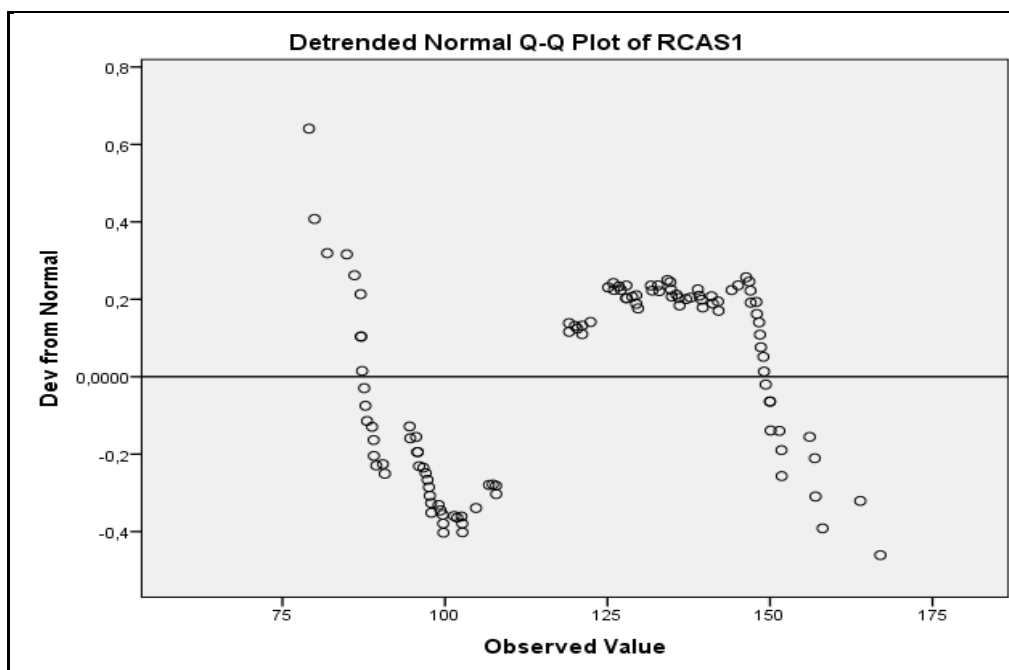
ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΠΕΡΙΓΡΑΦΙΚΗΣ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ			
		RCAS1	Ki-67
N	Valid	112	112
	Missing	0	0
Mean		120,8645	8,5446
Median		126,3800	7,0000
Mode		87,09 ^a	1,00
Std. Deviation		24,13227	6,50833
Variance		582,366	42,358
Minimum		79,09	1,00
Maximum		166,98	29,00
Percentiles	25	97,5650	3,0000
	50	126,3800	7,0000
	75	141,8000	12,7500
a. Multiple modes exist. The smallest value is shown			

Πίνακας 28: Στοιχεία περιγραφικής στατιστικής για τις μετρήσεις των RCAS1 και Ki-67.

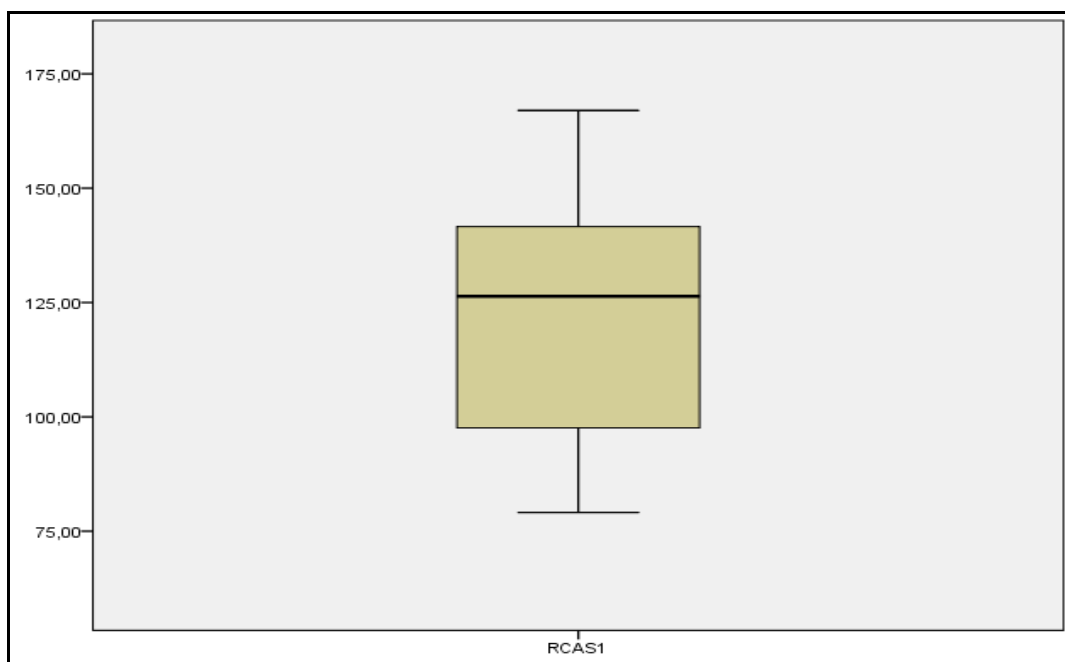
Έγινε έλεγχος κανονικότητας για τις μετρήσεις του μορίου RCAS1 χρησιμοποιώντας το κριτήριο Kolmogorov-Smirnov. Τα αποτελέσματα από την μελέτη αυτή φαίνονται στα ακόλουθα διαγράμματα.



Γράφημα 11: Έλεγχος κανονικότητας για τις τιμές του RCAS1 (κριτήριο Kolmogorov-Smirnov).



Γράφημα 12: Έλεγχος κανονικότητας για τις τιμές του RCAS1 (κριτήριο Kolmogorov-Smirnov).



Γράφημα 13: Έλεγχος κανονικότητας για τις τιμές του RCAS1 (κριτήριο Kolmogorov-Smirnov).

Όπως προαναφέρθηκε η μέτρηση της έκφρασης του RCAS1 με τη χρήση του ειδικού προγράμματος ανάλυσης εικόνας ήταν συνεχής με τιμές από 0 ως και 255. Επειδή, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν φυσιολογικές τιμές έκφρασης του μορίου RCAS1, λαμβάνοντας ως κριτήριο τη διάμεση τιμή ανοσοέκφρασης του RCAS1 στους 112 ασθενείς της παρούσας μελέτης, η οποία ήταν 126,380 (MEDIAN RCAS1=126,380), διακρίναμε τους ασθενείς σε δύο ομάδες (groups). Ειδικότερα, η ομάδα ασθενών με υπερέκφραση του RCAS1 (RCAS1 high) είχε τιμές $RCAS1 < 126,380$ ενώ η άλλη ομάδα με τη υποέκφραση του RCAS1 (RCAS1 low) είχε τιμές $RCAS1 > 126,380$. Σημειωτέον, ότι η διάμεση τιμή ανοσοέκφρασης του RCAS1 ήταν παραπλήσια με την μέση τιμή ανοσοέκφρασης του RCAS1 στους μάρτυρες (10 δείγματα από φυσιολογικό αναπνευστικό επιθήλιο) όπου η μέση τιμή του RCAS1 ήταν 131,435.

Αναφορικά λοιπόν με την έκφραση του RCAS1 56 ασθενείς (56/112, 50%) βρέθηκαν να εμφανίζουν υπερέκφραση του μορίου ενώ οι υπόλοιποι 56 ασθενείς (56/112, 50%) δεν εξέφρασαν το RCAS1 σε υψηλά επίπεδα. Τα στοιχεία αυτά καθώς και οι συσχετίσεις του RCAS1 με τα διάφορα δημογραφικά, κλινικά και ιστοπαθολογικά δεδομένα των ασθενών φαίνονται παρακάτω.

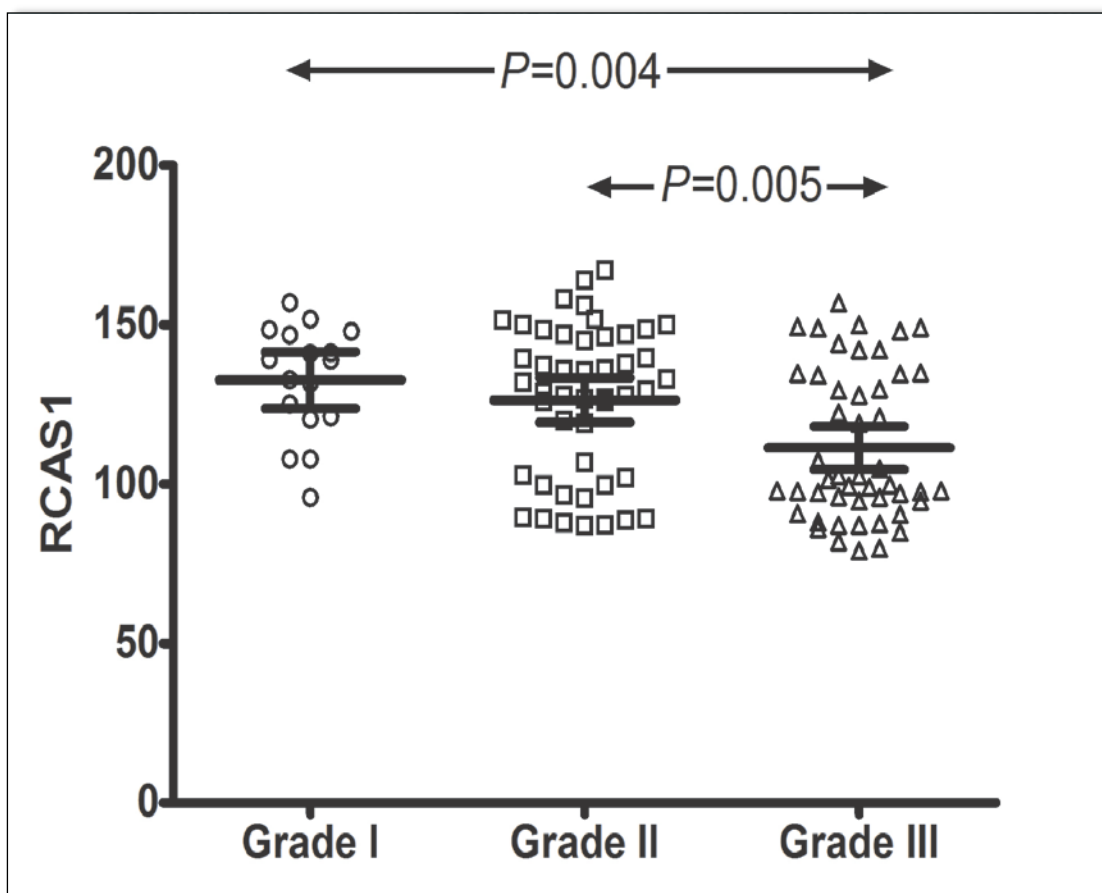
ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΤΟΥ RCAS1 ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ (Α)			
	RCAS1 high	RCAS1 low	P value
Ηλικία			p=1.0 (NS)
< 64 years	29	28	
> 64 years	27	28	
Φύλο			p=0.616 (NS)
Άνδρες	48	45	
Γυναίκες	8	11	
Κάπνισμα			p=1.0 (NS)
Ναι	51	51	
Όχι	5	5	
Αλκοόλ			p=0.567 (NS)
Ναι	30	34	
Όχι	26	22	
PS			p=0.704 (NS)
0	14	18	
1	33	30	
2	9	8	
Ιστολογικός τύπος			p=0.227 (NS)
Adenocarcinoma	30	29	
Squamous	18	19	
Large cell	7	3	
Άλλοι τύποι	1	5	
Grade			p=0.009
I	6	11	
II	18	29	
III	32	16	

Πίνακας 29: Συσχετίσεις του RCAS1 με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών (χρήση στατιστικής μεθόδου χ^2 διότι οι μετρήσεις του RCAS1 ομαδοποιήθηκαν ως high και low).

ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΤΟΥ RCAS1 ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ (B)			
	RCAS1 high	RCAS1 low	P value
Lymphovascular invasion			p=0.057
Ναι	19	9	
Όχι	37	47	
Φλεγμονή			p=0.818 (NS)
Ναι	13	11	
Όχι	43	45	
Νέκρωση			p=0.337 (NS)
Ναι	36	30	
Όχι	20	26	
Ίνωση			p=1.0 (NS)
Ναι	9	9	
Όχι	47	47	
T (Μέγεθος όγκου)			p=0.9 (NS)
T1	8	11	
T2	31	29	
T3	12	11	
T4	5	5	
N (Λεμφαδένες)			p=0.295 (NS)
N0	9	14	
N1	24	28	
N2	22	13	
N3	1	1	
M (Μεταστάσεις)			p=0.390 (NS)
M0	54	51	
M1a	1	1	
M1b	1	4	
Στάδιο			p=0.092
I	3	8	
II	23	26	
III	28	17	
IV	2	5	

Πίνακας 30: Συσχετίσεις του RCAS1 με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών (χρήση στατιστικής μεθόδου χ^2 διότι οι μετρήσεις του RCAS1 ομαδοποιήθηκαν ως high και low).

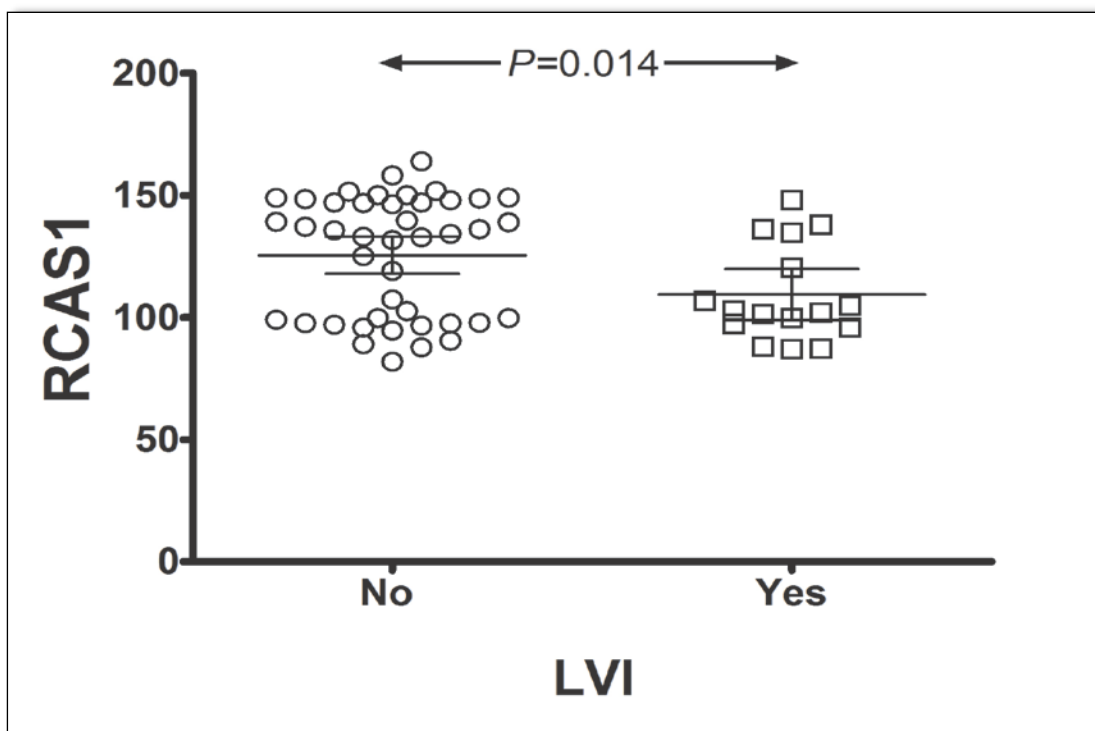
Η ανάλυση των παραπάνω δεδομένων και αποτελεσμάτων έγινε αρχικά για όλα τα περιστατικά και στη συνέχεια ξεχωριστά για τις δύο μεγάλες κατηγορίες ιστολογικών τύπων NSCLC (αδενοκαρκίνωμα και πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα). Όπως βλέπουμε από τους παραπάνω πίνακες, διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ αυξημένης έκφρασης του μορίου RCAS1 και των χαμηλής διαφοροποίησης νεοπλασμάτων grade III ($p = 0.004$). Ακολουθεί το scatter plot στο οποίο φαίνεται αυτή η συσχέτιση μεταξύ υπερέκφρασης του RCAS1 και των χαμηλής διαφοροποίησης όγκων grade III.



Γράφημα 14: Σε χαμηλής διαφοροποίησης όγκους Grade III παρατηρείται αυξημένη έκφραση του RCAS1. Σημειώνεται ότι για το RCAS1 έχουμε συνεχή ποσοτική μέτρηση των τιμών έκφρασης του (από 0 ως 256) αλλά όσο αυξάνονται οι τιμές αυτό σημαίνει ότι μειώνεται η έκφραση του μορίου. Έτσι στο Grade III έχουμε χαμηλότερες τιμές RCAS1 (mean $\pm$ SD: 111,3 $\pm$ 23,4) έναντι του Grade I (132,6 $\pm$ 17,3, $p = 0.004$) και του Grade II (126,3 $\pm$ 23,7, $p = 0.005$). Οι γραμμές στο σχήμα παριστούν τη μέση τιμή και τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (χρήση στατιστικής μεθόδου t-test διότι οι μετρήσεις του RCAS1 είναι στις απόλυτες τιμές τους).

Το διάγραμμα αυτό λέγεται scatter plot και είναι δύο άξονες, που ο καθένας αντιπροσωπεύει μία μεταβλητή. Τα σημεία στο διάγραμμα έχουν συντεταγμένες (x, y) όπου x η τιμή της μεταβλητής στον άξονα x και y η τιμή της μεταβλητής στον άξονα y . Έτσι το διάγραμμα μας δείχνει πως μεταβάλλονται οι τιμές της μίας μεταβλητής σε σχέση με τις τιμές της άλλης.

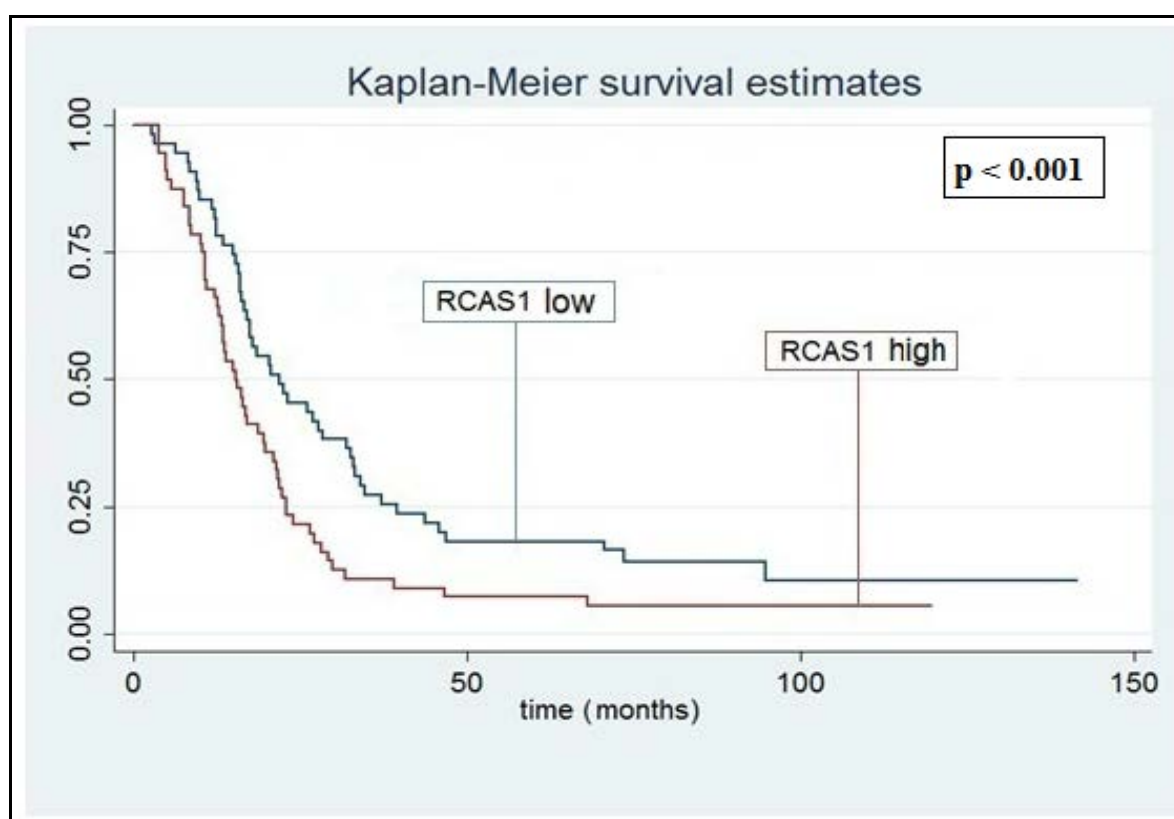
Επιπλέον, βρέθηκε μια τάση υπερέκφρασης του RCAS1 σε προχωρημένα και μεταστατικά στάδια νόσου ($p=0.092$) και σε νεοπλάσματα με ιστολογικά ευρήματα λεμφαγγειακής διήθησης ($p=0.057$). Ειδικότερα στην υποκατηγορία των αδενοκαρκινωμάτων η συσχέτιση μεταξύ αυξημένης έκφρασης του RCAS1 και ύπαρξης λεμφαγγειακής διήθησης (LVI) ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0.014$). Ακολουθεί το scatter plot στο οποίο φαίνεται αυτή η συσχέτιση μεταξύ της υπερέκφρασης του RCAS1 και της ύπαρξης λεμφαγγειακής διήθησης (LVI) στα αδενοκαρκινώματα.



Γράφημα 15: Η αυξημένη έκφραση του RCAS1 σχετίζεται με την ύπαρξη λεμφαγγειακής διήθησης (LVI) στα αδενοκαρκινώματα. Σημειώνεται ότι για το RCAS1 έχουμε συνεχή ποσοτική μέτρηση των τιμών έκφρασης του (από 0 ως 256) αλλά όσο αυξάνονται οι τιμές αυτό σημαίνει ότι μειώνεται η έκφραση του μορίων π.χ. σύγκριση δυο τιμών 120 και 160 για το RCAS1 σημαίνει ότι η πρώτη τιμή το 120 δείχνει μεγαλύτερη έκφραση του μορίου σε σχέση με τη δεύτερη το 160. Έτσι σε όγκους με λεμφαγγειακή διήθηση έχουμε χαμηλότερες τιμές RCAS1 άρα μεγαλύτερη έκφραση του (mean $\pm$ SD: $109,3 \pm 19,7$ vs $125,4 \pm 25,6$, $p = 0.014$). Οι γραμμές στο σχήμα παριστούν τη μέση τιμή και τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (χρήση στατιστικής μεθόδου t-test διότι οι μετρήσεις του RCAS1 είναι στις απόλυτες τιμές τους).

Από την άλλη μεριά, με βάση τα ευρήματά μας για το μόριο RCAS1 που φαίνονται στους πίνακες 29 και 30, η έκφραση του RCAS1 δεν συσχετίζεται με την ηλικία και το φύλο των ασθενών, το κάπνισμα, τη χρήση αλκοόλ, τη σωματική κατάσταση, τον ιστολογικό τύπο, την ύπαρξη φλεγμονής, νέκρωσης ή ίνωσης στο ιστολογικό παρασκεύασμα του όγκου, το μέγεθος του όγκου και τέλος την ύπαρξη λεμφαδενικών ή και απομακρυσμένων μεταστάσεων.

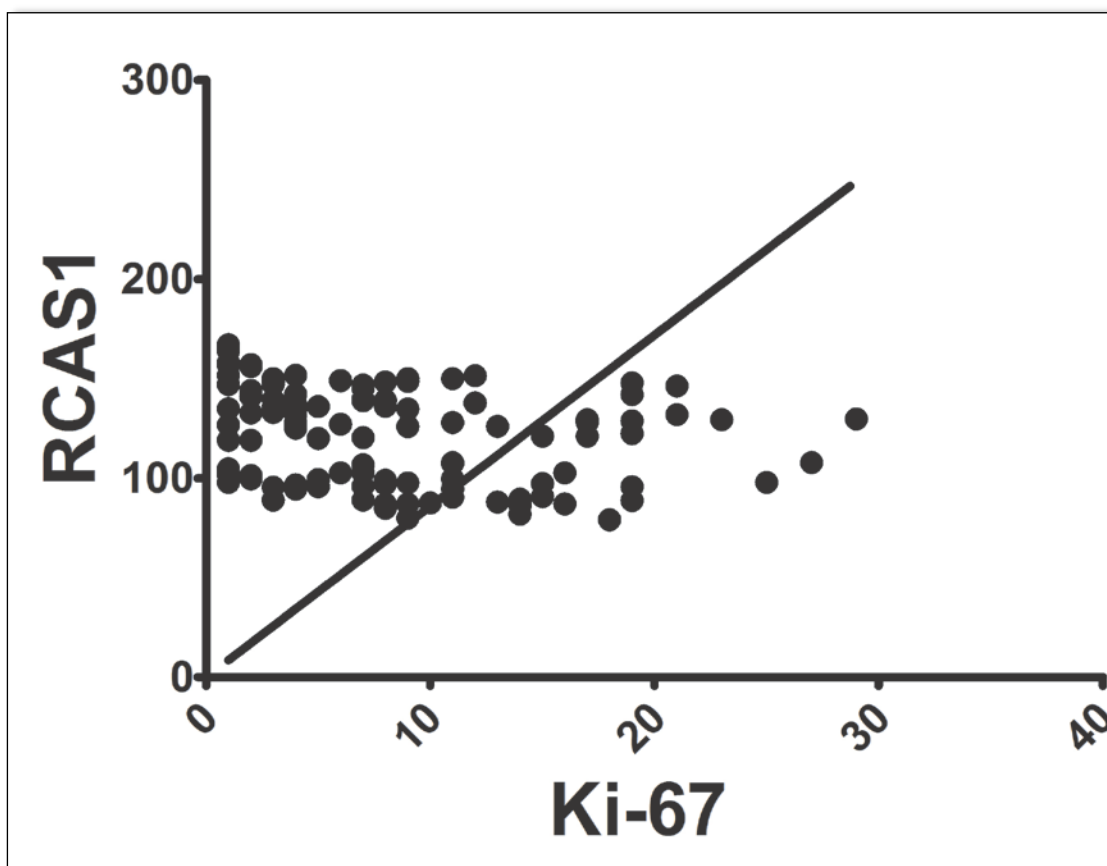
Αξιοσημείωτα ήταν και τα ευρήματα κατά την ανάλυση επιβίωσης όπου βρέθηκε ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση του RCAS1 και της συνολικής επιβίωσης των ασθενών (HR= 0.985, $p < 0.001$, 95% CI 0.977-0.994) τόσο στα μονοπαραγοντικά μοντέλα ανάλυσης όσο και στην πολυπαραγοντική ανάλυση.



Γράφημα 16: Διάγραμμα Kaplan-Meier για ανάλυση επιβίωσης των ασθενών ανάλογα αν οι ασθενείς έχουν αυξημένη έκφραση RCAS1 (RCAS1 high, τιμές < της διάμεσης τιμής) ή μειωμένη έκφραση RCAS1 (RCAS1 low, τιμές > της διάμεσης τιμής). Φαίνεται ότι οι ασθενείς με μειωμένη έκφραση έχουν καλύτερες πιθανότητες επιβίωσης (log-rank test, $p < 0.001$).

Επίσης, από την ανάλυση μας βρέθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ του RCAS1 και του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 ($p = 0.002$). Το p που έχει συμπεριληφθεί στο διάγραμμα είναι υπολογισμένο με τον παραμετρικό συντελεστή συσχέτισης

του Pearson. Ακολουθεί το scatter plot στο οποίο φαίνεται αυτή η συσχέτιση μεταξύ του RCAS1 και του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67.



Γράφημα 17: Στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ του RCAS1 και του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 ($p=0.002$). Σημειώνεται ότι για το RCAS1 έχουμε συνεχή ποσοτική μέτρηση των τιμών έκφρασης του (από 0 ως 256) αλλά όσο αυξάνονται οι τιμές αυτό σημαίνει ότι μειώνεται η έκφραση του μορίου.

Αναφορικά με τα αποτελέσματα για την χρώση του δείκτη Ki-67, λαμβάνοντας τη διάμεση τιμή ανοσοέκφρασης του Ki-67 στους 112 ασθενείς της παρούσας μελέτης, η οποία ήταν 7,000 (MEDIAN Ki-67=7,000), διακρίναμε τους ασθενείς σε δύο ομάδες (groups). Ειδικότερα, η ομάδα ασθενών με υπερέκφραση του Ki-67 (Ki-67 high) είχε τιμές Ki-67 >7,000 ενώ η άλλη ομάδα με τη υποέκφραση του Ki-67 (Ki-67 low) είχε τιμές Ki-67 <7,000. Τελικά 56 ασθενείς (54/112, 48%) βρέθηκαν να εμφανίζουν υψηλή τιμή ενώ οι υπόλοιποι 58 ασθενείς (58/112, 52%) είχαν μικρότερες τιμές Ki-67. Τα στοιχεία αυτά καθώς και οι συσχετίσεις του Ki-67 με τα διάφορα δημογραφικά, κλινικά και ιστοπαθολογικά δεδομένα των ασθενών φαίνονται παρακάτω.

ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΤΟΥ Ki-67 ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ (Α)			
	Ki-67 high	Ki-67 low	P value
Ηλικία			p=0.13 (NS)
< 64 χρόνια	23	34	
> 64 χρόνια	31	24	
Φύλο			p=0.321 (NS)
Άνδρες	47	46	
Γυναίκες	7	12	
Κάπνισμα			p=0.324 (NS)
Ναι	51	51	
Όχι	3	7	
Αλκοόλ			p=0.705 (NS)
Ναι	32	32	
Όχι	22	26	
PS			p=0.589 (NS)
0	13	19	
1	32	31	
2	9	8	
Ιστολογικός τύπος			p=0.073
Adenocarcinoma	25	34	
Squamous	22	15	
Large cell	5	5	
Άλλοι τύποι	2	4	
Grade			p=0.157 (NS)
I	6	11	
II	20	27	
III	28	20	

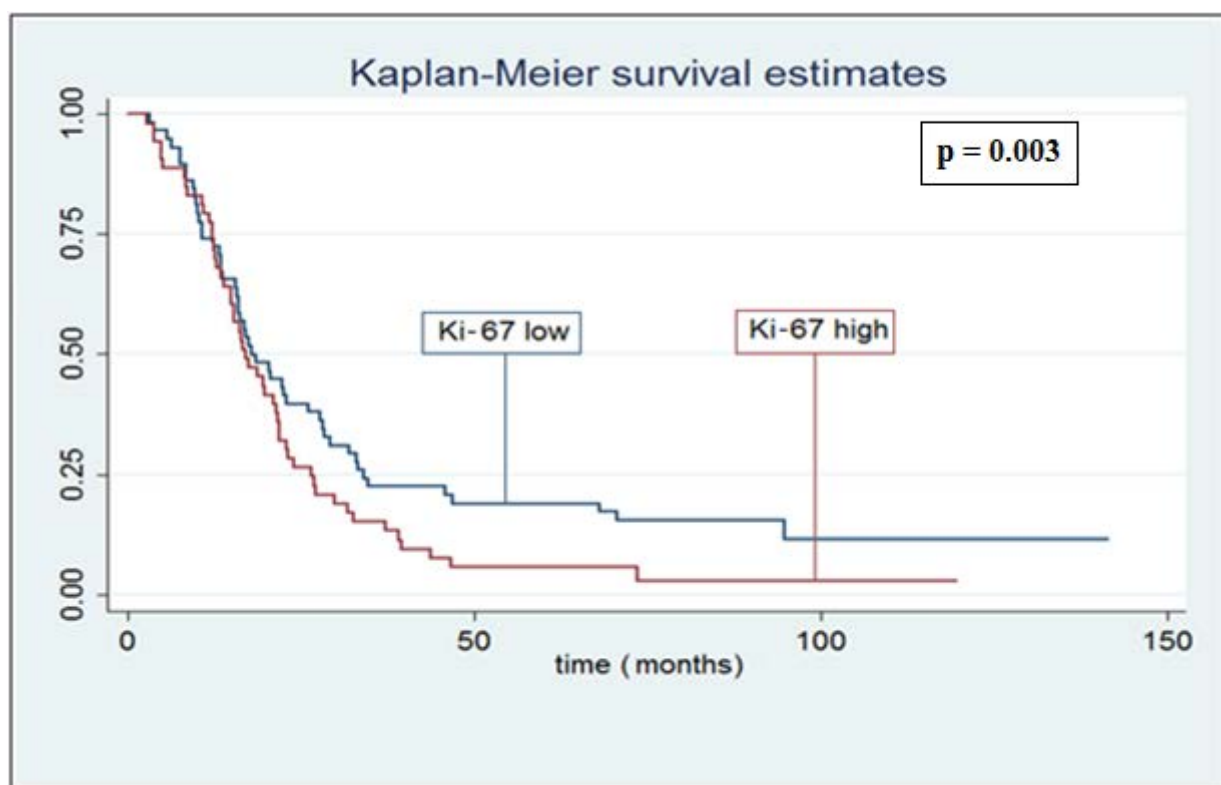
Πίνακας 31: Συσχετίσεις του Ki-67 με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών (χρήση στατιστικής μεθόδου χ^2 διότι οι μετρήσεις του δείκτη Ki-67 ομαδοποιήθηκαν ως high και low).

ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΤΟΥ Ki-67 ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ (B)			
	Ki-67 high	Ki-67 low	P value
Lymphovascular invasion			p=0.522 (NS)
Ναι	15	13	
Όχι	39	45	
Φλεγμονή			p=0.822 (NS)
Ναι	11	13	
Όχι	43	45	
Νέκρωση			p=0.703 (NS)
Ναι	33	33	
Όχι	21	25	
Ίνωση			p=0.609 (NS)
Ναι	10	8	
Όχι	44	50	
T (Μέγεθος όγκου)			p=0.086
T1	5	14	
T2	35	25	
T3	10	13	
T4	4	6	
N (Λεμφαδένες)			p=0.789 (NS)
N0	9	14	
N1	27	25	
N2	17	18	
N3	1	1	
M (Μεταστάσεις)			p=0.931 (NS)
M0	51	54	
M1a	1	1	
M1b	2	3	
Στάδιο			p=0.499 (NS)
I	3	7	
II	27	22	
III	21	24	
IV	3	4	

Πίνακας 32: Συσχετίσεις του Ki-67 με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών (χρήση στατιστικής μεθόδου χ^2 διότι οι μετρήσεις του δείκτη Ki-67 ομαδοποιήθηκαν ως high και low).

Όπως βλέπουμε από τους παραπάνω πίνακες, διαπιστώθηκε μια τάση υπερέκφρασης του δείκτη Ki-67 σε όγκους με μεγαλύτερο μέγεθος T ($p=0.086$) και σε κάποιους ιστολογικούς τύπους NSCLC και συγκεκριμένα στα αδenoκαρκινώματα ($p=0.073$).

Επιπλέον, κατά την ανάλυση επιβίωσης βρέθηκε ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση του δείκτη Ki-67 και της συνολικής επιβίωσης των ασθενών ($HR=1.046$, $p=0.003$, 95% CI 1.016-1.078) τόσο στα μονοπαραγοντικά μοντέλα ανάλυσης όσο και στην πολυπαραγοντική ανάλυση.



Γράφημα 18: Διάγραμμα Kaplan-Meier για ανάλυση επιβίωσης των ασθενών ανάλογα αν οι ασθενείς έχουν αυξημένη τιμή Ki-67 (Ki-67 high, τιμές > της διάμεσης τιμής) ή μειωμένη τιμή Ki-67 (Ki-67 low, τιμές < της διάμεσης τιμής). Φαίνεται ότι οι ασθενείς με μειωμένη τιμή Ki-67 έχουν καλύτερες πιθανότητες επιβίωσης (log-rank test, $p=0.003$).

Από την άλλη μεριά, με βάση τα ευρήματά μας για το δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 που φαίνονται στους πίνακες 31 και 32, η έκφραση του Ki-67 δεν συσχετίζεται με την ηλικία και το φύλο των ασθενών, το κάπνισμα, τη χρήση αλκοόλ, τη σωματική κατάσταση, το grade, την ύπαρξη λεμφαγγειακής διήθησης, φλεγμονής, νέκρωσης ή ίνωσης στο ιστολογικό παρασκεύασμα του όγκου, την ύπαρξη λεμφαδενικών ή και απομακρυσμένων μεταστάσεων και τέλος το στάδιο της νόσου.

Αναφορικά με τα αποτελέσματα για την χρώση του CD3, λάβαμε υπόψιν το ποσοστό των CD3(+) T-λεμφοκυττάρων εντός του όγκου. Αν αυτό ήταν >10% τότε οι ασθενείς χαρακτηρίστηκαν ως CD3 high ενώ οι υπόλοιποι ως CD3 low. Ειδικότερα, 35 ασθενείς (35/112, 31%) βρέθηκαν με υψηλή τιμή CD3 high ενώ οι υπόλοιποι 77 (77/112, 69%) είχαν μικρότερες τιμές CD3 low. Τα στοιχεία αυτά καθώς και οι συσχετίσεις του CD3 με τα διάφορα δημογραφικά, κλινικά και ιστοπαθολογικά δεδομένα των ασθενών φαίνονται παρακάτω.

ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΤΟΥ CD3 ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ (Α)			
	CD3 high	CD3 low	P value
Ηλικία			p=0.686 (NS)
< 64 χρόνια	19	38	
> 64 χρόνια	16	39	
Φύλο			p=0.110 (NS)
Άνδρες	26	67	
Γυναίκες	9	10	
Κάπνισμα			p=1.0 (NS)
Ναι	32	70	
Όχι	3	7	
Αλκοόλ			p=0.537 (NS)
Ναι	22	42	
Όχι	13	35	
PS			p=0.064
0	11	21	
1	15	48	
2	9	8	
Ιστολογικός τύπος			p=0.272 (NS)
Adenocarcinoma	18	41	
Squamous	10	27	
Large cell	4	6	
Άλλοι τύποι	3	3	
Grade			
I	7	10	p=0.239 (NS)
II	17	30	
III	11	37	

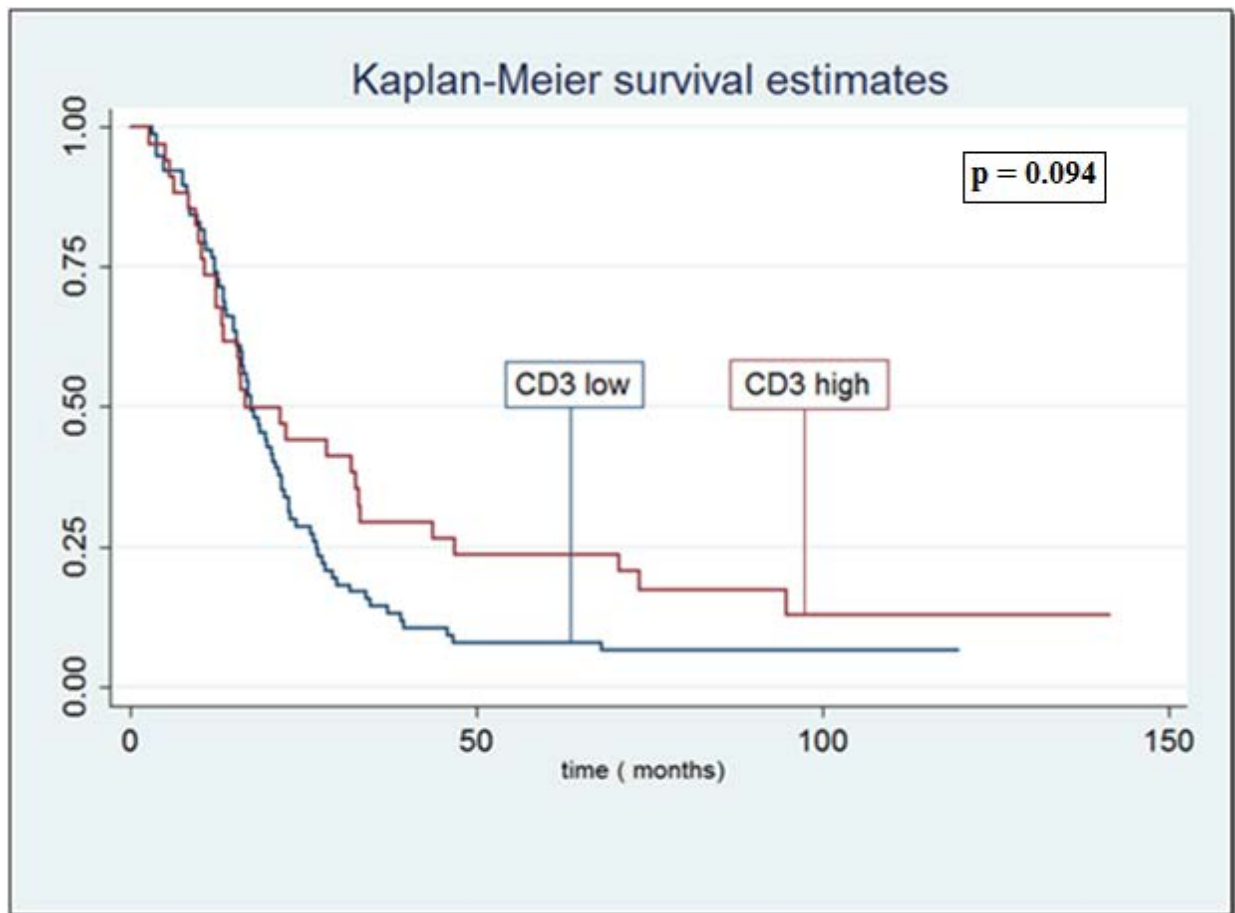
Πίνακας 33: Συσχετίσεις του CD3 με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών (χρήση στατιστικής μεθόδου χ^2 διότι οι μετρήσεις του CD3 ομαδοποιήθηκαν ως high και low).

ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΤΟΥ CD3 ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ (B)			
	CD3 high	CD3 low	P value
Lymphovascular invasion			p=0.243 (NS)
Ναι	6	22	
Όχι	29	55	
Φλεγμονή			p=0.027
Ναι	3	21	
Όχι	32	56	
Νέκρωση			p=0.151 (NS)
Ναι	17	49	
Όχι	18	28	
Ίνωση			p=0.175 (NS)
Ναι	3	15	
Όχι	32	62	
T (Μέγεθος όγκου)			p=0.101 (NS)
T1	8	11	
T2	19	41	
T3	3	20	
T4	5	5	
N (Λεμφαδένες)			p=0.717 (NS)
N0	7	16	
N1	14	38	
N2	13	22	
N3	1	1	
M (Μεταστάσεις)			p=0.580 (NS)
M0	33	72	
M1a	0	2	
M1b	2	3	
Στάδιο			p=0.537 (NS)
I	5	5	
II	13	36	
III	14	31	
IV	2	5	

Πίνακας 34: Συσχετίσεις του CD3 με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών (χρήση στατιστικής μεθόδου χ^2 διότι οι μετρήσεις του CD3 ομαδοποιήθηκαν ως high και low).

Όπως βλέπουμε λοιπόν από τους παραπάνω πίνακες, διαπιστώθηκε μια τάση ύπαρξης αυξημένου ποσοστού CD3(+) T-λεμφοκυττάρων εντός του όγκου σε ασθενείς με ύπαρξη φλεγμονής στο ιστολογικό παρασκεύασμα ($p=0.027$).

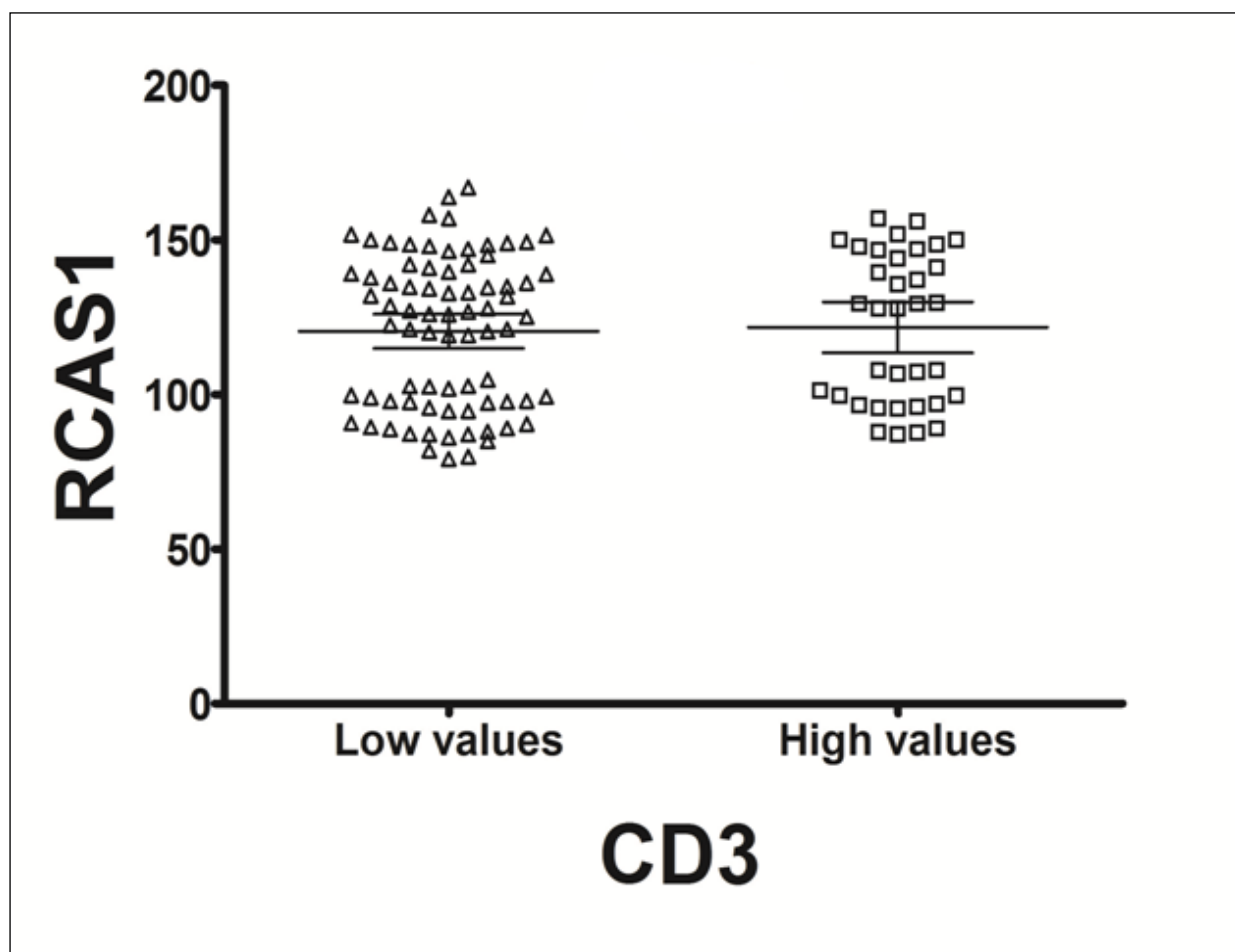
Επιπλέον, κατά την ανάλυση επιβίωσης βρέθηκε ότι υπήρχε θετική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού των CD3(+) T-λεμφοκυττάρων εντός του όγκου και της συνολικής επιβίωσης των ασθενών ($HR=0.687$, $p=0.094$, 95% CI 0.442-1.069) μόνο στα μονοπαραγοντικά μοντέλα ανάλυσης.



Γράφημα 19: Διάγραμμα Kaplan-Meier για ανάλυση επιβίωσης των ασθενών ανάλογα με το αν οι ασθενείς έχουν αυξημένο ποσοστό των CD3(+) T-λεμφοκυττάρων εντός του όγκου (CD3 high, τιμές >10%) ή μειωμένη έκφραση CD3 (CD3 low, τιμές < 10%). Φαίνεται ότι οι ασθενείς με αυξημένη έκφραση έχουν καλύτερες πιθανότητες επιβίωσης (log-rank test, $p=0.094$).

Αυτή όμως η συσχέτιση δεν διατηρήθηκε στην πολυπαραγοντική ανάλυση. Ειδικότερα, η μεταβλητή CD3 κατά την πολυπαραγοντική ανάλυση επιβίωσης, δεν έμεινε στο τελικό μοντέλο (αντίθετα με το RCAS1 και το Ki-67). Αυτό το στατιστικό δεδομένο μας δείχνει ότι η συσχέτιση του CD3 με την ολική επιβίωση των ασθενών, τελικά μάλλον οφείλεται κυρίως στην

αλληλεπίδραση της μεταβλητής CD3 με το RCAS1, δηλαδή στην αλληλεπίδραση του ποσοστού των CD3(+) T-λεμφοκυττάρων εντός του όγκου με το RCAS1. Συσχετίζοντας λοιπόν την έκφραση του RCAS1 με αυτή του CD3 βρέθηκε ότι υπάρχει έντονη αρνητική συσχέτιση μεταξύ τους ($p < 0.001$). Επιπλέον, βρέθηκε ότι και το Ki-67 έχει μια μία έντονη αρνητική συσχέτιση με το CD3 ($p < 0.001$). Ακολουθεί το scatter plot στο οποίο φαίνεται αυτή η συσχέτιση μεταξύ του RCAS1 και του CD3.



Γράφημα 20: Σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ του RCAS1 και του CD3 ($p=0.002$). Σημειώνεται ότι για το RCAS1 έχουμε συνεχή ποσοτική μέτρηση των τιμών έκφρασης του (από 0 ως 256) αλλά όσο αυξάνονται οι τιμές αυτό σημαίνει ότι μειώνεται η έκφραση του μορίου ενώ για το CD3 λάβαμε υπόψην το ποσοστό των CD3(+) T-λεμφοκυττάρων εντός του όγκου.

Επίσης, με βάση τα ευρήματά μας για το δείκτη CD3 που φαίνονται στους πίνακες 33 και 34, η έκφραση του CD3 δεν συσχετίζεται με την ηλικία και το φύλο των ασθενών, το κάπνισμα, τη χρήση αλκοόλ, τη σωματική κατάσταση, τον ιστολογικό τύπο, το grade, την ύπαρξη λεμφαγγειακής διήθησης, νέκρωσης ή ίνωσης στο ιστολογικό παρασκεύασμα του όγκου, το

μέγεθος του όγκου, την ύπαρξη λεμφαδενικών ή και απομακρυσμένων μεταστάσεων και τέλος το στάδιο της νόσου.

Τέλος, διενεργήσαμε πολυπαραγοντική ανάλυση επιβίωσης με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής. Η πολυπαραγοντική ανάλυση λειτουργεί ως εξής: αρχικά κάνουμε μονοπαραγοντική ανάλυση για όλες τις μεταβλητές σε σχέση με την επιβίωση, ακολούθως παίρνουμε αυτές που παρουσιάζουν $p < 0.1$ και τελικά τις βάζουμε όλες μαζί σε ένα κοινό μοντέλο στατιστικής ανάλυσης. Το στατιστικό πρόγραμμα λαμβάνει υπόψη του τις αλληλεπιδράσεις και τελικά κρατά μόνο τις μεταβλητές που έχουν άμεση επίδραση στην επιβίωση των ασθενών.

Το αποτέλεσμα είναι ότι η πολυπαραγοντική ανάλυση επιβίωσης αναδεικνύει την επίδραση στην επιβίωση μόνο αυτών των μεταβλητών (π.χ. RCAS1) χωρίς να φοβόμαστε ότι αυτή μπορεί να οφείλεται και σε άλλους συγχυτικούς παράγοντες (π.χ. Grade). Συμπερασματικά λοιπόν, με την πολυπαραγοντική ανάλυση ανευρίσκονται οι ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν άμεσα και καθοριστικά την συνολική επιβίωση των ασθενών. Παρακάτω, φαίνονται τα αποτελέσματα της δικής μας πολυπαραγοντικής ανάλυσης επιβίωσης.

ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ				
Variable	HR	p-value	[95% Conf. Interval]	
Necrosis	1.697	0.014	1.113	2.587
PS	1.603	0.017	1.087	2.363
N	1.484	0.075	0.96	2.294
RCAS1	0.992	0.055	0.983	1.00
Ki-67	1.032	0.062	0.998	1.066
Stage	1.936	0.003	1.254	2.989

Πίνακας 35: Ο πίνακας περιέχει τις μεταβλητές που συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση με βάση το Cox proportional hazards model (stepwise approach, entry criterion: $p=0.1$) και τις οποίες χρησιμοποιήσαμε για να κάνουμε την πολυπαραγοντική ανάλυση (multivariate survival analysis) στη μελέτη μας. [Stage: stage of disease (TNM classification), N: lymphnode infiltration (TNM classification), PS: performance status, NEC: necrosis].

Με βάση λοιπόν τα αποτελέσματα της πολυπαραγοντικής ανάλυσης επιβίωσης στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή βρέθηκε ότι το στάδιο της νόσου, η ύπαρξη νεκρώσεων στο ιστολογικό παρασκεύασμα, η σωματική κατάσταση του ασθενούς, η έκφραση του μορίου RCAS1, ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 και η ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες κατά σειρά μειούμενης στατιστικής σημαντικότητας.

Για να κατανοήσουμε το βιολογικό και κατ'επέκταση το κλινικό νόημα των ευρημάτων μας θα πρέπει να γνωρίζουμε τη σημασία των στατιστικών παραμέτρων που υπολογίσαμε βασιζόμενοι στα αποτελέσματά μας. Ειδικότερα, η παράμετρος HR (Hazard Ratio-HR) είναι ο λόγος της πιθανότητας να πεθάνει ένας ασθενής σε μια ομάδα Α (π.χ. 1) προς την πιθανότητα να πεθάνει ένας ασθενής σε μια ομάδα Β (π.χ. 0). Όταν λοιπόν το HR είναι > 1 σημαίνει ότι όσο αυξάνει αριθμητικά η μεταβλητή τόσο αυξάνει η πιθανότητα του θανάτου. Όταν όμως δεν έχουμε ομάδες, δηλαδή ποιοτικές μεταβλητές, αλλά οι μεταβλητές μας είναι ποσοτικές τότε το HR είναι ο λόγος της πιθανότητας να πεθάνει ένας ασθενής όταν αυξηθεί κατά μία μονάδα η τιμή της μεταβλητής. Στη περίπτωση μας λοιπόν για κάθε 1 μονάδα που αυξάνεται η μετρούμενη τιμή του RCAS1 (άρα ουσιαστικά μειώνεται η πραγματική έκφραση του) μειώνεται κατά 0,8% η πιθανότητα να πεθάνει ο ασθενής (για $HR=0.992$). Σημειωτέον ότι, έχουμε άλλες τιμές HR στη μονοπαραγοντική ($HR=0.985$) και άλλες στην πολυπαραγοντική ανάλυση ($HR=0.992$) διότι στην πολυπαραγοντική ανάλυση ένα τμήμα της συσχέτισης RCAS1 και επιβίωσης οφείλεται και σε άλλες μεταβλητές.

13. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Υπάρχουν αρκετά δεδομένα στη βιβλιογραφία για την αυξημένη έκφραση του RCAS1 σε διάφορους τύπους νεοπλασμάτων τα οποία συνηγορούν υπέρ μίας πολλαπλής επίδρασης του μορίου αυτού στην βιολογία των όγκων και στη φυσική πορεία των νεοπλασμάτων. Οι επιδράσεις λοιπόν του RCAS1 είναι δυνατόν να αφορούν στη διαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων, στον ρυθμό πολλαπλασιασμού τους, στη διηθητικότητα του όγκου, στην αγγειογένεση και βέβαια στη διαφυγή των καρκινικών κυττάρων από την επιτήρηση του ανοσοποιητικού συστήματος (immunoescape) και την αναδιαμόρφωση-τροποποίηση του μικροπεριβάλλοντος των όγκων [144,151].

Ειδικότερα, σε ασθενείς με NSCLC, η έκφραση του RCAS1 συσχετίστηκε σημαντικά με το μέγεθος του όγκου και το στάδιο της νόσου [137,172]. Επιπλέον, βρέθηκε ότι το RCAS1 εκφράζονταν πιο συχνά σε αδενοκαρκινώματα χαμηλής διαφοροποίησης σε σχέση με τα μετρίως ή καλώς διαφοροποιημένα [137]. Σε αντίθεση με τα παραπάνω, ο Oizumi et al. δεν αναφέρουν καμία σημαντική συσχέτιση της έκφρασης RCAS1 με το μέγεθος του όγκου και το στάδιο της νόσου [182]. Από την άλλη μεριά, ο Iwasaki et al. έδειξαν ότι η έκφραση του RCAS1 ήταν σημαντικά υψηλότερη στα πλακώδη νεοπλάσματα σε σχέση με τα αδενοκαρκινώματα [137], ενώ ο Izumi et al. δεν βρήκαν οποιαδήποτε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του RCAS1 και του ιστοπαθολογικού τύπου [172].

Σε ασθενείς με NSCLC και αυξημένη έκφραση του RCAS1, ο αποπτωτικός δείκτης των TILs ήταν σημαντικά υψηλότερος από ότι στις περιπτώσεις με χαμηλή έκφραση του RCAS1, γεγονός που υποδηλώνει ότι το RCAS1 που εκφράζεται από τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να διεγείρει την απόπτωση των κυττάρων TILs και έτσι να συμβάλλει στην διαφυγή του όγκου από το ανοσοποιητικό σύστημα [137].

Αναφορικά με την προγνωστική αξία της έκφρασης του RCAS1 σε ασθενείς με NSCLC βρέθηκε ότι η υψηλή έκφραση του RCAS1 σχετίζεται με σημαντικά χαμηλότερη συνολική επιβίωση των ασθενών σε αντίθεση με τη χαμηλή έκφραση του RCAS1 [137,172]. Σύμφωνα με την μελέτη του Oizumi et al., η οποία διεξήχθη σε 70 ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα και δεν περιλάμβανε άλλους ιστολογικούς τύπους καρκίνου, η έκφραση της πρωτεΐνης RCAS1 ήταν ένας σημαντικός και ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας [182].

Άλλη μία ανοσοϊστοχημική μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 35 ασθενείς με NSCLC αρχικού σταδίου II, επιβεβαίωσε περαιτέρω την σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης

του RCAS1 και του σταδίου της νόσου, της διαφοροποίησης του όγκου και της φτωχής πρόγνωσης [194]. Ωστόσο, σε μια πιο πρόσφατη μελέτη η οποία αφορούσε ασθενείς με NSCLC σταδίου IB-IIIΑ, δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του RCAS1 και των παραμέτρων επιβίωσης (OS, PFS) [195].

Διαπιστώνουμε λοιπόν ότι τα υπάρχοντα δεδομένα σχετικά με την κλινική σημασία της έκφρασης της πρωτεΐνης RCAS1 στο NSCLC είναι καταρχήν περιορισμένα. Ειδικότερα, πρώτον οι περισσότερες από τις μελέτες αυτές έγιναν σε μικρό σχετικά αριθμό ασθενών συνήθως μικρότερος του 100. Δεύτερον η μελέτη του Oizumi et al. που έδειξε ότι η έκφραση του RCAS1 ήταν ένας σημαντικός και ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας διεξήχθη μόνο σε 70 ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα και δεν περιλάμβανε άλλους ιστολογικούς τύπους NSCLC [182]. Τρίτον και σημαντικότερο κάποιες από τις μελέτες αυτές κατέληξαν σε αντικρουόμενα μεταξύ τους αποτελέσματα [137,172,182,194,195]. Ήταν προφανής λοιπόν η ανάγκη μιας νέας μελέτης η οποία θα προσπαθούσε να διερευνήσει και να επαναξιολογήσει την κλινική σημασία της έκφρασης του RCAS1 σε ένα μεγαλύτερο πληθυσμό ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα.

Αξίζει να αναφερθεί στο σημείο αυτό ότι μέχρι σήμερα δεν έχει γίνει κάποια ανάλογη έρευνα που να μελετά και να μετρά με ποσοτικό τρόπο την ανοσοϊστοχημική έκφραση του RCAS1 σε νεοπλασματικούς ιστούς και ειδικότερα σε ασθενείς με NSCLC. Με τη μέθοδο που εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη (Computerized Image Analysis-CIA) επιτυγχάνεται τελικά καλύτερη και αντικειμενικότερη εκτίμηση της ιστολογικής έκφρασης του συγκεκριμένου μορίου. Κατά συνέπεια και τα αποτελέσματα της είναι αντικειμενικότερα διότι βασίζονται στην ποσοτική μέτρηση της έκφρασης του RCAS1 και όχι απλά και μονό στην ποιοτική εκτίμηση της έκφρασης του εν λόγω μορίου όπως συνήθως γίνεται κατά την αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημείας.

Η κλινική σημασία του RCAS1 στην πρόγνωση αλλά και στην παθολογοανατομική αξιολόγηση της επιθετικότητας του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα ενισχύεται από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Αναλυτικότερα, με βάση τα ευρήματα της παρούσας μελέτης διαπιστώθηκε υπερέκφραση του RCAS1 αφενός στα grade III χαμηλής διαφοροποίησης νεοπλασμάτα του πνεύμονα ανεξάρτητα από τον ιστολογικό τους τύπο ($p = 0.004$) και αφετέρου στα αδενοκαρκινώματα με στοιχεία λεμφαγγειακής διήθησης (LVI) ($p = 0.014$). Αξιόλογο επίσης εύρημα της μελέτης είναι η εύρεση θετικής συσχέτισης μεταξύ της

έκφρασης RCAS1 και του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 ($p=0.002$) όπως επίσης και η ύπαρξη της τάσης υπερέκφρασης του RCAS1 στα προχωρημένα στάδια νόσου ($p=0.092$).

Ωστόσο, τα σημαντικότερα ευρήματα της μελέτης προέκυψαν από την ανάλυση της επιβίωσης των ασθενών. Πρώτον, επιβεβαιώθηκε η γνωστή γενικότερα αρνητική συσχέτιση μεταξύ του Ki-67 και της επιβίωσης ($HR=1.046$, $p=0.003$, 95% CI 1.016-1.078) και δεύτερον και περισσότερο ενδιαφέρον, διαπιστώθηκε η αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του RCAS1 και της ολικής επιβίωσης των ασθενών ($HR=0.985$, $p<0.001$, 95% CI 0.977-0.994). Η στατιστική σημαντικότητα των αποτελεσμάτων αυτών είναι ισχυρή διότι επιβεβαιώθηκε τόσο με μονοπαραγοντικά μοντέλα ανάλυσης όσο και με πολυπαραγοντική ανάλυση.

Επιπλέον, μεταξύ των αποτελεσμάτων της μελέτης υπάρχει συμφωνία και συνέχεια είτε αυτά αναφέρονται στη σχέση του RCAS1 με διαφορά ιστολογικά χαρακτηριστικά των όγκων είτε στη σχέση του RCAS1 με την συνολική επιβίωση των ασθενών. Ειδικότερα, τα αρχικά ευρήματα της συσχέτισης του RCAS1 με τα grade III νεοπλάσματα, με τα αδενοκαρκινώματα με λεμφαγγειακή διήθηση και με το Ki-67, επιβεβαιώνονται από τα αποτελέσματα της ανάλυσης επιβίωσης τα οποία κατέδειξαν την αρνητική προγνωστική αξία της υπερέκφρασης του RCAS1.

Τέλος αναφορικά με τα αποτελέσματα για το δείκτη CD3 στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε μια τάση ύπαρξης αυξημένου ποσοστού CD3(+) T-λεμφοκυττάρων εντός του όγκου σε ασθενείς με ύπαρξη φλεγμονής στο ιστολογικό παρασκεύασμα ($p=0.027$). Αυτό σε γενικές γραμμές ήταν ένα αναμενόμενο αποτέλεσμα, η συσχέτιση δηλαδή της φλεγμονής με το αυξημένο ποσοστό των CD3(+) T-λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, κατά την ανάλυση επιβίωσης βρέθηκε ότι υπήρχε θετική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού των CD3(+) T-λεμφοκυττάρων εντός του όγκου και της συνολικής επιβίωσης των ασθενών ($HR=0.687$, $p=0.094$, 95% CI 0.442-1.069) μόνο στα μονοπαραγοντικά μοντέλα ανάλυσης και όχι κατά την πολυπαραγοντική ανάλυση. Τα δεδομένα αυτά μας δείχνουν ότι η συσχέτιση του CD3 με την ολική επιβίωση, μάλλον οφείλεται κυρίως στην αλληλεπίδραση του ποσοστού των CD3(+) T-λεμφοκυττάρων εντός του όγκου με το RCAS1. Συσχετίζοντας λοιπόν την έκφραση του RCAS1 με αυτή του CD3 βρέθηκε ότι υπάρχει έντονη αρνητική συσχέτιση μεταξύ τους ($p<0.001$).

Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι τα καρκινώματα του πνεύμονα που εκφράζουν το RCAS1 μπορεί να εμφανίζουν μια πιο επιθετική βιολογική συμπεριφορά σε σχέση με εκείνα τα οποία είναι αρνητικά για το RCAS1. Αποτέλεσμα λοιπόν αυτής της βιολογικής επιθετικότητας είναι η κακή πρόγνωση των ασθενών. Συνεπώς, διατυπώθηκε η υπόθεση ότι οι ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και ισχυρή έκφραση του RCAS1 όπως αυτή αποκαλύπτεται σε μία προεγχειρητική βιοψία, πιθανότατα να χρήζουν είτε περαιτέρω διερεύνησης για ύπαρξη μεταστάσεων είτε η απόφαση για χορήγηση επικουρικής θεραπείας να είναι πιο εύκολη και άμεση [172].

Συμπερασματικά, η αυξημένη έκφραση του RCAS1 στα μη μικροκυτταρικά νεοπλάσματα του πνεύμονα έχει ισχυρή αρνητική προγνωστική αξία. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρέχουν δεδομένα τα οποία θα μπορούσαν να υποστηρίξουν την κλινική σημασία και χρησιμότητα της ιστολογικής έκφρασης του RCAS1 ως ενός νέου βιοδείκτη (biomarker) σχετιζόμενου με το βαθμό επιθετικότητας του όγκου. Η κλινική αξία αυτών των ευρημάτων συνοψίζεται στην πιθανή μελλοντική χρήση του RCAS1 ως ενός ιστολογικού-ανοσοϊστοχημικού δείκτη για την διαβάθμισή της βιολογικής επιθετικότητάς των μη μικροκυτταρικών καρκίνων του πνεύμονα και της πιθανότητας υποτροπής και μεταστάσεων. Επιπλέον, το RCAS1 θα μπορούσε να αποτελέσει στο μέλλον ένα νέο πιθανό θεραπευτικό στόχο σε ασθενείς με καρκίνο. Ειδικότερα, ο ενδεχόμενος αποκλεισμός της έκφρασης και της λειτουργίας του RCAS1 με φαρμακευτικά μέσα π.χ. ένα νέο μονοκλωνικό αντίσωμα, ίσως να συνέβαλε στην καλύτερη ανοσοεπιτήρηση των καρκινικών κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή με ότι θα μπορούσε να σημαίνει αυτό για την φυσική και κλινική πορεία του κάθε νεοπλάσματος. Παρόλ'αυτά, στην παρούσα φάση το βέβαιο είναι ότι απαιτούνται περαιτέρω μελέτες που θα διερευνήσουν το ρόλο και την κλινική σημασία του RCAS1, ενός νέου και ενδιαφέροντος βιολογικά μορίου, τόσο στο καρκίνο του πνεύμονα όσο και σε άλλα νεοπλάσματα του ανθρώπου.

14. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα σημαντικότερα ευρήματα της παρούσας μελέτης που αφορούν στη κλινική σημασία της έκφρασης της πρωτεΐνης RCAS1 σε ασθενείς με πρωτοπαθές NSCLC συνοψίζονται στα εξής:

- 1) Η αρνητική συσχέτιση μεταξύ του RCAS1 και της συνολικής επιβίωσης ασθενών με NSCLC (HR=0.985, $p<0.001$, 95% CI 0.977-0.994).
- 2) Η υπερέκφραση του RCAS1 στα χαμηλής διαφοροποίησης (grade III) NSCLC ανεξάρτητα από τον ιστολογικό τους τύπο ($p=0.004$).
- 3) Η υπερέκφραση του RCAS1 στα αδеноκαρκινώματα με στοιχεία λεμφαγγειακής διήθησης (LVI) ($p=0.014$).
- 4) Η ύπαρξη θετικής συσχέτισης μεταξύ της έκφρασής του RCAS1 και του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 σε ασθενείς με NSCLC ($p=0.002$).
- 5) Η αρνητική συσχέτιση του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 και της συνολικής επιβίωσης ασθενών με NSCLC (HR=1.046, $p=0.003$, 95% CI 1.016-1.078).
- 6) Η θετική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού των CD3(+) T-λεμφοκυττάρων εντός του όγκου και της συνολικής επιβίωσης των ασθενών με NSCLC (HR=0.687, $p=0.094$, 95% CI 0.442-1.069).
- 7) Η ύπαρξη έντονης αρνητικής συσχέτισης μεταξύ του RCAS1 και του ποσοστού των CD3(+) T-λεμφοκυττάρων εντός του όγκου ($p<0.001$).
- 8) Τα αποτελέσματα της πολυπαραγοντικής ανάλυσης βάσει των οποίων το στάδιο της νόσου, η ύπαρξη νεκρώσεων στο ιστολογικό παρασκεύασμα, η σωματική κατάσταση του ασθενούς, η έκφραση του μορίου RCAS1, ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 και η ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες κατά σειρά μειούμενης στατιστικής σημαντικότητας.

15. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ RCAS1 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Εισαγωγή: Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί ένα σημαντικότατο πρόβλημα υγείας εξαιτίας της επίπτωσης και της θνητότητάς του. Το RCAS1 (Receptor-binding Cancer Antigen expressed on SiSo cells) είναι πρωτεΐνη η οποία εκφράζεται σε διάφορους τύπους νεοπλασμάτων και πιθανολογείται ότι παίζει ρόλο στην ανοσοδιαφυγή των καρκινικών κυττάρων.

Σκοπός: Να μελετηθεί και να αξιολογηθεί η κλινική σημασία της έκφρασης της πρωτεΐνης RCAS1 σε μη μικροκυτταρικά νεοπλάσματα του πνεύμονα.

Υλικό και Μέθοδοι: Δημιουργήθηκαν ιστικές μικροσυστοιχίες (Tissue MicroArrays) από τα ιστικά δείγματα των όγκων 112 ασθενών με πρωτοπαθές μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα. Ακολούθησε ανοσοϊστοχημική μελέτη του RCAS1, του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 και του δείκτη CD3. Η ανάλυση και επεξεργασία των εικόνων (image analysis) έγινε με ειδικό πρόγραμμα (software). Η ανάλυση των συσχετίσεων μεταξύ της έκφρασης του RCAS1, του Ki-67 και του CD3 με τις διάφορες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους έγινε θεωρώντας βαθμό στατιστικής σημαντικότητας $\alpha=0.05$.

Αποτελέσματα: Η έκφρασή του RCAS1 ήταν μεγαλύτερη στους grade III όγκους, ανεξάρτητα από τον ιστολογικό τύπο και στα αδеноκαρκινώματα με λεμφαγγειακή διήθηση. Βρέθηκε μια θετική συσχέτιση μεταξύ του RCAS1 και του Ki-67. Επιπλέον, αποδείχθηκε η ύπαρξη αρνητικής συσχέτισης μεταξύ του RCAS1 και του Ki-67 με τη συνολική επιβίωση των ασθενών και ειδικότερα ασθενείς με υπερέκφραση του RCAS1 ή του Ki-67 είχαν στατιστικά σημαντικά μικρότερη επιβίωση. Βρέθηκε επίσης έντονη αρνητική συσχέτιση μεταξύ του RCAS1 και του ποσοστού των CD3(+) T-λεμφοκυττάρων εντός του όγκου. Τέλος, βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού των CD3(+) T-λεμφοκυττάρων εντός του όγκου και της συνολικής επιβίωσης των ασθενών.

Συμπεράσματα: Το RCAS1 πιθανότατα θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένας χρήσιμος ανοσοϊστοχημικός προγνωστικός δείκτης της επιθετικότητας του όγκου και της άσχημης πρόγνωσης των ασθενών με NSCLC.

16. SUMMARY

THE SIGNIFICANCE OF RCAS1'S EXPRESSION IN LUNG CANCER

Introduction: Lung cancer is an important health problem worldwide due to its incidence and mortality. RCAS1 (Receptor-binding Cancer Antigen expressed on SiSo cells) is a protein that is expressed in different types of cancer and seems to be involved in the process of the tumour cells' escape from the immune system surveillance (immunoescape).

Aim: The aim of this study was to evaluate the clinical significance of RCAS1 immunohistochemical expression in non small cell lung cancer (NSCLC).

Methods: Tissue microarrays of tumor specimens from 112 patients with newly diagnosed primary NSCLC were constructed. The sections were stained with monoclonal antibodies against RCAS1, Ki-67 and CD3 using immunohistochemistry and they were studied through computerized image analysis. Associations between RCAS1, Ki-67 and CD3 expression and clinicopathological variables and survival were analyzed. In all cases an alpha level of <0.05 was considered significant.

Results: RCAS1 expression was higher in grade III tumors, regardless of the histological type, and in adenocarcinomas with lymphovascular invasion. A positive correlation between RCAS1 and Ki-67 levels was observed. Moreover, there was an inverse correlation of survival interval with RCAS1 and Ki-67 levels and patients with higher expression of RCAS1 or Ki-67 had a significantly shorter survival than those with lower expression. There was also an inverse correlation between RCAS1 expression and the percentage of CD3(+) lymphocytes inside the tumor. Finally, there was a positive correlation between the percentage of CD3(+) lymphocytes inside the tumor and the overall survival.

Conclusions: RCAS1 could be a useful immunohistochemical marker indicating tumor aggressiveness and predicting poor prognosis for patients with NSCLC.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

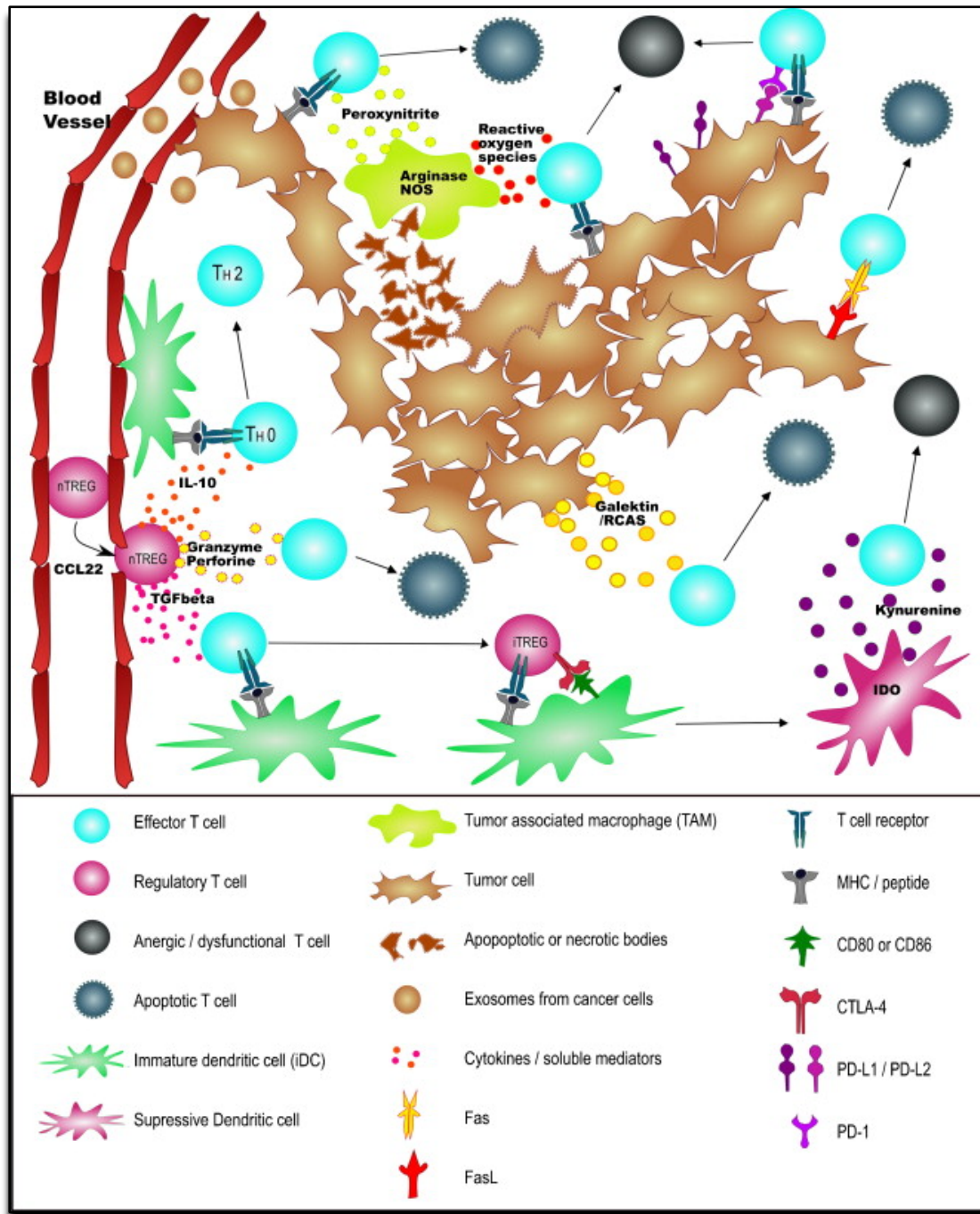


17. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

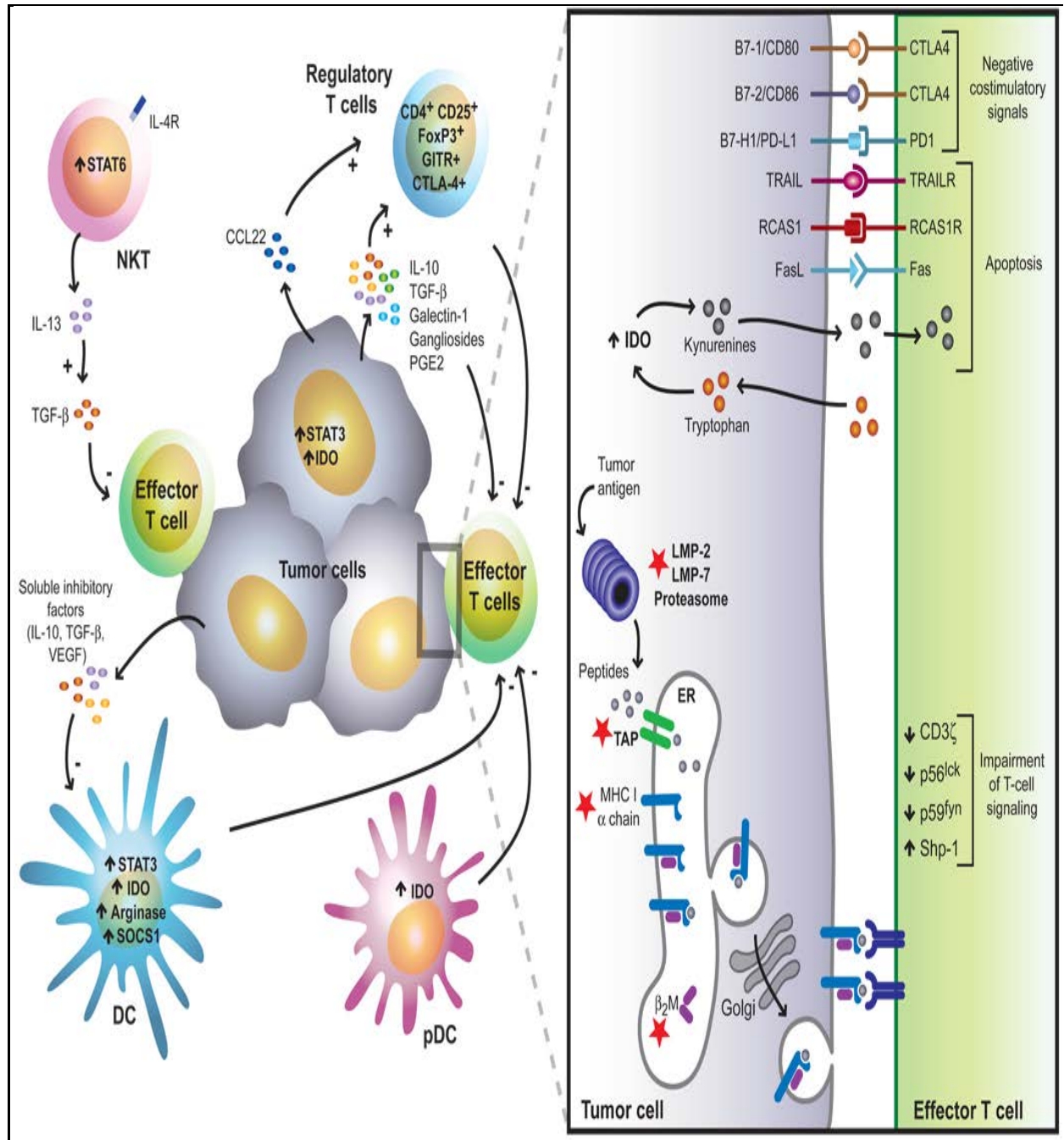
17.1 ΕΠΗΛΑΕΟΝ ΣΤΟΙΧΕΙΑ - ΕΙΚΟΝΕΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΟΡΙΟ RCAS1

Molecular and biochemical properties of RCAS1 protein	Description
Function	May participate in suppression of cell proliferation and induces apoptotic cell death through activation of interleukin-1- beta converting enzyme (ICE)-like proteases.
Subunit	Homodimer
Subcellular organization	Golgi apparatus membrane, Single-pass type II membrane protein.
Tissue specificity	Widely expressed. Expressed in ovary, testis, prostate, thymus, muscle and heart, but not in small intestine, colon, lymph nodes, or peripheral blood lymphocytes. The protein is not detected in any of the above organs.
Induction	By estrogen
Domain	The coiled coil domain is necessary for the homodimerization.
Disease	Defects in EBAG9 may be a cause of breast cancers and adenocarcinomas of the lung. It is present and overexpressed in many patients suffering from breast carcinomas, its level of expression correlates with tumor grade, suggesting that it may be involved in cancer immune escape.
Miscellaneous	May serve as a prognostic marker for cancers such as adenocarcinomas of the lung and breast cancers.
Organisms	Human, higher vertebrates.
Localization	Golgi apparatus membrane (transmembrane bitopic protein).

Πίνακας 1: Μοριακές και βιοχημικές ιδιότητες της πρωτεΐνης RCAS1 (στοιχεία από τις βάσεις δεδομένων για πρωτεΐνες π.χ. Swiss-Prot, UniProt, www.uniprot.org).

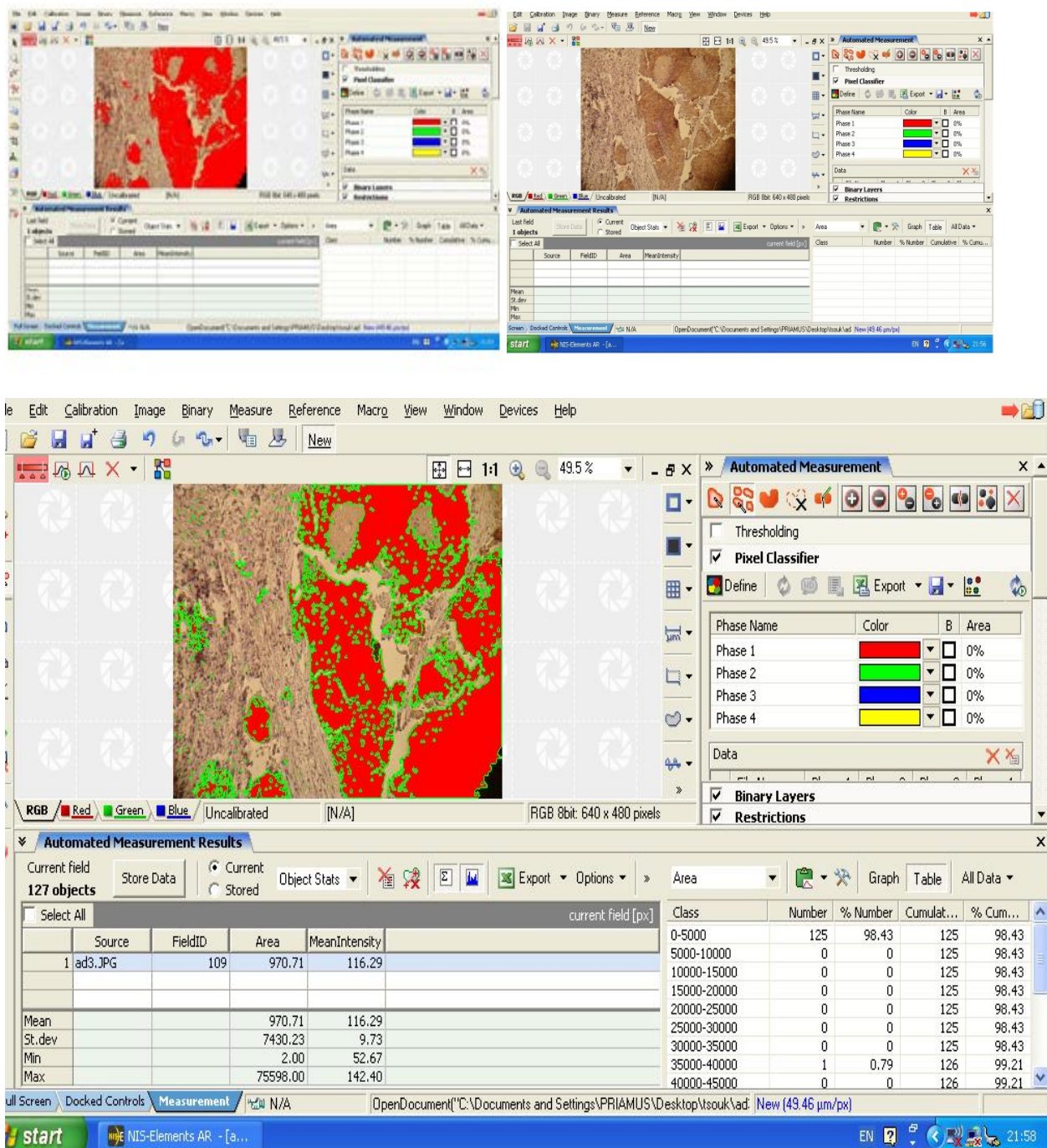


Εικόνα 1: Ανοσορυθμιστικά μονοπάτια-immunoregulatory networks στους όγκους που αλληλεπιδρούν με τις αντινεοπλασματικές κυτταρικές ανοσοαπαντήσεις (τροποποίηση από Gross S et al, Immunology Letters 2008).

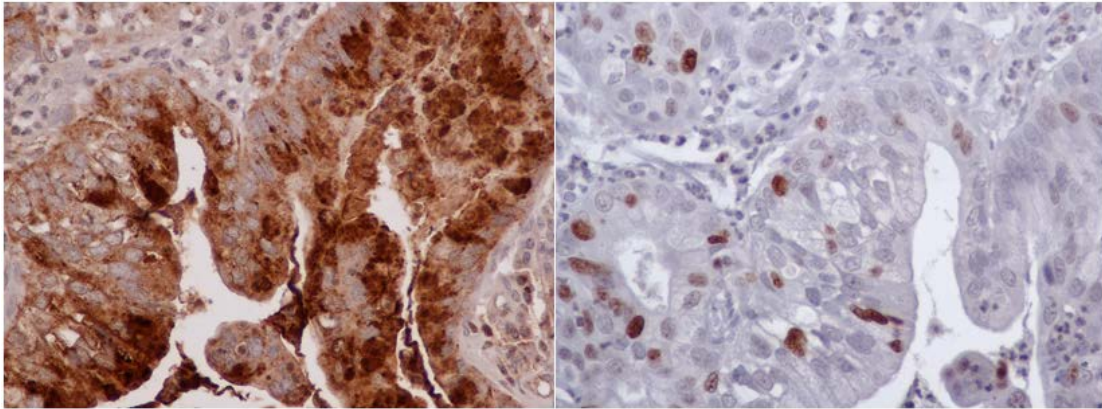


Εικόνα 2: Μηχανισμοί καταστολής της ανοσιακής απάντησης και τελικά ανοσοδιαφυγής-immunoescape των καρκινικών κυττάρων (τροποποίηση από Rabinovich GA et al, Annu Rev Immunol. 2007).

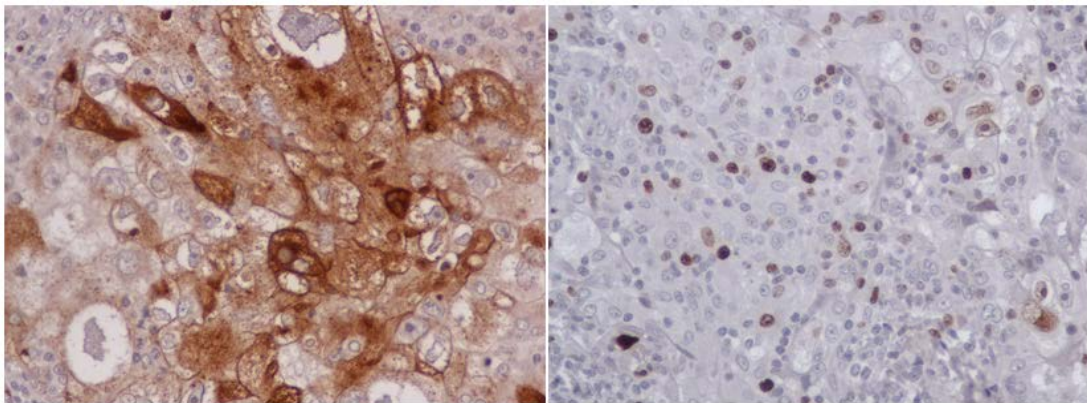
17.2 ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΜΕΘΟΔΟΙ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ



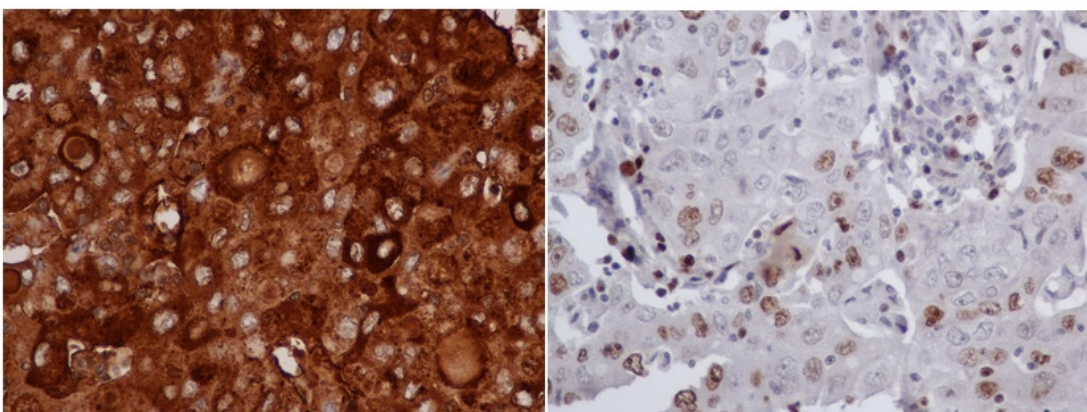
Εικόνα 3: Τελική εικόνα αποτελεσμάτων του προγράμματος υπολογιστικής ανάλυσης της εικόνας (output of programme CIA).



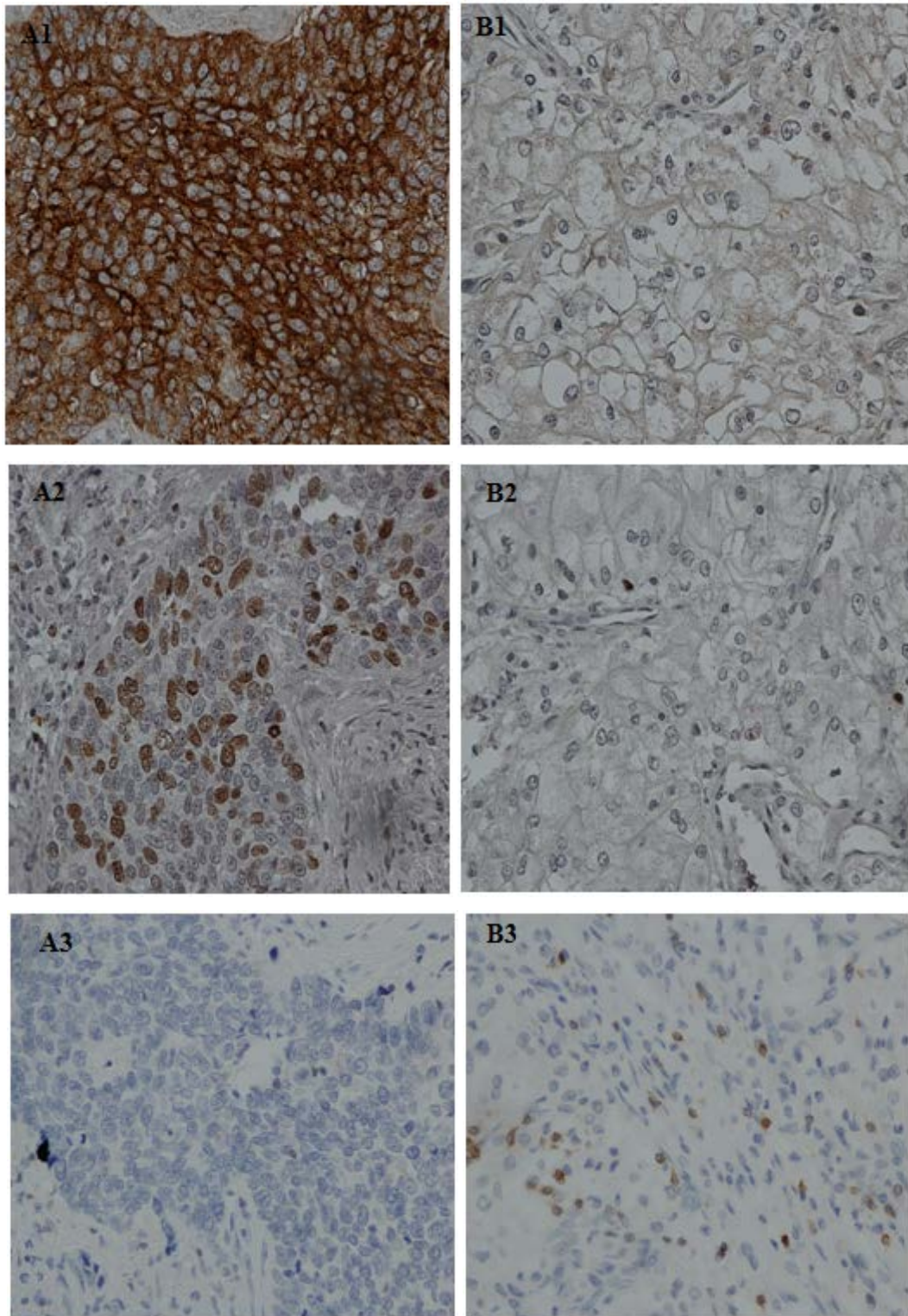
Εικόνα 4: Θετική χρώση για το RCAS1 (ΑΡ) και το Ki-67 (ΔΕ) σε αδеноκαρκίνωμα (400x).



Εικόνα 5: Θετική χρώση για το RCAS1 (ΑΡ) και το Ki-67 (ΔΕ) σε πλακώδες καρκίνωμα (400x).



Εικόνα 6: Θετική χρώση για το RCAS1 (ΑΡ) και το Ki-67 (ΔΕ) σε μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (400x).

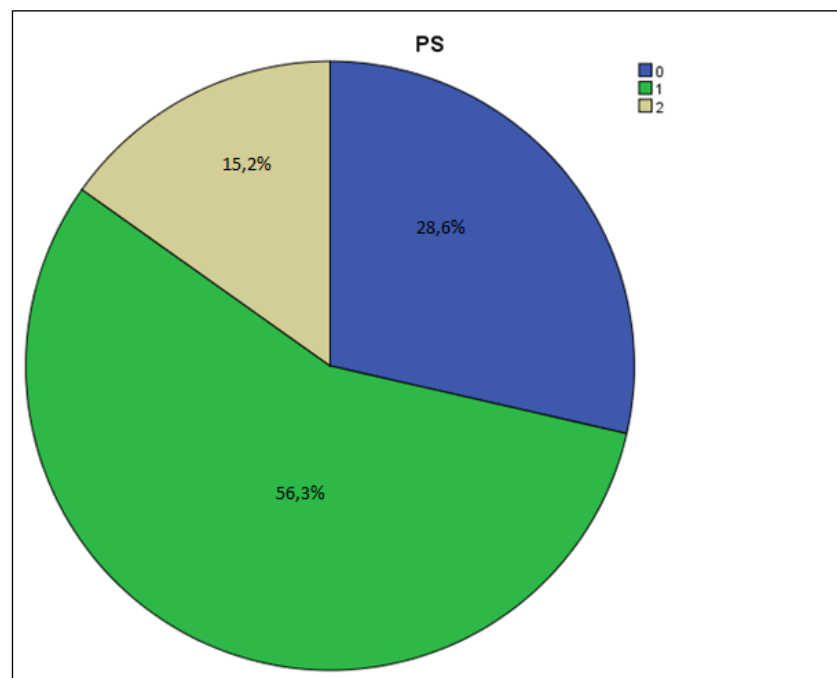


Εικόνα 7: Α) Ασθενής Α όπου έχει θετική χρώση για το RCAS1 (A1) και το Ki-67 (A2) και αρνητική χρώση για το CD3 (A3)(400x). Β) Ασθενής Β όπου έχει αρνητική χρώση για το RCAS1 (B1) και το Ki-67 (B2) και θετική χρώση για το CD3 (B3)(400x).

17.3 ΕΠΙΠΛΕΟΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

PS					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	0	32	28,6	28,6	28,6
	1	63	56,3	56,3	84,8
	2	17	15,2	15,2	100,0
	Total	112	100,0	100,0	

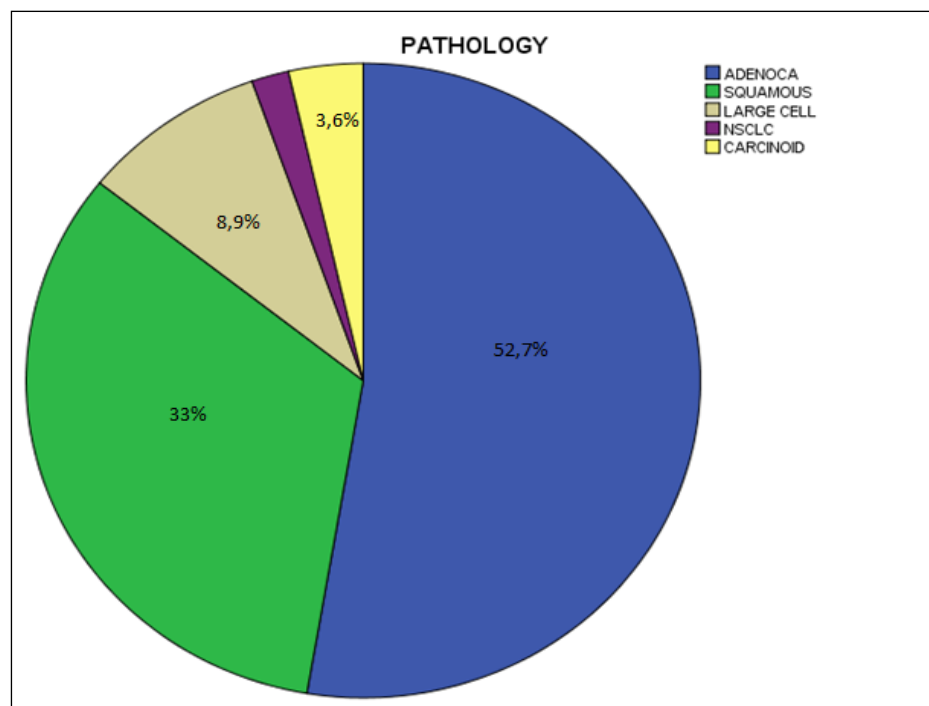
Πίνακας 2: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με τη σωματική τους κατάσταση (Performance Status-PS).



Γράφημα 1: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με τη σωματική τους κατάσταση (Performance Status-PS).

PATHOLOGY					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	ADENOCA	59	52,7	52,7	52,7
	SQUAMOUS	37	33,0	33,0	85,7
	LARGE CELL	10	8,9	8,9	94,6
	NSCLC	2	1,8	1,8	96,4
	CARCINOID	4	3,6	3,6	100,0
	Total	112	100,0	100,0	

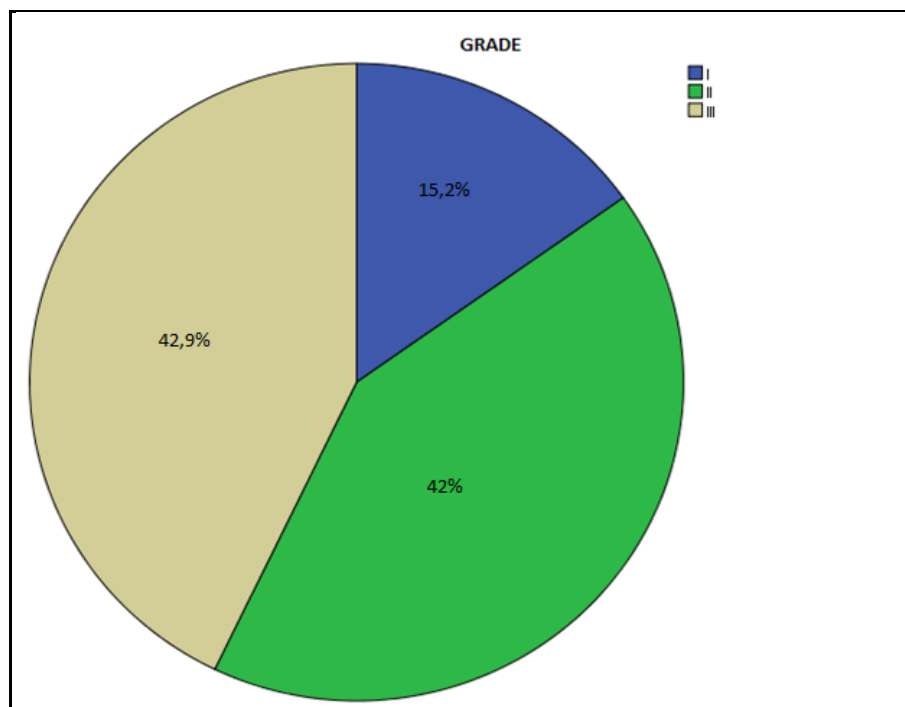
Πίνακας 3: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με τον ιστολογικό τύπο του NSCLC (PATHOLOGY).



Γράφημα 2: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με τον ιστολογικό τύπο του NSCLC (PATHOLOGY).

GRADE					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	I	17	15,2	15,2	15,2
	II	47	42,0	42,0	57,1
	III	48	42,9	42,9	100,0
	Total	112	100,0	100,0	

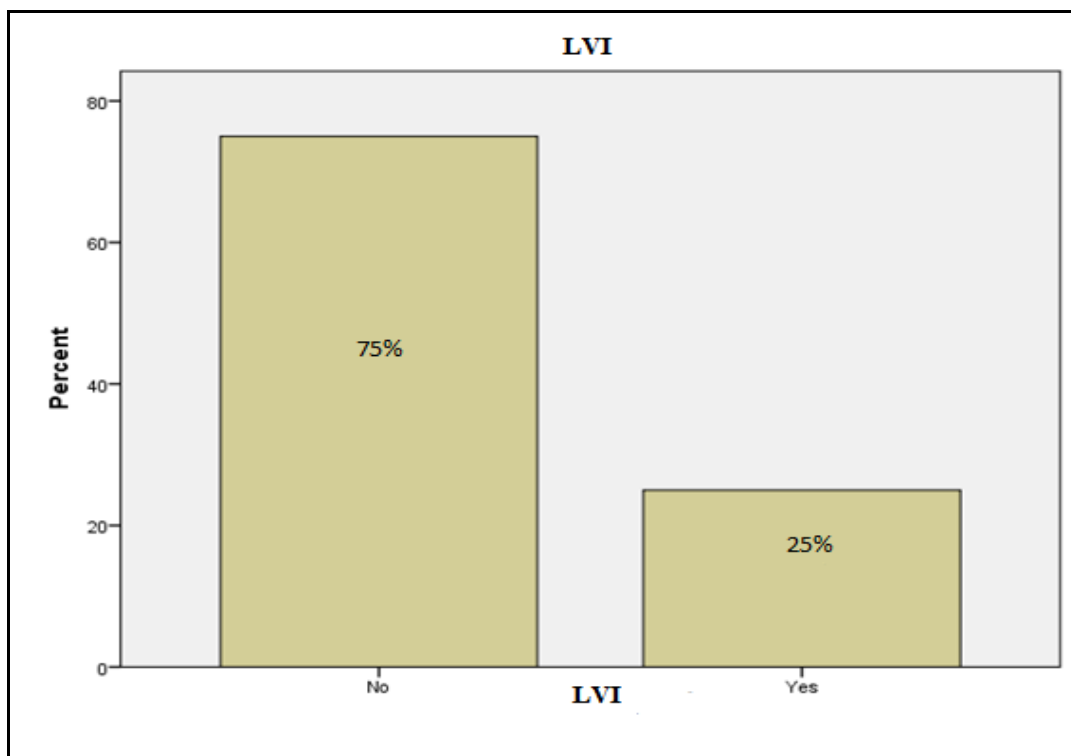
Πίνακας 4: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με το βαθμό διαφοροποίησης του NSCLC (GRADE).



Γράφημα 3: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με το βαθμό διαφοροποίησης του NSCLC (GRADE).

LVI					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	No	84	75,0	75,0	75,0
	Yes	28	25,0	25,0	100,0
	Total	112	100,0	100,0	

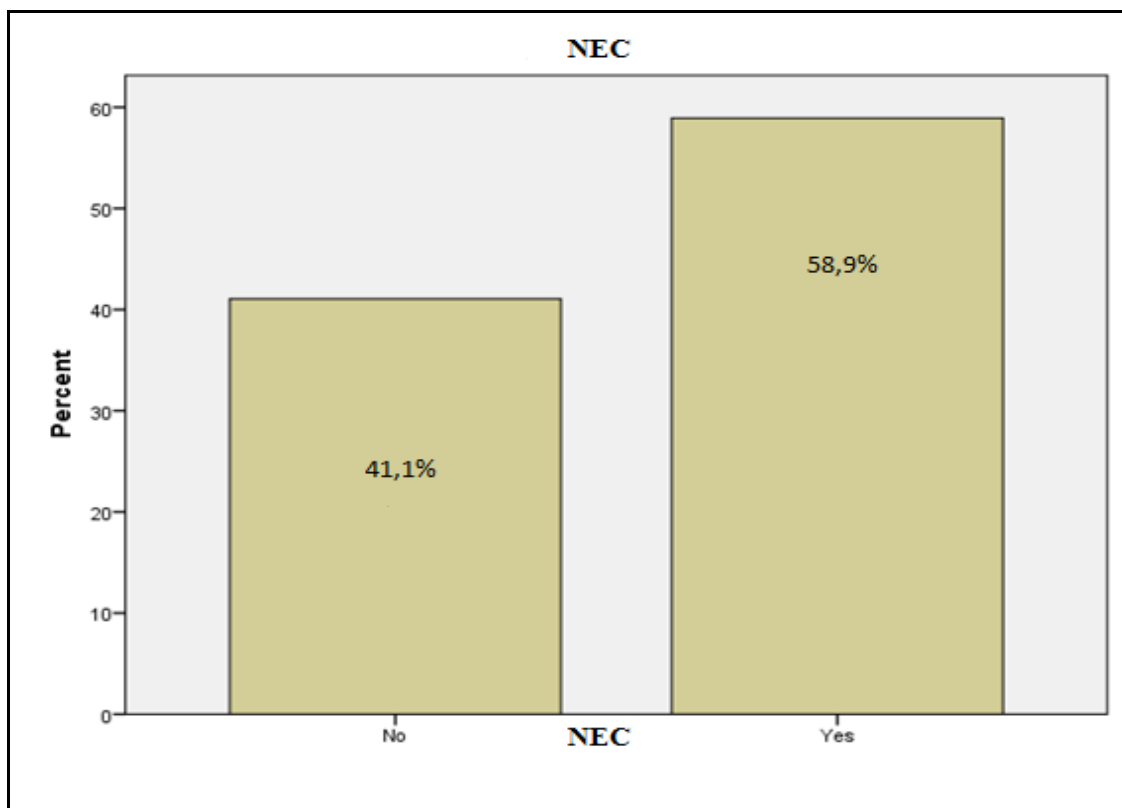
Πίνακας 5: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με την ύπαρξη λεμφαγγειακής διήθησης (LVI).



Γράφημα 4: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με την ύπαρξη λεμφαγγειακής διήθησης (LVI).

NEC					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	No	46	41,1	41,1	41,1
	Yes	66	58,9	58,9	100,0
	Total	112	100,0	100,0	

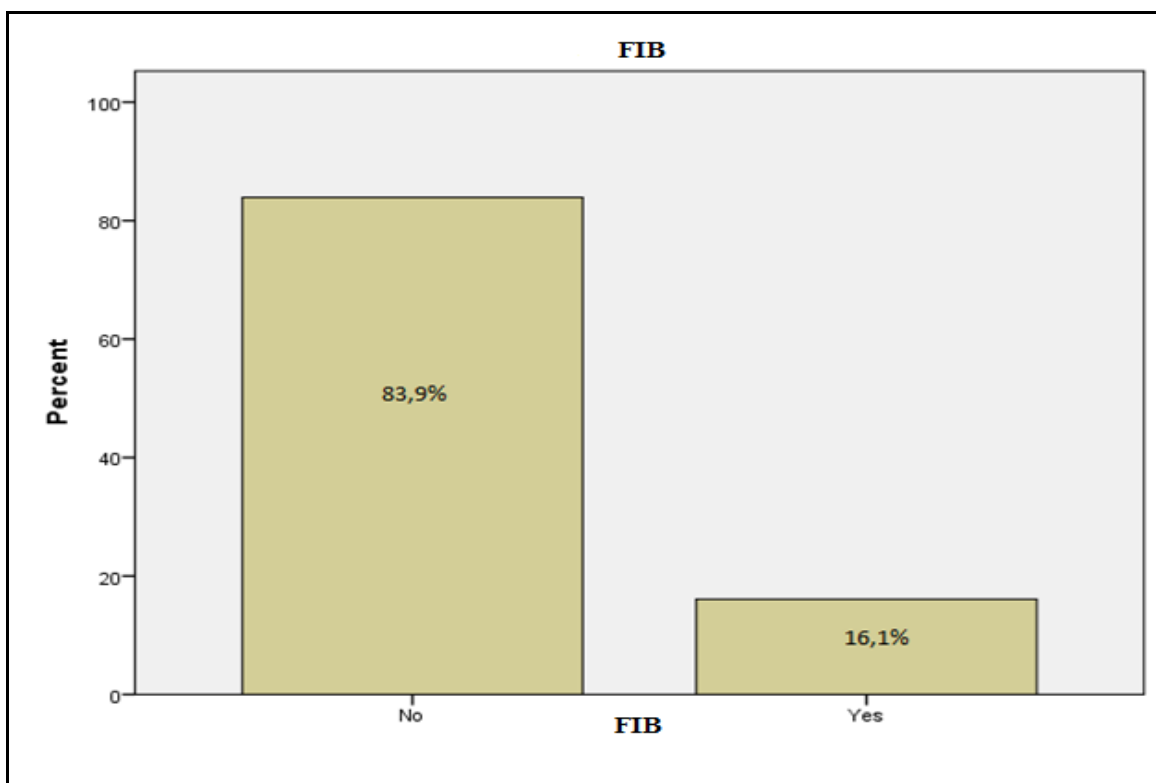
Πίνακας 6: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με την ύπαρξη νέκρωσης (NECROSIS).



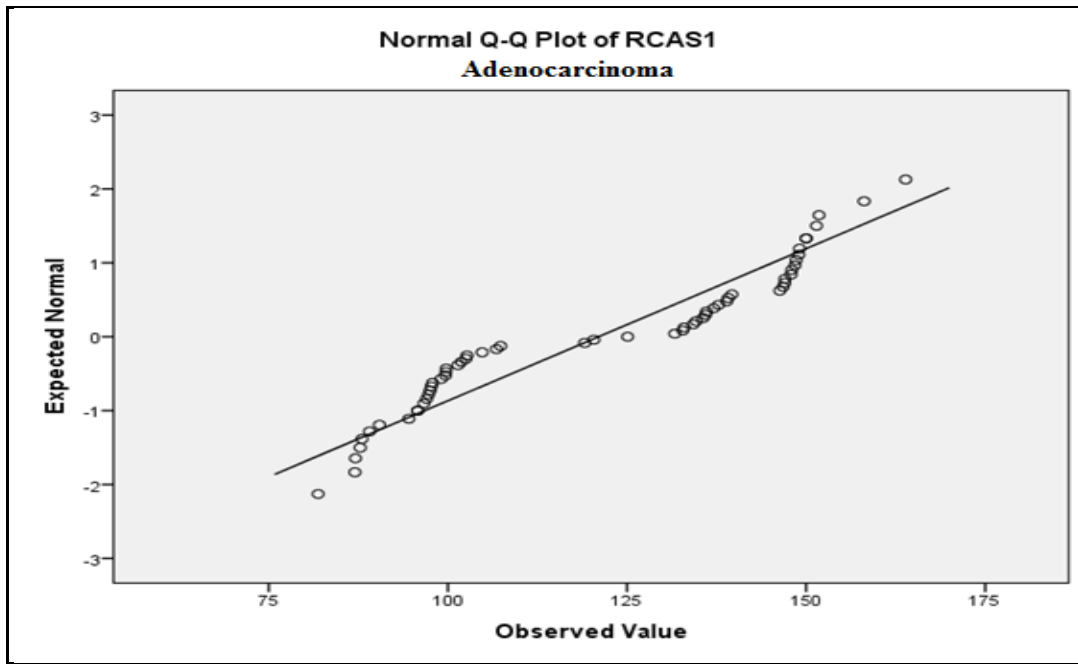
Γράφημα 5: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με την ύπαρξη νέκρωσης (NECROSIS).

FIB					
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	No	94	83,9	83,9	83,9
	Yes	18	16,1	16,1	100,0
	Total	112	100,0	100,0	

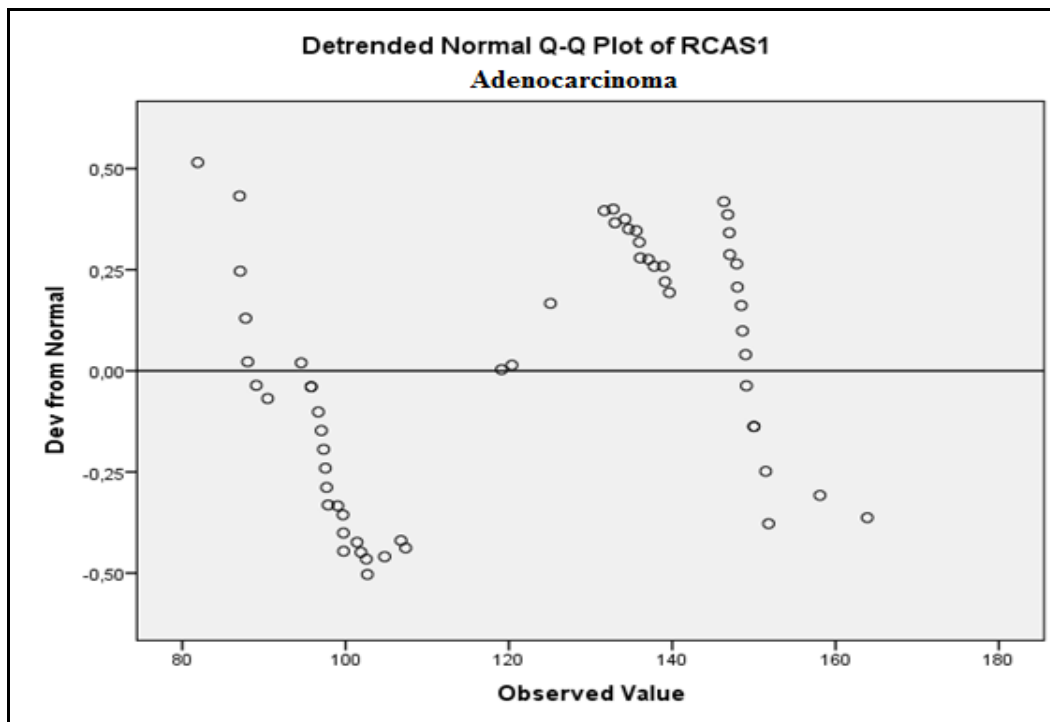
Πίνακας 7: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με την ύπαρξη ίνωσης (FIBROSIS).



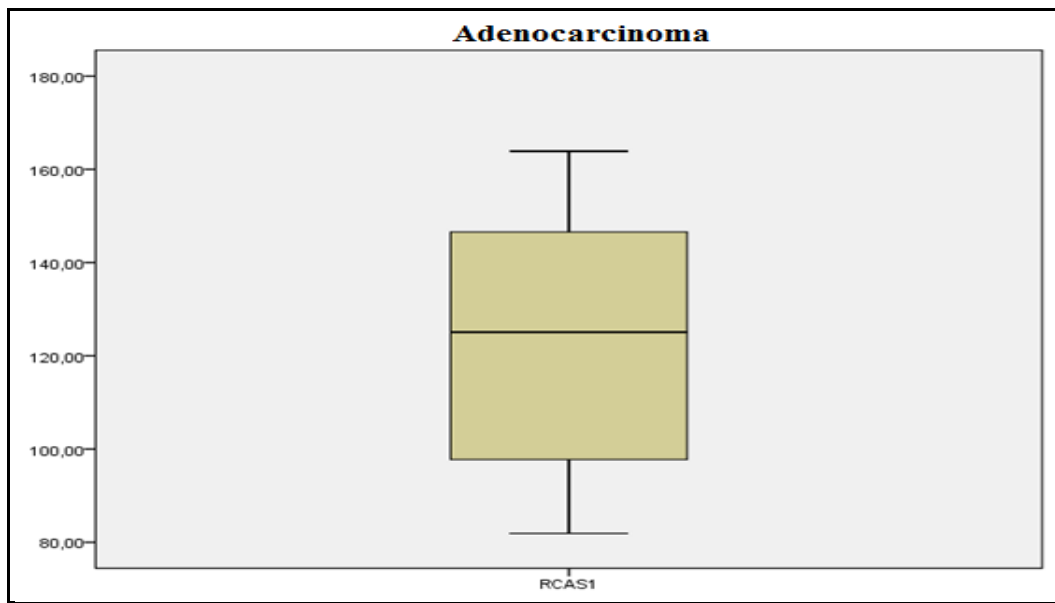
Γράφημα 6: Ποσοστά ασθενών αναφορικά με την ύπαρξη ίνωσης (FIBROSIS).



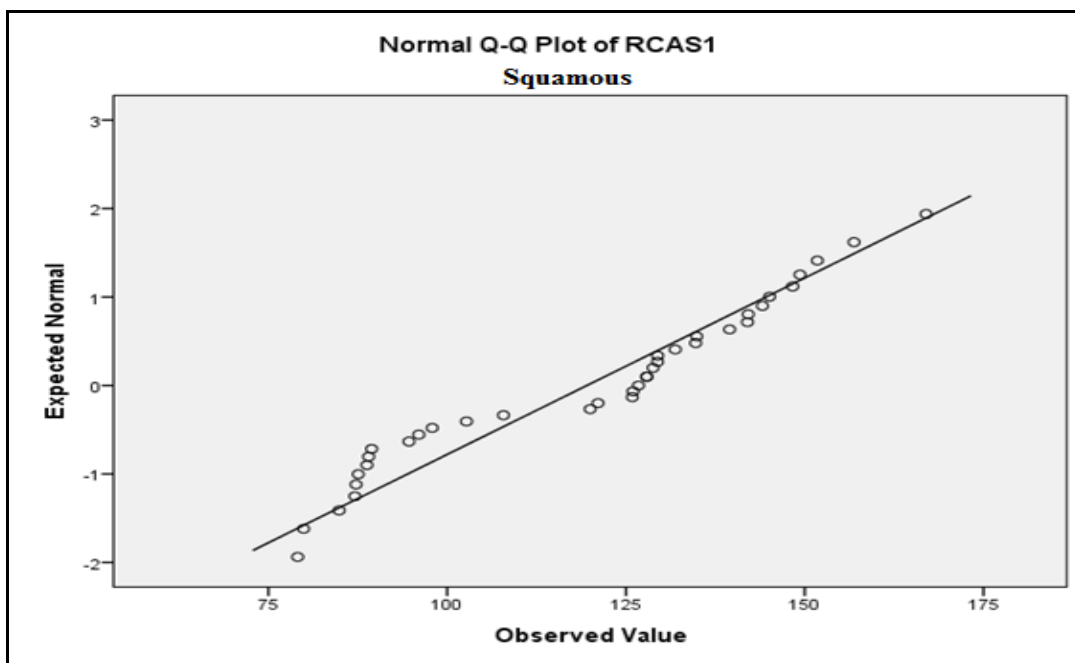
Γράφημα 7: Έλεγχος κανονικότητας για τις τιμές του RCAS1 στα αδενοκαρκινώματα (κριτήριο Kolmogorov-Smirnov).



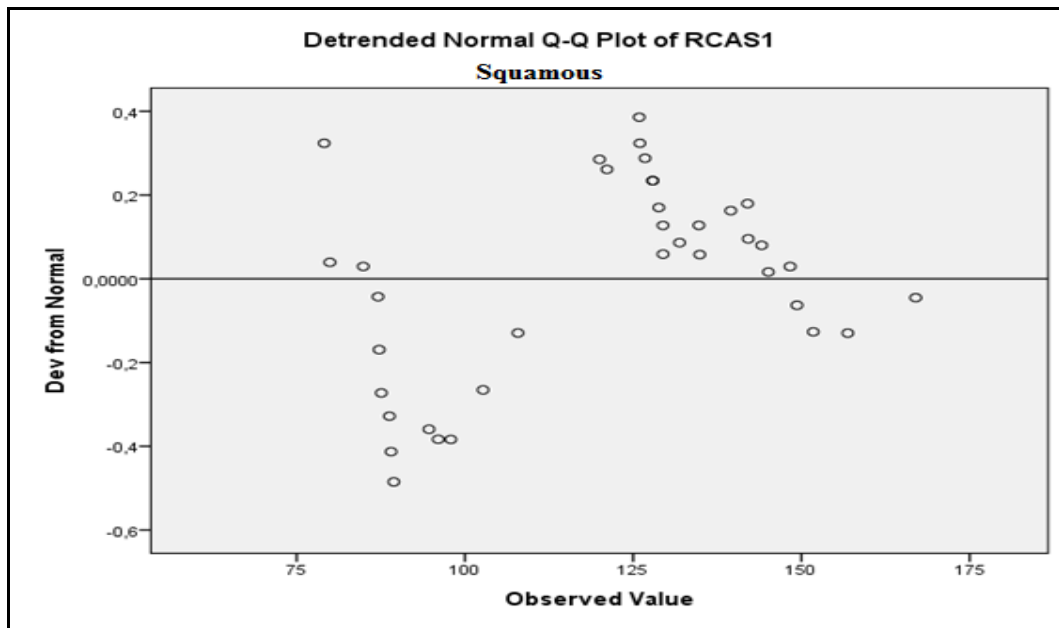
Γράφημα 8: Έλεγχος κανονικότητας για τις τιμές του RCAS1 στα αδενοκαρκινώματα (κριτήριο Kolmogorov-Smirnov).



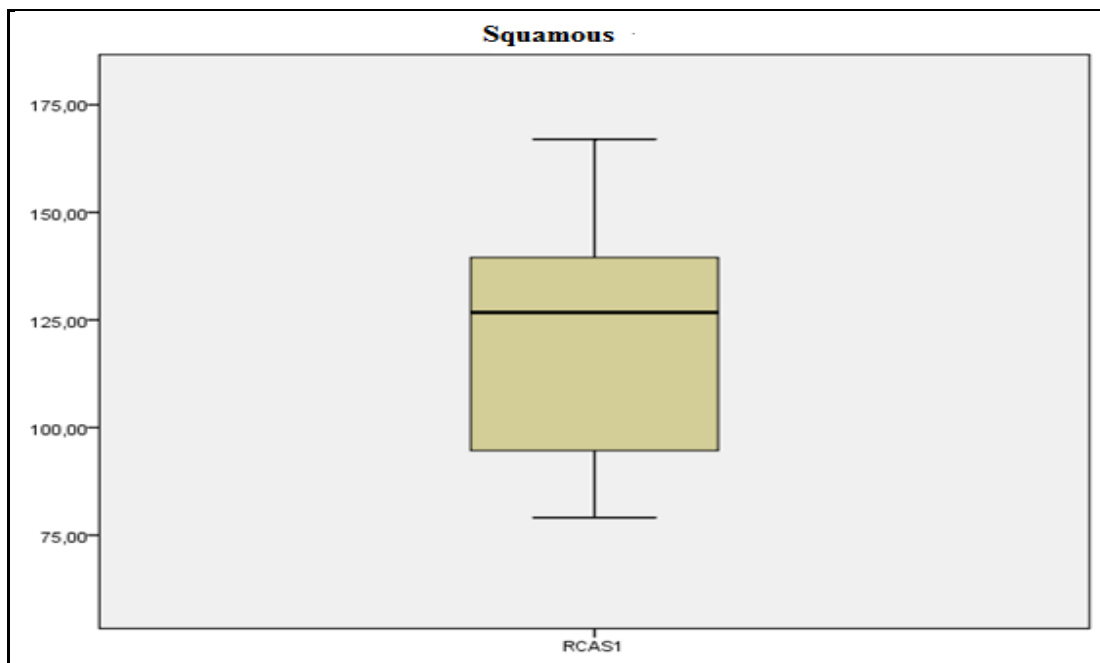
Γράφημα 9: Έλεγχος κανονικότητας για τις τιμές του RCAS1 στα αδενοκαρκινώματα (κριτήριο Kolmogorov-Smirnov).



Γράφημα 10: Έλεγχος κανονικότητας για τις τιμές του RCAS1 στα πλακώδη καρκινώματα (κριτήριο Kolmogorov-Smirnov).



Γράφημα 11: Έλεγχος κανονικότητας για τις τιμές του RCAS1 στα πλακώδη καρκινώματα (κριτήριο Kolmogorov-Smirnov).



Γράφημα 12: Έλεγχος κανονικότητας για τις τιμές του RCAS1 στα πλακώδη καρκινώματα (κριτήριο Kolmogorov-Smirnov).

No	NAM	AGE	GEN	SMO	ALC	PS	PATHOLOGY	GRA	INF	LVI	NEC	FIB	T	N	M	STAG	Ki-67	RCAS1	CD3
1	XG	61	M	Y	Y	1	ADENOCA	III	Y	N	Y	Y	T2a	N2	M0	IIIA	6	148,98	0
2	AK	45	F	N	N	1	ADENOCA	III	N	Y	N	N	T4	N2	M1a	IV	3	134,66	0
3	SN	67	M	Y	Y	0	ADENOCA	II	N	N	N	N	T2	N1	M0	IIA	8	136,09	0
4	LS	69	M	Y	N	2	ADENOCA	II	N	N	N	N	T3	N2	M0	IIIA	12	151,45	1
5	ZI	63	M	Y	Y	1	ADENOCA	I	N	Y	N	N	T2b	N1	M0	IIB	8	87,02	0
6	FF	60	F	N	N	1	ADENOCA	III	N	N	Y	N	T2b	N2	M0	IIIA	7	102,54	1
7	MN	64	M	Y	N	0	ADENOCA	II	Y	N	Y	Y	T2a	N2	M0	IIIA	8	97,03	0
8	RE	68	M	Y	Y	2	ADENOCA	III	N	Y	Y	N	T1b	N1	M0	IIA	1	104,78	1
9	MS	61	M	Y	Y	1	ADENOCA	I	N	N	Y	N	T4	N1	M0	IIIA	19	147,89	0
10	KE	69	F	N	N	1	ADENOCA	II	N	N	N	N	T2a	N2	M0	IIIA	3	132,98	1
11	ME	57	F	Y	N	0	ADENOCA	II	Y	N	N	Y	T1b	N0	M0	IA	4	96,66	0
12	SE	58	M	Y	N	0	ADENOCA	II	N	N	Y	N	T2b	N0	M0	IIA	2	119,09	0
13	FA	60	M	Y	Y	0	ADENOCA	I	N	N	Y	N	T3	N1	M0	IIIA	7	138,9	0
14	ME	67	M	Y	N	1	ADENOCA	II	N	N	Y	N	T2a	N1	M0	IIA	8	97,53	0
15	LS	61	M	Y	Y	1	ADENOCA	II	N	Y	N	N	T1b	N1	M0	IIA	13	88,01	0
16	NM	60	M	Y	Y	1	ADENOCA	II	Y	N	Y	N	T2a	N0	M0	IB	21	146,32	0
17	SK	74	M	Y	N	0	ADENOCA	III	N	N	Y	N	T2a	N2	M0	IIIA	11	90,45	0
18	TE	56	M	Y	N	1	ADENOCA	III	N	N	N	N	T1b	N1	M0	IIA	4	94,56	0
19	SK	65	M	Y	Y	0	ADENOCA	II	N	N	Y	Y	T3	N1	M0	IIIA	9	97,67	0
20	SK	73	M	Y	Y	1	ADENOCA	III	N	N	Y	Y	T2b	N3	M0	IIIB	14	81,89	0
21	KK	64	M	Y	Y	0	ADENOCA	III	N	Y	N	N	T4	N3	M1b	IV	3	147,98	1
22	MA	56	M	Y	Y	0	ADENOCA	I	N	N	Y	N	T1a	N0	M0	IA	1	151,8	1
23	DI	36	M	Y	Y	2	ADENOCA	III	N	Y	N	N	T4	N2	M0	IIIB	2	101,4	1
24	MI	72	F	N	N	1	ADENOCA	I	N	N	N	N	T3	N1	M0	IIIA	7	146,8	1
25	SP	56	M	Y	Y	0	ADENOCA	II	N	Y	Y	N	T3	N2	M0	IIIA	7	106,78	0
26	AA	64	F	N	N	1	ADENOCA	II	N	Y	Y	N	T1b	N2	M1b	IV	5	135,97	0
27	FG	67	M	Y	Y	0	ADENOCA	I	N	N	N	N	T1b	N0	M0	IA	8	139,12	1
28	NP	40	F	Y	N	2	ADENOCA	II	N	N	N	N	T4	N0	M0	IIIA	11	107,36	0

Πίνακας 8: Παράδειγμα φύλλου καταγραφής (excel) δεδομένων-μετρήσεων της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



18. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011 Mar-Apr;61(2):69-90.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012 Jan-Feb;62(1):10-29.
3. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* 2013 Jan;63(1):11-30.
4. Jemal A, Thun MJ, Ries LA, Howe HL, Weir HK, Center MM, Ward E, Wu XC, Ehemann C, Anderson R, Ajani UA, Kohler B, Edwards BK. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Dec 3;100(23):1672-94.
5. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest.* 2003 Jan;123(1 Suppl):21S-49S.
6. Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *BMJ.* 2004 Jun 26;328(7455):1519.
7. Kaufman EL, Jacobson JS, Hershman DL, Desai M, Neugut AI. Effect of breast cancer radiotherapy and cigarette smoking on risk of second primary lung cancer. *J Clin Oncol.* 2008 Jan 20;26(3):392-8.
8. Hodgson DC, Koh ES, Tran TH, Heydari M, Tsang R, Pintilie M, Xu T, Huang L, Sachs RK, Brenner DJ. Individualized estimates of second cancer risks after contemporary radiation therapy for Hodgkin lymphoma. *Cancer.* 2007 Dec 1;110(11):2576-86.
9. Lorigan P, Radford J, Howell A, Thatcher N. Lung cancer after treatment for Hodgkin's lymphoma: a systematic review. *Lancet Oncol.* 2005 Oct;6(10):773-9.
10. Hubbard R, Venn A, Lewis S, Britton J. Lung cancer and cryptogenic fibrosing alveolitis. A population-based cohort study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Jan;161(1):5-8.
11. National Lung Screening Trial Research Team, Aberle DR, Adams AM, Berg CD, Black WC, Clapp JD, Fagerstrom RM, Gareen IF, Gatsonis C, Marcus PM, Sicks JD. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med.* 2011 Aug 4;365(5):395-409.
12. Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. In: World Health Organization classification of tumours. IARC, Lyon, France 2004.
13. Janssen-Heijnen ML, Coebergh JW, Klinkhamer PJ, Schipper RM, Splinter TA, Mooi WJ. Is there a common etiology for the rising incidence of and decreasing survival with adenocarcinoma of the lung? *Epidemiology.* 2001 Mar;12(2):256-8.
14. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE, Garg K, Austin JH, Asamura H, Rusch VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Mitsudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett J, Sanchez-Cespedes M, Sculier JP, Takahashi T, Tsuboi M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang PC, Aberle D, Brambilla

- C, Flieder D, Franklin W, Gazdar A, Gould M, Hasleton P, Henderson D, Johnson B, Johnson D, Kerr K, Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, Petersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M, Yankelewitz D. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2011 Feb;6(2):244-85.
15. Hyde L, Hyde CI. Clinical manifestations of lung cancer. *Chest*. 1974 Mar;65(3):299-306.
16. Hirshberg B, Biran I, Glazer M, Kramer MR. Hemoptysis: etiology, evaluation, and outcome in a tertiary referral hospital. *Chest*. 1997 Aug;112(2):440-4.
17. Colice GL. Detecting lung cancer as a cause of hemoptysis in patients with a normal chest radiograph: bronchoscopy vs CT. *Chest*. 1997 Apr;111(4):877-84.
18. Kuo CW, Chen YM, Chao JY, Tsai CM, Perng RP. Non-small cell lung cancer in very young and very old patients. *Chest*. 2000 Feb;117(2):354-7.
19. Piehler JM, Pairolero PC, Gracey DR, Bernatz PE. Unexplained diaphragmatic paralysis: a harbinger of malignant disease? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1982 Dec;84(6):861-4.
20. Ramadan HH, Wax MK, Avery S. Outcome and changing cause of unilateral vocal cord paralysis. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998 Feb;118(2):199-202.
21. Chen HC, Jen YM, Wang CH, Lee JC, Lin YS. Etiology of vocal cord paralysis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2007;69(3):167-71.
22. Eren S, Karaman A, Okur A. The superior vena cava syndrome caused by malignant disease. Imaging with multi-detector row CT. *Eur J Radiol*. 2006 Jul;59(1):93-103.
23. Hiraki A, Ueoka H, Takata I, Gemba K, Bessho A, Segawa Y, Kiura K, Eguchi K, Yoneda T, Tanimoto M, Harada M. Hypercalcemia-leukocytosis syndrome associated with lung cancer. *Lung Cancer*. 2004 Mar;43(3):301-7.
24. Thomas L, Kwok Y, Edelman MJ. Management of paraneoplastic syndromes in lung cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2004 Feb;5(1):51-62.
25. List AF, Hainsworth JD, Davis BW, Hande KR, Greco FA, Johnson DH. The syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone (SIADH) in small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 1986 Aug;4(8):1191-8.
26. Hansen O, Sørensen P, Hansen KH. The occurrence of hyponatremia in SCLC and the influence on prognosis: a retrospective study of 453 patients treated in a single institution in a 10-year period. *Lung Cancer*. 2010 Apr;68(1):111-4.
27. Ellison DH, Berl T. Clinical practice. The syndrome of inappropriate antidiuresis. *N Engl J Med*. 2007 May 17;356(20):2064-72.
28. Honnorat J, Antoine JC. Paraneoplastic neurological syndromes. *Orphanet J Rare Dis*. 2007 May 4;2:22.
29. Elrington GM, Murray NM, Spiro SG, Newsom-Davis J. Neurological paraneoplastic syndromes in patients with small cell lung cancer. A prospective survey of 150 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1991 Sep;54(9):764-7.

30. Sillevs Smitt P, Grefkens J, de Leeuw B, van den Bent M, van Putten W, Hooijkaas H, Vecht C. Survival and outcome in 73 anti-Hu positive patients with paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy. *J Neurol*. 2002 Jun;249(6):745-53.
31. Younes-Mhenni S, Janier MF, Cinotti L, Antoine JC, Tronc F, Cottin V, Ternamian PJ, Trouillas P, Honnorat J. FDG-PET improves tumour detection in patients with paraneoplastic neurological syndromes. *Brain*. 2004 Oct;127(Pt 10):2331-8.
32. Kosmidis P, Krzakowski M; ECAS Investigators. Anemia profiles in patients with lung cancer: what have we learned from the European Cancer Anaemia Survey (ECAS)? *Lung Cancer*. 2005 Dec;50(3):401-12.
33. Kasuga I, Makino S, Kiyokawa H, Katoh H, Ebihara Y, Ohyashiki K. Tumor-related leukocytosis is linked with poor prognosis in patients with lung carcinoma. *Cancer*. 2001 Nov 1;92(9):2399-405.
34. Hamilton W, Peters TJ, Round A, Sharp D. What are the clinical features of lung cancer before the diagnosis is made? A population based case-control study. *Thorax*. 2005 Dec;60(12):1059-65.
35. Aoe K, Hiraki A, Ueoka H, Kiura K, Tabata M, Tanaka M, Tanimoto M. Thrombocytosis as a useful prognostic indicator in patients with lung cancer. *Respiration*. 2004 Mar-Apr;71(2):170-3.
36. Amital H, Applbaum YH, Vasiliev L, Rubinow A. Hypertrophic pulmonary osteoarthropathy: control of pain and symptoms with pamidronate. *Clin Rheumatol*. 2004 Aug;23(4):330-2.
37. Ilias I, Torpy DJ, Pacak K, Mullen N, Wesley RA, Nieman LK. Cushing's syndrome due to ectopic corticotropin secretion: twenty years' experience at the National Institutes of Health. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Aug;90(8):4955-62.
38. Delisle L, Boyer MJ, Warr D, Killinger D, Payne D, Yeoh JL, Feld R. Ectopic corticotropin syndrome and small-cell carcinoma of the lung. Clinical features, outcome, and complications. *Arch Intern Med*. 1993 Mar 22;153(6):746-52.
39. Shepherd FA, Laskey J, Evans WK, Goss PE, Johansen E, Khamsi F. Cushing's syndrome associated with ectopic corticotropin production and small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 1992 Jan;10(1):21-7.
40. Ross PJ, Ashley S, Norton A, Priest K, Waters JS, Eisen T, Smith IE, O'Brien ME. Do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for lung cancers? *Br J Cancer*. 2004 May 17;90(10):1905-11.
41. Colinet B, Jacot W, Bertrand D. Do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for lung cancers? *Br J Cancer*. 2004 May 17;90(10):1905-11.
42. Spiro SG, Gould MK, Colice GL; American College of Chest Physicians. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. 2007 Sep;132(3 Suppl):149S-160S.

43. [No authors listed] Pretreatment evaluation of non-small-cell lung cancer. The American Thoracic Society and The European Respiratory Society. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Jul;156(1):320-32.
44. Tamura M, Oda M, Tsunetzuka Y, Matsumoto I, Kawakami K, Ohta Y, Watanabe G. Chest CT and serum vascular endothelial growth factor-C level to diagnose lymph node metastasis in patients with primary non-small cell lung cancer. *Chest.* 2004 Aug;126(2):342-6.
45. Rubins JB, Dunitz J, Rubins HB, Maddaus MA, Niewoehner DE. Serum carcinoembryonic antigen as an adjunct to preoperative staging of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998 Sep;116(3):412-6.
46. Ferrigno D, Buccheri G. Clinical applications of serum markers for lung cancer. *Respir Med.* 1995 Oct;89(9):587-97.
47. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004 May 20;350(21):2129-39.
48. Silvestri GA, Gould MK, Margolis ML, Tanoue LT, McCrory D, Toloza E, Detterbeck F; American College of Chest Physicians Noninvasive staging of non-small cell lung cancer: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest.* 2007 Sep;132(3 Suppl):178S-201S.
49. Paone G, Nicastrì E, Lucantoni G, Dello Iacono R, Battistoni P, D'Angeli AL, Galluccio G. Endobronchial ultrasound-driven biopsy in the diagnosis of peripheral lung lesions. *Chest.* 2005 Nov;128(5):3551-7.
50. Gildea TR, Mazzone PJ, Karnak D, Meziane M, Mehta AC. Electromagnetic navigation diagnostic bronchoscopy: a prospective study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Nov 1;174(9):982-9.
51. Rivera MP, Mehta AC; American College of Chest Physicians. Initial diagnosis of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest.* 2007 Sep;132(3 Suppl):131S-148S.
52. Mentzer SJ, Swanson SJ, DeCamp MM, Bueno R, Sugarbaker DJ. Mediastinoscopy, thoracoscopy, and video-assisted thoracic surgery in the diagnosis and staging of lung cancer. *Chest.* 1997 Oct;112(4 Suppl):239S-241S.
53. Little AG, Rusch VW, Bonner JA, Gaspar LE, Green MR, Webb WR, Stewart AK. Patterns of surgical care of lung cancer patients. *Ann Thorac Surg.* 2005 Dec;80(6):2051-6; discussion 2056.
54. Wain JC. Video-assisted thoracoscopy and the staging of lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 1993 Sep;56(3):776-8.
55. Roberts JR, Blum MG, Arildsen R, Drinkwater DC Jr, Christian KR, Powers TA, Merrill WH. Prospective comparison of radiologic, thoracoscopic, and pathologic staging in patients with early non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 1999 Oct;68(4):1154-8.
56. AJCC Cancer Staging Manual, 6th ed, Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al (Eds), Springer-Verlag, New York 2002. p.435.

57. UICC TNM Classification of Malignant Tumors, 6th Ed, Sobin L, Wittekind C (Eds), Wiley-Liss, New York 2002. p.272.
58. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, Postmus PE, Rusch V, Sobin L; International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee; Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol.* 2007 Aug;2(8):706-14.
59. Karnofsky D, Abelmann W, Craver L, Burchenal J. The use of nitrogen mustards in the palliative treatment of carcinoma with particular reference to bronchogenic carcinoma. *Cancer.* 1948;1:634-56.
60. Buccheri G, Ferrigno D, Tamburini M. Karnofsky and ECOG performance status scoring in lung cancer: a prospective, longitudinal study of 536 patients from a single institution. *Eur J Cancer.* 1996 Jun;32A(7):1135-41.
61. NCCN guidelines for NSCLC and SCLC 2012 (<http://www.nccn.org>).
62. Tanvetyanon T, Robinson LA, Schell MJ, Strong VE, Kapoor R, Coit DG, Bepler G. Outcomes of adrenalectomy for isolated synchronous versus metachronous adrenal metastases in non-small-cell lung cancer: a systematic review and pooled analysis. *J Clin Oncol.* 2008 Mar 1;26(7):1142-7. doi: 10.1200/JCO.2007.14.2091.
63. Kvale PA, Simoff M, Prakash UB; American College of Chest Physicians. Lung cancer. Palliative care. *Chest.* 2003 Jan;123(1 Suppl):284S-311S.
64. Groome PA, Bolejack V, Crowley JJ, Kennedy C, Krasnik M, Sobin LH, Goldstraw P; IASLC International Staging Committee; Cancer Research and Biostatistics; Observers to the Committee; Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol.* 2007 Aug;2(8):694-705.
65. Hoang T, Xu R, Schiller JH, Bonomi P, Johnson DH. 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 Jan 1;23(1):175-83.
66. Blackstock AW, Herndon JE 2nd, Paskett ED, Perry MC, Graziano SL, Muscato JJ, Kosty MP, Akerley WL, Holland J, Fleishman S, Green MR. Outcomes among African-American/non-African-American patients with advanced non-small-cell lung carcinoma: report from the Cancer and Leukemia Group B. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Feb 20;94(4):284-90.
67. Stanley KE. Prognostic factors for survival in patients with inoperable lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1980 Jul;65(1):25-32.
68. Feinstein AR. Symptomatic Patterns, biology behavior, and prognosis in cancer of the lung. Practical application of boolean algebra and clinical taxonomy. *Ann Intern Med.* 1964 Jul;61:27-43.

69. Kawaguchi T, Takada M, Kubo A, Matsumura A, Fukai S, Tamura A, Saito R, Maruyama Y, Kawahara M, Ignatius Ou SH. 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 May;5(5):620-30.
70. Sculier JP, Chansky K, Crowley JJ, Van Meerbeeck J, Goldstraw P; International Staging Committee and Participating Institutions. The impact of additional prognostic factors on survival and their relationship with the anatomical extent of disease expressed by the 6th Edition of the TNM Classification of Malignant Tumors and the proposals for the 7th Edition. *J Thorac Oncol*. 2008 May;3(5):457-66.
71. Gail MH, Eagan RT, Feld R, Ginsberg R, Goodell B, Hill L, Holmes EC, Lukeman JM, Mountain CF, Oldham RK Prognostic factors in patients with resected stage I non-small cell lung cancer. A report from the Lung Cancer Study Group. *Cancer*. 1984 Nov 1;54(9):1802-13.
72. [No authors listed]. Postoperative T1 N0 non-small cell lung cancer. Squamous versus nonsquamous recurrences. The Lung Cancer Study Group. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1987 Sep;94(3):349-54.
73. Harpole DH Jr, Herndon JE 2nd, Young WG Jr, Wolfe WG, Sabiston DC Jr. Stage I nonsmall cell lung cancer. A multivariate analysis of treatment methods and patterns of recurrence. *Cancer*. 1995 Sep 1;76(5):787-96.
74. Pairolero PC, Williams DE, Bergstralh EJ, Piehler JM, Bernatz PE, Payne WS. Postsurgical stage I bronchogenic carcinoma: morbid implications of recurrent disease. *Ann Thorac Surg*. 1984 Oct;38(4):331-8.
75. Martini N, Bains MS, Burt ME, Zakowski MF, McCormack P, Rusch VW, Ginsberg RJ. Incidence of local recurrence and second primary tumors in resected stage I lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1995 Jan;109(1):120-9.
76. Lipford EH 3rd, Eggleston JC, Lillemoe KD, Sears DL, Moore GW, Baker RR. Prognostic factors in surgically resected limited-stage, nonsmall cell carcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol*. 1984 May;8(5):357-65.
77. Takise A, Kodama T, Shimosato Y, Watanabe S, Suemasu K. Histopathologic prognostic factors in adenocarcinomas of the peripheral lung less than 2 cm in diameter. *Cancer*. 1988 May 15;61(10):2083-8.
78. Cagini L, Monacelli M, Giustozzi G, Moggi L, Bellezza G, Sidoni A, Bucciarelli E, Darwish S, Ludovini V, Pistola L, Gregorc V, Tonato M Biological prognostic factors for early stage completely resected non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol*. 2000 May;74(1):53-60.
79. Kwiatkowski DJ, Harpole DH Jr, Godleski J, Herndon JE 2nd, Shieh DB, Richards W, Blanco R, Xu HJ, Strauss GM, Sugarbaker DJ. Molecular pathologic substaging in 244 stage I non-small-cell lung cancer patients: clinical implications. *J Clin Oncol*. 1998 Jul;16(7):2468-77.
80. Shields TW. Prognostic significance of parenchymal lymphatic vessel and blood vessel invasion in carcinoma of the lung. *Surg Gynecol Obstet*. 1983 Aug;157(2):185-90.

81. Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Chuanchieh H, Bigini D, Vignati S, Pingitore R, Angeletti CA. Blood vessel invasion by tumor cells predicts recurrence in completely resected T1 N0 M0 non-small-cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993 Jul;106(1):80-9.
82. Ruffini E, Asioli S, Filosso PL, Buffoni L, Bruna MC, Mossetti C, Solidoro P, Oliaro A. Significance of the presence of microscopic vascular invasion after complete resection of Stage I-II pT1-T2N0 non-small cell lung cancer and its relation with T-Size categories: did the 2009 7th edition of the TNM staging system miss something? *J Thorac Oncol.* 2011 Feb;6(2):319-26.
83. Naito Y, Goto K, Nagai K, Ishii G, Nishimura M, Yoshida J, Hishida T, Nishiwaki Y. Vascular invasion is a strong prognostic factor after complete resection of node-negative non-small cell lung cancer. *Chest.* 2010 Dec;138(6):1411-7.
84. Rusch VW, Hawes D, Decker PA, Martin SE, Abati A, Landreneau RJ, Patterson GA, Inculet RI, Jones DR, Malthaner RA, Cohen RG, Ballman K, Putnam JB Jr, Cote RJ. Occult metastases in lymph nodes predict survival in resectable non-small-cell lung cancer: report of the ACOSOG Z0040 trial. *J Clin Oncol.* 2011 Nov 10;29(32):4313-9.
85. Xi L, Coello MC, Litle VR, Raja S, Gooding WE, Yousem SA, El-Hefnawy T, Landreneau RJ, Luketich JD, Godfrey TE. A combination of molecular markers accurately detects lymph node metastasis in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2006 Apr 15;12(8):2484-91.
86. D'Angelo SP, Janjigian YY, Ahye N, Riely GJ, Chaft JE, Sima CS, Shen R, Zheng J, Dycoco J, Kris MG, Zakowski MF, Ladanyi M, Rusch V, Azzoli CG. Distinct clinical course of EGFR-mutant resected lung cancers: results of testing of 1118 surgical specimens and effects of adjuvant gefitinib and erlotinib. *J Thorac Oncol.* 2012 Dec;7(12):1815-22.
87. De Wever W, Ceyssens S, Mortelmans L, Stroobants S, Marchal G, Bogaert J, Verschakelen JA. Additional value of PET-CT in the staging of lung cancer: comparison with CT alone, PET alone and visual correlation of PET and CT. *Eur Radiol.* 2007 Jan;17(1):23-32.
88. Paesmans M, Berghmans T, Dusart M, Garcia C, Hossein-Foucher C, Lafitte JJ, Mascaux C, Meert AP, Roelandts M, Scherpereel A, Terrones Munoz V, Sculier JP; European Lung Cancer Working Party, and on behalf of the IASLC Lung Cancer Staging Project. Primary tumor standardized uptake value measured on fluorodeoxyglucose positron emission tomography is of prognostic value for survival in non-small cell lung cancer: update of a systematic review and meta-analysis by the European Lung Cancer Working Party for the International Association for the Study of Lung Cancer Staging Project. *J Thorac Oncol.* 2010 May;5(5):612-9.
89. Nair VS, Krupitskaya Y, Gould MK. Positron emission tomography 18F-fluorodeoxyglucose uptake and prognosis in patients with surgically treated, stage I non-small cell lung cancer: a systematic review. *J Thorac Oncol.* 2009 Dec;4(12):1473-9.
90. Hoekstra CJ, Stroobants SG, Smit EF, Vansteenkiste J, van Tinteren H, Postmus PE, Golding RP, Biesma B, Schramel FJ, van Zandwijk N, Lammertsma AA, Hoekstra OS. Prognostic relevance of response evaluation using [18F]-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography in patients with locally advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2005 Nov 20;23(33):8362-70.

91. Sugimura H, Nichols FC, Yang P, Allen MS, Cassivi SD, Deschamps C, Williams BA, Pairero PC. Survival after recurrent nonsmall-cell lung cancer after complete pulmonary resection. *Ann Thorac Surg.* 2007 Feb;83(2):409-17; discussion 417-8.
92. Sequist LV, Heist RS, Shaw AT, Fidias P, Rosovsky R, Temel JS, Lennes IT, Digumarthy S, Waltman BA, Bast E, Tammireddy S, Morrissey L, Muzikansky A, Goldberg SB, Gainor J, Channick CL, Wain JC, Gaisert H, Donahue DM, Muniappan A, Wright C, Willers H, Mathisen DJ, Choi NC, Baselga J, Lynch TJ, Ellisen LW, Mino-Kenudson M, Lanuti M, Borger DR, Iafrate AJ, Engelman JA, Dias-Santagata D. Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. *Ann Oncol.* 2011 Dec;22(12):2616-24.
93. Socinski MA. The emerging role of biomarkers in advanced non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2010 May;11(3):149-59.
94. Sudhindra A, Ochoa R, Santos ES. Biomarkers, prediction, and prognosis in non-small-cell lung cancer: a platform for personalized treatment. *Clin Lung Cancer.* 2011 Nov;12(6):360-8.
95. Allen M, Louise Jones J. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Pathol.* 2011 Jan;223(2):162-76.
96. Chan AT, Ogino S, Fuchs CS. Aspirin and the risk of colorectal cancer in relation to the expression of COX-2. *N Engl J Med.* 2007 May 24;356(21):2131-42.
97. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2006 Apr;6(4):295-307.
98. Ferrone C, Dranoff G. Dual roles for immunity in gastrointestinal cancers. *J Clin Oncol.* 2010 Sep 10;28(26):4045-51.
99. Wilke CM, Wu K, Zhao E, Wang G, Zou W. Prognostic significance of regulatory T cells in tumor. *Int J Cancer.* 2010 Aug 15;127(4):748-58.
100. McLean MH, Murray GI, Stewart KN, Norrie G, Mayer C, Hold GL, Thomson J, Fyfe N, Hope M, Mowat NA, Drew JE, El-Omar EM. The inflammatory microenvironment in colorectal neoplasia. *PLoS One.* 2011 Jan 7;6(1):e15366.
101. Finn OJ. Cancer immunology. *N Engl J Med.* 2008 Jun 19;358(25):2704-15.
102. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2004 Jan;4(1):11-22.
103. Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn.* 2008 Jan;10(1):13-27.
104. Ogino S, Stampfer M. Lifestyle factors and microsatellite instability in colorectal cancer: the evolving field of molecular pathological epidemiology. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Mar 17;102(6):365-7.
105. Ogino S, Chan AT, Fuchs CS, Giovannucci E. Molecular pathological epidemiology of colorectal neoplasia: an emerging transdisciplinary and interdisciplinary field. *Gut.* 2011 Mar;60(3):397-411.
106. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjöblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Dezso Z, Ustyanksky V, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Karchin

R, Wilson PA, Kaminker JS, Zhang Z, Croshaw R, Willis J, Dawson D, Shipitsin M, Willson JK, Sukumar S, Polyak K, Park BH, Pethiyagoda CL, Pant PV, Ballinger DG, Sparks AB, Hartigan J, Smith DR, Suh E, Papadopoulos N, Buckhaults P, Markowitz SD, Parmigiani G, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2007 Nov 16;318(5853):1108-13.

107. Nosho K, Baba Y, Tanaka N, Shima K, Hayashi M, Meyerhardt JA, Giovannucci E, Dranoff G, Fuchs CS, Ogino S. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J Pathol*. 2010 Dec;222(4):350-66.

108. Ogino S, Nosho K, Irahara N, Meyerhardt JA, Baba Y, Shima K, Glickman JN, Ferrone CR, Mino-Kenudson M, Tanaka N, Dranoff G, Giovannucci EL, Fuchs CS. Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clin Cancer Res*. 2009 Oct 15;15(20):6412-20.

109. Prall F, Dührkop T, Weirich V, Ostwald C, Lenz P, Nizze H, Barten M. Prognostic role of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in stage III colorectal cancer with and without microsatellite instability. *Hum Pathol*. 2004 Jul;35(7):808-16.

110. Menon AG, Janssen-van Rhijn CM, Morreau H, Putter H, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Fleuren GJ, Kuppen PJ. Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis. *Lab Invest*. 2004 Apr;84(4):493-501.

111. Alexander J, Watanabe T, Wu TT, Rashid A, Li S, Hamilton SR. Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am J Pathol*. 2001 Feb;158(2):527-35.

112. Shia J, Ellis NA, Paty PB, Nash GM, Qin J, Offit K, Zhang XM, Markowitz AJ, Nafa K, Guillem JG, Wong WD, Gerald WL, Klimstra DS. Value of histopathology in predicting microsatellite instability in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*. 2003 Nov;27(11):1407-17.

113. Ogino S, Odze RD, Kawasaki T, Brahmandam M, Kirkner GJ, Laird PW, Loda M, Fuchs CS. Correlation of pathologic features with CpG island methylator phenotype (CIMP) by quantitative DNA methylation analysis in colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2006 Sep;30(9):1175-83.

114. Michel S, Benner A, Tariverdian M, Wentzensen N, Hoefler P, Pommerencke T, Grabe N, von Knebel Doeberitz M, Kloor M. High density of FOXP3-positive T cells infiltrating colorectal cancers with microsatellite instability. *Br J Cancer*. 2008 Dec 2;99(11):1867-73.

115. Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S, Linnebacher M, Kienle P, Knaebel HP, Tariverdian M, Benner A, von Knebel Doeberitz M. Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology*. 2008 Apr;134(4):988-97.

116. Speetjens FM, Lauwen MM, Franken KL, Janssen-van Rhijn CM, van Duikeren S, Bres SA, van de Velde CJ, Melief CJ, Kuppen PJ, van der Burg SH, Morreau H, Offringa R. Prediction of the immunogenic potential of frameshift-mutated antigens in microsatellite instable cancer. *Int J Cancer*. 2008 Aug 15;123(4):838-45.

117. Tougeron D, Fauquembergue E, Rouquette A, Le Pessot F, Sesbouïé R, Laurent M, Berthet P, Mauillon J, Di Fiore F, Sabourin JC, Michel P, Tosi M, Frébourg T, Latouche JB. Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancers with microsatellite instability are correlated with the number and spectrum of frameshift mutations. *Mod Pathol*. 2009 Sep;22(9):1186-95.
118. Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM, Burgart LJ, Smyrk TC, Shimizu D, Waring PM, Ruszkiewicz AR, Pollett AF, Redston M, Barker MA, Baron JA, Casey GR, Dowty JG, Giles GG, Limburg P, Newcomb P, Young JP, Walsh MD, Thibodeau SN, Lindor NM, Lemarchand L, Gallinger S, Haile RW, Potter JD, Hopper JL, Jass JR; Colon Cancer Family Registry. Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology*. 2007 Jul;133(1):48-56.
119. Chirieac LR, Shen L, Catalano PJ, Issa JP, Hamilton SR Phenotype of microsatellite-stable colorectal carcinomas with CpG island methylation. *Am J Surg Pathol*. 2005 Apr;29(4):429-36.
120. Szczepanik AM, Siedlar M, Sierzega M, Goroszeniuk D, Bukowska-Strakova K, Czupryna A, Kulig J. T-regulatory lymphocytes in peripheral blood of gastric and colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol*. 2011 Jan 21;17(3):343-8.
121. Rubin MA, Zerkowski MP, Camp RL, Kuefer R, Hofer MD, Chinnaiyan AM, Rimm DL. Quantitative determination of expression of the prostate cancer protein alpha-methylacyl-CoA racemase using automated quantitative analysis (AQUA): a novel paradigm for automated and continuous biomarker measurements. *Am J Pathol*. 2004 Mar;164(3):831-40.
122. Zimmermann VS, Benigni F, Mondino A. Immune surveillance and anti-tumor immune responses: an anatomical perspective. *Immunol Lett*. 2005 Apr 15;98(1):1-8.
123. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002 Nov;3(11):991-8.
124. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:329-60.
125. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004 Aug;21(2):137-48.
126. Schreiber RD. Cancer vaccines 2004 opening address: the molecular and cellular basis of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Cancer Immun*. 2005 Apr 6;5 Suppl 1:1.
127. Sonoda K, Nakashima M, Kaku T, Kamura T, Nakano H, Watanabe T A novel tumor-associated antigen expressed in human uterine and ovarian carcinomas. *Cancer*. 1996 Apr 15;77(8):1501-9.
128. Nakashima M, Sonoda K, Watanabe T. Inhibition of cell growth and induction of apoptotic cell death by the human tumor-associated antigen RCAS1. *Nat Med*. 1999 Aug;5(8):938-42.
129. Yamaguchi K, Enjoji M, Nakashima M, Nakamuta M, Watanabe T, Tanaka M. Novel serum tumor marker, RCAS1, in pancreatic diseases. *World J Gastroenterol*. 2005 Sep 7;11(33):5199-202.
130. Watanabe T, Inoue S, Hiroi H, Orimo A, Kawashima H, Muramatsu M. Isolation of estrogen-responsive genes with a CpG island library. *Mol Cell Biol*. 1998 Jan;18(1):442-9.

131. Ikeda K, Sato M, Tsutsumi O, Tsuchiya F, Tsuneizumi M, Emi M, Imoto I, Inazawa J, Muramatsu M, Inoue S. Promoter analysis and chromosomal mapping of human EBAG9 gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jul 5;273(2):654-60.
132. Sonoda K, Miyamoto S, Yamazaki A, Kobayashi H, Nakashima M, Mekada E, Wake N. Biologic significance of receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells (RCAS1) as a pivotal regulator of tumor growth through angiogenesis in human uterine cancer. *Cancer*. 2007 Nov 1;110(9):1979-90.
133. Matsushima T, Nakashima M, Oshima K, Abe Y, Nishimura J, Nawata H, Watanabe T, Muta K. Receptor binding cancer antigen expressed on SiSo cells, a novel regulator of apoptosis of erythroid progenitor cells. *Blood*. 2001 Jul 15;98(2):313-21.
134. Sonoda K, Miyamoto S, Hirakawa T, Yagi H, Yotsumoto F, Nakashima M, Watanabe T, Nakano H Invasive potency related to RCAS1 expression in uterine cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2005 Oct;99(1):189-98.
135. Sonoda K, Miyamoto S, Hirakawa T, Yagi H, Yotsumoto F, Nakashima M, Watanabe T, Nakano H Clinical significance of RCAS1 as a biomarker of uterine cancer. *Gynecol Oncol*. 2006 Dec;103(3):924-31.
136. Gabrilovich DI, Nadaf S, Corak J, Berzofsky JA, Carbone DP. Dendritic cells in antitumor immune responses. II. Dendritic cells grown from bone marrow precursors, but not mature DC from tumor-bearing mice, are effective antigen carriers in the therapy of established tumors. *Cell Immunol*. 1996 May 25;170(1):111-9.
137. Iwasaki T, Nakashima M, Watanabe T, Yamamoto S, Inoue Y, Yamanaka H, Matsumura A, Iuchi K, Mori T, Okada M. Expression and prognostic significance in lung cancer of human tumor-associated antigen RCAS1. *Int J Cancer*. 2000 Nov 20;89(6):488-93.
138. Oshikiri T, Miyamoto M, Morita T, Fujita M, Miyasaka Y, Senmaru N, Yamada H, Takahashi T, Horita S, Kondo S Tumor-associated antigen recognized by the 22-1-1 monoclonal antibody encourages colorectal cancer progression under the scanty CD8+ T cells. *Clin Cancer Res*. 2006 Jan 15;12(2):411-6.
139. Han Y, Qin W, Huang G. Knockdown of RCAS1 expression by RNA interference recovers T cell growth and proliferation. *Cancer Lett*. 2007 Nov 18;257(2):182-90.
140. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 23;95(13):7556-61.
141. Coussens LM, Werb Z Inflammation and cancer. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):860-7.
142. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):436-44.
143. Garin-Chesa P, Old LJ, Rettig WJ. Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990 Sep;87(18):7235-9.

144. Sonoda K, Miyamoto S, Nakashima M, Wake N. The biological role of the unique molecule RCAS1: a bioactive marker that induces connective tissue remodeling and lymphocyte apoptosis. *Front Biosci.* 2008 Jan 1;13:1106-16.
145. Sonoda K, Miyamoto S, Yotsumoto F, Yagi H, Nakashima M, Watanabe T, Nakano H. Clinical significance of RCAS1 as a biomarker of ovarian cancer. *Oncol Rep.* 2007 Mar;17(3):623-8.
146. Sonoda K, Miyamoto S, Kobayashi H, Ogawa S, Okugawa K, Taniguchi S, Wake N. The level of RCAS1 expression is inversely correlated with the number of vimentin-positive stromal cells in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2009 Jul;19(5):838-43.
147. Dutsch-Wicherek M. RCAS1, MT, and vimentin as potential markers of tumor microenvironment remodeling. *Am J Reprod Immunol.* 2010 Mar 1;63(3):181-8.
148. Rosenberg SA. The immunotherapy of solid cancers based on cloning the genes encoding tumor-rejection antigens. *Annu Rev Med.* 1996;47:481-91.
149. Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava E, Kosma VM. Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *J Pathol.* 1997 Jul;182(3):318-24.
150. Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, Ohtani H. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998 Aug 15;58(16):3491-4.
151. Giaginis C, Giagini A, Theocharis S. Receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells (RCAS1): a novel biomarker in the diagnosis and prognosis of human neoplasia. *Histol Histopathol.* 2009 Jun;24(6):761-76.
152. Kaku T, Sonoda K, Kamura T, Hirakawa T, Sakai K, Amada S, Ogawa S, Kobayashi H, Nakashima M, Watanabe T, Nakano H. The prognostic significance of tumor-associated antigen 22-1-1 expression in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res.* 1999 Jun;5(6):1449-53.
153. Sonoda K, Kaku T, Hirakawa T, Kobayashi H, Amada S, Sakai K, Nakashima M, Watanabe T, Nakano H. The clinical significance of tumor-associated antigen RCAS1 expression in the normal, hyperplastic, and malignant uterine endometrium. *Gynecol Oncol.* 2000 Dec;79(3):424-9.
154. Tsuneizumi M, Nagai H, Harada H, Kazui T, Emi M. A highly polymorphic CA repeat marker at the EBAG9/RCAS1 locus on 8q23 that detected frequent multiplication in breast cancer. *Ann Hum Biol.* 2002 Jul-Aug;29(4):457-60.
155. Kubokawa M, Nakashima M, Yao T, Ito KI, Harada N, Nawata H, Watanabe T. Aberrant intracellular localization of RCAS1 is associated with tumor progression of gastric cancer. *Int J Oncol.* 2001 Oct;19(4):695-700.
156. Oshikiri T, Hida Y, Miyamoto M, Hashida H, Katoh K, Suzuoki M, Nakakubo Y, Hiraoka K, Shinohara T, Itoh T, Kondo S, Katoh H. RCAS1 as a tumour progression marker: an independent negative prognostic factor in gallbladder cancer. *Br J Cancer.* 2001 Dec 14;85(12):1922-7.

157. Takahashi H, Iizuka H, Nakashima M, Wada T, Asano K, Ishida-Yamamoto A, Watanabe T. RCAS1 antigen is highly expressed in extramammary Paget's disease and in advanced stage squamous cell carcinoma of the skin. *J Dermatol Sci*. 2001 Jun;26(2):140-4.
158. Umeoka K, Sanno N, Oyama K, Tahara S, Kurotani R, Ikuyama S, Nakashima M, Watanabe T, Osamura RY, Teramoto A. Immunohistochemical analysis of RCAS1 in human pituitary adenomas. *Mod Pathol*. 2001 Dec;14(12):1232-6.
159. Rousseau J, Têtu B, Caron D, Malenfant P, Cattaruzzi P, Audette M, Doillon C, Tremblay JP, Guérette B. RCAS1 is associated with ductal breast cancer progression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 May 24;293(5):1544-9.
160. Ikeguchi M, Ohoro S, Maeda Y, Yamaguchi K, Fukuda K, Shirai H, Kondo A, Tsujitani S, Kaibara N. Protein and gene expression of tumor-associated antigen RCAS1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2003 Nov-Dec;10(6):1891-4.
161. Zhou XH, Teng XD, Song WY, Wu YJ. Expression of receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells and estrogen receptor subtypes in the normal, hyperplastic, and carcinomatous endometrium. *Int J Gynecol Cancer*. 2008 Jan-Feb;18(1):152-8.
162. Theoharis S, Klijanienko J, Giaginis C, Rodriguez J, Jouffroy T, Girod A, Tsourouflis G, Sastre-Garau X. RCAS1 expression in mobile tongue squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Med Sci Monit*. 2011 Aug;17(8):BR228-234.
163. Giaginis C, Demetriou N, Alexandrou P, Stolakis V, Delladetsima I, Klijanienko J, Griniatsos I, Theoharis S. Receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells (RCAS1) expression in human benign and malignant thyroid lesions. *Med Sci Monit*. 2012 Apr;18(4):BR123-9.
164. Tsai TC, Yu CH, Cheng SJ, Liu BY, Chen HM, Chiang CP. Expression of RCAS1 is significantly associated with the progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *Oral Oncol*. 2008 Aug;44(8):759-66.
165. Fukuda M, Tanaka A, Hamao A, Suzuki S, Kusama K, Sakashita H. Expression of RCAS1 and its function in human squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oncol Rep*. 2004 Aug;12(2):259-67.
166. Nakakubo Y, Hida Y, Miyamoto M, Hashida H, Oshikiri T, Kato K, Suzuoki M, Hiraoka K, Ito T, Morikawa T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H. The prognostic significance of RCAS1 expression in squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Cancer Lett*. 2002 Mar 8;177(1):101-5.
167. Tsujitani S, Saito H, Oka S, Sakamoto T, Kanaji S, Tatebe S, Ikeguchi M. Prognostic significance of RCAS1 expression in relation to the infiltration of dendritic cells and lymphocytes in patients with esophageal carcinoma. *Dig Dis Sci*. 2007 Feb;52(2):549-54.
168. Kato H, Nakajima M, Masuda N, Faried A, Sohda M, Fukai Y, Miyazaki T, Fukuchi M, Tsukada K, Kuwano H. Expression of RCAS1 in esophageal squamous cell carcinoma is associated with a poor prognosis. *J Surg Oncol*. 2005 May 1;90(2):89-94.
169. Okada K, Nakashima M, Komuta K, Hashimoto S, Okudaira S, Baba N, Hishikawa Y, Koji T, Kanematsu T, Watanabe T. Expression of tumor-associated membrane antigen,

RCAS1, in human colorectal carcinomas and possible role in apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes. *Mod Pathol*. 2003 Jul;16(7):679-85.

170. Leelawat K, Watanabe T, Nakajima M, Tujinda S, Suthipintawong C, Leardkamolkarn V. Upregulation of tumour associated antigen RCAS1 is implicated in high stages of colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 2003 Oct;56(10):764-8.

171. Tsujitani S, Saito H, Honboh T, Ataka M, Tanida T, Makino M, Ikeguchi M. Prognostic significance of receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells (RCAS1) expression in relation to cadherin expression in patients with colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 2007 Aug;50(8):1241-9.

172. Izumi M, Nakanishi Y, Yoshino I, Nakashima M, Watanabe T, Hara N. Expression of tumor-associated antigen RCAS1 correlates significantly with poor prognosis in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 2001 Jul 15;92(2):446-51.

173. Takahashi S, Urano T, Tsuchiya F, Fujimura T, Kitamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S. EBAG9/RCAS1 expression and its prognostic significance in prostatic cancer. *Int J Cancer*. 2003 Sep 1;106(3):310-5.

174. Nakabayashi H, Nakashima M, Hara M, Toyonaga S, Yamada SM, Park KC, Shimizu K. Clinico-pathological significance of RCAS1 expression in gliomas: a potential mechanism of tumor immune escape. *Cancer Lett*. 2007 Feb 8;246(1-2):182-9.

175. Fukuda K, Tsujitani S, Maeta Y, Yamaguchi K, Ikeguchi M, Kaibara N. The expression of RCAS1 and tumor infiltrating lymphocytes in patients with T3 gastric carcinoma. *Gastric Cancer*. 2002;5(4):220-7.

176. Nakamura Y, Yamazaki K, Oizumi S, Nakashima M, Watanabe T, Dosaka-Akita H, Nishimura M. Expression of RCAS1 in human gastric carcinoma: a potential mechanism of immune escape. *Cancer Sci*. 2004 Mar;95(3):260-5.

177. Toyoshima T, Nakamura S, Kumamaru W, Kawamura E, Ishibashi H, Hayashida JN, Moriyama M, Ohyama Y, Sasaki M, Shirasuna K. Expression of tumor-associated antigen RCAS1 and its possible involvement in immune evasion in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2006 Jul;35(6):361-8.

178. Suzuki T, Inoue S, Kawabata W, Akahira J, Moriya T, Tsuchiya F, Ogawa S, Muramatsu M, Sasano H. EBAG9/RCAS1 in human breast carcinoma: a possible factor in endocrine-immune interactions. *Br J Cancer*. 2001 Nov 30;85(11):1731-7.

179. Sonoda K, Miyamoto S, Hirakawa T, Yagi H, Yotsumoto F, Nakashima M, Watanabe T, Nakano H. Association between RCAS1 expression and microenvironmental immune cell death in uterine cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2005 Jun;97(3):772-9.

180. Naito A, Narikiyo M, Yamada Y, Ueno M, Kamada K, Hachisuka T, Yoriki R, Mizuno T, Nakajima Y. A clinical and immunohistochemical study on gastrointestinal mesenchymal tumor (GIMT): RCAS1 as a predictor for recurrence of GIMT. *Oncol Rep*. 2005 Nov;14(5):1127-32.

181. Suzuoki M, Hida Y, Miyamoto M, Oshikiri T, Hiraoka K, Nakakubo Y, Shinohara T, Itoh T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H. RCAS1 expression as a prognostic factor after curative surgery for extrahepatic bile duct carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2002 May;9(4):388-93.

182. Oizumi S, Yamazaki K, Nakashima M, Watanabe T, Hommura F, Ogura S, Nishimura M, Dosaka-Akita H. RCAS1 expression: a potential prognostic marker for adenocarcinomas of the lung. *Oncology*. 2002;62(4):333-9.
183. Giaginis C, Davides D, Zarros A, Noussia O, Zizi-Serbetzoglou A, Kouraklis G, Theocharis S. Clinical significance of tumor-associated antigen RCAS1 expression in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Dig Dis Sci*. 2008 Jun;53(6):1728-34.
184. Aoki T, Inoue S, Imamura H, Fukushima J, Takahashi S, Urano T, Hasegawa K, Ogushi T, Ouchi Y, Makuuchi M. EBAG9/RCAS1 expression in hepatocellular carcinoma: correlation with tumour dedifferentiation and proliferation. *Eur J Cancer*. 2003 Jul;39(11):1552-61.
185. Ikeguchi M, Hirooka Y, Kaibara N. Gene and protein expression of RCAS1 in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res*. 2003 Nov-Dec;23(6D):4967-71.
186. Noguchi K, Enjoji M, Nakamuta M, Nakashima M, Nishi H, Choi I, Taguchi K, Kotoh K, Shimada M, Sugimachi K, Tsuneyoshi M, Nawata H, Watanabe T. Expression of a tumor-associated antigen RCAS1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2001 Jul 26;168(2):197-202.
187. Hiraoka K, Hida Y, Miyamoto M, Oshikiri T, Suzuoki M, Nakakubo Y, Shinohara T, Itoh T, Shichinohe T, Kondo S, Kasahara N, Katoh H. High expression of tumor-associated antigen RCAS1 in pancreatic ductal adenocarcinoma is an unfavorable prognostic marker. *Int J Cancer*. 2002 May 20;99(3):418-23.
188. Akahira JI, Aoki M, Suzuki T, Moriya T, Niikura H, Ito K, Inoue S, Okamura K, Sasano H, Yaegashi N. Expression of EBAG9/RCAS1 is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2004 Jun 1;90(11):2197-202.
189. Coban S, Ozkan H, Köklü S, Yüksel O, Koçkar MC, Akar T, Ormeci N. The utility of serum receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells in gastrointestinal tract cancers. *Can J Gastroenterol*. 2006 Sep;20(9):593-6.
190. Giaginis C, Margeli A, Kouraklis G, Zira A, Tsourouflis G, Theocharis S. Diagnostic and prognostic utility of serum receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells (RCAS1) levels in colon cancer patients. *Int J Biol Markers*. 2009 Apr-Jun;24(2):70-6.
191. Aoe K, Hiraki A, Maeda T, Murakami T, Yamazaki K, Sugi K, Takeyama H. Soluble receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells in pleural fluid: a potential diagnostic marker for malignant pleural effusion. *Chest*. 2004 Oct;126(4):1195-7.
192. Aoe K, Hiraki A, Yamazaki K, Nakamura Y, Murakami T, Maeda T, Nishimura M, Sugi K, Ueoka H. Elevated pleural fluid RCAS1 is a diagnostic marker and outcome predictor in lung cancer patients. *Int J Oncol*. 2006 Jul;29(1):65-72.
193. Hiraki A, Aoe K, Murakami T, Nakamura Y, Yamazaki K, Sueoka N, Taguchi K, Kamei T, Maeda T, Takeyama H, Kishimoto T, Nishimura M, Sugi K. Clinical significance of the expression of tumor-associated antigen, RCAS1, and its soluble protein in pleural fluid in malignant mesothelioma. *Oncol Rep*. 2005 Aug;14(2):357-62.

194. Kohri T, Sugano M, Kawashima O, Saito R, Sakurai S, Sano T, Nakajima T. Prognostic model of stage II non-small cell lung cancer by a discriminant analysis of the immunohistochemical protein expression. *Surg Today*. 2006;36(12):1039-46.
195. Timotheadou E, Skarlos DV, Samantas E, Papadopoulos S, Murray S, Skrickova J, Christodoulou C, Papakostantinou C, Pectasides D, Papakostas P, Kaplanova J, Vrettou E, Karina M, Kosmidis P, Fountzilas G. Evaluation of the prognostic role of a panel of biomarkers in stage IB-IIIa non-small cell lung cancer patients. *Anticancer Res*. 2007 Nov-Dec;27(6C):4481-9.
196. Sargent IL, Borzychowski AM, Redman C: NK cells and human pregnancy-an inflammatory view. *Trends Immunol* 2006; 27:399–404.
197. Yagel S: The developmental role of natural killer cells at the fetal-maternal interface. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 201:344–350.
198. Nakashima M, Sonoda K, Watanabe T: Inhibition of cell growth and induction of apoptotic cell death by the human tumor-associated antigen RCAS1. *Nat Med* 1999; 5:938–942.
199. Ohshima K, Nakashima M, Sonoda K, Kikuchi M, Watanabe T: Expression of RCAS1 and FasL in human trophoblasts and uterine glands during pregnancy: the possible role in immune privilege. *Clin Exp Immunol* 2001; 123:481–486.
200. Wicherek L, Dutsch-Wicherek M, Mak P, Klimek M: The Role of RCAS1 and oxytocinase in immune tolerance during pregnancy. *Fetal Diagn Ther* 2005;20:420–425.
201. Wicherek L, Klimek M, Dutsch-Wicherek M: The level of maternal immune tolerance and fetal maturity. *Neuro Endocrinol Lett* 2005; 26:561–566.
202. Galazka K, Wicherek L, Sikora J, Czekierdowski A, Banas T, Bednarek W, Obrzut B, Blecharz P, Reron A, Kalinka J: RCAs1 decidual immunoreactivity during stillbirth: immune cell presence and activity. *Am J Reprod Immunol* 2008; 60:513–522.
203. Wicherek L, Klimek M, Czekierdowski A, Popiela TJ, Galazka K, Tetlak T, Gilowski A, Dutsch-Wicherek M: The placental RCAS1 expression during stillbirth. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3:24.
204. Wicherek L, Klimek M, Dutsch-Wicherek M, Kolodziejewski L, Skotniczny K: The molecular changes during placental detachment. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 125:171–175.
205. Tskitishvili E, Komoto Y, Kinugasa Y, Kanagawa T, Song M, Mimura K, Tomimatsu T, Kimura T, Shimoya K: Relationship between human tumor-associated antigen RCAS1 and gestational diabetes mellitus. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58:440–446.
206. Tskitishvili E, Komoto Y, Kinugasa Y, Kanagawa T, Song M, Mimura K, Tomimatsu T, Kimura T, Shimoya K: The human tumor-associated antigen RCAS1 in pregnancies complicated by preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2008; 77:100–108.

207. Tskitishvili E, Nakamura H, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Kimura T, Tomimatsu T, Shimoya K: Temporal and spatial expression of tumor-associated antigen RCAS1 in pregnant mouse uterus. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63:137–143.
208. Wicherek L, Basta P, Galazka K, Mak P, Dancewicz L, Kalinka J: RCAS1 decidual immunoreactivity and RCAS1 serum level during cesarean section with respect to the progression of labor. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59:152–158.
209. Wicherek L, Galazka K, Lazar A: RCAS1 decidual immunoreactivity during placental abruption: immune cell presence and activity. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58:46–55.
210. Wicherek L, Basta P, Sikora J, Galazka K, Rytlewski K, Grabiec M, Lazar A, Kalinka J: RCAS1 decidual immunoreactivity in severe pre-eclampsia: immune cell presence and activity. *Am J Reprod Immunol* 2007; 58:358–366.
211. Dutsch-Wicherek M, Wicherek L: The association of RCAS1 serum concentration with the reversibility or irreversibility of the process of immune cytotoxic activity restriction during normal menstrual cycle, cancer relapse, and surgical treatment for various types of squamous cell carcinomas and adenocarcinomas. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59:266–275.
212. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983 Jan 15;31(1):13-20.
213. Rahmanzadeh R, Hüttmann G, Gerdes J, Scholzen T. Chromophore-assisted light inactivation of pKi-67 leads to inhibition of ribosomal RNA synthesis. *Cell Prolif*. 2007 Jun;40(3):422-30.
214. Bullwinkel J, Baron-Lóhr B, Lódemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, Scholzen T, et al. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol* 2006;206(3):624–35.
215. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984 Oct;133(4):1710-5.
216. Martin B, Paesmans M, Mascaux C, Berghmans T, Lothaire P, Meert AP, Lafitte JJ, Sculier JP. Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2004 Dec 13;91(12):2018-25.
217. Jakobsen JN, Sørensen JB. Clinical impact of ki-67 labeling index in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2013 Jan;79(1):1-7.
218. Zola H, Swart B, Banham A, Barry S, Beare A, Bensussan A, Boumsell L, Buckley C, Bühring HJ, Clark G, Engel P, Fox D, Jin BQ, Macardle PJ, Malavasi F, Mason D, Stockinger H, Yang X CD molecules 2006--human cell differentiation molecules. *J Immunol Methods*. 2007 Jan 30;319(1-2):1-5.
219. Chetty R, Gatter K. CD3: structure, function, and role of immunostaining in clinical practice. *J Pathol*. 1994 Aug;173(4):303-7.

220. Wan WH, Fortuna MB, Furmanski P. A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously. *J Immunol Methods*. 1987 Oct 23;103(1):121-9.
221. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998 Jul;4(7):844-7.
222. LeBaron MJ, Crismon HR, Utama FE, Neilson LM, Sultan AS, Johnson KJ, Andersson EC, Rui H. Ultrahigh density microarrays of solid samples. *Nat Methods*. 2005 Jul;2(7):511-3.
223. Schoenberg Fejzo M, Slamon DJ. Frozen tumor tissue microarray technology for analysis of tumor RNA, DNA, and proteins. *Am J Pathol*. 2001 Nov;159(5):1645-50.
224. Li R, Ni J, Bourne PA, Yeh S, Yao J, di Sant'Agnese PA, Huang J. Cell culture block array for immunocytochemical study of protein expression in cultured cells. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005 Mar;13(1):85-90.
225. Montgomery K, Zhao S, van de Rijn M, Natkunam Y. A novel method for making "tissue" microarrays from small numbers of suspension cells. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005 Mar;13(1):80-4.
226. Datta MW, Kahler A, Macias V, Brodzeller T, Kajdacsy-Balla A. A simple inexpensive method for the production of tissue microarrays from needle biopsy specimens: examples with prostate cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005 Mar;13(1):96-103.
227. Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Costa J, Olsen DA, Reiss M. Tissue microarray: a new technology for amplification of tissue resources. *Cancer J*. 2001 Jan-Feb;7(1):24-31.
228. Pozner-Moulis S, Cregger M, Camp RL, Rimm DL. Antibody validation by quantitative analysis of protein expression using expression of Met in breast cancer as a model. *Lab Invest*. 2007 Mar;87(3):251-60.
229. Fergenbaum JH, Garcia-Closas M, Hewitt SM, Lissowska J, Sakoda LC, Sherman ME. Loss of antigenicity in stored sections of breast cancer tissue microarrays. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004 Apr;13(4):667-72.
230. Andersson AC, Strömberg S, Bäckvall H, Kampf C, Uhlen M, Wester K, Pontén F. Analysis of protein expression in cell microarrays: a tool for antibody-based proteomics. *J Histochem Cytochem*. 2006 Dec;54(12):1413-23.
231. Vani K, Sompuram SR, Fitzgibbons P, Bogen SA. National HER2 proficiency test results using standardized quantitative controls: characterization of laboratory failures. *Arch Pathol Lab Med*. 2008 Feb;132(2):211-6.
232. Giltane JM, Rimm DL. Technology insight: Identification of biomarkers with tissue microarray technology. *Nat Clin Pract Oncol*. 2004 Dec;1(2):104-11.
233. Schnitt SJ. Estrogen receptor testing of breast cancer in current clinical practice: what's the question? *J Clin Oncol*. 2006 Apr 20;24(12):1797-9.
234. Rimm DL, Giltane JM, Moeder C, Harigopal M, Chung GG, Camp RL, Burtneess B. Bimodal population or pathologist artifact? *J Clin Oncol*. 2007 Jun 10;25(17):2487-8.

235. Kluger HM, Siddiqui SF, Angeletti C, Sznol M, Kelly WK, Molinaro AM, Camp RL. Classification of renal cell carcinoma based on expression of VEGF and VEGF receptors in both tumor cells and endothelial cells. *Lab Invest*. 2008 Sep;88(9):962-72.
236. Rimm DL. What brown cannot do for you. *Nat Biotechnol*. 2006 Aug;24(8):914-6.
237. Chan JK. Advances in immunohistochemistry: impact on surgical pathology practice. *Semin Diagn Pathol*. 2000 Aug;17(3):170-7.
238. Rosai J. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. 9th Edition vol 1. Edinburg: Mosby, 2004:37-89.
239. Nakane PK, Pierce GB Jr. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem*. 1966 Dec;14(12):929-31.
240. Larsson L. Tissue preparation methods for light microscopic immunohistochemistry. *Appl immunohistochem* 1993;1:2-16.
241. Judkins AR, Montone KT, LiVolsi VA, van de Rijn M. Sensitivity and specificity of antibodies on necrotic tumor tissue. *Am J Clin Pathol*. 1998 Nov;110(5):641-6.
242. Herrera GA. Ultrastructural immunolabeling: a general overview of techniques and applications. *Ultrastruct Pathol*. 1992 Jan-Apr;16(1-2):37-45.
243. Mount SL, Taatjes DJ, von Turkovich M, Tindle BH, Trainer TD. Diagnostic immunoelectron microscopy in surgical pathology: assessment of various tissue fixation and processing protocols. *Ultrastruct Pathol*. 1993 Sep-Oct;17(5):547-56.
244. Chess Q, Hajdu SI. The role of immunoperoxidase staining in diagnostic cytology. *Acta Cytol*. 1986 Jan-Feb;30(1):1-7.
245. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Immunobiology: The immune system in health and disease. 5th edition. New York: Garland Science 2001.
246. Rhoades RA, Pflanzer RG. Human Physiology, 4th ed. Belmont, CA: Brooks/Cole-Thomson Learning. 2003.
247. Putnam FW, Liu YS, Low TL. Primary structure of a human IgA1 immunoglobulin. IV. Streptococcal IgA1 protease, digestion, Fab and Fc fragments, and the complete amino acid sequence of the alpha 1 heavy chain. *J Biol Chem*. 1979 Apr 25;254(8):2865-74.
248. Milstein C. The hybridoma revolution: an offshoot of basic research. *Bioessays*. 1999 Nov;21(11):966-73.
249. Nelson PN, Reynolds GM, Waldron EE, Ward E, Giannopoulos K, Murray PG. Monoclonal antibodies. *Mol Pathol*. 2000 Jun;53(3):111-7.
250. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*. 2005 Jul;42(4):405-26.
251. Javois LC. Immunocytochemical Methods and Protocols. 2nd Ed. Totowa, New Jersey. Humana Press 1999:181-202.

252. Falini B, Taylor CR. New developments in immunoperoxidase techniques and their application. Arch Pathol Lab Med. 1983 Mar;107(3):105-17.
253. Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry. New York: Churchill Livingstone. 2002: 3-44.
254. McCarty KS Jr, Miller LS, Cox EB, Konrath J, McCarty KS Sr. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. Arch Pathol Lab Med. 1985 Aug;109(8):716-21.
255. Gown AM, de Weber N, Battifora H. Microwave based antigenic unmasking: a revolutionary new technique for routine immunohistochemistry. Appl Immunohistochem 1993;1:256-266.
256. Momose H, Mehta P, Battifora H. Antigen retrieval by microwave irradiation in lead thiocyanate. Comparison with protease digestion retrieval. Appl immunohistochem 1993;1:77-82.
257. D'Amico F, Skarmoutsou E, Stivala F. State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. J Immunol Methods. 2009 Feb 28;341(1-2):1-18.
258. Syrbu SI, Cohen MB. An enhanced antigen-retrieval protocol for immunohistochemical staining of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Methods Mol Biol. 2011;717:101-10.