



Εθνικό και Καποδιστριακό  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

“ Νεοπλασματική Νόσος στον Άνθρωπο: Έρευνα και Κλινικοπαθολογοανατομική Προσέγγιση στα Πλαίσια της Εξατομικευμένης Ιατρικής (Διάγνωση και Στοχευμένη Θεραπεία) “

## Τσανतिकίδη Αικατερίνη

*«Αναζήτηση μεταλλαγών σε ελεύθερο κυκλοφορούν DNA σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα»*

### Τριμελής επιτροπή

Σταμάτιος Θεοχάρης

Πηνελόπη Κορκολοπούλου

Αικατερίνη Πολίτη

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
Καρκίνος του πνεύμονα και παράγοντες κινδύνου.....	7
Επιδημιολογία του καρκίνου του πνεύμονα .....	9
Προβλεπόμενη θνησιμότητα εξ' αιτίας του καρκίνου του πνεύμονα μέχρι το 2035. ....	10
Σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα .....	11
ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ .....	13
Θεραπεία και διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα.....	13
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ.....	14
Η ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ .....	15
ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ.....	16
Μοριακό και μορφολογικό προφίλ του καρκίνου του πνεύμονα.....	16
ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΕΚ ΠΛΑΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....	17
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΕΚ ΠΛΑΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....	18
ΝΕΥΡΟΕΝΔΟΚΡΙΝΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ .....	19
Στοχευμένες θεραπείες για EGFR+ καρκίνους του πνεύμονα.....	22
ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ.....	26
Η επίκτητη αντοχή στους πρώτης και δεύτερης γενιάς EGFR TKIs .....	30
Τι είναι η T790M μεταλλαγή και ποιος ο ρόλος της στο καρκίνο του πνεύμονα? .....	31
Εμφάνιση αντίστασης στη θεραπεία με αναστολείς 3 <sup>ης</sup> γενιάς.....	35
EGFR εξαρτώμενοι μηχανισμοί.....	36
EGFR ανεξάρτητοι μηχανισμοί ανάπτυξης αντίστασης στη θεραπεία.....	37



Υγρή βιοψία ή βιοψία από ιστό? .....	38
<b>ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ</b> .....	39
Ελεύθερα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα. (CTCs) .....	40
Circulating Free DNA (cfDNA) .....	41
Εξωσώματα .....	42
Χρήση Ελεύθερου κυκλοφορούντος γενετικού υλικού (cfDNA) για τη διάγνωση του καρκίνου .....	42
Η χρησιμότητα του Ελεύθερου κυκλοφορούντος καρκινικού DNA στο πλάσμα στην κλινική πράξη .....	44
<b>Μέθοδοι και υλικά</b> .....	48
Απομόνωση DNA από ιστό .....	48
Αυτοματοποιημένη απομόνωση DNA από ιστό .....	48
Manual απομόνωση DNA από ιστό .....	49
<b>Διαδικασία απομόνωσης γενετικού υλικού από υγρές βιοψίες ( πλάσμα)</b> .....	51
ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΟΥ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΟΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΑΜΕ .....	52



Cobas EGFR mutation test v2 .....	53
Διαδικασία αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) σε δείγματα ιστού .....	54
<b>Πλάσμα NGS με τη χρήση Oncomine Cell-Free Total Nucleic Acid Research Assay</b> .....	56
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	59
.....	59

<b>Αποτελέσματα της GENEKOR με τη χρήση του cobas® EGFR Mutation Test v2 CE-IVD σε 1138 υγρές βιοψίες ασθενών με ΜΜΚΠ.....</b>	<b>59</b>
.....	61
<b>Cobas® EGFR Mutation Test v2 CE-IVD VS Next Generation Sequencing .....</b>	<b>61</b>
Αποτελέσματα του cobas.....	62
Αποτελέσματα του πλάσμα NGS με τη χρήση Oncomine Cell Free total nucleic acid kit .....	62
.....	63
Σύγκριση των αποτελεσμάτων του NGS σε δείγματα ιστού και πλάσματος. ....	63
<b>Discussion .....</b>	<b>66</b>
Η προσέγγιση της Genekor στον εντοπισμό της T790M. ....	67
ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΕΠΟΜΕΝΗΣ ΓΕΝΙΑΣ ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ, ΙΣΤΟ Ή ΚΑΙ ΣΤΟΥΣ ΔΥΟ ΤΥΠΟΥΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ? .....	70
ΠΟΥ ΩΦΕΙΛΕΤΑΙ Η ΑΣΥΜΦΩΝΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΔΥΟ ΜΕΘΟΔΩΝ (πλάσμα NGS vs NGS ιστού) ? .....	73
Το μέλλον των υγρών βιοψιών. Υγρές βιοψίες και ανοσοθεραπεία. ....	75
Μέτρηση του TMB στο πλάσμα και στον ιστό. Ποια η συμφωνία των αποτελεσμάτων των δυο μεθόδων?..	77
CTCs versus ct DNA analysis.....	79
NCCN GUIDELINES VERSION 4.2019 ( <a href="https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx">https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx</a> ).....	82
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>85</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>88</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ΜΜΚΠ εκτός του ότι είναι ένας από τους πιο θανατηφόρους τύπους όγκων, έχουν ως χαρακτηριστικό την παρουσία αρκετών στοχεύσιμων μεταλλαγών. Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS) είναι μια ισχυρή τεχνολογία που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανίχνευση μεταλλαγών σε γονίδια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες απόκρισης σε θεραπεία, όπως EGFR, ALK, ROS1, BRAF, NTRK1,2 & 3, ERBB2, RET και MET.

1138 υγρές βιοψίες ελέγχθηκαν από το 2016 στο εργαστήριο της Genekor. Πιο συγκεκριμένα, το 19% των δειγμάτων έφερε μεταλλαγές ευαισθητοποίησης του EGFR (Ex19del., P.L858R, p.G719X, p.L861Q, p.S768I), το 1% των δειγμάτων έφερε insensitizing μεταλλαγές (Ex20Ins), στο 8% εντοπίστηκε η μεταλλαγή αντίστασης T790M σε συνδυασμό με άλλες μεταλλαγές ευαισθητοποίησης του EGFR και στο 1% των δειγμάτων είχε ανιχνευθεί μόνο η T790M. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση ασθενών με NSCLC σε υποτροπή της νόσου μετά από τη θεραπεία με EGFR TKIs σε 21 ασθενείς τόσο με χρήση του NGS όσο και του cobas®. Επίσης σε 33 ασθενείς με διαθέσιμη βιοψία ιστού και πλάσματος, ανιχνεύθηκαν συνολικά 20 κλινικά σχετιζόμενες μεταλλάξεις. Από αυτές, οι 13 μεταλλαγές εντοπίστηκαν και στα δύο υλικά, 4 μεταλλαγές ανιχνεύθηκαν μόνο στον ιστό και 3 μεταλλαγές ανιχνεύθηκαν μόνο στο πλάσμα. Τέλος, όπως αποδείχθηκε η συμφωνία αυτών των δύο μεθόδων ήταν 86% ενώ η ειδικότητα και η ευαισθησία ήταν 94,4% και 81,82% αντίστοιχα. Το κύριο πλεονέκτημα του NGS έναντι της μεθόδου του cobas είναι η δυνατότητα μελέτης ενός πολυγονιδιακού πάνελ. Η προσπάθεια εντοπισμού της T790M μεταλλαγής αντίστασης εξαιτίας της πολύ μικρής συχνότητας που είναι παρούσα αποτελεί μια πρόκληση που οδηγεί σε προσπάθειες βελτιστοποίησης για την αύξηση της ευαισθησίας των πειραματικών συνθηκών για την ανίχνευση της p.T790M.

Η συγκεκριμένη μελέτη αποδεικνύει την κλινική χρησιμότητα της ανάλυσης του κυκλοφορούντος νουκλεϊνικού οξέος του όγκου (ctNA) ως υποκατάστατου της βιοψίας από ιστό στην κλινική πράξη για τη λήψη αποφάσεων εξατομικευμένης θεραπείας για ασθενείς με ΜΜΚΠ. Η χρήση νέων ευαίσθητων τεχνικών NGS μπορεί αξιόπιστα να ανιχνεύσει μεταλλάξεις σε υγρή βιοψία και να παρέχει κλινικά σημαντικές πληροφορίες τόσο πριν όσο και μετά από τη χορήγηση στοχευμένης θεραπείας σε ασθενείς με NSCLC. Έτσι, θα μπορούσαν να βοηθηθούν οι κλινικοί ογκολόγοι στη λήψη αποφάσεων όσον αφορά τη χορήγηση της θεραπείας για τους ασθενείς με ΜΜΚΠ.

*Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) except of being one of the most fatal tumor type is also the tumor types with the majority of approved targeted agents available. Next-generation sequencing (NGS) analysis is a robust technology that has been widely used for the detection of mutations in genes that can be used as biomarkers of response to treatment, such as EGFR, ALK, ROS1, BRAF, NTRK1,2 & 3, ERBB2, RET and MET.*

*1138 liquid biopsies had been tested since 2016 in Genekor. Specifically, 19% of the samples had sensitizing mutations of EGFR (Ex19del., P.L858R, p.G719X, p.L861Q, p.S768I), 1% of the samples had insensitizing mutations (Ex20Ins), 8% harbored the T790M resistance mutation in combination with other sensitizing mutations of EGFR and only in the 1% of the samples the T790M only had been detected. Additionally, a comparative analysis of NSCLC patients at relapse following EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor (TKIs) treatment was performed in 21 patients by both the cobas® and NGS platforms. In the 33 patients with concomitant tissue and liquid biopsy available, a total of 20 clinically relevant mutations were detected. Of them, 13 mutations were detected in both materials, 4 mutations were detected in tissue only and 3 mutations were detected in plasma only. Finally, the concordance of these two methods was 86% and the specificity and the sensitivity was 94,4% and 81,82% respectively. The main advantage of NGS over IVD is scalability for type of mutation and target gene.(e.g., the p.C797S resistance mutation ). Challenge of p.T790M detection in patients with acquired resistance to prior EGFR-TKI therapy due to genomic heterogeneity lead to efforts to optimize the experimental conditions to increase the sensitivity of p.T790M detection.*

*This study indicates the feasibility of circulating tumor nucleic acids (ctNA) analysis as a tumor biopsy surrogate in clinical practice for NSCLC personalized treatment decision making. The use of new sensitive NGS techniques can reliably detect tumor-derived mutations in liquid biopsy and provide clinically relevant information both before and after targeted treatment in patients with NSCLC. Thus, it could aid physicians in treatment decision making in clinical practice.*

## Καρκίνος του πνεύμονα και παράγοντες κινδύνου

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την κυριότερη αιτία θανάτου από καρκίνο στις χώρες του Δυτικού κόσμου. Η επίπτωση του στην Ευρωπαϊκή Ένωση είναι 52,5 περιπτώσεις / 100.000 κατοίκους κατά έτος και η θνητότητα 48,7 / 100.000. Η κατά φύλο επίπτωση και θνητότητα είναι: άνδρες 82,5 και 77,0 / 100.000 και γυναίκες 23,9 και 22,3 / 100.000 αντίστοιχα. Ο απόλυτος αριθμός των Ευρωπαίων που πεθαίνουν κάθε χρόνο από καρκίνο του πνεύμονα είναι 375.000 άτομα περίπου. Με την εμφάνιση της νόσου σχετίζεται κυρίως το κάπνισμα καθώς επίσης η έκθεση στο ραδόνιο, επαγγελματικοί, διατροφικοί και γενετικοί παράγοντες. Η επίπτωση του καρκίνου του πνεύμονα αυξήθηκε δραματικά τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες και σήμερα αποτελεί την συχνότερη αιτία θανάτου από νεόπλασμα μεταξύ των ανδρών. Η υιοθέτηση κοινωνικών συμπεριφορών από τις γυναίκες, που μέχρι πριν λίγα χρόνια αποτελούσαν "ανδρικό προνόμιο" και ιδιαίτερα η συνήθεια του καπνίσματος, είχε σαν αποτέλεσμα ο καρκίνος του πνεύμονα από το 1990 να αποτελεί και στις γυναίκες το κυριότερο αίτιο θανάτων από νεόπλασμα, ξεπερνώντας τον καρκίνο του μαστού. Υπολογίζεται ότι 1 στους 10-15 άνδρες και 1 στις 80-90 γυναίκες θα αναπτύξουν καρκίνο του πνεύμονα πριν την ηλικία των 75 ετών.

Η φυσική ιστορία της ανάπτυξης του καρκίνου περιλαμβάνει την έκθεση σε καρκινογόνα με επακόλουθες αλλαγές στο κροσσωτό κυλινδρικό επιθηλιακό κύτταρο και λιγότερο στο βλεννοπαραγωγό (ή καλυκοειδές κύτταρο) που καλύπτει το τραχειοβρογχικό δέντρο και το μετατρέπει σε ένα μεταπλαστικό πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο με ατυπία (4,5). Αυτές οι αλλαγές τελικώς εξελίσσονται σε καρκίνωμα *in situ* και στη συνέχεια σε πραγματική διήθηση από τον όγκο (1,3). Ο καρκίνος του Πνεύμονα είναι δύσκολο να διαγνωσθεί σε πρώιμο στάδιο. Οι ασθενείς επισκέπτονται για πρώτη φορά τον ιατρό με την εμφάνιση των συμπτωμάτων όταν το στάδιο της νόσου είναι ως επί το πλείστον προχωρημένο και έχει σαν συνέπεια μειωμένες θεραπευτικές επιλογές και κακή πρόγνωση. Στα συμπτώματα αυτά περιλαμβάνονται δύσπνοια και συριγμός, χρόνιος επίμονος βήχας (δεν υποχωρεί και επιδεινώνεται), οι επαναλαμβανόμενες κρίσεις βρογχίτιδας και το βράγχος φωνής που οφείλεται στην παράλυση των φωνητικών χορδών, η οποία προκαλείται από διήθηση του παλίνδρομου (λαρυγγικού) νεύρου.

Υπάρχουν δύο κύριες μορφές καρκίνου του πνεύμονα: ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (ΜΚΠ) που είναι σπανιότερος και χαρακτηρίζεται από ταχύτερη ανάπτυξη, συχνότερες μεταστάσεις (υπάρχουν ήδη κατά τη διάγνωση) και ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (ΜΜΚΠ) που είναι συχνότερος και εξελίσσεται με αργότερο ρυθμό. Η αντιμετώπισή τους είναι διαφορετική, έχουν διαφορετική ανάπτυξη, εξάπλωση, εξέλιξη και θεραπεία. Ο μη μικροκυτταρικός (ΜΜΚΠ) αποτελεί συνηθέστερη μορφή καρκίνου του πνεύμονα ευθύνεται για περίπου 80% του συνόλου των καρκίνων του πνεύμονος, και διακρίνεται σε καρκίνωμα από το πλακώδες επιθήλιο, και σε αδενοκαρκίνωμα (που

περιλαμβάνει και το βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα. Τα ΜΚΠ αποτελούν το 20% των πνευμονικών καρκινωμάτων που επάγουν την παραγωγή αυτοκρινών αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι συνιστούν την μοριακή βάση έναρξης της νόσου. Ιδιαίτερη σημασία στην ανάπτυξη και εξέλιξη του ΜΜΚΠ αποδείχθηκε ότι εμφανίζονται οι υποδοχείς της τυροσινικής κινάσης. Τα μικροκυτταρικά καρκινώματα (ΜΚΠ) εμφανίζουν όλα τα χαρακτηριστικά των νευροενδοκρινικών όγκων. Σε αυτά οι μεταλλάξεις του γονιδίου p53 είναι περισσότερο συνήθεις, όπως επίσης και η μεταλλαγή G σε T, πράγμα που σχετίζεται στενά με το κάπνισμα και ποτέ δεν παρατηρείται σε μη καπνιστές. Το screening στον καρκίνο του πνεύμονα αποτελεί αντικείμενο αντιπαράθεσης επί 30 και πλέον έτη.

Θεωρείται ότι ο καρκίνος του πνεύμονα οφείλεται με μεγάλο ποσοστό στην έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, αν και, η ευαισθησία στη νόσο μπορεί να μεταβληθεί ή να μετριαστεί από προστατευτικούς παράγοντες ενός ατόμου. Το κάπνισμα τσιγάρων είναι ο κυριότερος αιτιολογικός παράγοντας. Ενέχεται σε όλους τους τύπους καρκίνου του πνεύμονα, εκτός από τον τύπο του βρογχοκυψελιδικού καρκινώματος. Σε σχεδόν 9 στους 10 ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα, υπάρχει σχέση με το κάπνισμα. Αυξάνεται με τον αριθμό των τσιγάρων και τη χρονική διάρκεια που ένα άτομο καπνίζει. Η δράση του καπνίσματος, είτε σε ενεργητικούς είτε σε παθητικούς, σχετίζεται με την τροποποίηση γενετικών παραγόντων του ατόμου (ένζυμα κυτοχρώματος, γλουταθειονική τρανσφεράση κ.α.) με αποτέλεσμα την αδρανοποίησή τους και την άρση της προστασίας τους προς το άτομο. Σε άτομα με μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα παρατηρείται μετάλλαξη των ογκοκατασταλτικών ογκογονιδίων (p53 και Rb) και διέγερση κυτταρικών ογκογονιδίων (K-ras, c-myc και c-raf). Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου πνεύμονα ελαττώνεται, αν κανείς διακόψει το κάπνισμα. Καρκίνο του πνεύμονα προκαλούν επίσης το κάπνισμα πούρων ή πίπας. Η εισπνοή καπνού από το περιβάλλον, το λεγόμενο "παθητικό κάπνισμα", προκαλεί ετησίως 3.000 θανάτους από καρκίνο του πνεύμονα στις ΗΠΑ. (2) Άλλοι παράγοντες που φαίνεται να συσχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα είναι η επαγγελματική έκθεση σε διάφορα υλικά (πίσσα, αιθάλη και μέταλλα όπως αρσενικό και χρώμιο), οικοδομικά υλικά (άλατα πυριτίου και αμίαντο), ακτινοβολία (ραδιενεργό σκόνη, ραδόνιο, ακτίνες-X και ακτίνες γάμμα). Άλλοι παράγοντες είναι η ατμοσφαιρική ρύπανση (λόγω κυκλοφορίας - κυρίως λόγω των καυσαερίων από τις εξατμίσεις μηχανών ντίζελ και άλλων καρκινογόνων που μεταφέρονται με τον αέρα), η ρύπανση εσωτερικών χώρων (που προκαλείται από τις καύσεις για θέρμανση και μαγείρεμα και είναι ιδιαίτερα σημαντική στις φτωχότερες χώρες). Άτομα που έχουν οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του πνεύμονα, έχουν επίσης περισσότερες πιθανότητες να παρουσιάσουν τη νόσο.



## Επιδημιολογία του καρκίνου του πνεύμονα

Τις τελευταίες δεκαετίες, η επίπτωση του αδενοκαρκινώματος των πνευμόνων έχει αυξηθεί ταχύτερα από τον εκ πλακωδών κυττάρων καρκίνο στους άνδρες και ειδικά στις γυναίκες. Το αδενοκαρκίνωμα έχει γίνει ο συνηθέστερος ιστολογικός τύπος καρκίνου διαγνωσμένο σε όλο τον κόσμο από το 2004, σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία της WHO ( Οργάνωση Παγκόσμιας Υγείας ). Αυτή η τάση πιθανώς σχετίζεται με την αυξανόμενη χρήση καπνού ή του καπνού των σύγχρονων φιλτραρισμένων τσιγάρων. Ο υποτύπος του αδενοκαρκινώματος έχει γίνει ο συχνότερος ιστολογικός τύπος όχι μόνο για τους μη καπνιστές, αλλά και για τους καπνιστές.

Η παγκόσμια γεωγραφική κατανομή του καρκίνου του πνεύμονα παρουσιάζει έντονη περιφερειακή διαφοροποίηση. Στους άνδρες, τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης παρατηρούνται στην Κεντρική και Ανατολική Ευρώπη (53 ανά 100.000 άτομα) και την Ανατολική Ασία (50.4 ανά 100.000 άτομα). Χαρακτηριστικά χαμηλά ποσοστά επίπτωσης παρατηρείται στη Μέση και Δυτική Αφρική (2,0 και 1,7 ανά 100,000, αντίστοιχα) Στις γυναίκες, τα ποσοστά επίπτωσης είναι γενικά χαμηλότερα και το γεωγραφικό μοτίβο είναι λίγο διαφορετικό, αντανακλώντας κυρίως την διαφορετική ιστορική έκθεση στο κάπνισμα. Έτσι, τα εκτιμώμενα ποσοστά στη Βόρεια Αμερική (33,8) και στη Βόρεια Ευρώπη (23,7) με ένα σχετικά υψηλό ποσοστό στην Ανατολική Ασία (19,2) και τα χαμηλότερα ποσοστά και πάλι στη Δυτική και την Ασία Μέση Αφρική (1,1 και 0,8 αντίστοιχα).

Τα ποσοστά εμφάνισης και θνησιμότητας του καρκίνου του πνεύμονα διαφέρουν επίσης ανά εθνικότητα. Το 2012, η μαύρη φυλή των Αμερικανών εμφάνισαν τα υψηλότερα ποσοστά επίπτωσης 62 ανά 100.000 και την υψηλότερη θνησιμότητα με ποσοστό 48,4 ανά 100.000. Οι ισπανόφωνοι εμφάνισαν χαμηλότερο ποσοστό 28 ανά 100.000 και ποσοστό θνησιμότητας 19,4 ανά 100.000.

Table 1 Lung cancer mortality in 2012 by regions

Region	Males				Females			
	Number	Crude rate	ASR (W)	%	Number	Crude rate	ASR (W)	%
World	1,098,702	30.9	30.0	100	491,223	14.0	11.1	100
More developed regions	416,711	68.8	36.8	38	209,859	32.8	14.3	43
Less developed regions	681,991	23.1	27.2	62	281,364	9.8	9.8	57
Africa region	10,522	2.4	5.0	1	5,586	1.3	2.3	1
Americas region	149,462	31.7	25.9	14	112,852	23.4	15.9	23
East Mediterranean region	22,759	7.1	11.3	2	6,218	2.0	2.9	1
Europe region	283,324	64.8	40.3	26	104,879	22.5	11.3	21
South-East Asia region	104,264	11.0	14.2	9	41,952	4.6	5.2	9
Western Pacific region	528,212	55.9	43.3	48	219,708	24.5	15.4	45
Europe	254,706	71.2	39.8	100	99,142	25.8	11.8	100
Central and Eastern Europe	95,692	69.5	47.6	38	26,299	16.9	8.3	27
Northern Europe	29,606	60.0	29.7	12	22,865	44.9	19.1	23
Southern Europe	61,345	79.2	39.1	24	18,288	22.8	10.0	18
Western Europe	68,063	73.2	35.2	27	31,690	32.7	14.8	32
European Union (EU-28)	185,589	74.7	37.7	73	82,111	31.7	14.1	83

Εικόνα 1: Θνησιμότητα εξ' αιτίας του καρκίνου του πνεύμονα ανά περιοχή το 2012. (1)

WHO Africa Region → AFRO

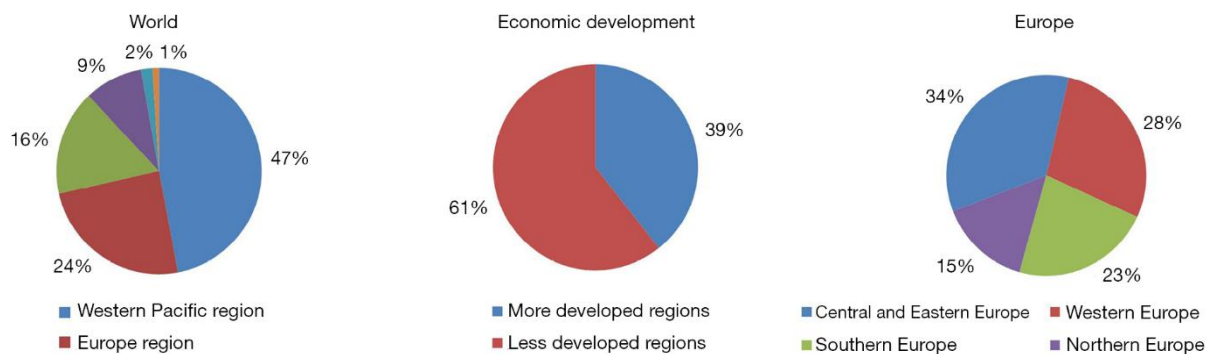
WHO Americas Region → PAHO

WHO East Mediterranean region → EMRO

WHO Europe region → EURO

WHO South-East Asia region → SEARO

WHO Western Pacific region → WPRO



Η υψηλότερη θνησιμότητα από καρκίνο του πνεύμονα παρατηρείται στις χώρες WPRO (ASR 43.3 / 105 για άνδρες, 15.4 / 105 για γυναίκες), στην Ευρώπη (40.3 / 105 για γυναίκες και 11.3 / 105 για άνδρες ) και στις γυναίκες σε PAHO (15.5 / 105) . Σχεδόν το 75% των θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα στους άνδρες και άνω του 80% στις γυναίκες στην Ευρώπη σημειώθηκε στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, μεταξύ των οποίων η πλειοψηφία (38% για τους άνδρες και 27% για τις γυναίκες) στην Κεντρική και Ανατολική Ευρώπη. Στις χώρες αυτές παρατηρείται επίσης η υψηλότερη θνησιμότητα από καρκίνο του πνεύμονα στους άνδρες (47,6 / 105). Η μεγαλύτερη θνησιμότητα από καρκίνο του πνεύμονα στις γυναίκες παρατηρείται στη Βόρεια και τη Δυτική Ευρώπη, με τα υψηλότερα ποσοστά στη Δανία (43/105), την Ολλανδία (36/105) και το Ηνωμένο Βασίλειο. (1)

## Προβλεπόμενη θνησιμότητα εξ' αιτίας του καρκίνου του πνεύμονα μέχρι το 2035.

Ο αριθμός των θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα παγκοσμίως θα αυξηθεί από 1,6 εκατομμύρια το 2012 σε 3 εκατομμύρια το 2035. Ο αριθμός των θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα σχεδόν διπλασιάζεται τόσο στους άνδρες (1,1 εκατομμύρια το 2012 σε 2,1 εκατομμύρια το 2035) όσο και στις γυναίκες (0,5 εκατομμύρια το 2012 σε 0,9 το 2035) και ο αριθμός των θανάτων από καρκίνο του

πνεύμονα θα συνεχίσει να παραμένει διπλάσιος από αυτόν των γυναικών. Εκτιμάται ότι περίπου το 50% των θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα παγκοσμίως θα εμφανιστεί σε WPRO, 20% σε EURO, 17% σε PAHO και 10% σε SEARO. Σε EMRO και AFROs θα υπάρξει περίπου 1-2% των θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα παγκοσμίως (Πίνακας 2). Εκτιμάται ότι μέχρι το 2035 ο αριθμός των θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα θα αυξηθεί συνολικά κατά 86% (σε σύγκριση με το 2012). Η αύξηση προβλέπεται σε όλες τις περιοχές αλλά η κλίμακα της είναι διαφορετική. Η χαμηλότερη αύξηση προβλέπεται για την Ευρώπη (37%). Σε λίγες περιοχές ο αριθμός των θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα προβλέπεται να διπλασιαστεί (WPRO κατά 97%, PAHO κατά 91%, SEARO κατά 95%). Σε EMRO (123%) και AFRO (108%) η αύξηση προβλέπεται να είναι η υψηλότερη.

Table 2 Predicted number of lung cancer deaths by region

Year	World	WPRO	SEARO	EURO	EMRO	PAHO	AFRO
2012	1,589,925	747,920	146,216	388,203	28,977	262,314	16,108
2015	1,732,185	837,333	159,277	407,619	31,317	287,764	17,355
2020	1,977,806	963,402	185,970	437,379	37,160	334,830	20,201
2025	2,275,048	1,125,058	216,576	469,413	44,544	388,657	23,756
2030	2,613,121	1,313,548	249,943	501,229	53,704	445,610	28,157
2035	2,952,063	1,475,602	284,518	530,257	64,477	501,860	33,534
% of total world number	100	50	10	18	2	17	1

WPRO, Western Pacific region; SEARO, South-East Asia region; EURO, Europe region; EMRO, Europe East Mediterranean region; PAHO, Americas region; AFRO, Africa region.

Εικόνα 2: Προβλεπόμενη θνησιμότητα του καρκίνου του πνεύμονα στο μέλλον ανά περιοχή. (1)

## Σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα

### Πρωτοπαθής όγκος (T)

Tx Δεν μπορεί να εκτιμηθεί, θετικές κυτταρολογικές πτυέλων χωρίς εμφανή εστία

T0 Χωρίς απόδειξη όγκου

Tis Ενδοεπιθηλιακός (in situ)

T1 Όγκος ≤ 3εκ. περιγεγραμμένος από υπεζωκότα, χωρίς διήθηση κεντρικότερα στελεχιαίου βρόγχου

T1a Όγκος ≤ 2εκ. στη μεγαλύτερη διάμετρο

T2b Όγκος > 2εκ. αλλά ≤ 3εκ. στη μεγαλύτερη διάμετρο

T2 Όγκος > 3εκ., διηθεί τον βασικό βρόγχο αλλά ≥ 2εκ. από την τρόπιδα, διηθεί τον υπεζωκότα, σχετίζεται με ατελεκτασία που φθάνει στην πύλη αλλά δεν περιλαμβάνει όλο τον πνεύμονα

T2a Όγκος > 2εκ. αλλά μικρότερος από 5εκ. στη μεγαλύτερη διάμετρο

T2b Όγκος > 5εκ. αλλά < 7εκ. στη μεγαλύτερη διάμετρο

T3 Όγκος οποιοδήποτε μεγέθους ο οποίος διηθεί το θωρακικό τοίχωμα, διάφραγμα, μεσοθωρακικό υπεζωκότα, περικάρδιο, βασικό βρόγχο < 2εκ. από την τροπίδα χωρίς να την διηθεί, αποφρακτική ατελεκτασία όλου του πνεύμονα

T4 Όγκος οποιοδήποτε μεγέθους που διηθεί μεσοθωράκιο, καρδιά, μεγάλα αγγεία, τραχεία, οισοφάγο σπονδύλους, τροπίδα· ύπαρξη κακοήθους πλευριτικής, ή περικαρδικής συλλογής ή δορυφορικοί όγκοι στον ομόπλευρο πνεύμονα

#### Περιοχικοί λεμφαδένες (N)

N<sub>x</sub> Δεν μπορούν να εκτιμηθούν

N<sub>0</sub> Χωρίς μεταστάσεις

N<sub>1</sub> Μεταστάσεις στους ομόπλευρους περιβρογχικούς, πυλαίους και ενδοπνευμονικούς αδένες

N<sub>2</sub> Μετάσταση στους ομόπλευρους μεσοθωρακικούς και / ή υποτροπιδικούς

N<sub>3</sub> Μετάσταση στους ετερόπλευρους μεσοθωρακικούς, πυλαίους, ομόπλευρους ή ετερόπλευρους σκαληνούς, υπερκλείδιους

#### Απομακρυσμένες μεταστάσεις (M)

M<sub>x</sub> Δεν μπορεί να εκτιμηθεί

M<sub>0</sub> Χωρίς μεταστάσεις

M<sub>1</sub> Με μεταστάσεις

M<sub>1a</sub> Ξεχωριστή οζώδης αλλοίωση σε ομόπλευρο λοβό και υπεζωκοτικά οζίδια ή κακοήθης πλευριτική ή περικαρδιακή συλλογή

M<sub>1b</sub> Απομακρυσμένες μεταστάσεις

<b>Προτεινόμενο σύστημα σταδιοποίησης TNM (7<sup>η</sup> έκδοση)</b>			
Λανθάνον καρκίνωμα	T <sub>x</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Στάδιο 0	T <sub>is</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Στάδιο IA	T <sub>1a,b</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Στάδιο IB	T <sub>1a,b</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>2a</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>2b</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
Στάδιο IIB	T <sub>2b</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>3</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>
Στάδιο IIIA	T <sub>1</sub> , T <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>3</sub>	N <sub>1</sub> , N <sub>2</sub>	M <sub>0</sub>

	T <sub>4</sub>	N <sub>0</sub> , N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>
Στάδιο IIIB	T <sub>4</sub> Όλα τα T	N <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	M <sub>0</sub> M <sub>0</sub>
Στάδιο IV	Όλα τα T	Όλα τα N	M <sub>1a,b</sub>

(2)

## ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Τα συμπτώματα του καρκίνου του πνεύμονα εντάσσονται σε ομάδες ανάλογα με το αν αφορούν το πάσχον όργανο και μόνο ή αποτελούν γενικότερες παθολογικές εκδηλώσεις. Έτσι ο καρκίνος του πνεύμονα εκδηλώνεται:

- ✓ Ως ασυμπτωματικός (τυχαίο ακτινολογικό εύρημα 5%).
- ✓ Με γενικευμένα μη ειδικά συμπτώματα και σημεία (απώλεια βάρους, κακουχία, πυρετός).
- ✓ Με συμπτώματα που οφείλονται σε τοπική ενδοπνευμονική ανάπτυξη (βήχας, αιμόφυρτα πτύελα, υποτροπιάζουσες πνευμονικές λοιμώξεις κ.α.)
- ✓ Συμπτώματα και σημεία που οφείλονται σε διήθηση του υπεζωκότα και του θωρακικού τοιχώματος (πλευριτικού τύπου πόνος, υπεζωκοτική συλλογή οστικά άλγη κ.α.).
- ✓ Συμπτώματα και σημεία που οφείλονται σε κατάληψη του μεσοθωρακίου (σύνδρομο άνω κοίλης φλέβας βράγχος φωνής, αρρυθμία, περικαρδίτιδες κ.α.).
- ✓ Συμπτώματα που οφείλονται σε μεταστάσεις
- ✓ Κλινικά σύνδρομα με ενδοκρινικές και νευρολογικές εκδηλώσεις

## Θεραπεία και διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα

Λόγω απουσίας ειδικών συμπτωμάτων, οι περισσότεροι καρκίνοι του πνεύμονα εντοπίζονται τυχαία κατά τη διάρκεια των ακτινολογικών εξετάσεων που πραγματοποιήθηκαν για άλλους λόγους. Υπάρχουν αρκετές δοκιμές απεικόνισης για να επιβεβαιώσουμε ή να αποκλείσουμε τη διάγνωση. Αυτές οι εξετάσεις περιλαμβάνουν ακτινογραφία θώρακος, υπολογιστική τομογραφία (CT), μαγνητική τομογραφία (MRI) ή τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PETScan). Η απλή ακτινογραφία του θώρακα είναι εκείνη που θα θέσει τη διάγνωση ή την σοβαρή υποψία για την ύπαρξη της νόσου σε συμπτωματικούς ασθενείς. Μπορεί να είναι διαγνωστική, μπορεί όμως να προβληματίσει από έμμεσα στοιχεία (πλευριτική συλλογή, ατελεκτασία, διεύρυνση πυλών, κ.λ.π.).

Η υπολογιστική τομογραφία του θώρακα είναι η εξέταση που θέτει απεικονιστικά την διάγνωση (απαιτείται όμως πάντοτε ιστολογική επιβεβαίωση) και προσδιορίζει την έκταση της νόσου ενδοθωρακικά. Για την πλήρη όμως σταδιοποίηση της νόσου (έλεγχος για ύπαρξη εξωθωρακικών μεταστάσεων) απαιτούνται επίσης αξονικές τομογραφίες εγκεφάλου άνω και κάτω κοιλίας και επί κλινικών συμπτωμάτων (οστικά άλγη, κατάγματα) σπινθηρογράφημα οστών με τεχνήτιο και γ-camera. Η μαγνητική τομογραφία έχει περιορισμένες ενδείξεις στον θώρακα (περιπτώσεις που δεν πρέπει να ακτινοβοληθεί ο ασθενής – νεαρή ηλικία, κύηση – περιπτώσεις αντένδειξης, χορήγησης ιωδιούχων σκευασμάτων, έλεγχος της σχέσης του όγκου με τα αγγεία των πυλών και ενδεχόμενη διήθησή τους). Η ποζιτρονική τομογραφία (PET) – μέθοδος καταγραφής των βιοχημικών διεργασιών σε διάφορα όργανα που στηρίζεται στη χορήγηση ραδιοισοτόπου σημασμένης γλυκόζης (18 – FDG) που εκπέμπει ποζιτρόνια – δίνει πολύ σημαντικές πληροφορίες για την διήθηση των λεμφαδένων του μεσοθωρακίου, προσδιορίζει απόλυτα ενδεχόμενες επινεφριδιακές μεταστάσεις και βοηθάει στο σχεδιασμό της ακτινοθεραπείας. Τέλος η παρακέντηση της μάζης υπό CT έλεγχο έχει περιορισμένες ενδείξεις ιδίως σε επιβαρυσμένους ασθενείς με περιορισμένες αναπνευστικές εφεδρείες.

## ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Σύμφωνα με την επισυναπτόμενη σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα όπως αυτή έχει τροποποιηθεί πρόσφατα, το στάδιο της νόσου είναι εκείνο που καθορίζει την ένδειξη και την δυνατότητα χειρουργικής επέμβασης. Έτσι με βάση το στάδιο υποψήφιοι για χειρουργική αντιμετώπιση είναι οι ασθενείς των σταδίων I και II και από τους ασθενείς του σταδίου III οι ασθενείς σταδίου IIIA της υπο-ομάδας T3N1M0. Πρόσφατα υποψήφιοι για χειρουργική αντιμετώπιση θεωρούνται και ορισμένοι επιλεγμένοι ασθενείς σταδίου IV με μονήρεις μεταστάσεις στον εγκέφαλο ή το επινεφρίδιο.

Εκτός από το στάδιο της νόσου, καθοριστικό ρόλο για την επιλογή ασθενών για χειρουργική επέμβαση διαδραματίζουν τυχόν συνυπάρχοντα προβλήματα υγείας και ιδιαιτέρως ή κατάσταση της αναπνευστικής και της καρδιακής λειτουργίας. Για την αξιολόγηση των ασθενών αυτών απαιτείται πλήρης μελέτη της αναπνευστικής λειτουργίας με σπιρομέτρηση (προσδιορισμό της FEV1 και ενδεχομένως υπολογισμό της μετεγχειρητικής FEV1) αέρια αίματος, διάχυση (αν απαιτείται) και δοκιμασία κόπωσης. Επίσης ο πλήρης έλεγχος της κατάστασης της καρδιακής λειτουργίας περιορίζει τον περιεγχειρητικό κίνδυνο.

Οι επεμβάσεις που εκτελούνται σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα είναι:

#### A. Μείζονες θωρακικές επεμβάσεις

- Λοβεκτομή
- Πνευμονεκτομή
- Εκτομές πνευμονικού παρεγχύματος με βρογχοπλαστική και αγγειοπλαστική (sleeve εκτομές)
- Εκτεταμένες εκτομές με συναφαίρεση τμημάτων άλλων ανατομικών σχηματισμών (θωρακικό τοίχωμα, διάφραγμα, περικάρδιο τραχεία κ.λ.π.)

#### B. Ελάσσονες θωρακικές επεμβάσεις

- Σφηνοειδής εκτομή
- Τμηματεκτομή

Οι ελάσσονες θωρακικές επεμβάσεις και ορισμένες επιλεγμένες λοβεκτομές είναι δυνατόν να εκτελεσθούν και θωρακοσκοπικά.

Σε τοπικά εκτεταμένα νεοπλάσματα είναι απαραίτητη η χειρουργική σταδιοποίηση (μεσοθωρακοσκόπηση, θωρακοσκόπηση, πρόσθια μεσοθωρακοτομή) για τον ακριβή προσδιορισμό της έκτασης της νόσου και τον μη αποκλεισμό ασθενών από την χειρουργική θεραπεία.

Η εισαγωγική θεραπεία σε εκτεταμένα νεοπλάσματα (neo adjuvant) βοηθεί σε ορισμένες περιπτώσεις σε υποσταδιοποίηση της νόσου και καθιστά χειρουργήσιμους ορισμένους αρχικά ανεγχείρητους ασθενείς.

Τέλος σε περιπτώσεις εκτεταμένης νόσου με πλευριτική συλλογή η θωρακοσκόπηση με περιοχική αναισθησία και η θωρακοσκοπική πλευρόδεση με τάλκη (αφού ελεγχθεί και τυχόν σύνδρομο παγιδευμένου πνεύμονα) ελαχιστοποιούν το αναπαραγόμενο πλευριτικό υγρό και βελτιώνουν σημαντικά την ποιότητα ζωής των ασθενών (ασθενείς ελεύθεροι υποτροπής πλευριτικής συλλογής μετά θωρακοσκοπική πλευρόδεση με τάλκη > 95% για χρονικό διάστημα 3-6 μηνών).

## Η ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Σε ασθενείς σταδίου I και II όπου η χειρουργική εξαίρεση είναι η ενδεικνυόμενη θεραπεία η ακτινοθεραπεία επιφυλάσσεται για τους ασθενείς εκείνους που λόγω πτωχής αναπνευστικής λειτουργίας αδυνατούν να χειρουργηθούν. Η χορήγηση ριζικής ακτινοθεραπείας (50-60 Gy) επιφέρει ανταπόκριση σε ποσοστό 35-60%. Η ακτινοθεραπεία χρησιμοποιείται μετεγχειρητικά ύστερα από ριζική εκτομή σε ασθενείς με τοπικά εκτεταμένη νόσο με σκοπό την μείωση της τοπικής υποτροπής και την παράταση της επιβίωσης. Ο συνδυασμός χήμειο- και ακτινοθεραπείας έχει θέση και στην υποσταδιοποίηση ασθενών με εκτεταμένη νόσο με αποτέλεσμα οι ασθενείς αυτοί να χειρουργούνται στην συνέχεια και να επιτυγχάνεται μεγαλύτερος χρόνος ελεύθερος νόσου και επιβίωσης. Τέλος η ακτινοθεραπεία έχει σημαντική θέση στον έλεγχο τοπικά εκτεταμένης νόσου αλλά και των απομακρυσμένων μεταστάσεων κυρίως οστικών (έλεγχος συμπτωμάτων

όπως βήχας, αιμόπτυση, απόχρεμψη αλλά και των οστικών αλγών και της νευρολογικής συμπτωματολογίας).

## ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

α. ΧΕΙΡΟΥΡΓΗΣΙΜΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΣ (συμπληρωματική χημειοθεραπεία)

Τα πρόσφατα δεδομένα συνηγορούν ότι παρατηρήθηκε σταθερά όφελος στην επιβίωση από χημειοθεραπεία με πλατινούχους συνδυασμούς.

β. ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ (στάδια IIIB-IV)

Οι πλέον δραστικοί και συχνότερα χρησιμοποιούμενοι παράγοντες στην καθημερινή κλινική πράξη είναι:

1. Πλατινούχα παράγωγα (σισπλατίνη, καρμποπλατίνη)
2. Ταξάνες (πακλιταξέλη, δοσεταξέλη)
3. Βινορελμπίνη
4. Γεμισταμπίνη
5. Πεμετρεξάτη
6. Καμπτοθεκίνες (ιρινοτεκάνη κυρίως μόνο στην Ιαπωνία)

Τα χορηγούμενα χημειοθεραπευτικά σχήματα αποτελούνται από συνδυασμό δύο φαρμάκων ένα από τα οποία είναι πλατινούχο. Συνήθως οι περισσότεροι ασθενείς ανταποκρίνονται και παρατηρούνται σημαντικά μεσοδιαστήματα ελεύθερα νόσου

## Μοριακό και μορφολογικό προφίλ του καρκίνου του πνεύμονα

Στη σημερινή εποχή το κόστος που καταβάλλεται και ο χρόνος που απαιτείται για την αλληλούχιση του γονιδιώματος κατέστησε δυνατή την εξέταση ογκογόνων γενετικών μεταβολών και επιγενετικών ανωμαλιών σε έναν ασθενή. Το ποσοστό θνησιμότητας του καρκίνου του πνεύμονα είναι το υψηλότερο μεταξύ όλων των καρκίνων παγκοσμίως.

Ο εντοπισμός μεταλλαγών στο γονίδιο του EGFR καθώς και πιθανές αναδιατάξεις στο ALK γονίδιο επιτρέπουν στον ογκολόγο τη χορήγηση στοχευμένων θεραπειών επιδεικνύοντας δραματικές κλινικές επιδράσεις σε σύγκριση με τη συμβατική κυτταροτοξική χημειοθεραπεία. Σύμφωνα με την TCGA βάση δεδομένων (The Cancer Genome Atlas) και μιας πληθώρας μελετών έχει πραγματοποιηθεί διαχωρισμός των υποτύπων του καρκίνου του πνεύμονα βάση του μοριακού προφίλ του όγκου.



## ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΕΚ ΠΛΑΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Το αδενοκαρκίνωμα είναι πλέον ο κύριος ιστολογικός τύπος, που αντιπροσωπεύει σχεδόν το ήμισυ όλων των περιπτώσεων. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας του 2015 υιοθέτησε την ταξινόμηση που πρόσφατα ανέπτυξε η Διεθνής Ένωση για τη Μελέτη του Καρκίνου του Πνεύμονα, της Αμερικανικής Θωρακικής Εταιρείας και της Ευρωπαϊκής Αναπνευστικής Εταιρείας.

Το αδενοκαρκίνωμα χαρακτηρίζεται από την παρουσία αδενικών σχηματισμών καθώς και από την κυτταροπλασματική βλέννα ενώ το καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων χαρακτηρίζεται από την παρουσία κερατινοποιημένων περιοχών. Η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας έχει συνεισφέρει σημαντικά στη διαφοροδιάγνωση αυτών των δύο τύπων καρκίνου. Πιο συγκεκριμένα η υπερέκφραση της TTF1 και της Napsin A συνηγορούν με αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα, ενώ η υπερέκφραση των p40 και Cytokeratin 5/6 με καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων.

### ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟ ΑΔΕΝΟΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Το αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα αποτελεί τον συχνότερο υπότυπο, παρουσιάζει περιφερική εντόπιση και διαχωρίζεται στο ενδοεπιθηλιακό και στο μικροδιηθητικό καρκίνωμα. Το διηθητικό αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα διαχωρίζεται περαιτέρω στις παρακάτω υποκατηγορίες: α) lipidic, β). Κυψελιδώδες, γ). θηλώδες, δ). Μικροθηλώδες, ε). Συμπαγές, στ). βλεννώδες, ζ). κολλοειδές, η). εμβρυικό, θ). εντερικό.

Πρόδρομες αλλοιώσεις όπως η άτυπη αδενωματώδης υπερπλασία, αδενοκαρκίνωμα in situ (βλεννώδης και μη βλεννώδης τύπος) και μικροδιηθητικό καρκίνωμα εισήχθησαν πρόσφατα στη σταδιοποίηση του αδενοκαρκινώματος κατά WHO. Διηθητικά βλεννώδη αδενοκαρκινώματα συνοδεύονται με μεγάλη ποσότητα κυτταροπλασματικής και εξωκυττάριας βλέννας και φέρουν μοναδικά μοριακά προφίλ σε σύγκριση με τα μη βλεννώδη αδενοκαρκινώματα. Η λεπτομερής μοριακή ανάλυση 230 δειγμάτων από ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα οδήγησε στον εντοπισμό μεταλλαγών στα εξής 18 γονίδια: TP53 (46%), KRAS (33%), KEAP1 (17%), STK11 (17%), EGFR (14%), NF1 (11%), BRAF (10%), SETD2 (9%), RBM10 (8%), MGA (8%), MET (7%), ARID1A (7%), PIK3CA (7%), SMARCA4 (6%), RB1 (4%), U2AF1 (3%) και RIT1 (2%). Στο 75% των αδενοκαρκινώματων που εξετάστηκαν εντοπίστηκαν μεταλλαγές οδηγόι στα KRAS, EGFR, BRAF, ERBB2, MAP2K1, NRAS, HRAS, αναδιατάξεις σε ROS1, ALK και RET, ενίσχυση γονιδίων ERBB2 και MET και απαλοιφή του εξωνίου 14 στο MET γονίδιο.

Ανδιατάξεις του ALK γονιδίου παρατηρούνται στο περίπου 4-5% των αδενοκαρκινωμάτων και χαρακτηρίζονται από την παρουσία των signet ring cells σχηματίζοντας μια ακτινική δομή με παραγωγή βλέννης. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των όγκων που φέρουν ROS – RET αναδιατάξεις είναι παρόμοια με εκείνα που φέρουν αναδιατάξεις στο ALK γονίδιο. Αδενοκαρκινώματα με RET αναδιάταξη παρουσιάζουν φτωχή διαφοροποίηση σε σύγκριση με τους όγκους που φέρουν μεταλλάξεις στο EGFR και ALK γονίδιο. Ο πλούσιος σε βλέννη υπότυπος που συμπεριλαμβάνει το βλεννώδες και το κολλοειδές αδενοκαρκίνωμα χαρακτηρίζεται από την παρουσία KRAS μεταλλαγών σε συχνότητα μεγαλύτερη από αυτή του μη βλεννώδους τύπου καρκίνου του πνεύμονα. Στο βλεννώδες τύπο επίσης ανιχνεύονται και αναδιατάξεις των NTRK γονιδίων. Επίσης η παρουσία KRAS μεταλλαγών συνοδεύονται με τη συνέκφραση του NKX2-1/ΤΤΦ1, συνδέεται με τον βλεννώδη υπότυπο και υποέκφραση της Napsin A πρωτεΐνης.

Η πιο συνηθισμένη μεταλλαγή που εντοπίζεται στον εντερικό τύπο αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα είναι η KRAS μεταλλαγή η οποία ακολουθείται από την αναδιάταξη EML4-ALK, NRAS και EGFR μεταλλάξεις. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι 4 στα 5 εντερικά αδενοκαρκινώματα φέρουν μεταλλάξεις στα γονίδια ομόλογου ανασυνδυασμού και χαμηλότερο score TMB.

Τέλος, τα εμβρυικά καρκινώματα διαχωρίζονται περαιτέρω σε low και σε high grade ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του πυρήνα των καρκινικών κυττάρων. Στα πρώτα εντοπίζονται μεταλλάξεις στο Wnt σηματοδοτικό μονοπάτι καθώς και υπερέκφραση της β κατενίνης. Τα δεύτερα, χαρακτηρίζονται από υπερέκφραση του p53 και μεταλλάξεις τόσο στο EGFR (20%) όσο και στο PIK3CA (7%). (3)

## ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΣΤΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΕΚ ΠΛΑΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ο συγκεκριμένος υπότυπος διαχωρίζεται περαιτέρω στον κερατινοποιημένο, μη κερατινοποιημένο τύπο και βασικοειδή τύπο.

Τα αδενοκαρκινώματα και τα πλακώδη καρκινώματα του πνεύμονα παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές ως προς το μοριακό τους προφίλ. Στη μελέτη των Sun et al. εντοπίστηκαν 778 γονίδια και 7 microRNAs τα οποία όπως αποδείχθηκε με τη χρήση βιοπληροφορικής ανάλυσης εκφράζονται με διαφορετικό τρόπο στους δυο κύριους τύπους καρκίνου του πνεύμονα. Το 2012 στη TCGA βάση δεδομένων δημοσιεύτηκαν τα αποτελέσματα από τη μοριακή ανάλυση 178 περιπτώσεων πλακωδών καρκινωμάτων. Οι σημαντικότερες μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν στα εξής γονίδια: TP53 (90%), CDKN2A, PTEN, PIK3CA, KEAP1, MLL2, HLA-A, NFE2L2, NOTCH1, RB1, PDYN. Επίσης μεταλλάξεις σε γονίδια οξειδωτικού στρες, γονίδια σχετιζόμενα με πλακώδη διαφοροποίηση

καθώς και γονίδια που συμμετέχουν PI3K/RTK/RAS μονοπάτι έφεραν μεταλλάγες σε ποσοστά 34%, 44% και 69% αντίστοιχα. Τέλος, αναστολή του CDKN2A γονιδίου σημειώθηκε στο 72% των περιπτώσεων.

Με βάση την κατάσταση του mRNA ο πλακώδης τύπος καρκίνου του πνεύμονα διαχωρίζεται σε 4 επιμέρους υποτύπους : α) στον κλασικό, β) στο βασικό, γ) στον εκκρηκτικό, και δ) στον πρωτόγονο.

Ο κλασικός υπότυπος χαρακτηρίζεται από μεταλλάγες στα γονίδια KEAP1, NFE2L2, PTEN, υπεμεθυλίωση και χρωμοσωμική αστάθεια, ο βασικός υπότυπος χαρακτηρίζεται από υψηλή συχνότητα μεταλλαγών στο NF1 γονίδιο, ο εκκρηκτικός υπότυπος χαρακτηρίζεται από την υπερενεργοποίηση των TP53 και RB1 γονιδίων ενώ ο πρωτόγονος υπότυπος φέρει μεταλλάγες στα RB1 και PTEN γονίδια.

## ΝΕΥΡΟΕΝΔΟΚΡΙΝΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ

Οι νευροενδοκρινικοί όγκοι του πνεύμονα (NET) αντιπροσωπεύουν το 20% των όγκων του πνεύμονα και ανήκουν σε μια μεγάλη ομάδα νεοπλασμάτων με διακριτή μορφολογία, συμπεριφορά και πρόγνωση.

Η ταξινόμηση της WHO το 1981 αντικαταστάθηκε από τη νεότερη του 1999 με σκοπό να βελτιώσει το επίπεδο της διάγνωσης συνδυάζοντας μορφολογία, ανοσοϊστοχημεία και κλινική εικόνα. Τα ιστολογικά κριτήρια της νέας ταξινόμησης της WHO το 1999 βασίζονται στην ανάδειξη της νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης, τα χαρακτηριστικά του πυρήνα, η παρουσία ή η απουσία νέκρωσης, ο μιτωτικός δείκτης, όπως επίσης τα ανοσοϊστοχημικά ευρήματα.

Τα νευροενδοκρινή καρκινώματα διαχωρίζονται στις εξής κατηγορίες:

### 1. Τυπικό καρκινοειδές:

Το τυπικό καρκινοειδές αντιπροσωπεύει ένα ποσοστό μικρότερο του 1%. Το πιο συχνό αρχιτεκτονικό πρότυπο είναι η παρουσία δοκίδων και φωλεών που βρίσκονται σε ένα λεπτό ινοαγγειωματώδες στρώμα. Η νέκρωση πάντα απουσιάζει και ο μιτωτικός δείκτης είναι μικρότερος του 2/10 HPF.

### 2. Άτυπο καρκινοειδές:

Το άτυπο καρκινοειδές αντιπροσωπεύει το 10% των όγκων του πνεύμονα. Το τυπικό και άτυπο καρκινοειδές μοιράζονται τα ίδια αρχιτεκτονικά, μορφολογικά και κυτταρολογικά χαρακτηριστικά, για αυτό και η ορθή διάγνωση μπορεί να αποδειχθεί πολύ δύσκολη, ειδικότερα σε μικρές βιοψίες.

Τα κύρια κριτήρια διαφορικής διάγνωσης είναι η παρουσία νέκρωσης και ο υψηλός μιτωτικός δείκτης (2-10 X10 HPF), στο άτυπο καρκινοειδές

### 3. Μικροκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα:

Το μικροκυτταρικό καρκίνωμα εμφανίζει γενικά στους κύριους αεραγωγούς, αναπτύσσεται πολύ γρήγορα και αρχικά τουλάχιστον είναι ευαίσθητο στη χημειοθεραπεία.

Παρά τη θεραπεία, ο ασθενής που κατά κανόνα είναι καπνιστής κατα-λήγει με διασπορά της νόσου σε 1-2 χρόνια. Όταν σε ένα SCLC ανευρίσκεται συνιστώσα πλακώδους ή αδενικής διαφορο-ποίησης, τότε αναφερόμαστε στο σύνθετο μικροκυτταρικό καρκίνωμα που είναι υπότυπος του SCLC.

Στη διαφορική διάγνωση συμπεριλαμβάνονται το καρκίνωμα από μεγά-λα κύτταρα (LCNEC), το λέμφωμα, οι αντιδραστικές λεμφικές αθροίσεις.

#### 4. Μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα:

Η ύπαρξη του LCNEC ως υψηλής κακοήθειας νευροενδοκρινικό καρκί-νωμα αναγνωρίσθηκε το 1991 και έγινε γνωστή ως ξεχωριστή οντότητα σε σχέση με το γνωστό μικροκυτταρικό καρκίνωμα.

Το κύριο διαφοροδιαγνωστικό πρόβλημα είναι το άτυπο καρκινοειδές.

Τα LCNECs διατηρούν και αυτά το οργανοειδές pattern αλλά χαρακτη-ρίζονται από μια ικανού βαθμού γεωγραφικού τύπου νέκρωση και ένα υψηλό μιτωτικό δείκτη  $>10/HPF$ . Το μέγεθος του κυττάρου όμως είναι αυτό που το διαχωρίζει από το μικροκυτταρικό καρκίνωμα.

Η πρώτη και η δεύτερη κατηγορία χαρακτηρίζονται ως low grade NET, ενώ η Τρίτη και η τέταρτη ως high grade.

Η μετάλλαξη του γονιδίου P53 είναι η πιο συχνή γενετική ανωμαλία στα LCNEC καθώς και στα SCLC. Άλλες συχνές μεταλλάξεις του γονιδίου του RB1 με απώλεια της λει-τουργίας του προϊόντος του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος έχουν ανακα-λυφθεί στα περισσότερα SCLC. Ανάλογες μεταλλάξεις στο PTEN γονίδιο φαίνεται να εκφράζονται κυρίως στα SCLC. Σημαντικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος τα οποία ρυθμίζουν τον κυτ-ταρικό κύκλο και μεταβάλλουν το μοντέλο έκφρασης πρωτεϊνών σε πολλά ση-μεία, φαίνεται να έχουν προγνωστική και διαγνωστική σημασία.

Διαταραχή της οδού μεταγωγής σήματος Rb/p16/κυκλίνη D1 είναι η συ-χνότερη στους NET με συνύπαρξη με μια ποικιλία μορίων και μηχανισμών που προφανώς αντικατοπτρίζουν μια γενετική διαφοροποίηση των διαφορετι-κών όγκων.

Η ενεργότητα της τελομεράσης έχει ευρέως μελετηθεί στους νευροενδο-κρινικούς όγκους. Οι τελομεράσες είναι ένζυμα που συνθέτουν τα τελομερή άκρα του DNA, αντισταθμίζοντας κατά συνέπεια τις απώλειες του DNA κατά τη διάρκεια κάθε κυτταρικού κύκλου.

Τα SCLC έχουν υψηλή ενεργότητα τελομεράσης στο 90-100% των πε-ριπτώσεων. Επιπλέον στο LCNEC έχει βρεθεί πολύ υψηλότερη ενεργότητα τελομεράσης σε σχέση με το TC.

Στον καρκίνο του πνεύμονα έχει βρεθεί σημαντική συσχέτιση μεταξύ του μήκους της τελομεράσης και των προγνωστικών / διαγνωστικών παραγόντων.

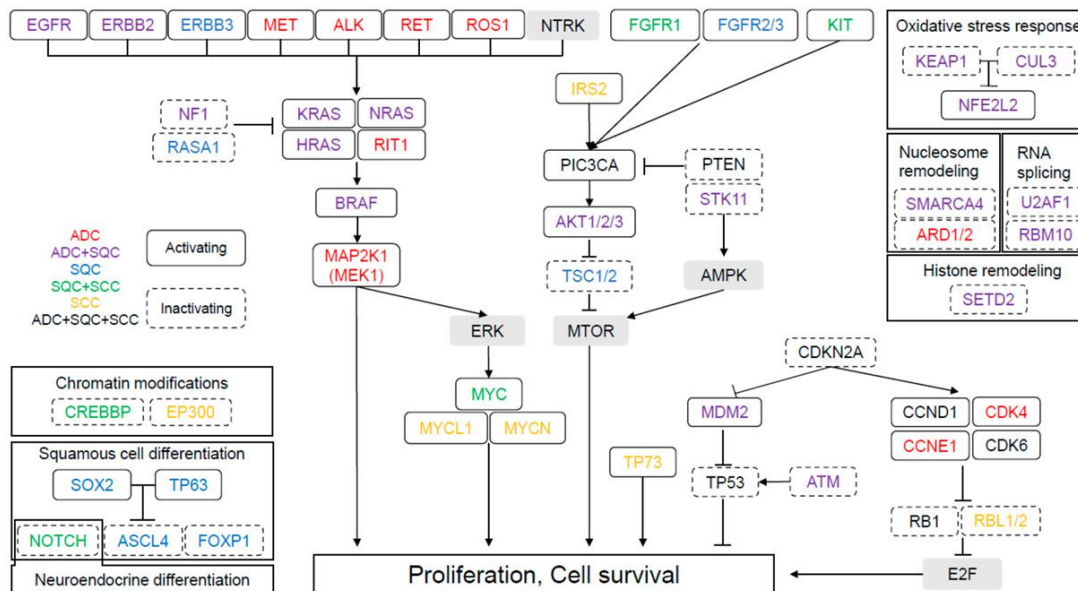
Επιπλέον η ανώμαλη έκφραση της E-cadherin και β-catenin έχει συσχετισθεί με λεμφαδενικές μεταστάσεις και προχωρημένο στάδιο νόσου στα καρκινοειδή και LCNEC.

Επίσης, το mTOR (mammalian target of rapamycin) είναι ένας από τους κύριους ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, συναντάται δε με πολλά κύρια μόρια σηματοδότησης όπως το PTEN/Pi3-kinase, AMPK, RAS/RAF).

Η λειτουργία του mTOR στα κύτταρα των θηλαστικών περιλαμβάνουν τον έλεγχο της μετάφρασης του mRNA και του μεταβολισμού.

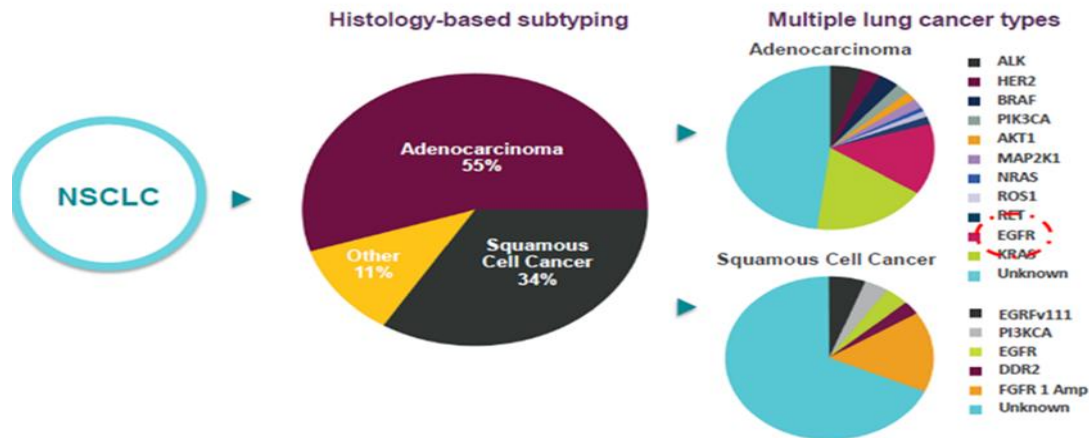
Πειραματικές μελέτες στα SCLC κύτταρα έδειξαν ότι η αναστολή της ο-γκογόνου οδού της Pi3-kinase/Akt/mTOR με ραπαμυκίνη είναι αρκετή για να μειώσει την ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία και να επάγει απόπτωση στα SCLC κύτταρα.

Είναι γεγονός ότι η ορθή ταυτοποίηση των επιμέρους όγκων της ομάδας των NET του πνεύμονα με τη βοήθεια της μορφολογίας και του μοριακού προφίλ είναι σημαντική για τον περαιτέρω θεραπευτικό σχεδιασμό.



Εικόνα 3: Στο διάγραμμα αυτό παρουσιάζονται συνοπτικά οι μεταλλάξεις που εντοπίζονται στο αδενοκαρκίνωμα, στο πλακώδες καθώς και στο μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα όπως αναφέρθηκε από τη μελέτη Cancer Genome Atlas. (4)

Επί του παρόντος, τα αδενοκαρκινώματα αναλύονται συνήθως για μεταλλάξεις ενεργοποίησης υποδοχέα αυξητικού παράγοντα επιδερμικού παράγοντα (EGFR) και αναδιατάξεις γονιδίων ROS1 και αναπλαστικής κινάσης τυροσίνης λεμφώματος (ALK), καθώς αυτές οι μοριακές αλλαγές αποτελούν αποτελεσματικούς στόχους στοχευμένης θεραπείας. (υπότυποι καρκίνου του πνεύμονα).



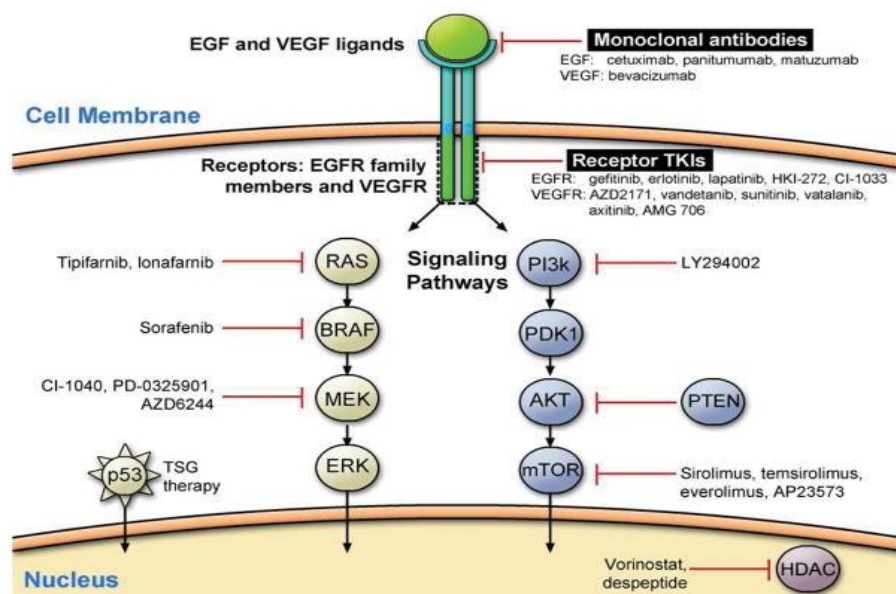
Εικόνα 4: Ανάλογα με τον ιστολογικό υπότυπο του καρκίνου του πνεύμονα μεταβάλλεται και το μοριακό προφίλ της νόσου. (5)

Τα αδενοκαρκινώματα τελικού σταδίου με ενεργοποιητικές μεταλλάξεις EGFR μπορούν να υποβληθούν σε θεραπεία με φάρμακα erlotinib, gefitinib ή afatinib που είναι πρώτης ή δεύτερης γραμμής αντι-EGFR αναστολείς κινάσεων τυροσίνης (TKI). Αξίζει να σημειωθεί ότι σύμφωνα με έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν ο συγκεκριμένος τύπος θεραπείας παρουσιάζει υψηλά ποσοστά ανταπόκρισης και αποτελεσματικότητας σε σύγκριση με την τυπική χημειοθεραπεία. Παρομοίως, ειδικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα που αναστέλλουν την ανώμαλη ενεργοποίηση των μεταλλαγμένων κινασών EML-ALK, BRAF και ROS1 σε AdenoCAs, έχουν ως απότοκο την βελτίωση της έκβασης της θεραπείας των ασθενών. Οι συνεχιζόμενες έρευνες και οι πολλαπλές κλινικές δοκιμές περιλαμβάνουν νέες στοχευμένες θεραπείες και λιγότερο επιθετικά θεραπευτικά σχήματα που βελτιώνουν την επιβίωση των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Οι στοχευόμενοι θεραπευτικοί παράγοντες βασίζονται στην έννοια της ανακάλυψης γενετικών αλλαγών και κατ' επέκταση των οδών σηματοδότησης που έχουν μεταβληθεί στον καρκίνο του πνεύμονα και έχουν προστεθεί σημαντικά στο οπλοστάσιο μας προκειμένου να παραταθεί η επιβίωση των ασθενών και να ελαχιστοποιηθεί η τοξικότητα του φαρμάκου. Από το 1998 από 34 μοριακά στοχευμένα φάρμακα, έχουν εγκριθεί από το FDA τρεις στοχευμένες θεραπείες για τη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα (το gefitinib το 2002, το erlotinib το 2003 και το bevacizumab το 2006). Από το 1998, όταν το Trastuzumab ήταν το πρώτο μοριακώς στοχευμένο φάρμακο που εγκρίθηκε από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA), εισήχθησαν 34 επιπλέον φάρμακα στις ΗΠΑ για θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου μέχρι το τέλος του 2009. Ωστόσο, η κλινική ανταπόκριση στις στοχευμένες θεραπείες ποικίλλει.

Στοχευμένες θεραπείες για EGFR+ καρκίνους του πνεύμονα

Η συχνότητα εμφάνισης των μεταλλαγών EGFR σε ασθενείς με MMKP είναι μόνο 10-15% σε Καυκάσιους ασθενείς και περίπου 30% στον Ασιατικό πληθυσμό. Το αντίστοιχο ποσοστό για τις αναδιατάξεις της ALK είναι 3-5%.

Ο EGFR ή αλλιώς υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR, HER-1 / ErbB1) είναι μέλος της οικογένειας ErbB υποδοχέων κινάσης τυροσίνης (TK), που περιλαμβάνει HER-1 / ErbB1, HER-2 / neu / ErbB2, HER-3 / ErbB3 και HER-4 / ErbB4. Αποτελείται από μια εξωκυττάρια περιοχή (πρόσδεση του εξωκυττάριου σήματος), από μια διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυττάρια περιοχή (τυροσίνη-κινάση). Με την πρόσδεση του συνδέτη και τον ομο-ή ετεροδιμερισμό και την ενεργοποίηση του υποδοχέα, ενεργοποιούνται κυρίως δυο “downstream” σηματοδοτικά μονοπάτια : PI3K / AKT και RAS / RAF / MAPK (εικόνα). Αυτές οι οδοί ενδοκυτταρικής σηματοδότησης ρυθμίζουν βασικές διαδικασίες όπως η απόπτωση και ο πολλαπλασιασμός.

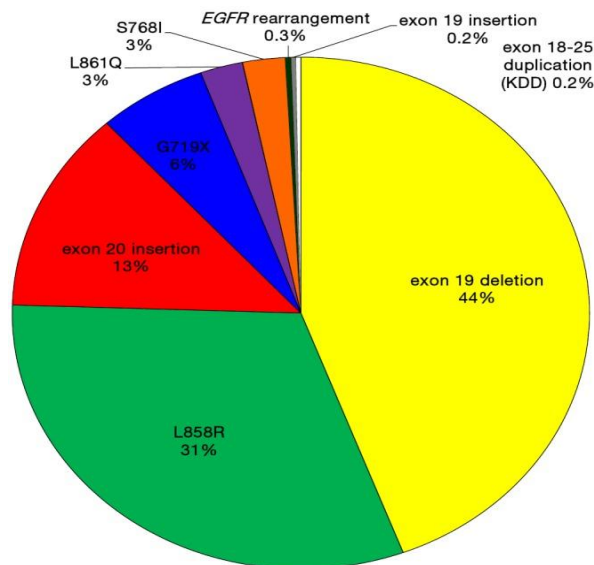


Εικόνα 5: Τρέχουσες διαθέσιμες θεραπείες που στοχεύουν την οδό σηματοδότησης του EGFR.(6)

Ο EGFR υποδοχέας υπερεκφράζεται στο 10-80% των περιπτώσεων των ασθενών με NSCLC, ανάλογα με τις μεθόδους αξιολόγησης. Η κατάσταση του EGFR στον καρκίνο του πνεύμονα έχει εκτιμηθεί με διάφορες μεθόδους που περιλαμβάνουν ανοσοϊστοχημεία (έκφραση πρωτεϊνών), FISH / CISH (αλλαγές αριθμού γονιδιακού αντιγράφου) και μοριακή ανάλυση των μεταλλαγών του. Οι σωματικές μεταλλάξεις στα εξώνια 18-21 της περιοχής τυροσίνης-κινάσης (TK) του EGFR έχουν συσχετιστεί με υψηλή πιθανότητα ανταπόκρισης στους αναστολείς της κινάσης τυροσίνης EGFR (TKI). (7) Οι αναστολείς αυτοί στοχεύουν μεταλλάξεις εντοπιζόμενες σε τέσσερα εξώνια (18-21) του EGFR γονιδίου, τα οποία κωδικοποιούν μέρος της

επικράτειας κινάσης τυροσίνης (ολόκληρη η περιοχή κινάσης κωδικοποιείται από τα εξώνια 18-24) και εντοπίζονται γύρω από την περιοχή πρόσδεσης του ATP ενζύμου. Εμφανίζονται περίπου στο 10% των δυτικών και έως και στο 50% των ασθενών του Ασιατικού πληθυσμού. Αρκετά κλινικά χαρακτηριστικά, όπως το φύλο, το κάπνισμα, η εθνικότητα βρέθηκαν να σχετίζονται με την ανταπόκριση στη θεραπεία με TKIs .

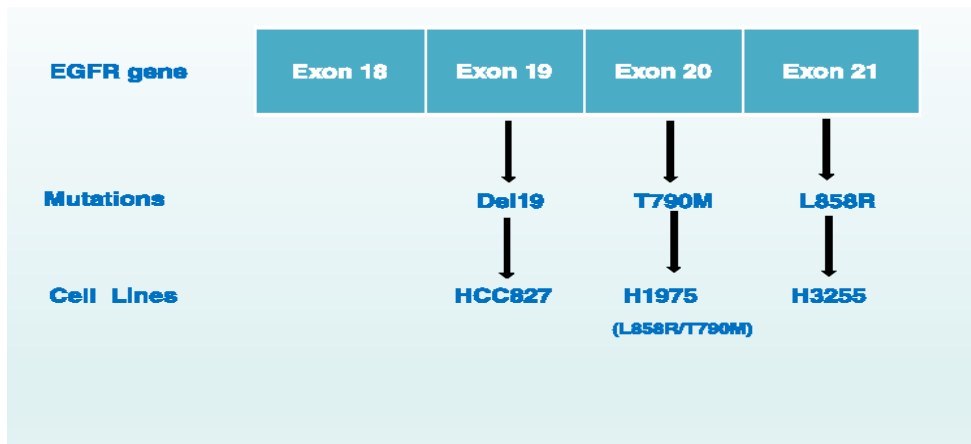
Οι πιο συνηθισμένες μεταλλαγές είναι οι απαλοιφές εντός πλαισίου ανάγνωσης στο εξώνιο 19 (45%), ακολουθούμενες από σημειακές μεταλλαγές (CTG > CGG) στο κωδικόνιο 858 που έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση λευκίνης από αργινίνη (L858R) (41%).



Εικόνα 6: Κατανομή μεταλλαγών του γονιδίου του EGFR για τις οποίες έχει εγκριθεί η χρήση αναστολέων TKIs 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> γενιάς. (8)

Καθώς οι μεταλλάξεις του EGFR γονιδίου είναι ο καλύτερος προγνωστικός δείκτης της ανταπόκρισης του ασθενούς στη θεραπεία με EGFR TKI, έχουν αναφερθεί διάφορες τεχνικές μοριακής αναλύσης στη βιβλιογραφία. Η άμεση αλληλούχιση DNA χρησιμοποιείται ως η πιο κοινή τεχνική εντοπισμού μεταλλάξεων που χρησιμοποιείται από πολλά εργαστήρια. Παρόλα αυτά μπορεί να μην ανιχνεύσει μεταλλάξεις εάν τα κύτταρα όγκου αντιπροσωπεύουν <25% του δείγματος. Ως εκ τούτου, αναπτύχθηκαν νέες πιο ευαίσθητες τεχνικές.





Εικόνα 7: Οι πιο κοινές μεταλλάξεις του γονιδίου του EGFR εντοπίζονται μεταξύ των εξωνίων 18-21 και αποτελούν τον κύριο στόχο της θεραπείας με αναστολείς κινασών τυροσίνης. (9)

Όπως είναι γνωστό, η θεραπεία με αναστολείς κινασών τυροσίνης χρησιμοποιούνται ευρέως στις περιπτώσεις ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του πνεύμονα. Παρόλα αυτά δεν είναι λίγες οι φορές που εξαιτίας της εμφάνισης της T790M μεταλλάξης ο πάσχων αναπτύσσει αντίσταση στη θεραπεία με αναστολείς 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> γενεάς και επομένως σταματά να ανταποκρίνεται στην θεραπεία. Επόμενο βήμα από το θεράποντα ιατρό αποτελεί η χορήγηση θεραπείας με αναστολέα 3<sup>ης</sup> γενιάς.

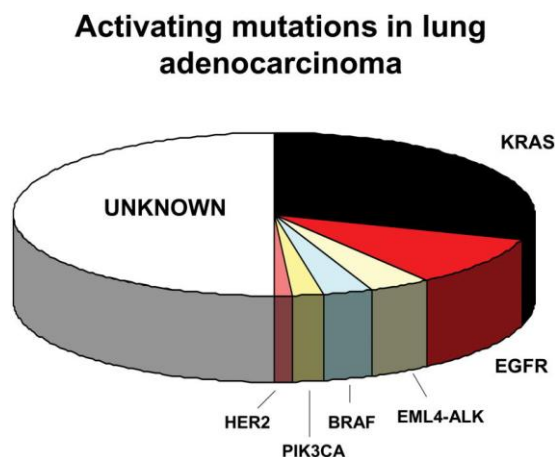
EGF binding		EGF binding TM		Tyrosine Kinase				Auto-phosphorylation	
5	7	13	16, 17	18	21	24	28		
678	Nucleotide binding site		729		762		824	Activation loop	
EXON 18		EXON 19		EXON 20		EXON 21			
G719X (3%)		LREA deletion (45%)		V765A (<1%)		L858R (40%)			
		VAIKEL insertion (1%)		T783A (<1%)		L861X (2%)			
		L747S (<1%)		V774A (<1%)		T854A (<1%)			
		D761Y (<1%)		S784P (<1%)		A871E (<1%)			
				T790M *					
				Exon 20 insertion (4%)					
				V769M (<1%)					
				V769M (<1%)					

Εικόνα 8: Πιθανές σωματικές μεταλλάξεις του EGFR γονιδίου: Οι μεταλλάξεις με πράσινο χρώμα θεωρούνται μεταλλάξεις ευαισθητοποίησης καθώς οι ασθενείς που τις φέρουν παρουσιάζουν καλή ανταπόκριση στη θεραπεία με TKIs. Ενώ αυτές που είναι με κόκκινο χρώμα θεωρούνται μεταλλάξεις αντίστασης ή μεταλλάξεις μειωμένης ανταπόκρισης στη θεραπεία (ex20Ins). (10)

## ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελείται από δύο κύριους ιστολογικούς υποτύπους: τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) και τον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (SCLC). Κατά την τελευταία δεκαετία, έχει καταστεί προφανές ότι αυτές οι δυο υποκατηγορίες του NSCLC μπορούν να οριστούν περαιτέρω σε μοριακό επίπεδο με επαναλαμβανόμενες “driver mutations” που εμφανίζονται σε πολλαπλά ογκογονίδια, συμπεριλαμβανομένων των AKT1, ALK, BRAF, EGFR, HER2, KRAS, MEK1, MET, NRAS, PIK3CA, RET και ROS1. Ένα άλλο γονίδιο μεταλλάξεως του οποίου εμφανίζονται στον καρκίνο του πνεύμονα είναι το MET. Αυτές οι μεταλλάξεις σπάνια βρίσκονται ταυτόχρονα στον ίδιο όγκο και μπορούν να βρεθούν σε όλες τις υποκατηγορίες του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (συμπεριλαμβανομένου του αδενοκαρκινώματος, του καρκίνου των πλακωδών κυττάρων (SCC) και του μεγαλοκυτταρικού καρκινώματος). Οι μη καπνιστές πάσχοντες με αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα εμφανίζουν υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης μεταλλάξεων EGFR, HER2, ALK, RET και ROS1. Είναι σημαντικό ότι στο παρόν προσφέρονται ή αναπτύσσονται συγκεκριμένοι αναστολείς μικρών μορίων για συγκεκριμένα μοριακά καθορισμένα υποσύνολα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα.

Τα τελευταία έτη, δεδομένης της ανάπτυξης νέων στοχευμένων θεραπειών, οι τεράστιες προσπάθειες κατευθύνονται προς τον εντοπισμό δυνητικά θεραπεύσιμων μοριακών μεταβολών, ειδικά έναντι γνωστών μεταλλάξεων. Παρόλο που έχουν περιγραφεί πολυάριθμες μεταλλάξεις στο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα, η στοχευμένη θεραπεία των τελευταίων παραμένει άγνωστη σε περισσότερο από το 50% των περιπτώσεων (Εικόνα ). Παρά τις προσπάθειες αυτές, μέχρι σήμερα μπορούμε να εντοπίσουμε θεραπευτικούς στόχους μόνο σε 20% των καρκίνων του πνεύμονα (εικόνα). Στο ΜΜΚΠ μέσα από ευρύ φάσμα μελετών προκύπτει ότι οι μεταλλάξεις του EGFR και του ALK αποτελούν προβλεπτικούς παράγοντες των αντίστοιχων στοχευμένων θεραπειών.



Εικόνα 9: Κλινικά σημαντικές ογκογόνες μεταλλάξεις του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα. (8)

→ BRAF μεταλλαγές στον καρκίνο του πνεύμονα

Η πιο γνωστή μεταλλαγή που σημειώνεται στο BRAF γονίδιο είναι η V600E, η αντικατάσταση δηλαδή της βαλίνης από γλουταμινικό οξύ και πρόκειται για μια μεταλλαγή εξαιτίας της οποίας παρατηρείται αυξημένη δραστηριότητα της κινάσης του BRAF γονιδίου. Σε περίπτωση εμφάνισης μιας μεταλλαγής σαν και αυτής οι ασθενείς παρουσιάζουν μειωμένη ανταπόκριση στη θεραπεία με gefitinib(19). Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι οι BRAF μεταλλαγές εμφανίζονται συνήθως σε όγκους άγριου τύπου για τα EGFR, ALK γονίδια. Την παρούσα στιγμή υπάρχει βιβλιογραφία που υποστηρίζει ότι ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα που φέρουν τη μεταλλαγή V600E στο BRAF γονίδιο παρουσίασαν πολύ καλή ανταπόκριση στη θεραπεία με vemurafenib ή dabrafenib. Σε μια μελέτη στην οποία συμμετείχαν 697 ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα, B-RAF μεταλλαγές ανιχνεύθηκαν στο 3% εξ αυτών ,οι περισσότεροι εκ των οποίων ήταν καπνιστές. Πιο συγκεκριμένα εκ των BRAF μεταλλαγμένων ασθενών, το 50% έφεραν τη μεταλλαγή V600E, το 39% την G469A και το 11% την D594G μεταλλαγή. Τέλος αποδείχθηκε σε προκλινικές μελέτες ότι ασθενείς που έφεραν τη μεταλλαγή G469A παρουσίασαν μειωμένη ανταπόκριση στη θεραπεία με dasatinib ενώ η θεραπεία με sorafenib έφερε θαυμάσια αποτελέσματα. (20)

→ ALK αναδιατάξεις και καρκίνος του πνεύμονα

Το ALK γονίδιο όπως έχει αποδειχθεί και στο παρελθόν εμπλέκεται σε χρωμοσωμικές αναδιατάξεις με άλλα ογκογόνα γονίδια οδηγώντας έτσι στην δημιουργία παραλλαγμένων μορφών του ALK γονιδίου και κατ' επέκταση στην υπερέκφρασή του. Οι αναδιατάξεις του συγκεκριμένου γονιδίου έχουν παρατηρηθεί στο 5% των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα και κυρίως σε νεότερους μη καπνιστές ασθενείς. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η έκβαση των ασθενών που φέρουν αναδιατάξεις στο γονίδιο ALK εμφανίζουν πολύ καλή ανταπόκριση στη θεραπεία με ALK αναστολείς και κλινικά έχει αποδειχθεί ότι η εμφάνιση των συγκεκριμένων αναδιατάξεων ίσως αποτελεί έναν μηχανισμό αντίστασης στη θεραπεία με EGFR TKIs. Σε μια δοκιμή φάσης I αποδείχθηκε ότι ασθενείς των οποίων οι όγκοι ήταν θετικοί για αναδιατάξεις του ALK γονιδίου, που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με ALK/MET αναστολείς παρουσίασαν πολύ καλή έκβαση με έναν μεσό όρο επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της πάθησης 9,7 μήνες. Τέτοιος αναστολέας είναι το crizotinib. Σε μια άλλη κλινική μελέτη στην οποία συμμετείχαν 180 πάσχοντες από προχωρημένο καρκίνο του πνεύμονα με

θετικούς για ALK αναδιατάξεις όγκους, αποδείχθηκε ότι η χορήγηση δεύτερης γενιάς ALK/MET αναστολέων (ceritinib) εμφάνισε ποσοστό ανταπόκρισης 60%. (11) Βασιζόμενοι στα NCCN guidelines προτεινόμενη πρώτη γραμμή θεραπείας για ALK αναδιατάξεις+ ασθενείς αποτελεί το crizotinib και επί πρόοδο της νόσου έχει προταθεί η χορήγηση του ceritinib.

➔ KRAS μεταλλαγές στον καρκίνο του πνεύμονα.

Περίπου το 15-20% των ασθενών που πάσχουν από αδenoκαρκίνωμα του πνεύμονα παρουσιάζουν μεταλλαγές στο KRAS γονίδιο οι οποίες δεν είναι τόσο συνηθισμένες στον καρκίνο εκ πλακωδών κυττάρων. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων οι μεταλλαγές αυτές χαρακτηρίζονται από μια αντικατάσταση αμινοξέος στις θέσεις 12, 13 και 61 με αποτέλεσμα την υπερέκφραση του KRAS γονιδίου.

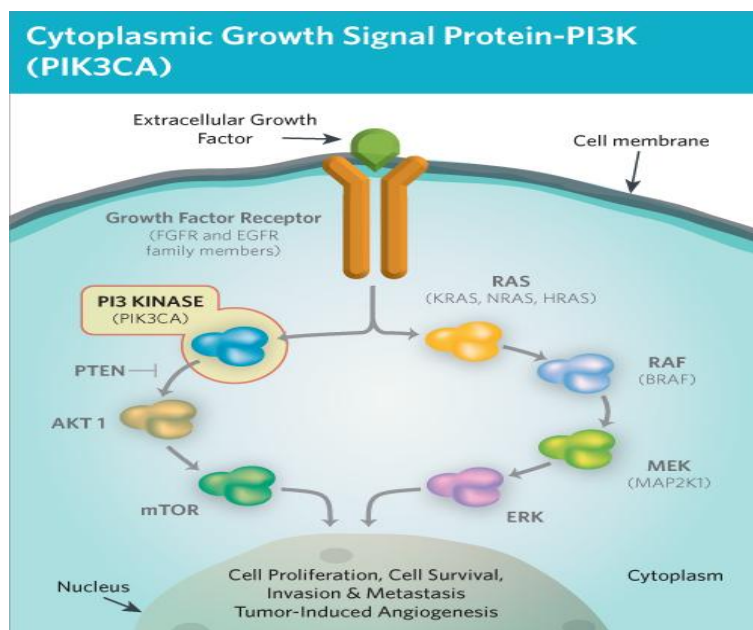
Στην πλειονότητα των περιπτώσεων KRAS μεταλλαγές ανιχνεύονται σε φυσιολογικούς για το EGFR και ALK γονίδια όγκους. Με άλλα λόγια χαρακτηρίζονται ως “αμοιβαία αποκλειόμενες” μεταλλαγές. Ο ρόλος του KRAS γονιδίου ως προγνωστικός παράγοντας δεν είναι ακόμα γνωστός και πολύ λίγες κλινικές μελέτες για το ρόλο του ως βιοδείκτης στο μεταστατικό περιβάλλον έχουν ολοκληρωθεί. Ωστόσο έχει αποδειχθεί πως η ανίχνευση μεταλλαγών στο συγκεκριμένο γονίδιο αποτελούν αρνητικό προγνωστικό δείκτη στην έκβαση της θεραπείας με EGFR αναστολείς (gefitinib και erlotinib), ενώ δεν έχει ανακαλυφθεί μέχρι σήμερα άμεση αντι KRAS θεραπεία για τον καρκίνο του πνεύμονα. (23)

➔ PIK3CA μεταλλαγές στον καρκίνο του πνεύμονα

Το PIK3CA είναι ένα γονίδιο που κωδικοποιεί την 3-κινάση φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI3K), το οποίο είναι ένα ένζυμο που αποτελεί μέρος μιας σημαντικής οδού σηματοδότησης (PI3K / AKT) που συμμετέχει στον έλεγχο της ανάπτυξης, της διαίρεσης, την κίνηση και τη δομή των κυττάρων. Η ανίχνευση μεταλλαγών στο PIK3CA γονίδιο συνεπάγεται την υπερέκφρασή του, και έχει παρατηρηθεί στο 1-5% των περιπτώσεων των αδenoκαρκινωμάτων του πνεύμονα, ενώ μεγαλύτερο ποσοστό των μεταλλαγών αυτών (14-38%) έχει διαπιστωθεί στο καρκίνωμα του πνεύμονα εκ πλακωδών κυττάρων.

Η μεταλλαγές στο PIK3CA γονίδιο σημαντικότερες από τις οποίες είναι οι E542K, E545K, E545Q, H1047R, H1047L, αποτελούν αρνητικό προγνωστικό δείκτη σε αρκετούς τύπους καρκίνων αλλά δεν έχει ακόμα εδραιωθεί η συσχέτιση του με την πορεία της θεραπείας των ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του πνεύμονα. (12) Οι μεταλλαγές που λαμβάνουν χώρα στο PIK3CA γονίδιο χαρακτηρίζονται ως μεταλλαγές “ενεργοποίησης” καθώς συνεπάγονται την υπερενεργοποίηση του PI3K/Akt/ m TOR μονοπατιού και κατ επέκταση την αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού τόσο των φυσιολογικών όσο και των καρκινικών κυττάρων. Τόσο αναστολείς του m TOR γονιδίου όπως είναι το everolimus και το temsirolimus των οποίων η χρήση έχει εγκριθεί από το FDA όσο και αναστολείς των PI3K και Akt γονιδίων έχουν δοκιμαστεί σε επίπεδο κλινικών μελετών και για τον καρκίνο του πνεύμονα. Σε μελέτες προκλινικού σταδίου έχει διαπιστωθεί πως μεταλλαγές ή υπερέκφραση του PIK3CA γονιδίου σχετίζονται άμεσα με την

ανταπόκριση με αντι-PIK3CA θεραπεία (NVP-BYL719) όπως και με την εμφάνιση αντίστασης στη θεραπεία με EGFR TKIs. (13)



Εικόνα 10: Σηματοδοτικό μονοπάτι στο οποίο συμμετέχει το PIK3CA γονίδιο. (14)

→ HER-2 μεταλλαγές και καρκίνος του πνεύμονα.

Το ERBB2 γονίδιο, που αποκαλείται συχνά HER2, είναι ένα γονίδιο που κωδικοποιεί έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα με ενδογενή δράση κινάσης τυροσίνης. Η πρόσδεση αυξητικών παραγόντων στον υποδοχέα αυτόν έχει ως αποτέλεσμα τη διέγερση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την κυτταρική ανάπτυξη, και την ικανότητα των κυττάρων για διήθηση και μετάσταση. Σε ορισμένους όγκους, η ενεργοποίηση της σηματοδότησης του μονοπατιού που συμμετέχει το HER2 είναι ένας σημαντικός μηχανισμός που οδηγεί στην καρκινογένεση. Αυτό μπορεί να συμβεί μέσω της ενίσχυσης του γονιδίου HER2 (του συνηθέστερου μηχανισμού) ή της μετάλλαξης γονιδίου HER2 σε καρκινικά κύτταρα.

Η πιο συχνή μεταλλαγή στο γονίδιο αυτό είναι η προσθήκη στο εξώνιο 20 (Ex20Ins) το οποίο κωδικοποιεί ένα τμήμα της περιοχής της κινάσης. Η μεταλλαγή αυτή έχει παρατηρηθεί στο 2-4% των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, ενώ το ποσοστό αυτό αυξάνεται στο 6% σε ασθενείς με EGFR/KRAS/ALK αρνητικούς όγκους. (24) Σε αρκετές μελέτες έχει αποδειχθεί το όφελος της θεραπείας με trastuzumab (Μονοκλωνικό αντι-HER2 αντίσωμα) για ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο του πνεύμονα με όγκους θετικούς για την HER-2 μεταλλαγή. Έχει αναφερθεί επίσης η περίπτωση ενός ασθενούς του οποίου ο όγκος έφερε την προσθήκη στο εξώνιο 20 του HER-2 γονιδίου ( G776L) ο οποίος παρουσίασε πολύ καλή

ανταπόκριση στη συνδυαστική θεραπεία του trastuzumab με εβδομαδιαία δόση paclitaxel (πακλιταξέλης) . Τέλος, σε μια αναδρομική μελέτη, 15 ασθενείς με NSCLC με μεταλλάξεις στο HER2 που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με τραστοζουμάμπη σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία έδειξαν ποσοστό ελέγχου της ασθένειας 96% (25)

Διάφορα προκλινικά δεδομένα αναφέρουν ότι η παρουσία αυτής της μετάλλαξης συνδέεται με την παρουσία αντίστασης στη θεραπεία με αναστολείς 1<sup>η</sup> γενιάς EGFR TKI, erlotinib και gefitinib (Wang et al., 2006). Ωστόσο, τα κύτταρα που φέρουν τη μετάλλαγή στο εξόνιο 20 του HER2 γονιδίου είναι ευαίσθητα στη θεραπεία με EGFR και HER2 TKIs neratinib και afatinib . (26) Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι οι μεταλλάξεις HER2 βρίσκονται συνήθως σε όγκους άγριου τύπου για EGFR, ALK και άλλες μεταλλάξεις οδηγού.

Gene	Alteration	Frequency in NSCLC
AKT1	Mutation	1%
ALK	Rearrangement	3–7%
BRAF	Mutation	1–3%
DDR2	Mutation	~4%
EGFR	Mutation	10–35%
FGFR1	Amplification	20%
HER2	Mutation	2–4%
KRAS	Mutation	15–25%
MEK1	Mutation	1%
MET <sup>a</sup>	Amplification	2–4%
NRAS	Mutation	1%
PIK3CA	Mutation	1–3%
PTEN	Mutation	4–8%
RET	Rearrangement	1%
ROS1 <sup>a</sup>	Rearrangement	1%

Εγκεκριμένες θεραπείες στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.

Εγκεκριμένες θεραπείες στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο.

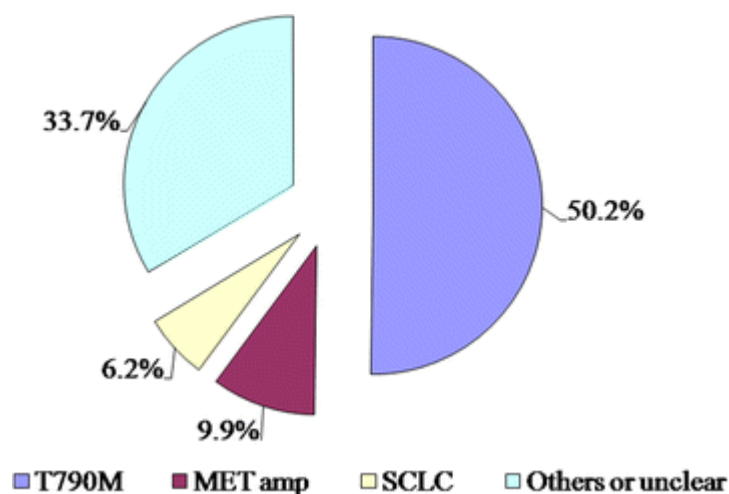
Εγκεκριμένες θεραπείες σε άλλους τύπους καρκίνου

Θεραπείες σε επίπεδο κλινικών μελετών.

Η επίκτητη αντοχή στους πρώτης και δεύτερης γενιάς EGFR TKIs

Προκαλείται από έναν αριθμό διαφορετικών μοριακών μηχανισμών οι οποίοι έχουν εξεταστεί εκτεταμένα σε πρόσφατες μελέτες. Τους μηχανισμούς αυτούς μπορούμε να τους ταξινομήσουμε σε τρεις (3) κατηγορίες:

1. Μεταλλαγές του στόχου ( στην περίπτωση μας του EGFR) που εμποδίζουν τη δράση των αναστολέων
2. Ενεργοποίηση εναλλακτικών μονοπατιών σηματοδότησης που οδηγούν σε ανεξάρτητη από EGFR ανάπτυξη και πολ/σμό των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα
3. Ιστολογικές μεταβολές όπως είναι το φαινόμενο της επιθηλιομεσεγχυματικής μετατροπής (EMT) ή η μετάπτωση από μη μικροκυτταρικό σε μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.



Εικόνα 11: Μηχανισμοί ανάπτυξης ανθεκτικότητας στη θεραπεία. (15)

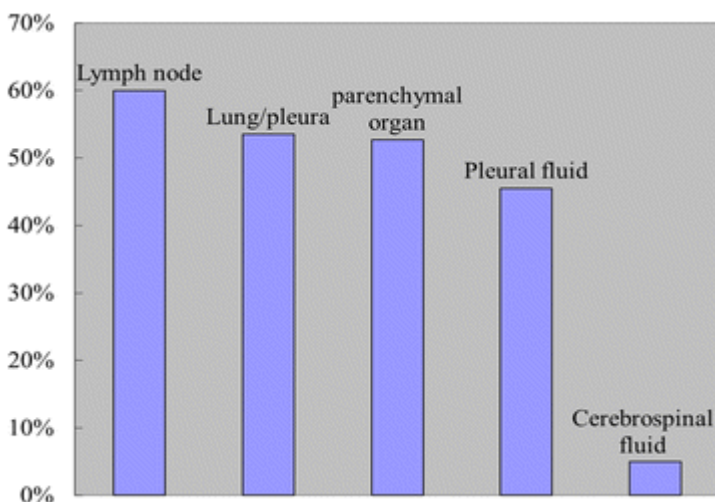
## Τι είναι η T790M μεταλλαγή και ποιος ο ρόλος της στο καρκίνο του πνεύμονα?

Η σημειακή μετάλλαξη T790M που εντοπίζεται στο εξόνιο 20 του γονιδίου EGFR είναι ο συνηθέστερος μηχανισμός της επίκτητης αντίστασης σε TKIs πρώτης και δεύτερης γενιάς. (8). Με βάση τη δομική μοντελοποίηση της παραγόμενης πρωτεΐνης διαπιστώθηκε ότι η αντικατάσταση της θρεονίνης σε μεθειονίνη επάγει τη στερεοχημική παρεμπόδιση της πρόσδεσης του αναστολέα στον υποδοχέα του EGFR. Επιπλέον μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η μετάλλαξη T790M παράγει μια αυξημένη συγγένεια του EGFR υποδοχέα για ATP, οδηγώντας έτσι στην εκτόπιση ανταγωνιστών του ATP και κατ' επέκταση στην μη αποτελεσματική ανταπόκριση του ασθενούς στη θεραπεία με τον συγκεκριμένο αναστολέα.

Τα πειραματικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι η επίκτητη αντίσταση στους στοχευόμενους παράγοντες μπορεί να προκληθεί είτε από de novo μεταλλάξεις που εμφανίζονται σε καρκινικά κύτταρα

λόγω της γενετικής αστάθειας τους είτε από μεταβολές που προϋπήρχαν στον όγκο που δεν υποβλήθηκε σε θεραπεία σε πολύ χαμηλή συχνότητα και συνεπώς δεν μπορεί να προσδιοριστεί χρησιμοποιώντας τις συνήθεις διαγνωστικές τεχνικές. Η T790M αποτελεί μια μεταλλαγή εντοπιζόμενη στο 50-60% των περιπτώσεων ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του πνεύμονα και αναπτύσσουν αντίσταση στη θεραπεία με αναστολείς 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> γενιάς και λιγότερο από το 1% των περιπτώσεων σχετίζεται με κληρονομικότητα.(9)

Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως η παρουσία της T790M μεταλλαγής πριν την έναρξη της θεραπείας ακόμα και σε πολύ μικρά ποσοστά σχετίζεται με μικρότερα ποσοστά PFS (progression free survival) και όπως έχει αποδειχθεί η παρουσία της σε ανιχνεύσιμα επίπεδα με διαγνωστικές τεχνικές ρουτίνας είτε μόνη της είτε σε συνδυασμό με άλλη μεταλλαγή αποτελεί σπάνιο φαινόμενο για ασθενείς που δεν έχουν υποβληθεί σε κανένα είδος θεραπείας με αναστολείς TKIs. Επιπλέον η ανίχνευση της T790M μεταλλαγής σε συνδυασμό με άλλη sensitizing μεταλλαγή και συγκεκριμένα με την απαλοιφή στο εξώνιο 19 προσδίδει ένα σημαντικό πλεονέκτημα επιβίωσης. Επίσης δεν έχει αποδειχθεί κάποια συσχέτιση της παρουσίας της T790M με την ηλικία, το φύλο ή το κάπνισμα ενώ όπως έχει δειχθεί σε μια μελέτη του Wang et al. (2018) υπάρχει άμεση συσχέτιση της παρουσίας της με τον εντοπισμό της νόσου. (πίνακας) Πιο συγκεκριμένα, ο συνολικός ρυθμός μετάλλαξης T790 M στις βιοψίες στερεών όγκων ήταν 52,7% , παρόμοιος με εκείνον που παρατηρήθηκε σε δείγματα πνευμονικής και υπεζωκοτικής βιοψίας ενώ ανιχνεύθηκε σε λιγότερο από 5% σε δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (1/21),και σε σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά από αυτά σε άλλους τύπους δειγμάτων (P <0,05).



Εικόνα 12: Συσχέτιση του ποσοστού παρουσίας της T790M μεταλλαγής με τον εντοπισμό της νόσου. (15)



**Table 1** Types, frequency and epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor sensitivity of *EGFR* kinase domain mutations in lung cancer

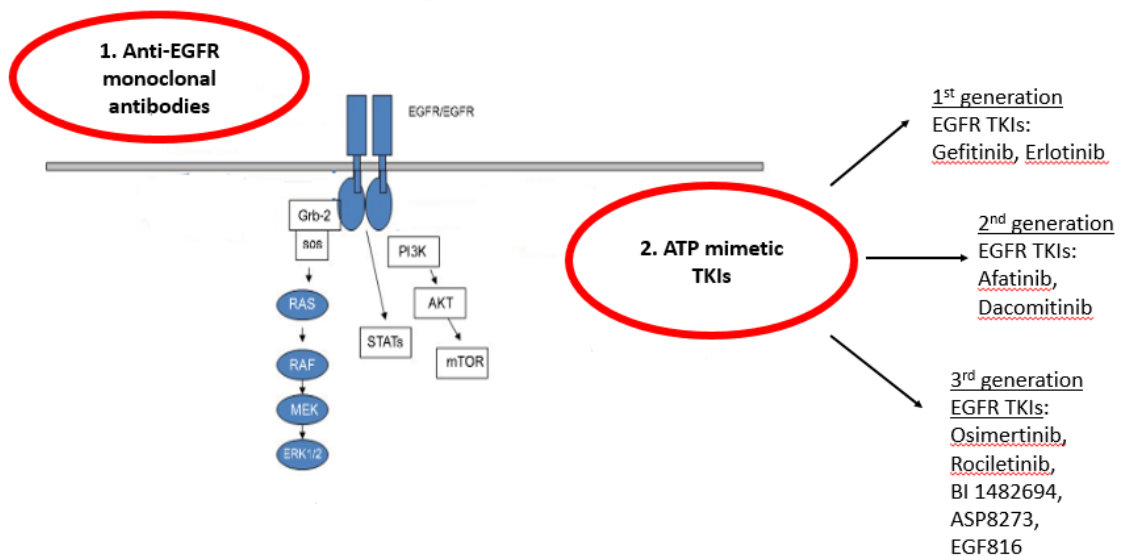
EGFR mutation	Approximate frequency (%)	EGFR TKI [ <i>in vitro</i> sensitivity and expected overall response rate (ORR)]		
		1 <sup>st</sup> generation	2 <sup>nd</sup> generation	3 <sup>rd</sup> generation
EGFR TKI sensitivity type		Gefitinib 250 mg Erlotinib 150 mg	Afatinib 40 mg	Osimertinib 80 mg
<b>Sensitizing</b>				
Exon 19 deletion	45.0	++++ (ORR >70%)	++++ (ORR >75%)	++++ (ORR >70%)
L858R	35.0	++++ (ORR >60%)	++++ (ORR >70%)	++++ (ORR >60%)
G719X	3.0	++ (ORR >55%)	+++ (ORR >65%)	++ (ORR ?)
L861Q	3.0	++ (ORR >55%)	++ (ORR >55%)	++ (ORR ?)
S768I	<1.5	+ (ORR >45%)	++ (ORR >55%)	? (ORR ?)
Exon 18 indel/E709X	<0.5	++ (ORR >55%)	+++ (ORR >65%)	++ (ORR ?)
Exon 19 insertion	<0.5	++ (ORR >55%)	++ (ORR ?)	++ (ORR ?)
A763_Y764insFQEA	<0.5	++ (ORR >55%)	++ (ORR ?)	++ (ORR ?)
Exon 18–25 duplication ( <i>EGFR</i> -KDD)	<0.5	++ (ORR >55%)	+++ (ORR >65%)	++ (ORR ?)
Rearrangement ( <i>EGFR</i> - <i>RAD51</i> )	<0.5	++ (ORR >55%)	+++ (ORR ?)	++ (ORR ?)
<b>Insensitizing</b>				
Exon 20 insertion	>7.0	– (ORR <5%)	– (ORR <10%)	– (ORR ?)
T790M inherited	<1.0	– (ORR ~0%)	– (ORR ~0%)	++++ (ORR >60%)
Others	>2.0	? (ORR ?)	? (ORR ?)	? (ORR ?)
<b>Acquired resistance</b>				
T790M + sens.	>50.0 (1 <sup>st</sup> /2 <sup>nd</sup> gen. TKI)	– (ORR ~0%)	– (ORR <5%)	++++ (ORR >60%)
C797X + T790M + sens.	<50.0 (osimertinib)	– (ORR ~0%)	– (ORR ~0%)	– (ORR ~0%)

Εικόνα 13: 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> generation TKIs (16)

Οι αναστολείς 3<sup>ης</sup> γενεάς χρησιμοποιούνται ευρέως πλέον στην κλινική πράξη. Τέτοιοι αναστολείς είναι:

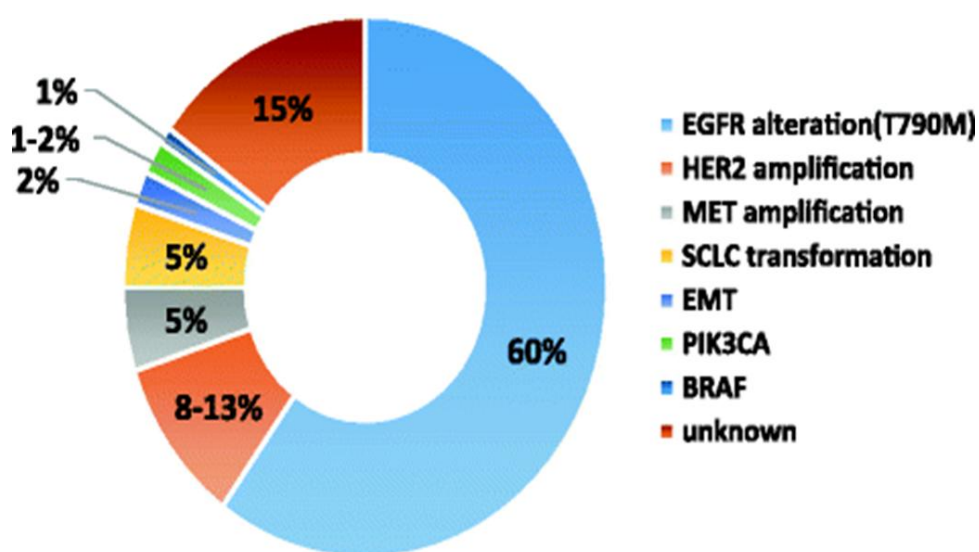
- i. To osimertinib
- ii. To rociletinib
- iii. Οι HM61713, ASP8273, EGF 816, PF-06747775

### Molecular targets of EGFR inhibitors



Εικόνα 14: Τρόπος δράσης των αναστολέων TKIs. (17)

Η χρήση του osimertinib εγκρίθηκε πρόσφατα από το FDA για περιπτώσεις μεταστατικών EGFR T790M+ καρκίνων του πνεύμονα. Ο συγκεκριμένος αναστολέας διαφέρει δομικά από τους αναστολείς 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> γενιάς. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι ασθενείς με EGFR T790M+ θετικούς όγκους παρουσίασαν μεγαλύτερο PFS (9,6 μήνες) σε σύγκριση με EGFR T790M- ασθενείς. Βάσει κλινικών μελετών ημερήσια συνιστώμενη δόση έχει προταθεί 80mg με πιθανά τα συμπτώματα της διάρροιας, ναυτίας, εμμετούς και μειωμένη όρεξη για σίτιση. Το AZD9291 έχει εξεταστεί στη θεραπεία πρώτης γραμμής από τη δοκιμή AURA. Ειδικότερα, χορηγήθηκαν δόσεις 80 ή 160 mg / ημέρα σε 60 ασθενείς που δεν είχαν λάβει προηγούμενη θεραπεία με προχωρημένο NSCLC και μεταλλαγμένο το γονίδιο EGFR. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν τα 63,5 έτη και οι υποτύποι μετάλλαξης του EGFR περιελάμβαναν την απαλοιφή στο εξόνιο 19 (37%), την αντικατάσταση p.L858R στο εξόνιο 21(40%), και άλλες μεταλλάξεις ευαισθητοποίησης του EGFR (3%) καθώς και την T790M σε ποσοστό 8% των ασθενών. Το ORR την ημέρα αποκοπής της θεραπείας 70% (95% CI 57-81) και το 1/3 των ασθενών παρουσίασαν ανεπιθύμητα συμπτώματα, που περιλαμβάνουν κυρίως δερματικό εξάνθημα και διάρροια. Αυτά τα αποτελέσματα φαίνεται να είναι πολλά υποσχόμενα αλλά σαφώς βρίσκονται ακόμα σε αρκετά πρώιμο στάδιο. Σε μια κλινική μελέτη πρώτης γραμμής φάσης III εξετάστηκε η επίδραση και η ασφάλεια χορήγησης του AZD9291 σε συνδυασμό με το gefitinib ή το erlotinib σε ασθενείς με κοινές μεταλλάξεις του EGFR. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν μεταλλαγμένες για το EGFR γονίδιο κυτταρικές σειρές και κατέληξαν στην ύπαρξη επιπλέον μηχανισμών ανάπτυξης αντίστασης στη θεραπεία. Πιο συγκεκριμένα, μεταλλαγή στα KRAS και NRAS γονίδια ίσως ευθύνονται για την ανάπτυξη αντοχής στη θεραπεία. Σε επόμενο στάδιο διαπιστώθηκε ότι ο συνδυασμός του AZD9291 με το selumetinib ( αναστολέας MEK) φάνηκε να προκαλεί την υποχώρηση των ανθεκτικών υποκλώνων στη θεραπεία με AZD9291 σε ένα EGFR+/T790M+ διαγονιδιακό μοντέλο.



Εικόνα 15: Άλλες γονιδιακές μεταλλαγές εξαιτίας των οποίων επάγεται ανάπτυξη αντίστασης στη θεραπεία. (18)

Μια ποικιλία μελετών όσον αφορά το συνδυασμό της χορήγησης του AZD9291 με άλλους αναστολείς βρίσκεται σε εξέλιξη και απεικονίζεται στον παρακάτω πίνακα.

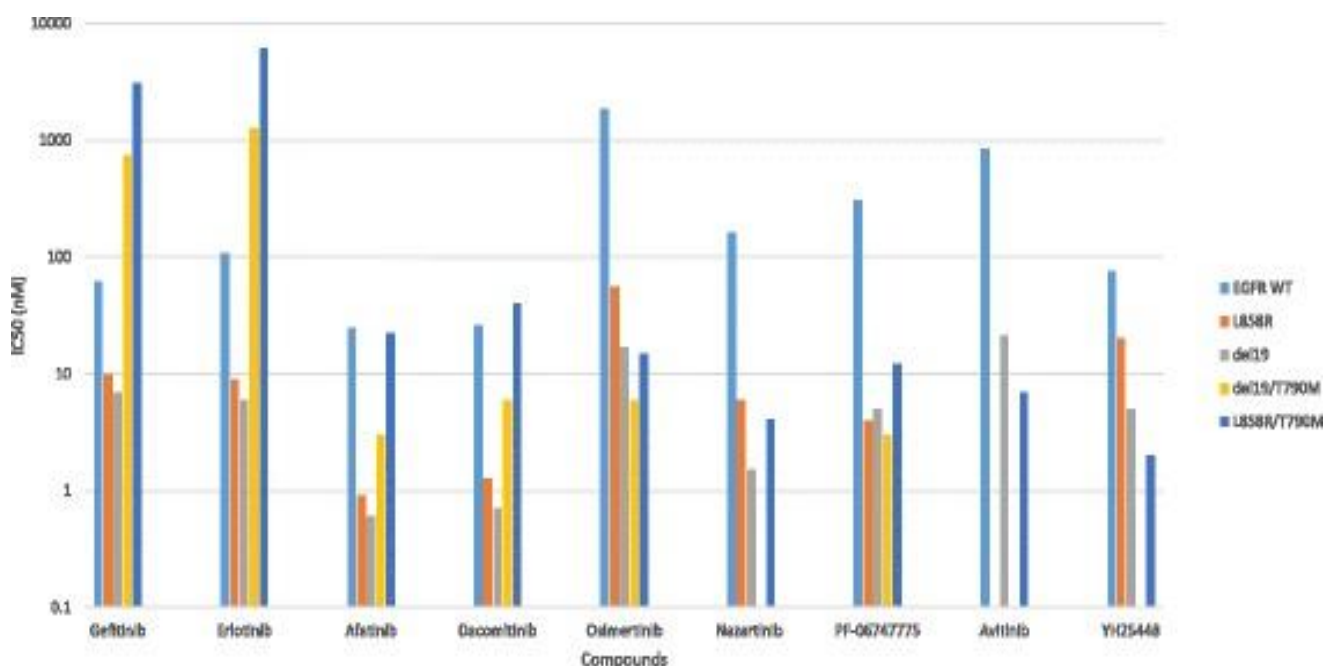
Phase	Study population	NCT no.
Phase Ib	EGFR mutated advanced NSCLC progressed following therapy with an EGFR TKI	02143466
Phase I	EGFR mutated advanced NSCLC progressed following therapy with an EGFR TKI and standard therapy	02157883
Phase I	EGFR mutated advanced NSCLC progressed following therapy with an EGFR TKI	02317016
Phase III (ADAURA)	EGFR mutated stage IB–IIIA NSCLC following complete resection with or without adjuvant chemotherapy	02511106
Phase I	EGFR mutated advanced NSCLC progressed following therapy with an EGFR TKI	02197234
Phase III	EGFR mutated advanced NSCLC	02296125
Phase III	EGFR T790M mutation-positive NSCLC progressed following therapy with an EGFR TKI	02474355
Phase III	EGFR T790M mutation-positive NSCLC progressed following therapy with an EGFR TKI	02151981
Phase I	EGFR mutated advanced NSCLC progressed following therapy with an EGFR TKI	02503722
Phase I	EGFR mutated advanced NSCLC progressed following therapy with an EGFR TKI	02496663
Phase I/II	EGFR mutated advanced NSCLC progressed following therapy with an EGFR TKI	01802632
Phase I	EGFR mutated advanced NSCLC	02228369
Phase II	EGFR T790M mutation-positive NSCLC progressed following therapy with an EGFR TKI	02094261
Phase II	EGFR T790M mutation-positive NSCLC progressed following therapy with an EGFR TKI	02442349
Phase Ib	EGFR mutated advanced NSCLC progressed following therapy with an EGFR TKI	02520778
Phase IIa	Stage IIIB–IV locally advanced or metastatic NSCLC	02179671
Phase I	Chinese patients with EGFR mutated advanced NSCLC progressed following therapy with an EGFR TKI	02529995
Phase II	EGFR mutated advanced NSCLC progressed following therapy with an EGFR TKI	02504346

Εικόνα 16: Κλινικές μελέτες που βρίσκονται σε εξέλιξη σχετικά με τη χορήγηση osimertinib.

## Εμφάνιση αντίστασης στη θεραπεία με αναστολείς 3<sup>ης</sup> γενιάς.

Όπως προαναφέρθηκε η πιο κοινή μεταλλαγή αντίστασης στη θεραπεία με αναστολείς 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> γενιάς είναι ο εντοπισμός της T790M μεταλλαγής. Ωστόσο, παρά την αρχική επιτυχή έκβαση του ασθενούς στη θεραπεία με αναστολείς 3<sup>ης</sup> γενιάς (osimertinib) υπάρχει ακόμα η περίπτωση ανάπτυξης αντοχής στη θεραπεία με κάποιους μηχανισμούς συχνότερος εκ των οποίων είναι η αντικατάσταση p.C797S στο εξώνιο 20 του EGFR γονιδίου. Έχει αποδειχθεί ότι η συγκεκριμένη μεταλλαγή μπορεί να εμφανιστεί περίπου 6-17 μήνες μετά την έναρξη της θεραπείας με 3<sup>ης</sup> γενιάς αναστολείς για τους T790M+ ασθενείς. Επιπλέον μηχανισμοί αντίστασης σαφώς και υπάρχουν εφόσον δεν είναι λίγες φορές που έχει

εντοπιστεί ανοχή στη θεραπεία με AZD9291 ακόμα και για ασθενείς αρνητικούς τόσο για την T790M όσο και για την C797S μεταλλαγή. (9, 18)



Εικόνα 17: Κλινική αποτελεσματικότητα των αναστολέων κινάσων τυροσίνης σχετιζόμενη με τις εντοπιζόμενες μεταλλάξεις. (9) (19)

Κατά τη διάρκεια των ετών διάφοροι μηχανισμοί αντίστασης στη θεραπεία έχουν εντοπιστεί και διακρίνονται σε δυο κύριες κατηγορίες: τους EGFR εξαρτώμενους μηχανισμούς και τους ανεξάρτητους από το EGFR γονίδιο μηχανισμούς. Οι πρώτοι περιλαμβάνουν την C797S μεταλλαγή και οι δεύτεροι τις μεταλλαγές που προκαλούνται σε γονίδια των downstream μονοπατιών σηματοδότησης του EGFR.

### EGFR εξαρτώμενοι μηχανισμοί

Εκτός από το osimertinib η C797S μεταλλαγή έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να προκαλέσει αντίσταση στη θεραπεία και σε άλλους αναστολείς 3<sup>ης</sup> γενιάς όπως είναι το HM61713 olmutinib, το rociletinib, και το nazartinib. Σε μια μελέτη του Chabon et al. (2018) που πραγματοποιήθηκε, μελετήθηκε το μοριακό προφίλ των ασθενών πριν και μετά τη θεραπεία με rociletinib. Μόνο σε έναν από τους 43 ασθενείς ανιχνεύθηκε η C797S μεταλλαγή με τον συνεντοπισμό της T790M μεταλλαγής ( C797+/T790M+ ), μια συχνότητα αρκετά μικρότερη σε σύγκριση με τα αποτελέσματα μια παρόμοιας μελέτης που πραγματοποιήθηκε για τη θεραπεία με osimertinib. Σε μια παρόμοια μελέτη που πραγματοποίησε ο Piotrowska σε 12 ασθενείς που είχαν λάβει θεραπεία με rociletinib και για τους οποίους παρατηρήθηκε πρόοδος της νόσου, δεν εντοπίστηκε καμία C797S μεταλλαγή. Επομένως καταλήγουμε στην ύπαρξη διαφορετικού προτύπου ανάπτυξης αντίστασης στη

θεραπεία αυτών των δυο αναστολέων 3<sup>ης</sup> γενιάς. Πρόσφατα περιγράφηκε από τους Tan et al. η συνύπαρξη της C797S μεταλλαγής με την απαλοιφή μια περιοχής του mTOR γονιδίου, ύστερα από πρόοδο της νόσου που σημειώθηκε μετά από θεραπεία με EGFR816 nazartinib. Επίσης μια πρόσφατη μελέτη των Piotrowska και των φοιτητών του αξιολόγησαν μια βάση δεδομένων της Guardant Health αποτελούμενη από 61 δείγματα plasma από 61 πάσχοντες από αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα με C797S μεταλλαγή. Πρόκειται για ασθενείς στους οποίους είχε χορηγηθεί θεραπεία με osimertinib ύστερα από την εμφάνιση της T790M μεταλλαγής και τα αποτελέσματα διαμορφώθηκαν ως εξής: στους 50 ασθενείς ανιχνεύθηκε η C797 σε συνδυασμό με την T790M (in cis), στους 6 ανιχνεύθηκε η T790M χωρίς την C797 (ή το αντίστροφο) in trans στους 4 ανιχνεύθηκε η C797 μεταλλαγή μόνη της και 1 ασθενής (2%) είχε δύο συνυπάρχοντες κλώνους C797S (έναν σε cis κατάσταση με την T790 M και έναν σε trans). Στους 51 ασθενείς εμφανίστηκε ταυτόχρονα με την C797S μεταλλαγή τουλάχιστον ένας επιπλέον μηχανισμός αντίστασης στη θεραπεία που μπορεί να αφορά είτε την ενίσχυση του EGFR γονιδίου, είτε την ενίσχυση του MET είτε μεταλλαγή του BRAF (V600E) ή του PIK3CA γονιδίου. Έτσι, η πολυκλωνικότητα του C797S γονιδίου, μαζί με την ύπαρξη κι άλλων μηχανισμών αντίστασης, τονίζουν την ανομοιογένεια των ανθεκτικών EGFR-μεταλλαγμένων όγκων. (20, 21)

Εκτός από τη μετάλλαξη C797S, άλλες μεταλλάξεις EGFR όπως οι L792 και L718 έχουν επίσης αναφερθεί. Είναι ενδιαφέρον ότι όλες οι μεταλλάξεις L792 είναι σε cis κατάσταση με την T790 M και σε trans με την C797 μετάλλαξη όταν πρόκειται για τον ίδιο ασθενή. Άλλες μεταλλάξεις του EGFR όπως η L798I, E709K, L792V και G796S / R έχουν επίσης περιγραφεί. (9, 16, 21, 22).

## EGFR ανεξάρτητοι μηχανισμοί ανάπτυξης αντίστασης στη θεραπεία.

Τόσο οι KRAS μεταλλαγές όσο και μεταλλαγές στο BRAF στο NRAS γονίδιο (συμπεριλαμβανομένου και ενός νέου στόχου, της E6K μεταλλαγής) καθώς και στο MEK1 θεωρούνται υπεύθυνες για την εμφάνιση αντίστασης στη θεραπεία με αναστολείς 3<sup>ης</sup> γενιάς σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. Πιο συγκεκριμένα οι KRAS G12S, G12A, Q61H, A146T και G12D μεταλλάξεις έχουν αναφερθεί σε πολλές περιπτώσεις ασθενών μετά τη θεραπεία με τρίτης γενιάς EGFR TKIs. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι τέτοιες ανθεκτικές κυτταρικές σειρές παρουσίασαν ευαισθησία ύστερα από συνδυαστική θεραπεία EGFR TKIs και MEK inhibitors (selumetinib).

Τελευταία έχει γίνει λόγος για τη σημασία της ύπαρξης μεταλλαγής στο BRAF γονίδιο στην ανάπτυξη αντίστασης στη θεραπεία. Ειδικότερα, η V600E μεταλλαγή μπορεί να ευθύνεται στην έλλειψη ανταπόκρισης των ασθενών στη θεραπεία με osimertinib. Όταν επιχειρήθηκε η χορήγηση αναστολέα του BRAF γονιδίου σε συνδυασμό με osimertinib, τα αποτελέσματα ήταν πολλά υποσχόμενα. (23) Επιπλέον μεταλλαγές στο HER-2 και MET γονίδιο ίσως είναι υπεύθυνες για την αντίσταση στη θεραπεία με αναστολείς 3<sup>ης</sup> γενιάς. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ενίσχυση του HER-2 γονιδίου και η T790M μεταλλαγή είναι δύο μεταλλάξεις

αμοιβαία αποκλειόμενες για τους ασθενείς που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με osimertinib, ενώ η συνύπαρξη τους είναι εφικτή για αυτούς που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με rociletinib. Η ενίσχυση MET έχει επίσης αναφερθεί για ασθενείς που προχώρησαν στην θεραπεία τόσο με osimertinib όσο και με rociletinib και nazartinib.(24) Μέχρι σήμερα 2 μεταλλαγές στο γονίδιο PIK3CA (E545K, E542K) έχουν ανιχνευθεί στους 5/43 ασθενείς που παρουσίασαν αντοχή στη θεραπεία με osimertinib.

Υγρή βιοψία ή βιοψία από ιστό?



Ο καρκίνος είναι μια από τις μεγαλύτερες απειλές που αντιμετωπίζει η κοινωνία μας, ώντας η δεύτερη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Μέχρι πρότινος οι τρέχουσες στρατηγικές διάγνωσης του καρκίνου συνίστανται στην βιοψία ιστού. Αυτό το δείγμα επιτρέπει τη μελέτη συγκεκριμένων βιοδεικτών και τη γενετική φύση του όγκου. Ωστόσο, η διαδικασία που ακολουθείται κατά την πραγματοποίηση της βιοψίας από ιστό αποτελεί μια επικίνδυνη και επώδυνη για τον ασθενή διαδικασία και σε ορισμένες περιπτώσεις δεν είναι διαθέσιμη σε δυσπρόσιτους όγκους. Επιπλέον, μια βιοψία ιστού είναι δαπανηρή και χρονοβόρα και δεν μπορεί να εφαρμοστεί επανειλημμένα ή κατά την υποτροπή της νόσου. Νέες εναλλακτικές λύσεις που ξεπερνούν αυτά τα μειονεκτήματα αυξάνονται μέχρι σήμερα, όπως η υγρή βιοψία που αποτελεί μια αρκετά ελπιδοφόρα πρόκληση στον τομέα της ογκολογίας. Η υγρή βιοψία είναι η αναζήτηση των βιοδεικτών σε έναν μη στερεό βιολογικό ιστό, κυρίως αίμα, το οποίο έχει αξιολογικά πλεονεκτήματα έναντι της παραδοσιακής μεθόδου. Αποτελεί μια μη επεμβατική και ανώδυνη μέθοδο, δεν απαιτεί χειρουργική επέμβαση και μειώνει το κόστος και το χρόνο διάγνωσης. Οι περισσότερο μελετημένοι καρκινικοί μη επεμβατικοί βιοδείκτες είναι τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), το κυκλοφορούν DNA του όγκου (ctDNA) και τα εξωσώματα. Αυτοί οι κυκλοφορούντες βιοδείκτες διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην κατανόηση της μετάστασης και της ογκογένεσης, που θα μπορούσαν να δώσουν μια καλύτερη εικόνα για την εξέλιξη της δυναμικής του όγκου κατά τη διάρκεια της θεραπείας και της εξέλιξης της νόσου.

Η υγρή βιοψία, όπως υπονοεί και το όνομά της, συνίσταται στη λήψη δείγματος αίματος από τον ασθενή, με σκοπό την παρακολούθηση της εξέλιξης της ασθένειας. Ενδείκνυται ειδικά σε περιπτώσεις που

η κλασική επεμβατική βιοψία είναι δύσκολη ή αδύνατη, παρέχοντας κρίσιμες πληροφορίες για την υγεία του ασθενούς σε πραγματικό χρόνο και με μικρότερο σωματικό, ψυχολογικό και οικονομικό κόστος. Τι πληροφορίες, όμως, μπορεί να δώσει το αίμα ενός ασθενούς με καρκίνο; Πληροφορίες για το «μοριακό προφίλ» του όγκου, εκτός από τα καρκινικά κύτταρα, δίνει και το ελεύθερο γενετικό υλικό του όγκου, το οποίο κυκλοφορεί σε μικρές ποσότητες στο αίμα και φέρει τις καρκινικές μεταλλάξεις (γενετικές αλλαγές). Καθώς ο όγκος μεταβάλλεται συνεχώς, εμφανίζοντας νέες μεταλλάξεις που μπορεί να τον καταστήσουν ανθεκτικό σε μια θεραπεία, η υγρή βιοψία μπορεί να δώσει στον γιατρό πολύτιμο χρόνο για την προσαρμογή της θεραπευτικής αγωγής.

Ορισμένα θραύσματα DNA που απελευθερώνονται από τον όγκο στην κυκλοφορία του αίματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μη επεμβατική εξέταση ασθενών που πάσχουν από πρώιμα στάδια καρκίνου, για την παρακολούθηση της ανταπόκρισης των ασθενών σε μια συγκεκριμένη θεραπεία καθώς και να μας εξηγήσουν το λόγο που κάποιοι ασθενείς εμφανίζουν ανθεκτικότητα στη θεραπεία. Για τους περισσότερους όγκους η βιοψία ιστού αποτελεί μια πρόκληση τόσο από άποψη κόστους, όσο και από άποψη κινδύνου για επιπλοκές κατά τη διάρκεια συλλογής του δείγματος κυρίως από ασθενείς που πάσχουν από καρκίνο προχωρημένου σταδίου. Η ανάπτυξη μη επεμβατικών μεθόδων ανίχνευσης και παρακολούθησης όγκων εξακολουθεί να αποτελεί μείζονα πρόκληση στην ογκολογία. Η υγρή βιοψία χρησιμοποιήθηκε αρχικά για την ανάλυση cfDNA τόσο σε περιφερικό αίμα όσο και σε σωματικά υγρά όπως ούρα, ασπλητικό και εγκεφαλονωτιαίο υγρό

## ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ ΚΑΙ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Η συχνότητα εμφάνισης του καρκίνου του πνεύμονα έχει αυξηθεί σημαντικά τον περασμένο αιώνα, κυρίως λόγω του καπνίσματος, και παραμένει η πιο κοινή αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως. Αυτό συμβαίνει συχνά στις περιπτώσεις που ο καρκίνος του πνεύμονα παρουσιάζεται για πρώτη φορά στα τελευταία στάδια και στην έλλειψη θεραπευτικών επιλογών σε αυτά τα μεταγενέστερα στάδια. Οι καθυστερημένες διαγνώσεις, οι ανεπαρκείς δειγματοληψίες όγκων και οι λανθασμένες διαγνωστικές εξετάσεις για τον καρκίνο του πνεύμονα δεν είναι επίσης ασυνήθιστες εξαιτίας των περιορισμών της βιοψίας ιστών.

Πολλαπλές μοριακές μέθοδοι υγρής βιοψίας εξετάζονται επί του παρόντος για να προσδιοριστεί η αποτελεσματικότητά τους ως υποκατάστατα στη βιοψία ιστού. Ο χαμηλός βαθμός επιβίωσης στον καρκίνο του πνεύμονα οφείλεται στο ότι μόνο το 20% των περιπτώσεων LC διαγνώστηκαν στα αρχικά στάδια, ενώ τα υπόλοιπα διαγνώστηκαν σε μεταγενέστερα στάδια, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο τις θεραπευτικές επιλογές. Όταν χρησιμοποιούνται μέθοδοι ανίχνευσης που επιτρέπουν προηγούμενες διαγνώσεις, η επιβίωση των ασθενών αυξάνεται. Για παράδειγμα, σε σύγκριση με την

τυπική ακτινογραφία θώρακα, η σπειροειδής υπολογιστική τομογραφία (CT) μειώνει την θνησιμότητα του LC κατά 20%. Η υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα που σχετίζονται με τον καρκίνο του υπογραμμίζουν την ανάγκη για καλύτερες μεθόδους πρώιμης ανίχνευσης.

Έχει αποδειχθεί ότι για ALK θετικά αδενοκαρκινώματα η θεραπεία με crizotinib αυξάνει σημαντικά την επιβίωση του ασθενούς. Επιπρόσθετα, ο καρκίνος του πνεύμονα μπορεί να προκληθεί και από επιγενετικές τροποποιήσεις, όπως αυξημένος ρυθμός μεθυλίωσης προαγωγού γονιδίου p16, RASSF1, APC και H-καντερίνης, η οποία περιορίζει την έκφραση γονιδίου καταστολέα όγκου, προάγοντας την εξέλιξη του καρκίνου [12]. Επί του παρόντος αναπτύσσονται νέες θεραπείες που στοχεύουν τις LC επιγενετικές αλλαγές και μερικές έχουν ήδη αποδειχθεί αποτελεσματικές στη θεραπεία LC. (25)

Προκειμένου να δημιουργηθεί το μοριακό προφίλ ενός όγκου, μπορεί να απαιτείται βιοψία ή αρκετές βιοψίες. Οι επαναλαμβανόμενες βιοψίες είναι επεμβατικές και μπορεί να χάσουν τμήματα του όγκου που αναπτύσσουν αντοχή στη θεραπεία ή έχουν αποκτήσει νέες μεταλλάξεις οδηγού. Επιπρόσθετα σε καρκίνους προχωρημένου σταδίου, μόνο στο 31% των ασθενών ήταν εφικτή η πραγματοποίηση βιοψίας περιορίζοντας έτσι τη δυνατότητα επίτευξης μοριακής ανάλυσης. Τέλος, πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι οι κακοήθεις όγκοι έχουν σημαντική μοριακή ετερογένεια, καθώς τα κύτταρα από ένα τμήμα ενός όγκου έχουν διαφορετικές μεταλλάξεις από άλλες περιοχές και μερικές φορές μοιράζονται μόνο το ένα τρίτο των μεταλλάξεων σε ολόκληρο τον όγκο. Επομένως, οι ελάχιστα επεμβατικές μέθοδοι που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην έγκαιρη διάγνωση και ανίχνευση μεταλλάξεων θα ήταν χρήσιμες στη βελτιστοποίηση της θεραπείας του καρκίνου του πνεύμονα. Πρόσφατες εργασίες σχετικά με τις αναλύσεις βιοδεικτών με βάση το αίμα, συμπεριλαμβανομένου του ελεύθερου κυκλοφορούντος DNA (cfDNA), των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTC) και των αιμοπεταλίων (TEPs), υποδεικνύουν ότι αυτοί οι βιοδείκτες μπορούν να επιτρέψουν την πρώιμη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα με πιο συχνή παρακολούθηση. Επιπρόσθετα, αυτές οι τεχνικές είναι λιγότερο επεμβατικές και μπορούν να παρέχουν πληρέστερο μοριακό χαρακτηρισμό του όγκου.(26) Αυτοί οι δείκτες μπορούν επίσης να επιτρέψουν την παρακολούθηση τυχόν ελάχιστης υπολειμματικής νόσου.

### Ελεύθερα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα. (CTCs)

Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα είχαν παρατηρηθεί ήδη από πολύ παλιά. Πρόκειται για βιώσιμα κύτταρα προερχόμενα από τον όγκο που απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος. Τα περισσότερα CTCs είναι τυχαία κύτταρα που βγήκαν προς τα έξω κάτω από την πίεση εξωτερικών δυνάμεων όπως η ανάπτυξη του όγκου, δυνάμεις κατά την εγχειρητική διαδικασία ή την τριβή. Παρόλο που χιλιάδες τέτοια κύτταρα μπορούν να απελευθερωθούν με κάθε έναν από αυτούς τους τρόπους, τα περισσότερα από αυτά απομακρύνονται από την κυκλοφορία του αίματος μέσω απόπτωσης, δυνάμεων ροής του αίματος και



επίθεσης από το ανοσοποιητικό σύστημα. Τα κύτταρα αυτά είναι επομένως πολύ σπάνια και η απομόνωση και ανάλυση τους αποτελούν μια σημαντική τεχνολογική πρόκληση.

Οι τεχνολογίες που έχουν αναπτυχθεί για την απομόνωση CTCs είναι πολλές και όλες έχουν σαν τελικό στόχο να απομονώσουν αποτελεσματικά αυτόν τον πολύ σπάνιο πληθυσμό κυττάρων σε βιώσιμη και άθικτη κατάσταση και σε υψηλή καθαρότητα από τον τεράστιο αριθμό κυττάρων που τα περιβάλλει.

Οι υπάρχουσες τεχνολογίες μπορούν να χωριστούν με βάση την αρχή προσέγγισης τους σε αυτές που βασίζονται στην έκφραση επιφανειακών δεικτών και σε αυτές που είναι ανεξάρτητες από επιφανειακούς δείκτες. Οι περισσότερες τεχνολογίες της πρώτης κατηγορίας αφορούν θετική επιλογή που βασίζεται στην έκφραση συγκεκριμένων επιφανειακών δεικτών που απουσιάζουν από τα φυσιολογικά λευκοκύτταρα, κυρίως το EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) και cytokeratins. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τεχνολογίες που βασίζονται κυρίως σε μορφολογικά χαρακτηριστικά των CTCs, όπως το αυξημένο μέγεθος, το παραμορφωμένο σχήμα τους και διαφορές στην πυκνότητα, το ηλεκτρικό φορτίο ή τις μεταναστευτικές τους ιδιότητες. Οι τεχνολογίες αυτής της κατηγορίας μπορούν να βρουν καλύτερη εφαρμογή για καρκινικά κύτταρα που στερούνται επιθηλιακών δεικτών (όπως μελάνωμα, triple negative breast) καθώς και για καρκινικά κύτταρα που λόγω EMT χάνουν τους επιθηλιακούς δείκτες.

### Circulating Free DNA (cfDNA)

Η ανάλυση μοριακού προφίλ βασιζόμενη στη υγρή βιοψία χρησιμοποιείται βασίζεται στην ανίχνευση ελεύθερου κυκλοφορούντος νουκλεϊκού οξέος στο ολικό περιφερικό αίμα το οποίο ενισχύεται και στη συνέχεια αναλύεται με ειδικές μοριακές τεχνικές. Η πρώτη περιγραφή του ελεύθερου κυκλοφορούντος DNA χρονολογείται το 1948 με την ανίχνευση εμβρυϊκού γενετικού υλικού σε μητρικό δείγμα αίματος. Πιο συγκεκριμένα, όταν μια γυναίκα υποβλήθηκε σε προγεννητική εξέταση ρουτίνας μέσω αίματος τελείως τυχαία ανιχνεύθηκαν μεταλλάξεις cfDNA που προμήνυαν την ύπαρξη καρκίνου που μέχρι εκείνη τη χρονική στιγμή δεν ήταν δυνατό να διαπιστωθεί. Παρ' όλα αυτά, μόνο μετά από 50 χρόνια το cf DNA χρησιμοποιήθηκε για διαγνωστικό σκοπό με την καθιέρωση ευαίσθητων μοριακών πλατφόρμων. Η διαπίστωση αυτή σήμανε την έναρξη της χρήσης ελεύθερου κυκλοφορούντος γενετικού υλικού για την πρώιμη ανίχνευση μεταλλάξεων σε διάφορους τύπους όγκων. Στη σύγχρονη εποχή η υγρή βιοψία διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ανίχνευση T790M μετάλλαξης αντίστασης του γονιδίου του EGFR και κατ' επέκταση στον καθορισμό της στοχευμένης θεραπείας των ασθενών που πάσχουν από Μη μικρομυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΜΚΠ).

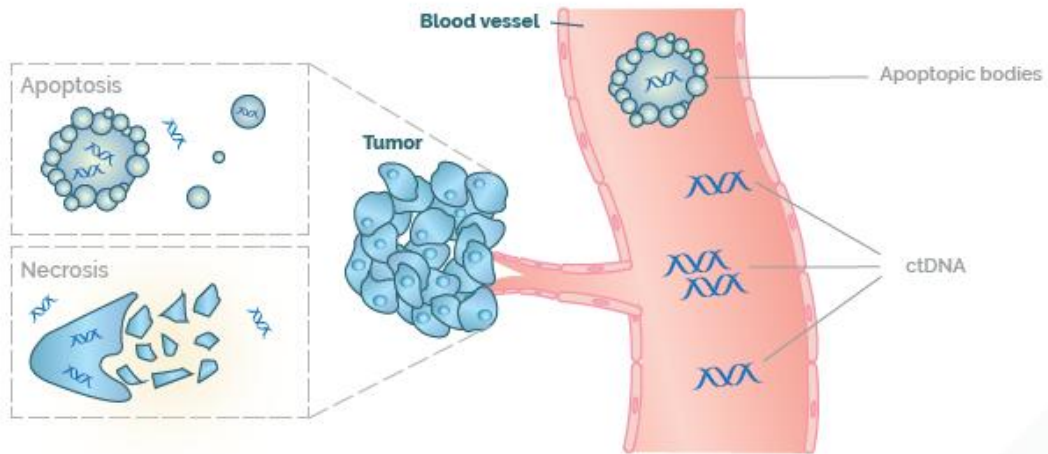
Το ελεύθερο κυκλοφορούν γενετικό υλικό προέρχεται από στέρεους όγκους με υψηλό δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αρκετά αποπτωτικά κύτταρα. Έτσι, πηγές cfDNA εκτός από τους όγκους, αποτελούν ο φυσιολογικός ιστός αναγέννησης σε διάφορες καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένης της αιμοποίησης, αντιδράσεις ανοσίας, φλεγμονώδεις διεργασίες και νέκρωση λόγω ανεπαρκούς παροχής αίματος. Η απελευθέρωση του ctDNA στην κυκλοφορία του αίματος επηρεάζεται από τον τύπο και το μέγεθος του όγκου, την τοποθεσία του καθώς και την αγγειοποίηση στην περιοχή αυτή.

### Εξωσώματα

Η μεταφορά βιολογικών υλικών μέσω διαφόρων μεμβρανών (ενδοκύττωση) είναι μια πολύ σημαντική διαδικασία για τη διατήρηση της ομοιόστασης των κυττάρων και πραγματοποιείται με μια ενεργή και παθητική εξαγωγή μικρο-και μακρομορίων μέσω μικροσωματιδίων, όπως τα εξωσώματα. Μπορούμε να τα χαρακτηρίσουμε ως μικρά, δεσμευμένα στη μεμβράνη κυστίδια που απελευθέρωνονται από τα κύτταρα για την πραγματοποίηση ανταλλαγής κάποια μοριακής πληροφορίας μεταξύ τους. Το μέγεθός τους κυμαίνεται από 30-100nm και η συγκέντρωσή τους στο αίμα σχετίζεται άμεσα από το φορτίο και το στάδιο της νόσου. Η απομόνωση των εξωσωμάτων εμφανίζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις προαναφερθέντες πηγές (ctc και ctDNA) κυρίως χάρη του ομοιογενούς μεγέθους τους και της δυνατότητας που δίνουν στους ερευνητές να τα διακρίνουν με τη χρήση μικροσκοπίου. Φέροντας στην επιφάνειά τους ειδικούς δείκτες μπορούν να “μαρτυρήσουν” τα κύτταρα στόχους τους γεγονός που αποτελεί χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο. Επιπλέον, τα εξωσώματα εμπεριέχοντας τα ειδικά για τον κάθε όγκο RNA δίνει τη δυνατότητα στους επιστήμονες για την ανάλυση του μοριακού προφίλ του όγκου. Τέλος, έχοντας τη δυνατότητα συγχώνευσης με την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων στόχων τα καθιστά δυνητικά εφαρμόσιμα ως “οχήματα” για την παροχή φαρμάκων στα κύτταρα στόχους αλλά και ως φορείς γονιδιακής θεραπείας.

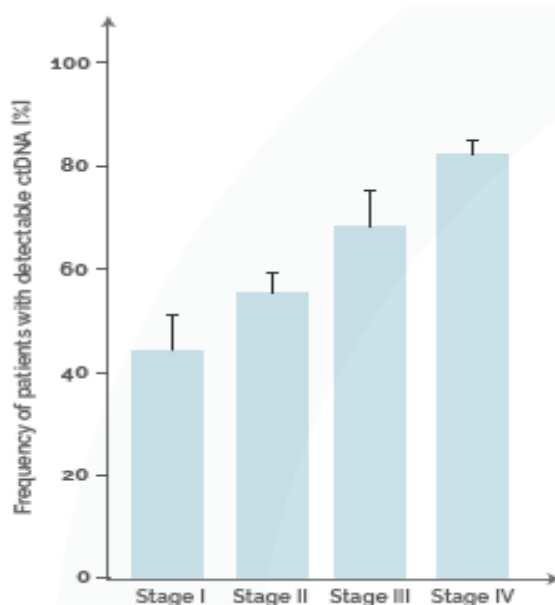
### Χρήση Ελεύθερου κυκλοφορούντος γενετικού υλικού (cfDNA) για τη διάγνωση του καρκίνου

Η ύπαρξη ελεύθερου κυκλοφορούντος DNA στο ολικό περιφερικό αίμα περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1948 αλλά ήταν τριάντα χρόνια αργότερα όταν αναφέρθηκε υψηλότερη συγκέντρωση cfDNA σε ασθενείς με καρκίνο παρά σε υγιή άτομα στον οποίων το αίμα ανιχνεύθηκαν θραύσματα ελεύθερου DNA λόγω απόπτωσης, αλλά η συγκέντρωση του cfDNA είναι χαμηλή λόγω της δράσης των φαγοκυττάρων. Ωστόσο, οι ασθενείς με όγκους έχουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα cfDNA εξαιτίας της δράσης των καρκινικών κυττάρων, τόσο μέσω αποπτωτικών όσο και νεκρωτικών διεργασιών.



Εικόνα 18: Τα καρκινικά κύτταρα απελευθερώνουν φράγματα DNA στο ολικό περιφερικό αίμα. (27)

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός του ότι τόσο η συγκέντρωση του cfDNA όσο και το ποσοστό των ασθενών με ανιχνεύσιμα θραύσματα ελεύθερου κυκλοφορούντος DNA σχετίζονται άμεσα με το στάδιο της νόσου. Πιο συγκεκριμένα όπως απεικονίζεται και στα παρακάτω διαγράμματα το 47% των ασθενών με καρκίνο σταδίου I έφεραν cfDNA, ενώ το ποσοστό αυτό αυξήθηκε στο 55%, 69% και 82% για τους ασθενείς των σταδίων II, III και IV, αντίστοιχα. Έχει πλέον επιβεβαιωθεί ότι το cfDNA περιέχει μεταλλάξεις (αντιγραφές, προσθήκες, απαλοιφές) τόσο πρωτογενών όσο και μεταστατικών βλαβών.



Εικόνα 19: Το ποσοστό των ασθενών με ανιχνεύσιμο κυκλοφορούν DNA αυξάνεται με το στάδιο της νόσου. (28)

## Η χρησιμότητα του Ελεύθερου κυκλοφορούντος καρκινικού DNA στο πλάσμα στην κλινική πράξη

Όπως είναι γνωστό, κύριο χαρακτηριστικό των όγκων είναι η ετερογένεια που εμφανίζουν κάτι που μπορεί να δυσκολέψει την ανάλυση του μοριακού τους προφίλ. Όσον αφορά την ιστολογία των όγκων, ο καρκινικός τους ιστός μπορεί να εμφανίσει μια ποικιλία τόσο στη μορφολογία όσο και στην κυτταρική σύσταση στις διάφορες περιοχές του ίδιου όγκου. Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι ο καρκίνος εμφανίζει δυναμική εξέλιξη κατά την εξέλιξη της νόσου. Τόσο οι ενδογενείς όσο και οι εξωγενείς παράγοντες ωθούν τη μετακίνηση των καρκινικών κυττάρων στις λεγόμενες “μεταστατικές εστίες” μετατρέποντας τον καρκίνο σε μια συστηματική νόσο. Ενώ η αρχική διάγνωση βιοψίας και ο πρωτογενής όγκος προσφέρουν κρίσιμες πληροφορίες για την θεραπεία του καρκίνου απαιτούνται νέες μεθοδολογίες που προσφέρουν διαγνωστική ευαισθησία.

### Ετερογένεια του όγκου

Για τη θεραπεία της πλειονότητας των όγκων γίνεται χρήση αντικαρκινικών παραγόντων οι οποίοι όμως δεν είναι λίγες οι φορές εμφάνισης αντίστασης στη θεραπεία τόσο εξαιτίας της ετερογένειας του όγκου, όσο και της κλωνικής εξέλιξης και επιλογής. Υπόκλωνοι του όγκου αυξάνονται κατά την πρόοδο της νόσου μεταβάλλοντας την αναλογία των συγκεκριμένων παρεκκλίσεων μεταξύ του πρωτεύοντος όγκου και των μεταστάσεων. Η ανάπτυξη ευαίσθητων μεθόδων ανάλυσης του ελεύθερου κυκλοφορούντος καρκινικού DNA στο πλάσμα μας διευκολύνει σε αυτό καθώς καθιστά εφικτή την αξιολόγηση του DNA από ποικίλες θέσεις. Στην μελέτη των Chabon et al. που αναλύθηκαν δείγματα όγκων και πλάσμάτων ανιχνεύθηκαν ποικίλοι μηχανισμοί αντίστασης στη θεραπεία ύστερα από τη χορήγηση EGFR TKIs σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. Πιο συγκεκριμένα, περιέγραψαν καινούριους μηχανισμούς ανάπτυξης αντίστασης στη θεραπεία στους οποίους περιλαμβάνονται η L798I μεταλλαγή και η C797S που όπως αποδείχθηκε αναπτύσσεται στο 33% των ασθενών που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με αναστολέα τρίτης γενεάς (osimertinib) και σε ένα μικρό ποσοστό της τάξεως 3% σε αυτούς που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με rociletinib. Οι Yang et al. ανέφεραν ότι είναι επιτακτική η ανάγκη εφεύρεσης νέων θεραπευτικών στρατηγικών για την ανίχνευση και κατ επέκταση την στόχευση αυτών των ανθεκτικών στη θεραπεία υπόκλωνων του όγκου. Με την ανάλυση του γενετικού υλικού τόσο σε δείγματα ιστών όσο και σε πλάσματα ασθενών κατέληξαν στο ότι μεταλλαγές σε γονίδια που μπορεί να ευθύνονται για την ανάπτυξη αντίστασης στη θεραπεία όπως είναι το TP53, EGFR, BRAF, CTNNB1, ARID1A, ERBB2 και PDGFRA ανιχνεύθηκαν σε μικρά

ποσοστά μόνο στο πλάσμα. Επομένως, η ανάλυση ctDNA παρέχει άμεσες ενδείξεις χωρικής και χρονικής ετερογένειας του όγκου.

### Πρώιμος εντοπισμός των μεταστάσεων και πρόγνωση

Ο Deryugina et al έδειξε ότι η μετάσταση μπορεί να συμβεί καθ' όλη την εξέλιξη του όγκου, ακόμη και σε πρώιμο στάδιο. Τα επίπεδα του ctDNA εμφάνισαν τη μεγαλύτερη ευαισθησία στη διάγνωση και τη συσχέτιση με το φορτίο της νόσου, που παρέχουν ένα σημαντικό πλεονέκτημα 5 μηνών έναντι της CT απεικόνισης για την ανίχνευση της εξέλιξης της νόσου στο 53% των ασθενών. (Dawson et al.) Υψηλά επίπεδα ctDNA σε πρώιμο ακόμα στάδιο της νόσου συνηγορούν με γρήγορη εξέλιξη της νόσου και πιο επιθετική μορφή. Η ανίχνευση επιπέδων ctDNA στο πλάσμα ασθενών που έχουν υποβληθεί σε χειρουργική εκτομή του όγκου μπορεί να αποτελεί ένα σημάδι για την ύπαρξη υποτροπής της νόσου καθώς μειωμένης συνολικής επιβίωσης. Η έγκαιρη ανίχνευση του ctDNA καθιστά δυνατό τον εντοπισμό των “μεταλλάξεων οδηγών” και μεταστατικών δεικτών κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου. Παρόλο που ασθενείς αρχικού σταδίου εμφανίζουν χαμηλότερα επίπεδα ctDNA, η βαθιά αλληλούχιση μπορεί να ανιχνεύσει συγκεκριμένες μεταβολές που επιτρέπουν τη θεραπευτική παρέμβαση με στόχο την πρόληψη της μεταστατικής προόδου. Ως εκ τούτου, το ctDNA θα μπορούσε να προσφέρει ολοκληρωμένη εικόνα των ασθενών ακόμη και σε πρώιμο στάδιο, πολύ πριν από τις κλινικές εκδηλώσεις της νόσου.

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

Εικόνα 20: Κλινική χρησιμότητα του ελεύθερου κυκλοφορούντος γενετικού υλικού (29)

Η ανίχνευση ctDNA μπορεί να εκτιμήσει με μεγαλύτερη ακρίβεια την πρόγνωση του ασθενούς. Προηγούμενες μελέτες απέδειξαν ότι δοκιμές με βάση το πλάσμα και η ανίχνευση της μοριακής ετερογένειας μπορεί να προβλέψει την έκβαση του ασθενούς. Σε μια αναδρομική μελέτη ασθενών με

στάδιου I-III CRC, η ανίχνευση του ctDNA συνεπαγόταν υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής ή μικρότερη συνολική επιβίωση ασθενών που είχαν υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία ή στοχευμένη θεραπεία. Εντοπισμός μεταλλαγών στο KRAS γονίδιο σε πλάσματα ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του πνεύμονα αποτελεί έναν κακό προγνωστικό δείκτη για την έκβαση της νόσου και με μειωμένη ανταπόκριση του όγκου σε EGFR αναστολείς κινάσης τυροσίνης (TKIs). Ασθενείς με MMKP που ήταν θετικοί για το EGFR-T790M στο πλάσμα έδειξαν ισοδύναμα αποτελέσματα στη θεραπεία με osimertinib με ασθενείς που ταξινομήθηκαν ως θετικοί στη δοκιμασία με βάση τον ιστό, υποστηρίζοντας την ανάλυση πλάσματος για την αποφυγή επεμβατικών βιοψιών όγκου σε τέτοιους ασθενείς. Συμπερασματικά, τα επίπεδα ctDNA στο πλάσμα ασθενών παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες για την πρόγνωση ασθενών και συμβάλουν στη λήψη αποφάσεων για την οργάνωση των θεραπευτικών στρατηγικών.

Η ανίχνευση μοριακών "αλλαγών" στο ctDNA παρέχει ένα ισχυρό εργαλείο για την παρακολούθηση των ασθενών στην απόκριση στη θεραπεία και στην εμφάνιση δευτερογενών μεταλλαγών που σχετίζονται με την ανάπτυξη αντίστασης στη θεραπεία. Λαμβάνοντας υπόψη τη δυναμική φύση του καρκίνου, ο εντοπισμός των επιπέδων ανίχνευσης ctDNA στο πλάσμα σε πολλαπλά χρονικά σημεία κατά τη διάρκεια της θεραπείας και της εξέλιξης της νόσου μπορεί να προσφέρει αξιοσημείωτες πληροφορίες για τη μετέπειτα διαχείριση των ασθενών. Μελέτες έχουν αναφέρει ότι η θεραπεία πρώτης γραμμής σε EGFR+ ασθενείς με EGFR TKIs gefitinib, erlotinib ή το afatinib έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερα ποσοστά συνολικής επιβίωσης σε σύγκριση με τη χημειοθεραπεία. Ανίχνευση της EGFR-T790M μεταλλαγής κατά την παρακολούθηση ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα οδηγεί στη θεραπεία με αναστολέα τρίτης γενεάς EGFR TKIs και συγκεκριμένα με osimertinib. Επιπλέον, η ανάλυση του ctDNA σε ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα που έλαβαν θεραπεία με αναστολείς PD1 αποτελεί έναν χρήσιμο προγνωστικό δείκτη της ανταπόκρισης του όγκου στη θεραπεία και κατ' επέκταση της συνολικής επιβίωσης. Σε προχωρημένο καρκίνο του προστάτη, το ctDNA μπορεί να συμβάλει στην ανίχνευση μεταλλαγών στον υποδοχέα των ανδρογόνων και με αυτόν τον τρόπο να συμβάλει στην πρόβλεψη αντίδρασης ή αντίστασης σε κατευθυνόμενες με ανδρογόνα θεραπείες. Έτσι λοιπόν, οι γενετικές αλλοιώσεις στο ctDNA παρέχουν πολύ χρήσιμες πληροφορίες για τη χορήγηση θεραπευτικής αγωγής σε πραγματικό χρόνο, στην πρόβλεψη πρόγνωσης καθώς και στην εύρεση αιτιών ανάπτυξης της αντίστασης στη θεραπεία πριν από τις μελέτες απεικόνισης.

Η ποσότητα του ctDNA που ανιχνεύεται στο αίμα των ασθενών συσχετίζεται με το στάδιο του καρκίνου και την επιθετικότητα όγκου.

Συγκρίνοντας την ασθένεια όψιμου με πρώιμου σταδίου, ctDNA ανιχνεύθηκε στο 100% των ασθενών με MMKP σταδίου II-IV και στο 50% των ασθενών με NSCLC του σταδίου I. Η ανίχνευση ctDNA δείχνει κάποια διακύμανση μεταξύ των τύπων όγκων. Ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών με προχωρημένο πρωτογενές

παγκρεατικό, ωοθηκικό, ορθοκολικό καρκίνο, καθώς και σε περιπτώσεις καρκίνου στήθους, ουροδόχου κύστης, και οισοφάγου, αλλά και το μελάνωμα και το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα φέρουν ανιχνεύσιμα επίπεδα ctDNA στο πλάσμα τους ενώ τα επίπεδα πέφτουν κάτω από το 50% για τους ασθενείς με καρκίνο του εγκεφάλου, του νεφρού, του προστάτη και του θυρεοειδούς, αν και αυτό πιθανόν να ποικίλλει ανάλογα με την τεχνολογία που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ctDNA. (29)

Έχει αποδειχθεί ότι η ποσοτικοποίηση των επιπέδων ctDNA καθιστά δυνατή της νωρίτερης αξιολόγηση της έκβασης των ασθενών στη θεραπεία απ ότι οι διάφορες ραδιογραφικές προσεγγίσεις. Ειδικότερα οι Misale et al στη μελέτη τους ανέφεραν ότι μέσω της ανάλυσης ctDNA και πιο συγκεκριμένα μέσω του εντοπισμού μεταλλαγών στο KRAS γονίδιο στο πλάσμα ασθενών που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία με cetuximab, 10 μήνες πριν η υποτροπή της νόσου προσδιοριστεί με απεικόνιση. Η ανάλυση του ctDNA επομένως θα μπορούσε να αποτελεί μια συμπληρωματική μέθοδο πρότυπων προσεγγίσεων διαλογής αυξάνοντας την ευαισθησία και την ειδικότητα της διάγνωσης.

# Μέθοδοι και υλικά

Η συγκεκριμένη εργασία διακρίνεται σε δυο μέρη. Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε ανάλυση ενός πάνελ 12 γονιδίων και 3 αναδιατάξεων (ALK, ROS1, RET), με χρήση τεχνολογίας NGS σε όγκους και πλάσμα 35 ασθενών με ΜΜΚΠ πριν την έναρξη της θεραπείας. Σε δεύτερο στάδιο μελετήθηκαν δείγματα 20 ασθενών με ΜΜΚΠ οι οποίοι έφεραν μεταλλαγή στο γονίδιο EGFR κατά τη διάγνωση και είχαν λάβει στοχευμένη θεραπεία με TKIs. Κατά τη θεραπεία διαπιστώθηκε ανάπτυξη αντίστασης. Παρόλα αυτά κατά το follow up δεν ανιχνεύθηκε η μεταλλαγή αντίστασης (p.T790M), χρησιμοποιώντας την CE-IVD μέθοδο cobas EGFR Mutation Test v2. Η ανάλυση όμως των συγκεκριμένων δειγμάτων με τη χρήση του Oncomine Cell Free Nucleic Acid kit κατάφερε να ανιχνεύσει μεταλλαγές που ίσως δικαιολογούν την ανάπτυξη αντοχής στη θεραπεία με EGFR TKIs.

## Απομόνωση DNA από ιστό

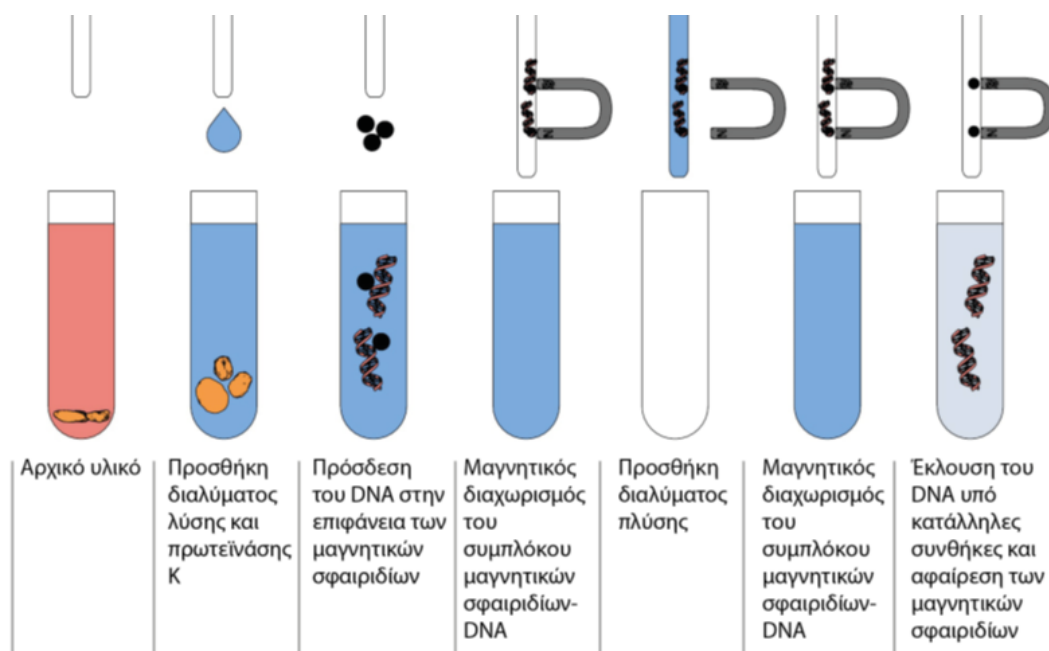
### Αυτοματοποιημένη απομόνωση DNA από ιστό

Για την απομόνωση του DNA από κύβο παραφίνης χρησιμοποιήθηκε το κιτ της QIAZEN.

1. Προσθήκη **160μl** διαλύματος αποπαραφινοποίησης (**Deparaffinization solution**) σε βιδωτό tube 2ml (από το 2<sup>ο</sup> συρτάρι κάτω από το thermoblock)
2. Απόξεση τμήματος του ιστού , με νυστέρι από τη σημειωμένη .
3. **Vortex** για **5-10sec**
4. Σύντομο **spin** (στο **max**) στη φυγόκεντρο
5. Προσθήκη **200μl ATL**
6. Προσθήκη **20μl** πρωτεϊνάση K (**Proteinase K**) **Vortex** ξανά για λίγα sec
7. **Επώαση** για **1hour** (ή overnight) σε **υδατόλουτρο** στους **56 °C** ώστε να δράσει η **Proteinase K**
8. Τοποθέτηση για **15min** σε **thermoblock** στους **90 °C** ώστε να σταματήσουμε τη δράση της πρωτεϊνάσης.



Ακολουθείται η χρήση του QIA Symphony για την αυτοματοποιημένη απομόνωση του γενετικού υλικού.



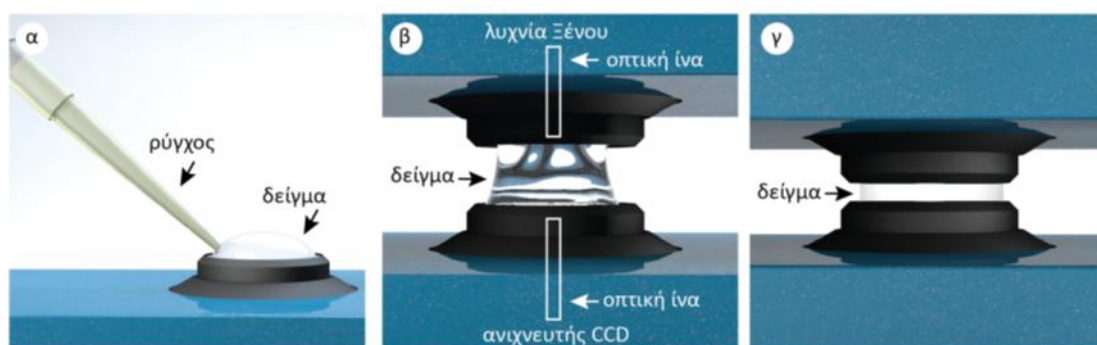
*Αρχή λειτουργίας του QIA Symphony.*

## Manual απομόνωση DNA από ιστό

Μετά το στάδιο της τοποθέτησης στους **90 °C** (από 15min έως 1hour) το πρωτόκολλο συνεχίζεται ως εξής:

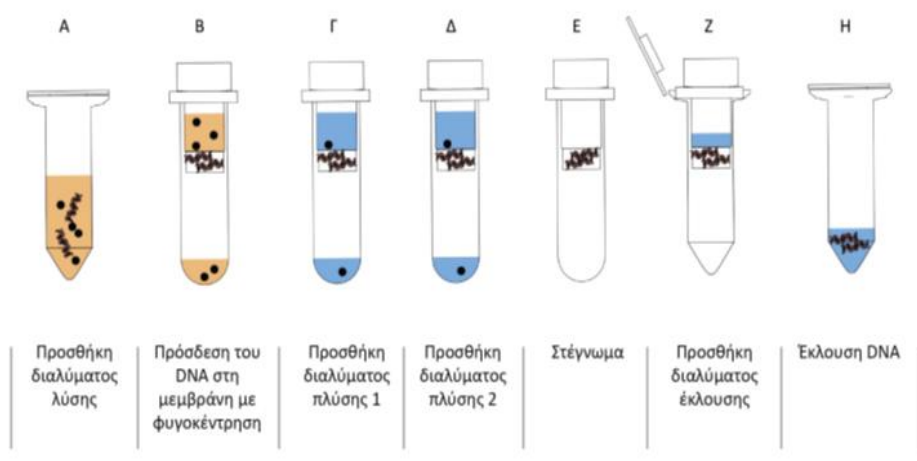
1. Προσθήκη 200μl AL buffer (ίδιο tip)
2. Προσθήκη 200μl EtOH 100% (ίδιο tip)
3. Vortex
4. Εισαγωγή του δείγματος σε κολώνα (QIAZEN kit)
5. Φυγοκέντρηση στις 13000G για 1min.
6. Αλλαγή collection tube
7. Προσθήκη 500μl AW1 wash
8. Φυγοκέντρηση σε 6000G για 1min

9. Αλλαγή collection tube
10. Προσθήκη 500μl AW2 wash
11. Φυγοκέντρηση σε 6000G για 1min
12. Φυγοκέντρηση στο MAX (20000G) για 3min.
13. Προσθήκη 40μl ATE elution buffer και φυγοκέντρηση σε 14000G για 1min
14. Φωτομέτρηση του δείγματος με τη χρήση του Nano drop.



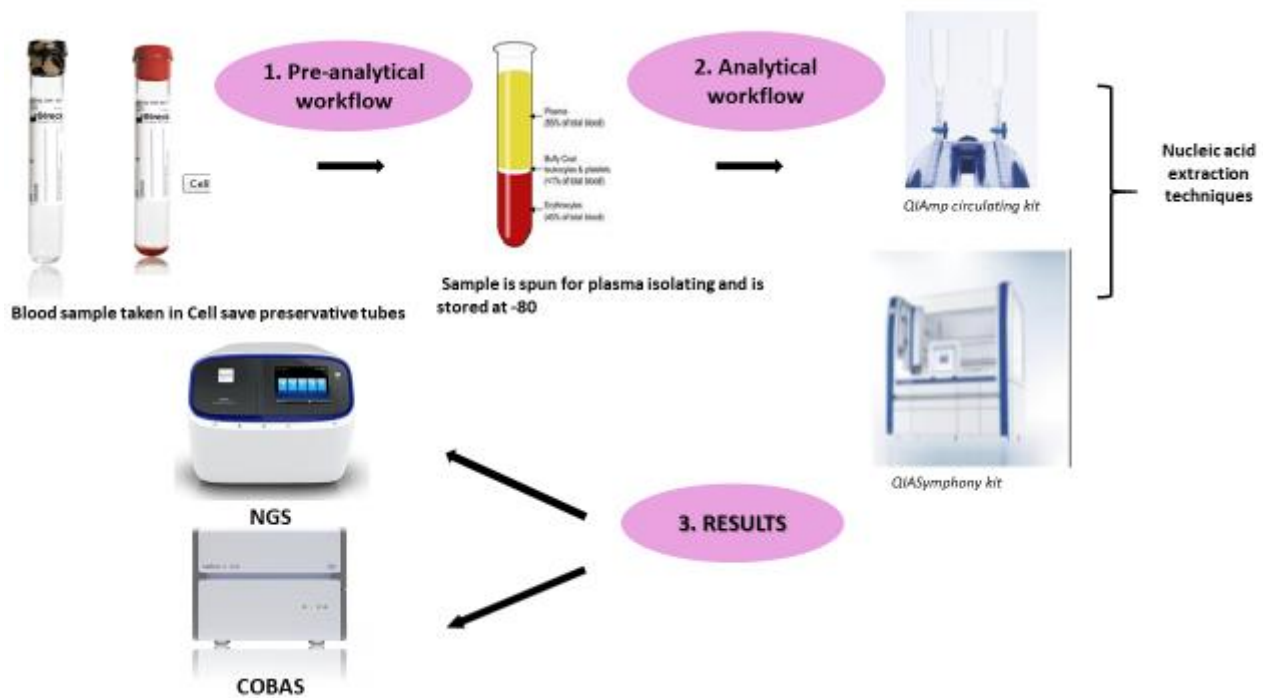
Για την εκτίμηση της καθαρότητας ενός διαλύματος νουκλεϊκών οξέων είναι απαραίτητο να μετρηθεί η απορρόφηση σε δύο μήκη κύματος, στα 260 nm και στα 280 nm ( $A_{260nm}$  και  $A_{280nm}$ ) και στη συνέχεια να υπολογιστεί ο λόγος των δύο απορροφήσεων  $A_{260nm}/A_{280nm}$ :

- Λόγος  $A_{260nm}/A_{280nm} = 2$  είναι χαρακτηριστικός διαλύματος καθαρού RNA.
- Λόγος  $A_{260nm}/A_{280nm} = 1,8$  είναι χαρακτηριστικός διαλύματος καθαρού DNA.



Manual απομόνωση DNA

## Διαδικασία απομόνωσης γενετικού υλικού από υγρές βιοψίες ( πλάσμα)



Τα δείγματα των υγρών βιοψιών παραλαμβάνονται από το εργαστήριο σε ειδικά φιαλίδια και στις κατάλληλες συνθήκες. Πραγματοποιούνται δυο φυγοκεντρήσεις των 10' με σκοπό την απομόνωση του πλάσματος στους -80 °C μέχρι τη στιγμή της απομόνωσης του γενετικού υλικού είτε με τη χρήση του QIA Symphony είτε με τη χρήση του QIAmp circulating kit (Qiagen).

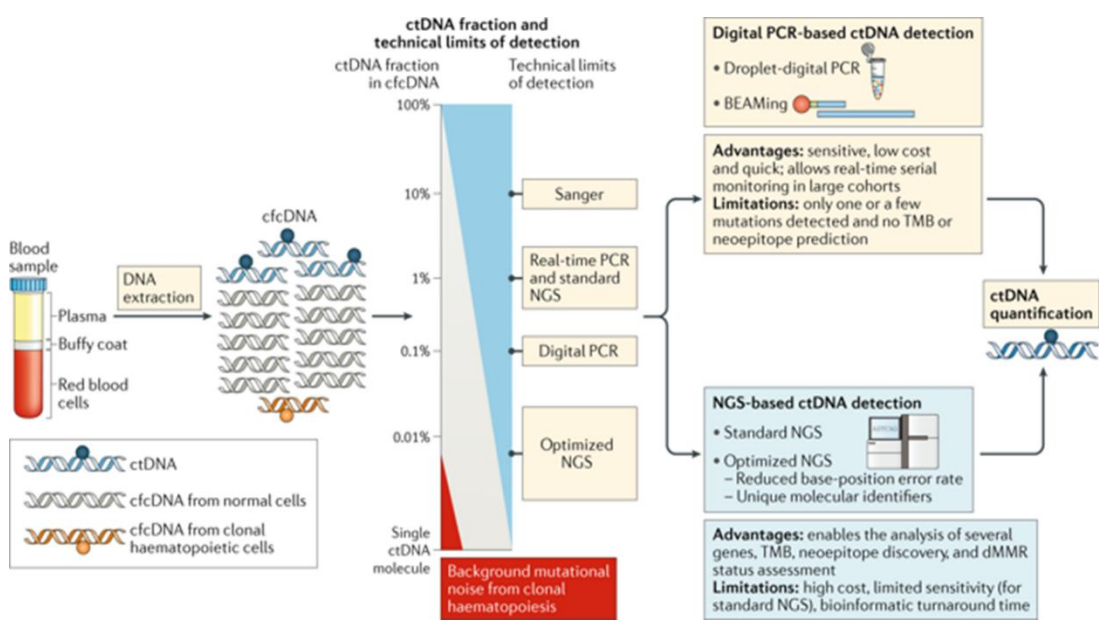
### Πρωτόκολλο

1. 200 μl Proteinase K
2. 1,6 ml ACL buffer
3. 3,6 ml ACB buffer-RNA carrier
4. 600 μl AW1 + AW2
5. 750 μl Ethanol
6. 50-150 μl AVE Elution buffer



## ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΟΥ ΕΛΕΥΘΕΡΟΥ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΟΣ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΑΜΕ

Με την ραγδαία εξέλιξη της τεχνολογίας, ανακαλύπτονται όλο και και καινотόμες τεχνικές ανάλυσης του ελεύθερου κυκλοφορούντος γενετικού υλικού από το πλάσμα με διαφορετικά επίπεδα ευαισθησίας για την ανίχνευση μεταλλαγμένων αλληλομόρφων . Ωστόσο καθώς όπως προαναφέραμε το ελεύθερο κυκλοφορούν καρκινικό γενετικό υλικό βρίσκεται με τη μορφή αρκετών θραυσμάτων στην κυκλοφορία του αίματος σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (0,01% του συνολικού ελεύθερου κυκλοφορούντος γενετικού υλικού) απαιτούνται μέθοδοι πολύ υψηλής ευαισθησίας και ακριβείας . Για την διεκπεραίωση της εργασίας αυτής χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι βασιζόμενες στην πραγματικού χρόνου αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (real time PCR) και μέθοδοι βασιζόμενες στην αλληλούχιση επόμενη γενιάς (next generation sequencing).



Τεχνικές ανάλυσης του ctDNA (20)



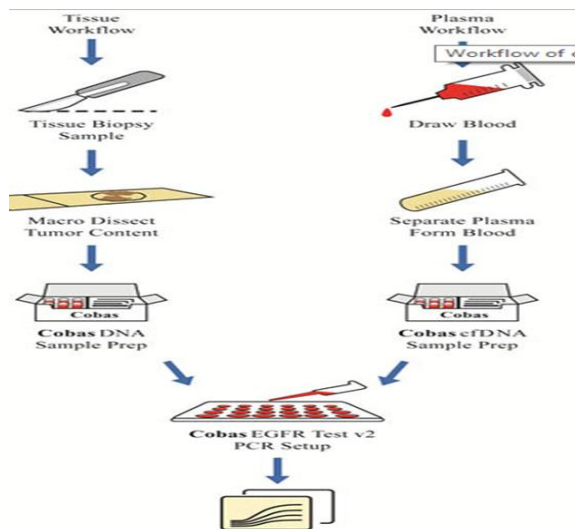
## Cobas EGFR mutation test v2

Η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελεί μια real time PCR που μας δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης 42 μεταλλαγών στα εξόνια 18, 19, 20 και 21 του γονιδίου του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), συμπεριλαμβανομένης και της μεταλλαγής T790 εξαιτίας της οποίας αναπτύσσεται αντίσταση στη θεραπεία με EGFR TKIs 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> γενιάς . Πιο συγκεκριμένα, η δοκιμασία cobas® EGFR ανιχνεύει μεταλλάξεις του EGFR σε ασθενείς με NSCLC των οποίων οι όγκοι παρουσιάζουν μεταλλαγή στο εξώνιο 18 (G719X), αντικαταστάσεις, απαλοιφές στο εξώνιο 19, προσθήκες και αντικαταστάσεις εξώνιο 20 (T790M, S768I) και 21 (L858R, L861Q), αλλά όχι οποιεσδήποτε άλλες μεταλλάξεις του EGFR. Για βέλτιστα αποτελέσματα της ροής της εργασίας, η Roche ανέπτυξε ένα κιτ απομόνωσης cfDNA.

Η συγκεκριμένη τεχνική αποτελεί μια μέθοδο με σχετικά καλή ευαισθησία (1% LOD) με μικρό κόστος και αρκετά σύντομη καθώς όλη η διαδικασία διαρκεί λιγότερο από 4 ώρες. Επίσης αποτελεί τη μοναδική εγκεκριμένη από το FDA μέθοδο για την ανίχνευση των EGFR μεταλλαγών για τη χορήγηση TAGRISSO. Ωστόσο μας δίνει τα δυνατότητα ανίχνευσης μόνο συγκεκριμένων μεταλλαγών και δεν μας επιτρέπει την ανίχνευση άλλων μεταλλαγών αντίστασης όπως της C797S παρά μόνο την T790M.

### Πλεονεκτήματα της μεθόδου

- Δυνατότητα εξέτασης δυο διαφορετικων τύπων δειγμάτων του ίδιου ασθενούς (πλάσμα και ιστό)
- Ανίχνευση 42 διαφορετικών μεταλλαγών στα εξόνια 18, 19, 20, 21 του γονιδίου του EGFR.
- Παροχή άμεσου αποτελέσματος (σε λιγότερο από 4 ωρες)
- Επαναληψιμότητα αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών εργαστηρίων.
- Ευαισθησία μεθόδου (LOD 1% )



Ροή εργασίας του cobas (30)

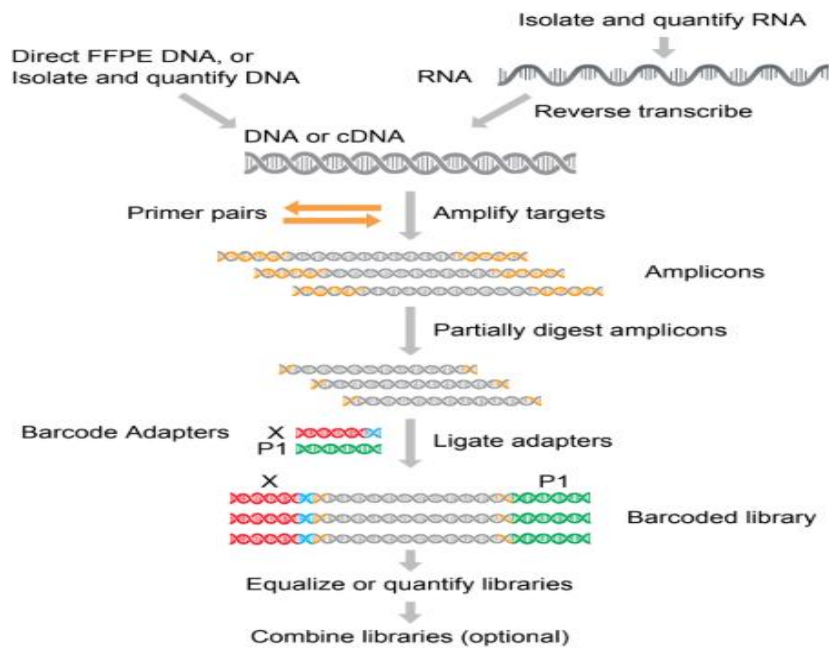
## Διαδικασία αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) σε δείγματα ιστού

Οι παραδοσιακές φαρμακευτικές και γενετικές εφαρμογές για τον μοριακό χαρακτηρισμό του καρκίνου, βασίζονται στον έλεγχο ενός ή λίγων γονιδιακών δεικτών από τα κύτταρα του όγκου. Τα τελευταία χρόνια επειδή οι high-throughput τεχνολογίες των -omics (genomics, transcriptomics, proteomics) έχουν εξελιχθεί ιδιαίτερα με σημαντική πτώση του κόστους, οι ερευνητές δεν ελέγχουν πλέον μόνο ένα ή λίγα γονίδια, αλλά ένα πάνελ πολλών γονιδίων με αλληλούχιση του γονιδιώματος των καρκινικών κυττάρων. Όπως έχει προαναφερθεί οι τεχνολογίες NGS παρέχουν μια άμεση πληροφόρηση για τις γενετικές παραλλαγές που υπάρχουν στο γονιδίωμα και δεδομένου ότι πολλές φορές ο καρκίνος προκύπτει από νέες σωματικές μεταλλάξεις, η τεχνολογία NGS αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη των τροποποιήσεων αυτών. Με αυτό τον τρόπο, οι επιστήμονες θα κατανοήσουν σε βάθος τα μοριακά μονοπάτια που οδηγούν στην ογκογένεση, αλλά και θα μπορούν να χαρακτηρίσουν αποδοτικότερα τους καρκινικούς όγκους, ώστε στη συνέχεια να ακολουθήσει εξατομικευμένη θεραπεία με περισσότερες πιθανότητες επιτυχίας (21).

Τα νέα αυτά συστήματα αλληλούχισης περιλαμβάνουν ένα κοινό πρότυπο αλληλούχισης που ονομάζεται κυκλική σειρά αλληλούχισης (Metzker, 2010). Αυτές οι πλατφόρμες επιτυγχάνουν σε χαμηλό κόστος μαζικές αλληλουχίσεις πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα με ένα πολύ μεγάλο αριθμό διαβασμάτων ανά δείγμα. Βέβαια, προς το παρόν αυτή η πολύ υψηλή απόδοση επιτυγχάνεται με μειονεκτήματα όσο αφορά το μήκος και την ακρίβεια των διαβασμάτων, σε σύγκριση με τις κλασσικές μεθόδους, αλλά αυτά τα μειονεκτήματα

υπερκαλύπτονται από τις εξαιρετικά πολυπληθείς αλληλοεπικαλύψεις των διαβασμάτων. Μάλιστα όταν υπάρχει γνωστό γονιδίωμα αναφοράς, όπως και στο ανθρώπινο αυτές οι νέες πλατφόρμες είναι άμεσα εφαρμόσιμες με πολύ μεγάλη απόδοση. Μάλιστα, η “γονιδιωματική ογκολογία”(genomics driven oncology) χρησιμοποιώντας πάνελ πολλών γονιδίων, δύναται να επεκτείνει το οπλοστάσιο των ιατρών ως προς τη θεραπεία ασθενειών οι οποίες δεν αντιμετωπίζονται με τις τυπικές θεραπείες, όπως είναι και οι μεταστατικές νόσοι. Μία τυπική κλινική εξέταση με αλληλούχιση επόμενης γενιάς του γονιδιώματος του καρκινικού όγκου, έχει ένα τυποποιημένο λεπτομερές πρωτόκολλο το οποίο περιγράφει τις διαδικασίες πριν και μετά την ανάλυση. Οι διαδικασίες πριν την ανάλυση περιλαμβάνουν τα κλινικά χαρακτηριστικά του ασθενούς και λεπτομέρειες για τη συλλογή και την προετοιμασία των δειγμάτων. Στη συνέχεια, οι μεταβλητές της ανάλυσης που θα χρησιμοποιηθούν μπορεί να επηρεάσουν την ακρίβεια της αλληλούχισης του πάνελ των γονιδίων και σχετίζονται με την πλατφόρμα αλληλούχισης που θα χρησιμοποιηθεί. Οι μεταβλητές της μετα-ανάλυσης και της βιοπληροφορικής επεξεργασίας (εισαγωγή των δεδομένων, επικύρωση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων) σχετικά με την αλληλούχιση επόμενης γενιάς περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων κυρίως την κλινική ερμηνεία των αποτελεσμάτων και την αποθήκευση των δεδομένων σε παγκόσμιες βάσεις δεδομένων ελεύθερα προσβάσιμες στην Ιατρική κοινότητα. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων είναι σημαντική για την επιτυχή ολοκλήρωση της εφαρμογής και ορισμένες φορές ποικίλει ανάλογα και με την κλινική πρακτική, ενώ στηρίζεται κυρίως στην ευθυγράμμιση του γονιδιώματος από το καρκινικό δείγμα με το ανθρώπινο γονιδίωμα αναφοράς έτσι, ώστε να βρεθούν οι παραλλαγές (μεταλλάξεις, SNPs, αναδιοργανώσεις του γονιδιώματος) που σχετίζονται με το συγκεκριμένο είδος καρκίνου. Όλες οι βιοπληροφορικές αναλύσεις έχουν εξειδικευμένους υπολογιστικούς αλγορίθμους σχεδιασμένους να διαχειριστούν πολύ μεγάλους όγκους δεδομένων και αλληλουχιών, οι οποίες αρχικά χρησιμοποιούνταν μόνο για ερευνητικούς σκοπούς. Παρόλα αυτά, οι αναλύσεις αυτές έχουν πλέον αναβαθμισθεί με τέτοιο τρόπο ώστε να περιλαμβάνουν και γενικότερα δεδομένα για την κλινική αντιμετώπιση του καρκίνου. Αν και υπάρχει μια έλλειψη ολοκληρωμένων δεδομένων για το ποιες μεταλλάξεις ή/και πολυμορφισμοί αποτελούν ευρήματα που χρήζουν κλινικής έρευνας έναντι του καρκίνου, έχουν δημιουργηθεί τρεις κατηγορίες πολυμορφισμών (22).

- 1) Πολυμορφισμοί που συνδέονται με FDA-εγκεκριμένο φάρμακο για συγκεκριμένο τύπο όγκου,
- 2) Πολυμορφισμοί που συνδέονται με FDA-εγκεκριμένο φάρμακο χωρίς συσχέτιση με καρκινικό όγκο,
- 3) Πολυμορφισμοί που συνδέονται με μη εγκεκριμένα φάρμακα από τον FDA



Ion AmpliSeq NGS workflow: 1) Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση του γενετικού υλικού από δείγματα ιστού εγκλεισμένους σε κύβους παραφίνης με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω. 2) Ακολούθησε ενίσχυση των περιοχών στόχων με τη χρήση του κιτ βιβλιοθήκης Ion AmpliSeq™ και το ανάλογο θερμικό πρωτόκολλο. 3) Δημιουργία θραυσμάτων με τη χρήση του ενζύμου FUPA (χρησιμοποιείται το ανάλογο θερμικό πρωτόκολλο) 4) Ακολούθησε η προσθήκη των ειδικών αντάπτορων με τη χρήση Switch και της DNA λιγάσης. 5) Καθαρισμός της βιβλιοθήκης. 6) Ποσοτικοποίηση της βιβλιοθήκης. 8) Ion Chef system. 7) Sequencing (S5 system). 8) Βιοπληροφορική ανάλυση. (31)

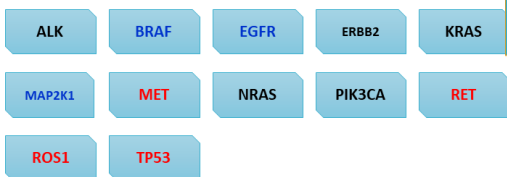
## Πλάσμα NGS με τη χρήση Oncomine Cell-Free Total Nucleic Acid Research Assay

Με τη χρήση του συγκεκριμένου κιτ της Thermo Fisher δίνεται η δυνατότητα ανίχνευσης μεταλλαγμένων αλληλομόρφων σε πολύ μικρή συχνότητα σε ένα ευρύ πάνελ γονιδίων.

- ➔ Oncomine Lung Cell Free Total Nucleic Acid Research Assay εξετάζουμε ένα πάνελ 12 γονιδίων και 3 fusions.



## 12 genes



## 3 fusion transcripts



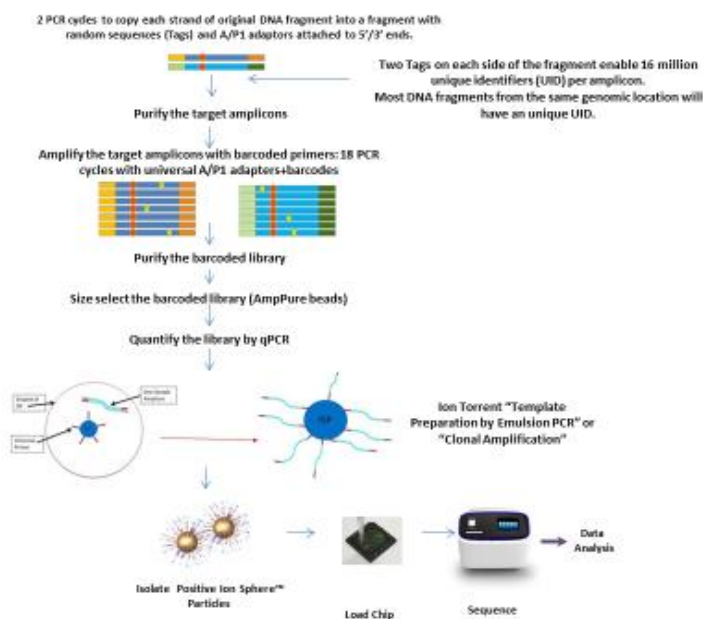
➔ Με τη χρήση Oncomine Pan Cancer Cell Free Total Nucleic Acid Research Assay εξετάζουμε ένα πάνελ 50 γονιδίων και 12 fusions.



### 12 fusion transcripts



Προκειμένου, να εκμεταλλευτούμε τις τεράστιες δυνατότητες ανίχνευσης θεραπευτικώς στοχεύσιμων μεταλλαγών που μας παρέχει μια υγρή βιοψία είναι σκόπιμη η χρήση τεχνικών μεγάλης ευχαισθησίας.

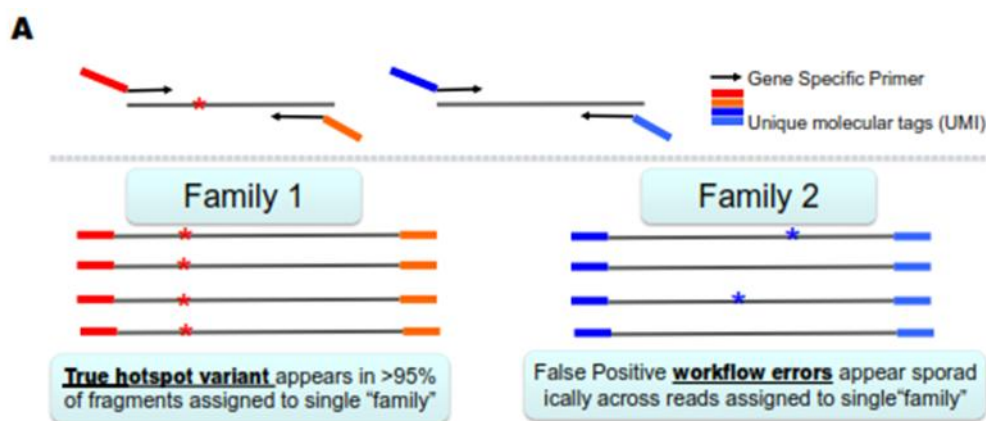


## Oncomine Cell-Free Total Nucleic workflow

Η διαδικασία που ακολουθείται έχει ως εξής:

- Απομόνωση του γενετικού υλικού από το πλάσμα με τη χρήση ειδικού της Qiagen kit.
- Πραγματοποιείται αντίστροφη μεταγραφή του γενετικού υλικού που απομόνωσαμε με τη χρήση του SuperScript™ VILO™ Master Mix.
- Ενίσχυση των γονιδίων στόχων με τη χρήση ειδικών παρεχόμενων από το χρησιμοποιούμενο kit, μίξ των αντίστοιχων εκκινητών (Lung/Pan Cancer cfTNA Panel).
- Καθαρισμός με χρήση αιθανόλης 80% των ενισχυμένων προϊόντων και πρόσδεση των barcodes με τη βοήθεια ειδικού θερμικού πρωτοκόλου.
- Καθαρισμός της βιβλιοθήκης και ποσοτικοποίηση με τη χρήση του Ion Library TaqMan® Quantitation Kit.
- Χρησιμοποιήθηκε το Ion Chef™ System πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση με τη βοήθεια του Ion S5™ Sequencing Kit.
- Ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη χρήση του Ion Reporter Torrent Server.

Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά της UMI τεχνολογίας στην οποία βασίζεται και το kit που χρησιμοποιήσαμε, είναι ότι κατά την ενίσχυση των γονιδίων στόχων που μας ενδιαφέρουν μας δίνει τη δυνατότητα της επιδιόρθωσης λαθών με αποτέλεσμα να αυξάνεται και η ειδικότητα της μεθόδου.



Επιδιόρθωση λαθών με τη χρήση της UMI τεχνολογίας. (31)

### Πλεονεκτήματα της μεθόδου:

- ✓ Δυνατότητα ανάλυσης μεγάλου πάνελ γονιδίων με ένα μόνο πείραμα
- ✓ Δυνατότητα επιδιόρθωσης λαθών

- ✓ Υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

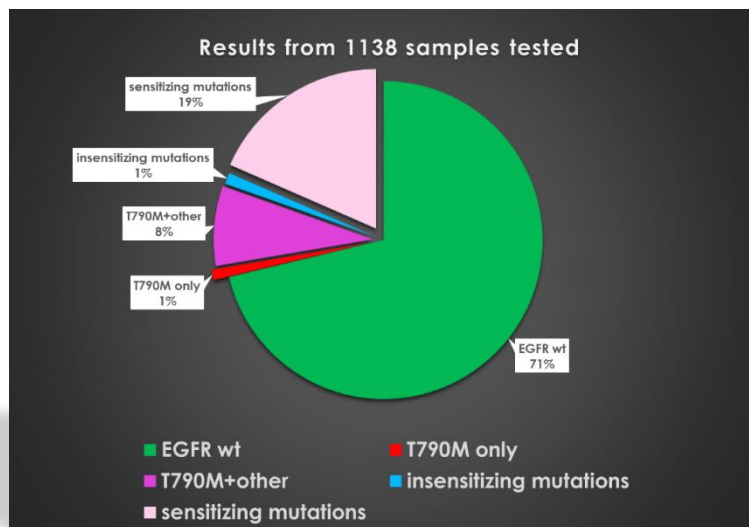
Το αντικείμενο της εργασίας αυτής διακρίνεται σε 3 επιμέρους μέρη. Αρχικά θα γίνει παρουσίαση των αποτελεσμάτων από 1138 υγρές βιοψίες που λάβαμε στη Genekor από ασθενείς με ΜΜΚΠ. Σε 2<sup>ο</sup> στάδιο θα πραγματοποιηθεί σύγκριση των αποτελεσμάτων κατά το follow up 21 ασθενών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με αναστολείς 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> γενιάς και ανέπτυξαν αντίσταση στη θεραπεία με τη χρήση του cobas και του NGS. Τέλος, θα γίνει παρουσίαση των αποτελεσμάτων που λάβαμε από την ανάλυση ενός πάνελ 12 γονιδίων και 3 αναδιατάξεων (ALK, ROS1, RET), με χρήση τεχνολογίας NGS σε όγκους και πλάσμα 35 ασθενών με ΜΜΚΠ πριν την έναρξη της θεραπείας.

### 1<sup>ο</sup> Μέρος

#### Αποτελέσματα της GENEKOR με τη χρήση του cobas® EGFR Mutation Test v2 CE-IVD σε 1138 υγρές βιοψίες ασθενών με ΜΜΚΠ

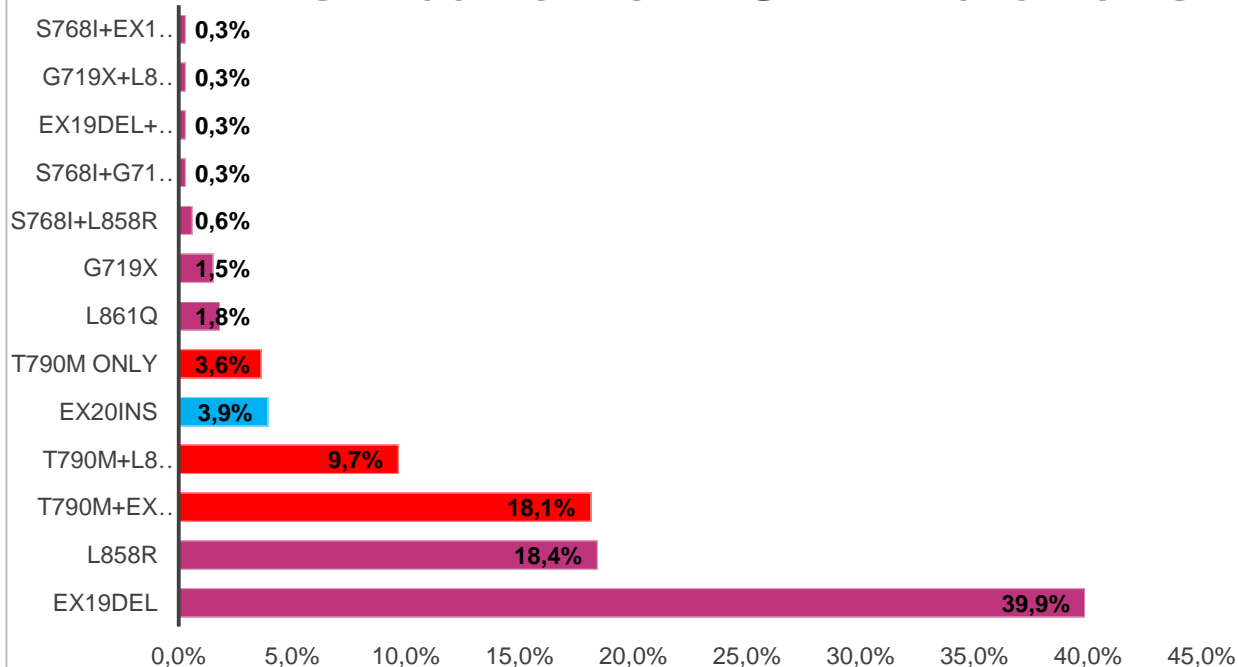
Από τα 1138 δείγματα που λάβαμε στη GENEKOR, στο 29 % ανιχνεύθηκαν μεταλλαγές στο γονίδιο του EGFR ενώ το 71 % των δειγμάτων ήταν φυσιολογικά. Ειδικότερα, το 19% των δειγμάτων έφεραν sensitizing μεταλλαγές του EGFR (Ex19del., p.L858R, p.G719X, p.L861Q, p.S768I), το 1% των δειγμάτων έφερε

insensitizing μεταλλαγές (Ex20Ins), το 8% τη μεταλλαγή T790M σε συνδυασμό με άλλες sensitizing μεταλλαγές του EGFR και μόνο το 1% των δειγμάτων έφερε μόνο την T790M μεταλλαγή αντίστασης. Τα αποτελέσματα αυτά απεικονίζονται λεπτομερώς στο διάγραμμα που ακολουθεί.



Αποτελέσματα του cobas σε 1138 υγρές βιοψίες

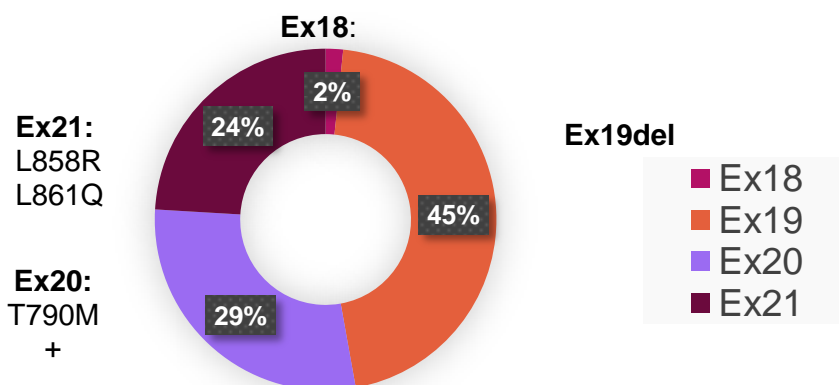
## Distribution of EGFR mutations



Στον πίνακα αυτό απεικονίζονται τα ποσοστά των EGFR μεταλλαγών που ανιχνεύθηκαν με τη χρήση του cobas. Όπως παρατηρούμε, περίπου το 40% εκ των μεταλλαγμένων δειγμάτων έφεραν τη μεταλλαγή

απαλοιφής στο εξώνιο 19. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι μεταλλάξεις που είναι υπεύθυνες για αντίσταση στη θεραπεία, ενώ με γαλάζιο χρώμα απεικονίζονται οι λεγόμενες *insensitizing* μεταλλάξεις (Ex20INS) οι οποίες ευθύνονται για μειωμένη ανταπόκριση του ασθενούς στη θεραπεία με αναστολείς TKIs.

Όσον αφορά την κατανομή των ανιχνεύσιμων μεταλλαγών ανά εξώνιο του EGFR προκύπτει το εξής διάγραμμα

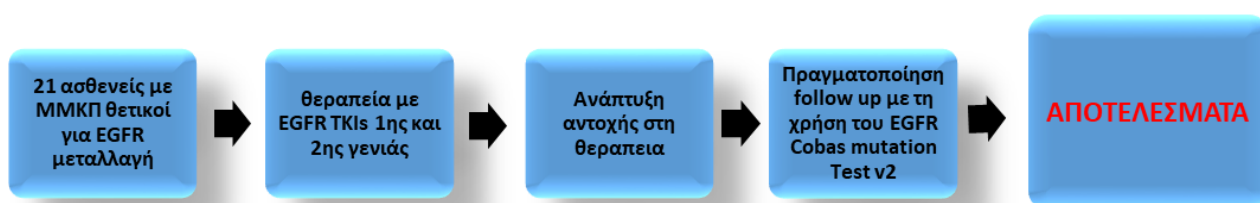


Κατανομή των EGFR μεταλλαγών ανά εξώνιο

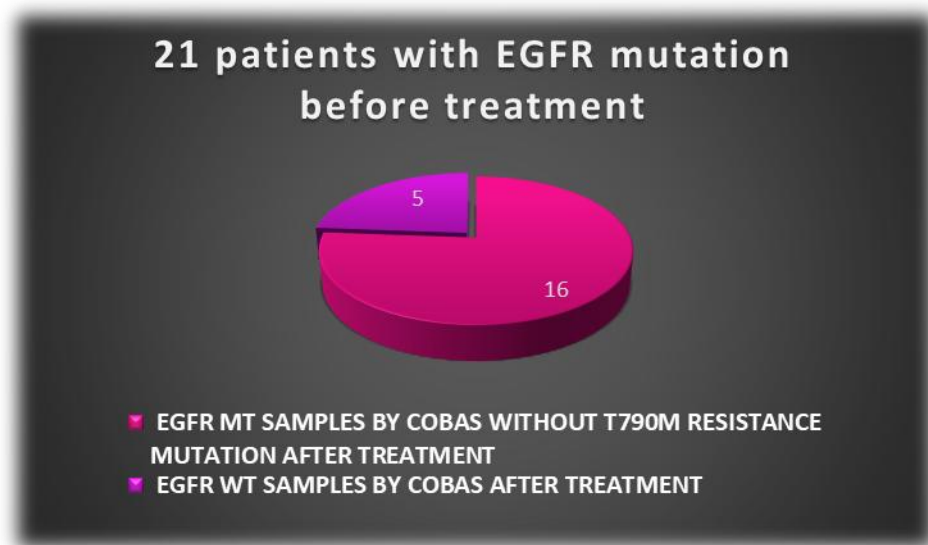
## 2ο Μέρος

### Cobas® EGFR Mutation Test v2 CE-IVD VS Next Generation Sequencing

Κατά το follow up των 21 ασθενών ( ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία με EGFR TKIs και είχαν αναπτύξει αντίσταση στη θεραπεία) με τη χρήση του cobas EGFR Mutation Test v2 λάβαμε τα εξής αποτελέσματα:



## Αποτελέσματα του cobas

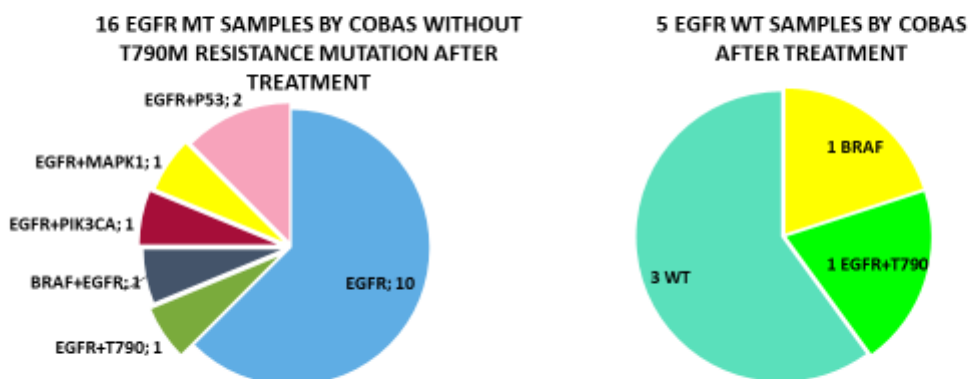


→ Από τους 21 ασθενείς με EGFR μεταλλαγή πριν τη θεραπεία, κατά το follow up στους 16 ασθενείς ανιχνεύθηκε EGFR μεταλλαγή αλλά ΟΧΙ η T790M που όπως γνωρίζουμε είναι μια μεταλλαγή αντικατάστασης που ευθύνεται για την ανάπτυξη αντίστασης στη θεραπεία με 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> γενιάς αναστολείς του υποδοχέα του EGFR, ενώ στους 5 δεν ανιχνεύθηκε καμία μεταλλαγή.

## Αποτελέσματα του πλάσμα NGS με τη χρήση Oncomine Cell Free total nucleic acid kit

Όσον αφορά τα αποτελέσματα που λάβαμε από την εξέταση αυτών των 21 δειγμάτων με τη χρήση του Oncomine lung cell free total nucleic acid kit είχαν ως εξής: Στα 10 δείγματα ανιχνεύθηκε μεταλλαγή στο γονίδιο του EGFR, και στους 6 μεταλλαγή στον EGFR σε συνδυασμό με άλλες μεταλλαγές σε γονίδια όπως στο p53, στο MAPK1, στο PIK3CA και στο BRAF γονίδιο. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι σε 1 από τα 16 δείγματα ανιχνεύθηκε η μεταλλαγή T790M την οποία δεν κατόρθωσε να ανιχνεύσει το cobas. Επίσης από τα 5 φυσιολογικά με βάση το cobas δείγματα, στα 3 δεν ανιχνεύθηκε καμία μεταλλαγή με τη χρήση ngs, σε 1 ανιχνεύθηκε μεταλλαγή στο BRAF γονίδιο και σε 1 το ngs ήταν ικανό να ανιχνεύσει μια μεταλλαγή EGFR συνοδευόμενη από τη μεταλλαγή αντίστασης την T790M.

## 21 PATIENTS WITH EGFR MUTATION BEFORE TREATMENT



Επομένως βασιζόμενοι στα αποτελέσματα των δυο αυτών τεχνικών καταλήγουμε στα εξής σημαντικά συμπεράσματα:

1. Με τη χρήση plasma NGS μας δόθηκε η δυνατότητα ανιχνεύσης της T790M σε 2 από τους 21 ασθενείς που το cobas δεν ήταν ικανό να ανιχνεύσει λόγω της χαμηλότερης ευαισθησίας του.
2. Αντοχή στη θεραπεία με αναστολείς 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> γενιάς μπορεί να επέλθει και εξαιτίας της ύπαρξης μεταλλαγών και σε γονίδια όπως στο PIK3CA, στο BRAF και στο MAPK.

### 3<sup>ο</sup> Μέρος

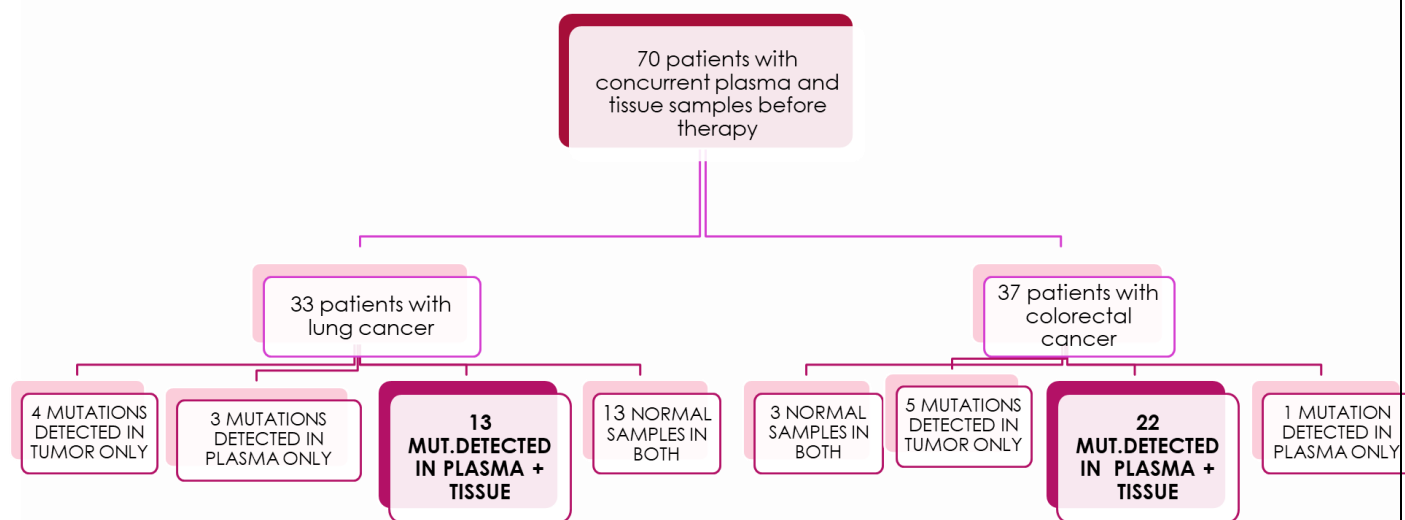
## Genekor's experience

### Σύγκριση των αποτελεσμάτων του NGS σε δείγματα ιστού και πλάσματος.

Προκειμένου να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα αυτών των δυο μεθόδων εξετάστηκαν 70 δείγματα ιστού και πλάσμα από ασθενείς που έπασχαν από καρκίνο του πνεύμονα και παχέος εντέρου. Εμείς θα επικεντρωθούμε στα αποτελέσματα της ανάλυσης των 33 ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα που είναι και το αντικείμενο της εργασίας. Θα αναφερθούμε στη συμφωνία των αποτελεσμάτων των δυο μεθόδων ενώ

στη συνέχεια θα πραγματοποιηθεί υπολογισμός της ευαισθησίας και της ειδικότητας της μεθόδου της αλληλούχισης επόμενης γενιάς στο πλάσμα των ασθενών.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης είχαν ως εξής: από τα 33 δείγματα ιστού και πλάσμα που εξετάσαμε 13 μεταλλαγές ανιχνεύθηκαν και με τις 2 μεθόδους, 4 μεταλλαγές ανιχνεύθηκαν μόνο στον ιστό και 3 μόνο στο πλάσμα.



Διάγραμμα αποτελεσμάτων πειράματος.

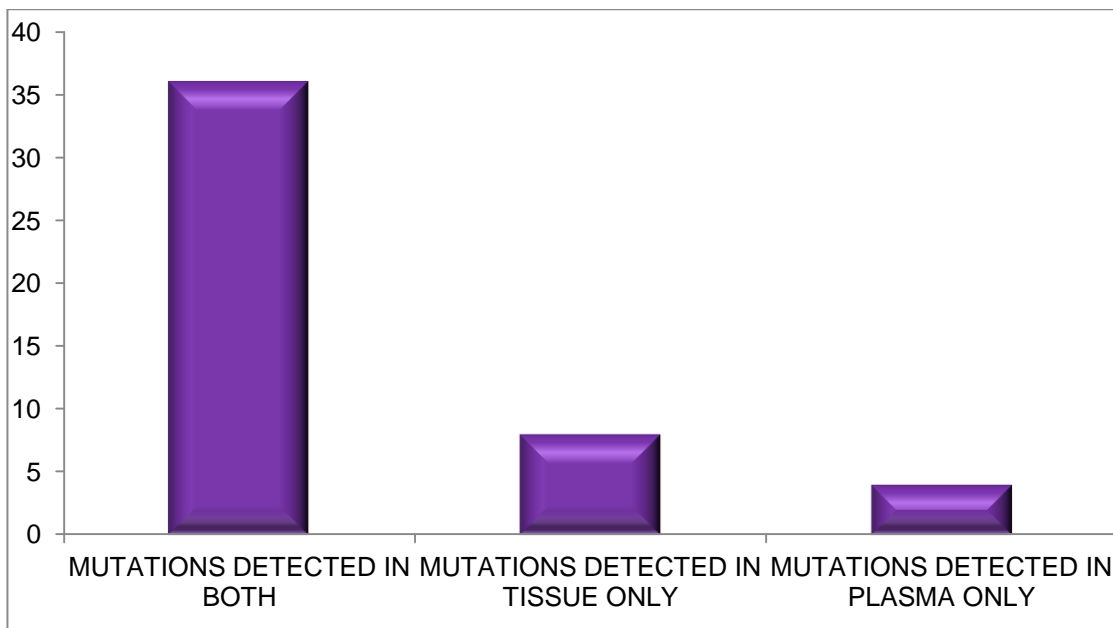
Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι τα αποτελέσματα των δυο μεθόδων βασίζονται ΜΟΝΟ στις θεραπευτικώς στοχεύσιμες μεταλλαγές. Με πράσινο χρώμα απεικονίζονται οι μεταλλαγές που ανιχνεύθηκαν και με τις δυο μεθόδους. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι μεταλλαγές που ανιχνεύθηκαν μόνο στον ιστό ενώ με κίτρινο οι μεταλλαγές που εντοπίστηκαν μόνο στο πλάσμα.

**Θεραπευτικώς στοχεύσιμες θεωρούνται οι μεταλλαγές των BRAF, RAS, PIK3CA, EGFR και ERBB2 γονιδίων.**



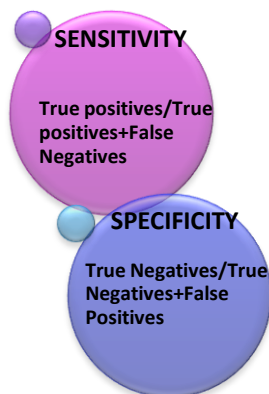
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33					
AKT1																																						
APC																																						
BRAF				■															■	■																		
FBWX7																																						
KRAS		■					■			■	■	■	■		■				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

- Mutation detected in both Tissue AND Plasma
- Mutation detected in Tissue only
- Mutation detected in Plasma only



Ο βαθμός της συνέπειας μιας ταξινόμησης μπορεί να εκτιμηθεί με την ευαισθησία & την ειδικότητα. Δηλαδή, περιγράφουν την ακρίβεια μιας έρευνας και βοηθάνε στη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ των διαγνωστικών τεστ και την παρουσία ή απουσία μιας ασθένειας. Η ευαισθησία της μεθόδου εκφράζει την ικανότητα του τεστ να ανιχνεύει τους αληθώς θετικούς σε μια ασθένεια και είναι ο λόγος των αληθώς θετικών προς το σύνολο εκείνων που φαίνεται να πάσχουν από την ασθένεια. Είναι ένας χρήσιμος ορισμός όταν απαιτείται λεπτομέρεια. Η ειδικότητα της μεθόδου εκφράζει την ικανότητα του τεστ να ανιχνεύει τους

αληθώς αρνητικούς (υγιείς) σε μια ασθένεια και είναι ο λόγος των αληθώς αρνητικών (υγιών) προς το σύνολο εκείνων που δεν φαίνεται να πάσχουν (και δεν πάσχουν) από την ασθένεια. Είναι χρήσιμος ορισμός για να διαχωριστούν με σιγουριά οι υγιείς. Προκειμένου να υπολογιστεί η ευαισθησία και η ειδικότητα του NGS από πλάσμα θεωρήσαμε ως gold standard τα αποτελέσματα του NGS από δείγματα ιστού των ασθενών και χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω σχέσεις.



Επομένως το specificity της μεθόδου υπολογίστηκε 94,4% και το sensitivity 81,82%. Το concordance των αποτελεσμάτων μεταξύ αυτών των δυο μεθόδων έφτασε το 85,92%.

## Discussion

Από τα 1138 δείγματα υγρής βιοψίας από ασθενείς με ΜΜΚΠ που μελετήθηκαν το 29% ήταν θετικά για EGFR μεταλλάξεις ενώ το 71% φυσιολογικά για το γονίδιο του EGFR. Πιο συγκεκριμένα, όπως

διαπιστώθηκε το 18% των δειγμάτων έφεραν μια μεταλλαγή ευαισθητοποίησης ( Ex19Del, p.L858R, p.L861Q, p.G719X, p.S768I), το 1% έφερε μη ευαισθητοποιημένες μεταλλαγές (Ex20Ins), το 8% έφερε τη μεταλλαγή αντίστασης T790M σε συνδυασμό με κάποια άλλη μεταλλαγή ευαισθητοποίησης. Μόνο το 1% των δειγμάτων έφερε μόνο την T790M. Όπως εύκολα παρατηρούμε και στα αποτελέσματα της προηγούμενης ενότητας το μεγαλύτερο ποσοστό εκ των μεταλλαγμένων δειγμάτων έφεραν μια μεταλλαγή απαλοιφής στο εξώνιο 19 του γονιδίου του EGFR (46%) ακολουθώντας η μεταλλαγή L858R στο εξώνιο 21. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν απέδειξαν ότι ασθενείς που φέρουν τις συγκεκριμένες αυτές μεταλλαγές παρουσίασαν σημαντικό κέρδος επιβίωσης στη θεραπεία με αναστολείς κινασών τυροσίνης (EGFR TKIs) σε σύγκριση με τη χημειοθεραπεία.

Δυστυχώς όμως παρά το κέρδος επιβίωσης που αποκτήθηκε με τη θεραπείας πρώτης και 2<sup>ης</sup> γενιάς TKIs, τα καρκινικά κύτταρα των όγκων έχουν την ικανότητα να αναπτύσσουν κλώνους ανθεκτικούς στη θεραπεία ύστερα από ένα μέσο διάστημα 10-12 μηνών μετά την έναρξη της θεραπείας.

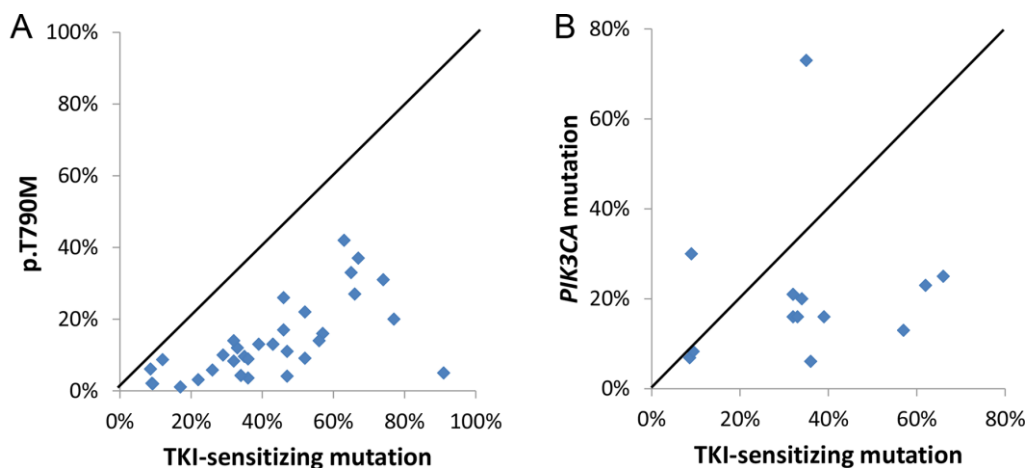
Κυριότερη αιτία εμφάνισης της αντίστασης στη θεραπεία όπως έχει αποδειχθεί στο παρελθόν θεωρείται η εμφάνιση μεταλλαγών στο εξώνιο 20 του EGFR γονιδίου, και πιο συγκεκριμένα η T790M μεταλλαγή γνωστή και ως “second site mutation”. Η συγκεκριμένη μεταλλαγή πρόκειται για μια αντικατάσταση θρεονίνης από το αμινοξύ μεθειονίνη και εμφανίζεται στο 50-60% των περιπτώσεων αντίστασης στη θεραπεία με αναστολείς TKIs. Πρόσφατα η επιστημονική κοινότητα ογκολόγων επιβεβαίωσαν την εισαγωγή του osimertinib, ενός αναστολέα 3<sup>ης</sup> γενιάς, στην πρώτη γραμμή θεραπείας ασθενών που πάσχουν από ΜΜΚΠ χάρη στην ικανότητα στόχευσης τόσο των μεταλλαγών ευαισθητοποίησης όσο και της μεταλλαγής αντίστασης T790M. Η ανίχνευση της συγκεκριμένης μεταλλαγής αποτελεί ένα σημαντικό όπλο για τους θεράποντες γιατρούς. Ωστόσο ο εντοπισμός της αποτελεί μια σημαντική πρόκληση για τους μοριακούς ογκολόγους καθώς ανιχνεύεται σε πολύ μικρά ποσοστά και προϋποθέτει τη χρήση τεχνικών υψηλής ευαισθησίας

### Η προσέγγιση της Genekor στον εντοπισμό της T790M.

Όσον αφορά τη δική μας προσέγγιση η Genekor εξέτασε το πλάσμα από 21 ασθενείς οι οποίοι αφού ήταν θετικοί για κάποια EGFR μεταλλαγή υποβλήθηκαν σε θεραπεία με αναστολείς 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> γενιάς. Ωστόσο κατά την εξέλιξη της θεραπείας εμφάνισαν αντίσταση. Κατά το follow up των συγκεκριμένων ασθενών τα δείγματα αναλύθηκαν τόσο με τη μέθοδο του cobas όσο και με τη μέθοδο αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) και διαπιστώθηκε αφενός ότι το NGS χάρη στη μεγαλύτερη ευαισθησία του μας δίνει μεγαλύτερη δυνατότητα κατά 2% ανίχνευσης της T790M και αφετέρου ότι η αντίσταση στη θεραπεία μπορεί να επέλθει από μια πληθώρα άλλων μηχανισμών. Είναι γεγονός ότι στη σύγχρονη εποχή η τεχνολογία του NGS έχει χαράξει έναν τεράστιο δρόμο στον τομέα της έρευνας τόσο χάρη στην υψηλή ευαισθησία ανίχνευσης μεταλλαγμένων αλληλομόρφων όσο και στην δυνατότητα που μας παρέχει για την

ανάλυση ενός πολυγονιδιακού πάνελ ταυτόχρονα. Ωστόσο, το υψηλό κόστος και το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί για την έκβαση του αποτελέσματος ίσως να αποτελούν δυο παράγοντες εξαιτίας των οποίων περιορίζεται λίγο η χρήση του.

Οι αναστολείς των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων ( EGFR TKIs ) όπως είναι το gefitinib και το erlotinib προσδένονται στη θέση σύνδεσης του μορίου ATP και με αυτόν τον τρόπο μπλοκάρουν την πρόσδεσή του. Σωματικές μεταλλαγές του EGFR γονιδίου και αυξημένα αντίγραφα κάποιων γονιδίων σχετίζονται με σπουδαία έκβαση της θεραπείας με αναστολείς. Η υπερέκφραση του EGFR υποδοχέα έχει ως απότοκο την αύξηση του πολ/σμού των καρκινικών κυττάρων, τη διήθηση και τη μετάσταση και παρατηρείται στους όγκους σε παραπάνω του 60% των ασθενών που πάσχουν από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Για τον πληρέστερο χαρακτηρισμό των μηχανισμών εμφάνισης αντίστασης στη θεραπεία σε μια μελέτη των Deborah et al.(32) αναλύθηκαν 48 βιοψίες που έφεραν μεταλλαγές που προσέδιδαν αντίσταση στη θεραπεία. Με τη χρήση της τεχνικής του NGS διαπιστώθηκε ότι το 79% των ασθενών έφεραν την μεταλλαγή T790M, το 26% παρουσίασε μια μεταλλαγή στο γονίδιο PIK3CA, 1 ασθενής εμφάνισε την p.S768\_V769delInsT μεταλλαγή και ένας ασθενής την G12C στο KRAS γονίδιο. Τέλος, η ιστολογική μετάπτωση από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα σε μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα παρατηρήθηκε σε 4 ασθενείς. Στο 24% των δειγμάτων που έφεραν την T790M μεταλλαγή, η συχνότητα των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων ήταν μικρότερη του 5% σε αντίθεση με τη συχνότητα αλληλομόρφων άλλων μεταλλαγών ευαισθητοποίησης υποδηλώνοντας έτσι ότι η συγκεκριμένη μεταλλαγή είναι παρούσα σε μια υποομάδα μόνο κυττάρων του όγκου ή σε έναν υπόκλωνο.



Συχνότητα των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων για τα p.T790M+ και PIK3CA+ δείγματα (32)

Οι μεταλλαγές του EGFR γονιδίου και του KRAS θεωρούνται αμοιβαία αποκλειόμενες μεταλλαγές για τους ασθενείς που δεν έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με EGFR TKIs και όπως έχει αποδειχθεί η παρουσία μεταλλαγών του τελευταίου αποτελούν αρνητικό προγνωστικό δείκτη για την έκβαση της θεραπείας (21). Έκπληξη προκαλεί το γεγονός ότι η συσχέτιση του KRAS γονιδίου με την εμφάνιση

αντίστασης στη θεραπεία δεν είχε εντοπιστεί σε προηγούμενες μελέτες. Η συγκεκριμένη μελέτη είναι η πρώτη που κάνει λόγο για τη συσχέτιση του εντοπισμού των μεταλλαγών στο γονίδιο KRAS με την ανάπτυξη αντίστασης στη θεραπεία. Επομένως απαιτείται η πραγματοποίηση επιπρόσθετων μελετών με μεθόδους υψηλής ευαισθησίας για την κατανόηση της αιτίας ύπαρξης μεταλλαγών σε γονίδια που εμφανίζονται συνήθως σε άλλους τύπους καρκίνου και όχι στον καρκίνο του πνεύμονα.

	<i>EGFR</i>	<i>AKT1</i>	<i>BRAF</i>	<i>ERBB2</i>	<i>KRAS</i>	<i>NRAS</i>	<i>PIK3CA</i>
Sequist et al. ( <i>n</i> = 37) <sup>a</sup>	49%	ND	0%	ND	0%	0%	5%
Ohashi et al. ( <i>n</i> = 146–212) <sup>b</sup>	55%	ND	1%	ND	0%	0%	ND
Yu et al. ( <i>n</i> = 88) <sup>c</sup>	63%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Wu et al. ( <i>n</i> = 20–42) <sup>d</sup>	48%	NA	0%	0%	0%	0%	0%
Current study ( <i>n</i> = 39)	79%	0%	0%	0%	3%	0%	26%

Άλλες όχι και τόσο κοινές μεταλλαγές που εντοπίζονται στο EGFR γονίδιο και ευθύνονται για την ανάπτυξη αντίστασης στη θεραπεία είναι οι εξής: p.D761Y, p.T854A, p.747S, p.C797S. (22)

Σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες μια αρκετά υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης μεταλλαγών στο PIK3CA εμφανίστηκε σε αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα μετά από θεραπεία με EGFR TKIs ενώ οι συγκεκριμένες μεταλλαγές σε αυτό το γονίδιο δεν είναι τόσο κοινές πριν την έναρξη της θεραπείας. Οι πιο κοινές μεταλλαγές στο γονίδιο PIK3CA είναι αυτές που ενοπίζονται στα κωδικόνια 542, 545, 1047. Επίσης υπάρχουν και αναφορές με βάση τις οποίες μεταλλαγές στο γονίδιο του BRAF να είναι υπεύθυνες για την απόκτηση αντοχής στη θεραπεία προκαλώντας έκτοπο πολλαπλασιασμό των ευαίσθητων σε EGFR TKIs καρκινικών κυττάρων. (24)

Αν και η γενετική βάση της απόκτησης αντίστασης στους EGFR TKIs έχει κατά κάποιο τρόπο καθιερωθεί, πολλές πρόσφατες παρατηρήσεις κάνουν λόγο για έναν αναστρέψιμο επιγενετικό μηχανισμό εξαιτίας του οποίου συνεπάγεται η ανάπτυξη αντοχής στα φάρμακα. Το γεγονός αυτό εξηγείται από τρία κυρίως φαινόμενα. Αρχικά, οι γενετικές αλλαγές από μόνες τους δεν μπορούν να δικαιολογήσουν το τόσο μεγάλο ποσοστό των όγκων που αναπτύσσουν αντίσταση στη θεραπεία. Επίσης, έχουν συμβεί περιπτώσεις ασθενών οι οποίοι έχουν προβεί σε παύση της θεραπείας εξαιτίας της αντίστασης που εμφανίζουν και παράλα αυτά μετά τη μεσολάβηση ενός χρονικού διαστήματος να ανταποκρίνονται ξανά στη θεραπεία. Τέλος είναι γεγονός ότι ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό ανθεκτικών στη θεραπεία όγκων δεν φέρουν γνωστές μοριακές αλλαγές που να εξηγούν την αντίσταση στη θεραπεία. (25)

Επομένως, εκτός από την παρουσία της T790M υπάρχουν και άλλα γονίδια όπως το KRAS το MET το HER-2 και το B-RAF μεταλλαγές των οποίων ευθύνονται για την εμφάνιση αντίστασης στη θεραπεία.

Η ενίσχυση του γονιδίου MET θεωρείται μια από τις πιο συχνές αιτίες ανάπτυξης αντίστασης σε EGFR+. Η ετεροδιμερισμός του MET και του ERBB3 οδηγεί σε παρατεταμένη ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης PI3K / AKT, και στην παράκαμψη της αναστολής του EGFR υποδοχέα από τους TKIs. Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η ενίσχυση του MET γονιδίου παρατηρείται περίπου στο 22% των περιπτώσεων ανάπτυξης αντίστασης στη θεραπεία ανεξάρτητα από την παρουσία τα T790M μεταλλαγής.

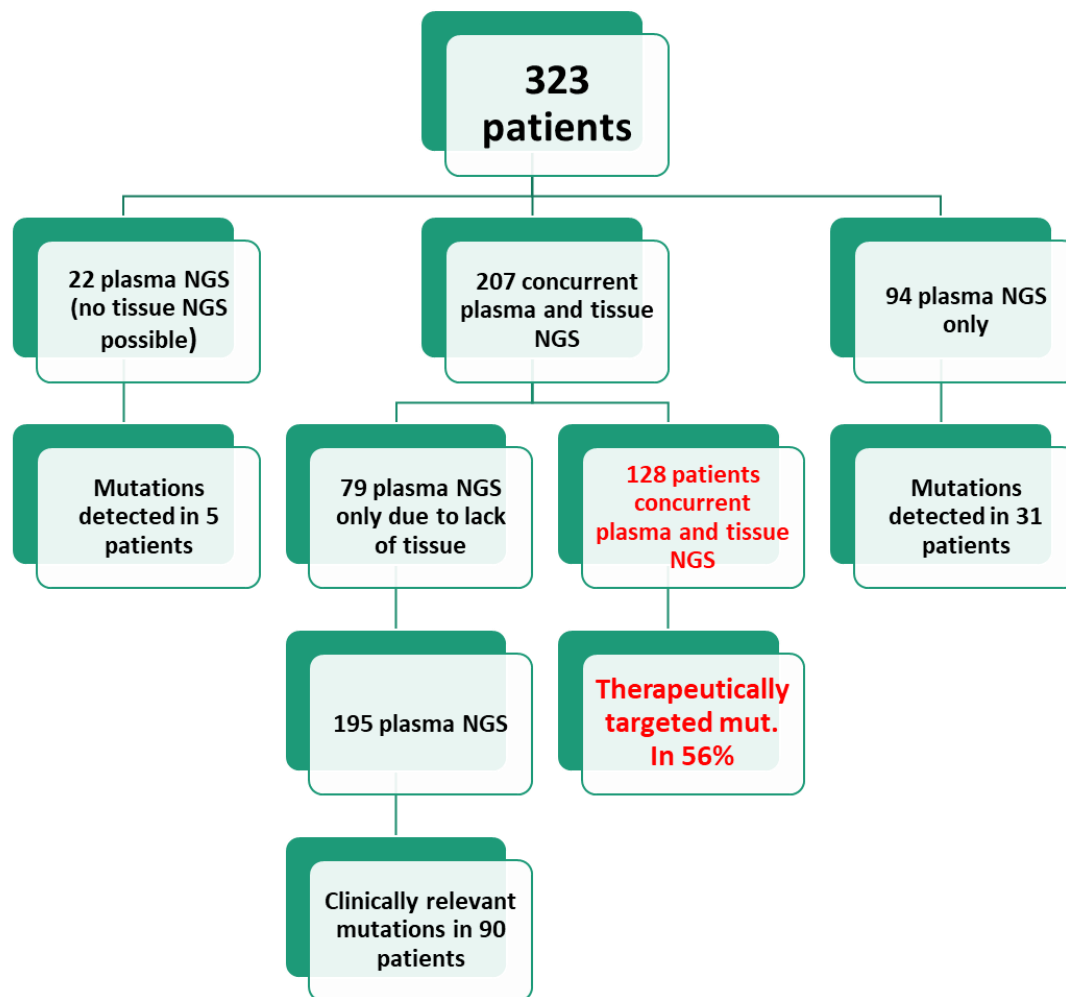
Στη συγκεκριμένη μελέτη επίσης περιγράφηκε ότι για EGFR μεταλλαγμένους όγκους, τα καρκινικά κύτταρα των οποίων παρουσίασαν αντίσταση στη θεραπεία είτε λόγω της ύπαρξης της T790M είτε λόγω της ενίσχυσης του γονιδίου MET, εμφάνισαν αυξημένο ρυθμό απόπτωσης ύστερα από υποβολή σε συνδυαστική θεραπεία αναστολέων του γονιδίου PIK3CA και αναστολέων του μονοπατιού MEK γονιδίου. (23) Επομένως ένα σημαντικός τρόπος για την αντιμετώπιση της αντίστασης στη θεραπεία ίσως είναι η ταυτόχρονη στόχευση αυτών των δυο γονιδίων που μέσω των μονοπατιών που συμμετέχουν ευθύνονται για τον πολλαπλασιασμό και τη διήθηση των καρκινικών κυττάρων.

## ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΕΠΟΜΕΝΗΣ ΓΕΝΙΑΣ ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ, ΙΣΤΟ Ή ΚΑΙ ΣΤΟΥΣ ΔΥΟ ΤΥΠΟΥΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ?

Παρόλο που ακόμα οι τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες που αποδεικνύουν την σπουδαία κλινική χρησιμότητα της αλληλούχισης επόμενης γενιάς στην κλινική ογκολογία είναι ελλιπείς, η χρήση της συγκεκριμένης τεχνικής στις μέρες μας διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στη διάγνωση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Είναι γεγονός, ότι η βιοψία ιστού πολλές φορές δεν είναι εφικτό να πραγματοποιηθεί καθώς αποτελεί μια διαδικασία αρκετά επίπονη για τον ασθενή. Μια λύση σε αυτό το πρόβλημα ήταν η προσπάθεια πραγματοποίησης μιας «υγρής βιοψίας». Σε αυτή την περίπτωση το NGS διεξάγεται στο πλάσμα του ασθενούς και όχι σε ιστό, αποφεύγοντας την ανάγκη για επεμβατική βιοψία ιστών. Αυτή η πιο εύκολη τεχνική χρησιμοποιείται ήδη από πολλά ινστιτούτα, ιδιαίτερα όταν τα δείγματα βιοψίας ιστού δεν είναι διαθέσιμα. Όσοσο είναι γεγονός ότι όπως πολλές άλλες επεμβάσεις στην ιατρική, έτσι και το πλάσμα NGS με ενσωματώθηκε στην κλινική πράξη χωρίς να αξιολογηθεί επαρκώς.

Ένα μεγάλο ερώτημα που ίσως να αποσχολεί τους περισσότερους μοριακούς ογκολόγους είναι: “Ποια η συμφωνία των αποτελεσμάτων των δυο αυτών μεθόδων?”

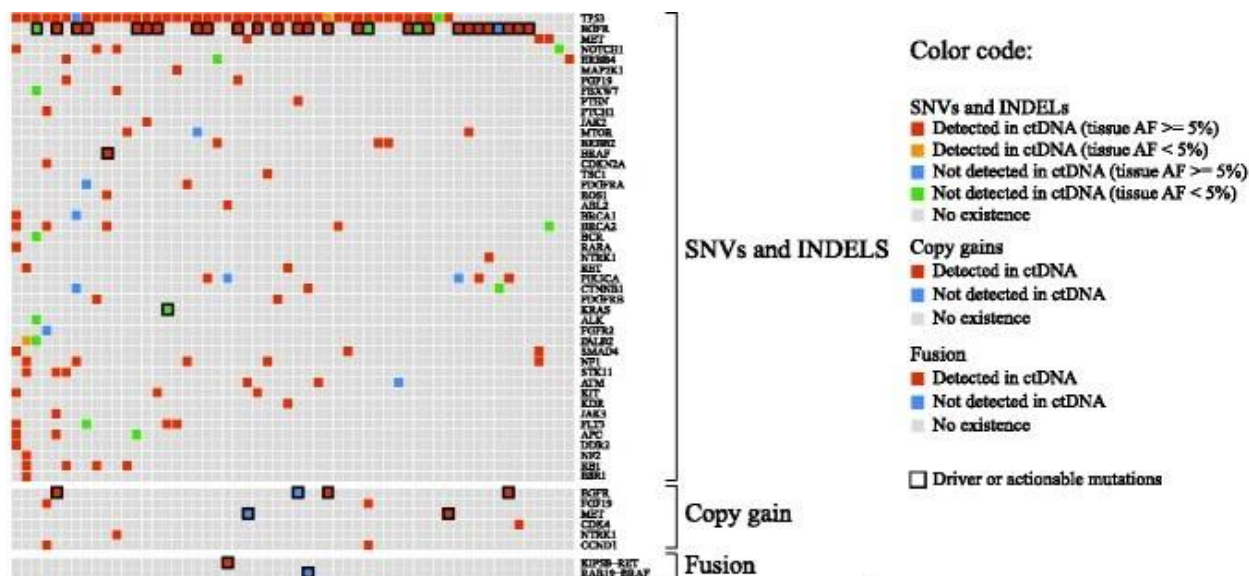
Σε μια μελέτη των Aggarwal και των συνεργατών του (33) πραγματοποιήθηκε η ανάλυση 70 γονιδίων σε δείγματα από 323 ασθενείς . Οι 94 από αυτούς υποβλήθηκαν μόνο σε πλάσμα NGS, οι 207 σε NGS και στους δυο τύπους δειγμάτων και οι 24 σε πλάσμα NGS εξαιτίας ανεπαρκούς ποσότητας ιστού. Τα αποτελέσματα που πήραν απεικονίζονται αναλυτικά στο παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα αποτελεσμάτων της μελέτης των Aggarwal et al. (33)

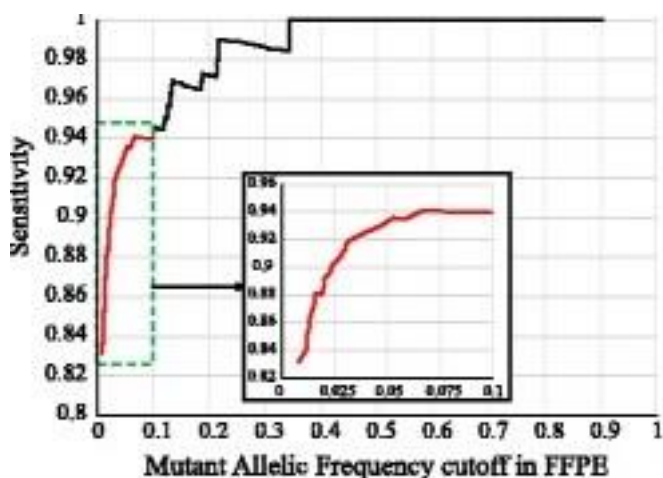
Συνολικά, από τους 116 ασθενείς για τους οποίους δεν πραγματοποιήθηκε βιοψία ιστού, το NGS στο πλάσμα τους συνέβαλε στην ανίχνευση μεταλλαγών στο 31% των ασθενών. Όσον αφορά τους υπόλοιπους 207 ασθενείς, για τους 79 η ποιότητα του γενωμικού υλικού που απομονώθηκε από τον ιστό τους ήταν αρκετά χαμηλή με αποτέλεσμα να υποβληθούν μόνο σε πλάσμα NGS. Έτσι ο συνολικός αριθμός των ασθενών που υποβλήθηκαν σε πλάσμα NGS έφτασε τους 195 εκ των οποίων οι 90 (46%) έφεραν κάποια παθογόνο μεταλλαγή. Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι μόνο οι 58 (30%) έφεραν θεραπευτικώς στοχεύσιμες μεταλλαγές στις οποίες όπως αναφέρθηκε και στην Εισαγωγή της εργασίας συγκαταλλέγονται οι: EGFR, ALK, MET, BRCA1, ROS1, RET, ERBB2, και οι BRAF μεταλλαγές. **Έτσι λοιπόν μόνο το 1/3 των συνολικών ανιχνεύσιμων μεταλλαγών ήταν θεραπευτικώς στοχεύσιμες.** Ωστόσο είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ένα σημαντικό ποσοστό των ασθενών (20%) που υποβλήθηκαν μόνο σε πλάσμα NGS έχοντας ήδη αναπτύξει αντίσταση σε θεραπεία με TKIs, είχαν 50-60% παραπάνω πιθανότητα να φέρουν και κάποια από τις παθογόνες μεταλλαγές που αναφέρθηκαν και πιο συγκεκριμένα την T790M. Όσον αφορά το ποσοστό των ασθενών που υποβλήθηκαν σε NGS τόσο σε ιστό όσο και στο πλάσμα, η συμφωνία των αποτελεσμάτων και με τις δυο μεθόδους έφτασε το 81%.

Σε μια παρόμοια μελέτη του Yang και των συνεργατών του (34) στην οποία συμμετείχαν δυο γκρουπ ασθενών σε στάδια IIIB και IV της νόσου πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των δειγμάτων σε 56 ασθενείς και με τις δυο μεθόδους για δυο κυρίως σκοπούς αφενός για την εύρεση της συμφωνίας των αποτελεσμάτων της ανάλυσης του πλάσμα και ιστού NGS και αφετέρου θέλησαν να απαντήσουν σε ένα σημαντικό ερώτημα όπως είναι : “που οφείλεται η ασυμφωνία των αποτελεσμάτων των δυο αυτών μεθόδων?”



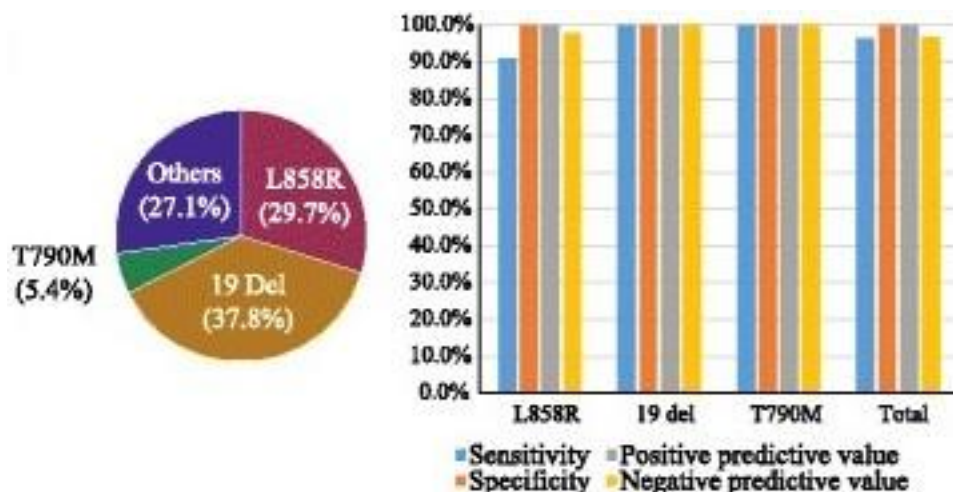
Αποτελέσματα της μελέτης των Yang et al. (34)

Στη μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι η ευαισθησία της μεθόδου στην ανίχνευση των θεραπευτικώς στοχεύσιμων μεταλλαγών ήταν 93,6% όταν η συχνότητα των αντίστοιχων μεταλλαγμένων αλληλομόρφων στον ιστό ήταν >5%, ενώ η ευαισθησία της ανάλυσης του ctDNA έπεφτε στο 9,1% για τις μεταλλαγές των οποίων τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα στον ιστό υπήρχαν σε ποσοστό <5%. Με αυτόν τον τρόπο χρησιμοποιήθηκε σαν cut off το 5% για την πραγματοποίηση της μελέτης.





Η ευαισθησία της ανάλυσης του ctDNA σχετίζεται άμεσα με τη συχνότητα των αντίστοιχων μεταλλαγμένων αλληλομόρφων στον ιστό. (34)



Ευαισθησία της ανάλυσης του ct DNA για τις EGFR hotspot μεταλλαγές. (34)

Όπως παρατηρούμε και στην παραπάνω εικόνα η ευαισθησία της μεθόδου για την ανίχνευση των EGFR hotspot μεταλλαγών μπορεί να φτάσει το 90% και η ειδικότητα το 100%. Πιο συγκεκριμένα, όπως παρατηρούμε η ευαισθησία της ανίχνευσης της p.L858R μεταλλαγής υπολογίζεται στο 90% ενώ η ευαισθησία για την ανίχνευση των Ex19Del και p.T790M μεταλλαγών φτάνει το 100%.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της δίκης μας μελέτης η συμφωνία των αποτελεσμάτων σε δείγματα που αναλύθηκαν και με τις δυο μεθόδους έφτασε το 85,92% με ποσοστά ευαισθησίας και ειδικότητας 81,82% και 94,44% αντίστοιχα. Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι τα ποσοστά αυτά αναφέρονται στις θεραπευτικώς στοχεύσιμες μεταλλαγές και όχι στον συνολικό αριθμό ανιχνεύσιμων μεταλλαγών.

## ΠΟΥ ΩΦΕΙΛΕΤΑΙ Η ΑΣΥΜΦΩΝΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΔΥΟ ΜΕΘΟΔΩΝ (πλάσμα NGS vs NGS ιστού) ?

Βασιζόμενοι στις δυο αυτές μελέτες όσον αφορά τη συμφωνία των αποτελεσμάτων της ανάλυσης των θεραπευτικώς στοχεύσιμων μεταλλαγών στο πλάσμα και στον ιστό καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα:

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

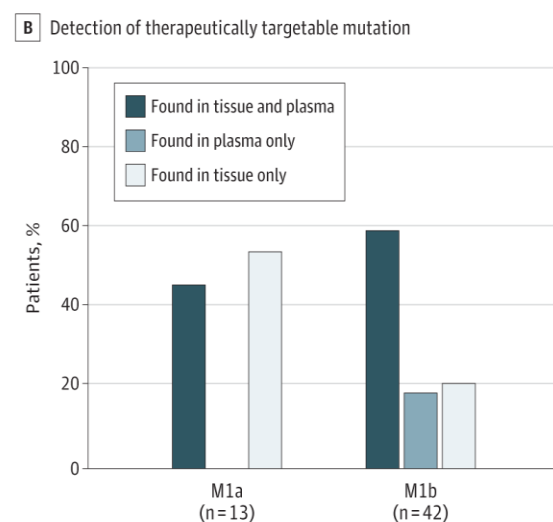
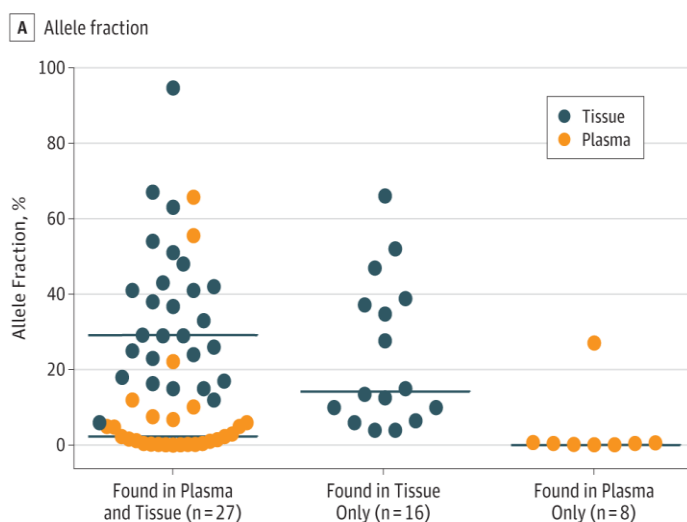
2). Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ της λήψης των δυο τύπων δειγμάτων μπορεί επίσης να επηρεάσει τη συμφωνία των αποτελεσμάτων.

3). Η συγκέντρωση του cf DNA σχετίζεται άμεσα με το concordance των δυο μεθόδων. Ειδικότερα, έχει αποδειχθεί ότι για τα δείγματα των οποίων η συγκέντρωση του cf DNA ήταν υψηλή, η ευαισθησία της ανάλυσης του ct DNA ήταν αρκετά μεγαλύτερη καθώς και ότι η συχνότητα των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων σε δείγματα με cf DNA > 30ng/ml ήταν αρκετά υψηλότερα από ότι για τα δείγματα πλάσματος με συγκέντρωση < 9ng/ml. Αυτό το εξηγεί το γεγονός του ότι μικρή συγκέντρωση ελεύθερου κυκλοφορούντος DNA (cfDNA) συνεπάγεται και μικρή συγκέντρωση του ελεύθερου καρκινικού κυκλοφορούντος DNA ( ct DNA) επομένως όλο και πιο ευαίσθητες τεχνικές ανίχνευσης μεταλλαγών απαιτούνται για του ασθενείς με cfDNA < 9ng/μl.

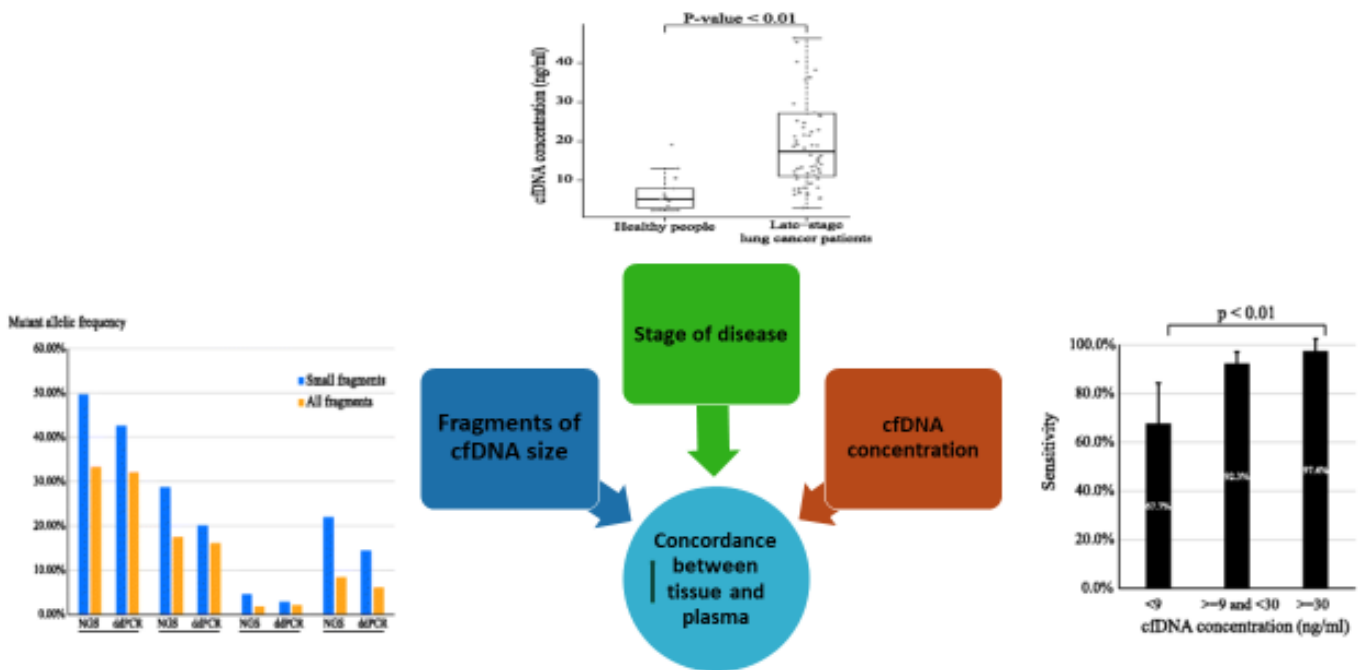
4). Το μέγεθος των θραυσμάτων του cf DNA σχετίζεται με την ευαισθησία της ανίχνευσης των μεταλλαγών. Ειδικότερα στη μελέτη του Yang et al. διαπιστώθηκε ότι όσον αφορά τη μεταλλαγή p.L858R το ποσοστό ευαισθησίας ανίχνευσής της σε μικρά θραύσματα είναι σημαντικά μεγαλύτερο.

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

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



A) Συχνότητα ανίχνευσης μεταλλαγμένων αλληλομόρφων των θεραπευτικώς στοχεύσιμων μεταλλαγών. Β). Επίδραση του εντοπισμού της νόσου στη συμφωνία των αποτελεσμάτων των δυο μεθόδων. (34)



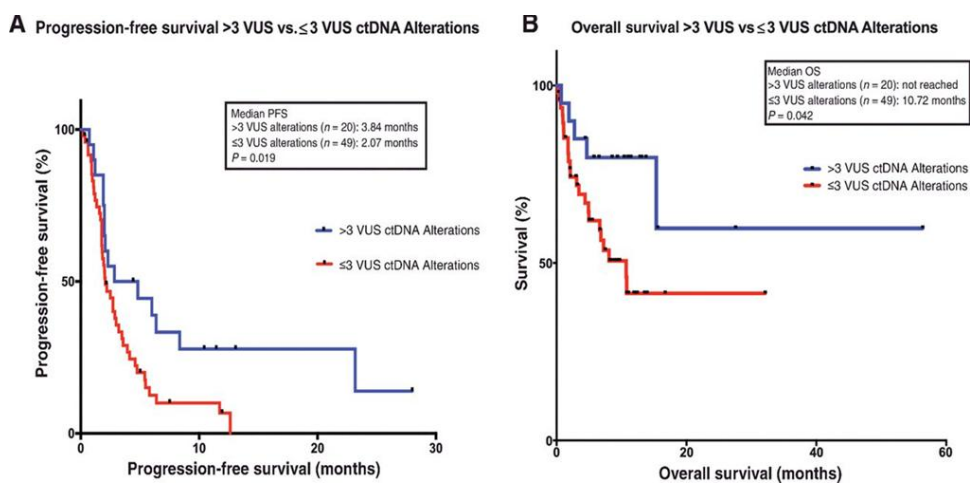
Οι κυριότεροι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η συμφωνία των δυο μεθόδων. (34)

## Το μέλλον των υγρών βιοψιών. Υγρές βιοψίες και ανοσοθεραπεία.

Η ανοσοθεραπεία με τη χρήση αναστολέων (checkpoint inhibitors) έχει κάνει την επανάσταση της στη θεραπεία διαφόρων κακοηθειών και πιο συγκεκριμένα στη θεραπεία του ΜΜΚΠ. Για παράδειγμα, ο αναστολέας PD-1 pembrolizumab κατέδειξε σημαντικά ποσοστά ανταπόκρισης περίπου της τάξεως 45% και η χορήγησή του έχει πλέον εγκριθεί στην πρώτη γραμμή θεραπείας για όγκους αρνητικούς για την παρουσία EGFR μεταλλαγών ευαισθητοποίησης καθώς και για ALK αναδιατάξεις. Άλλοι αναστολείς σημείων ελέγχου, όπως το αντι-CTLA-4 αντίσωμα ipilimumab και το αντι-PD1 αντίσωμα nivolumab, καθώς και το αντι-PD-L1 αντίσωμα atezolizumab, κατέδειξαν κλινικά σημαντική αποτελεσματικότητα για πολλές κακοήθειες. Παρά την αδιαμφισβήτητη αποτελεσματικότητα της ανοσοθεραπείας σε πολλούς τύπους καρκίνου, οι ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα δεν είναι αμελητέες. Σε μια αναδρομική ανασκόπηση 14 δοκιμών φάσης I έως III για το ipilimumab στις οποίες συμμετείχαν 1.500 ασθενείς, το 64,2% των ασθενών εμφάνισαν τοξικότητα στη θεραπεία, ενώ το 20% έως 30% εμφάνισαν

ανεπιθύμητες ενέργειες βαθμού 3-4 (συμπεριλαμβανομένης της γαστρεντερικής, δερματολογικής βλάβης, ηπατικές, ενδοκρινικές ή πνευμονικές ανεπιθύμητες ενέργειες. Η χρήση αντι-PD1 παραγόντων έχει επίσης βρεθεί ότι έχει ως απότοκο την παρουσία σοβαρής τοξικότητας σε ποσοστό περίπου 6%. Επιπλέον, σημαντικό είναι το ποσοστό αυτών που δεν ανταποκρίνονται στη θεραπεία. Επομένως για τους παραπάνω λόγους, καθίσταται επιτακτική η ανάγκη ανακάλυψης προγνωστικών δεικτών ανταπόκρισης στη θεραπεία.

Σε μελέτη του Yuilian και των συνεργατών του (35) αποδείχθηκε ότι το PFS για κάθε ασθενή παρουσιάζει σημαντική συσχέτιση με τον αριθμό των αδιευκρίνιστης κλινικής σημασίας μεταλλαγών που εντοπίζονται στο ct DNA αλλά και με τον συνολικό αριθμό των μεταλλαγών.



*PFS και OS για VUS >3 σε σύγκριση με με ≤3 groups. Η συγκεκριμένη μελέτη συμπεριέλαβε 69 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ανοσοθεραπεία με checkpoint inhibitors. (35)*

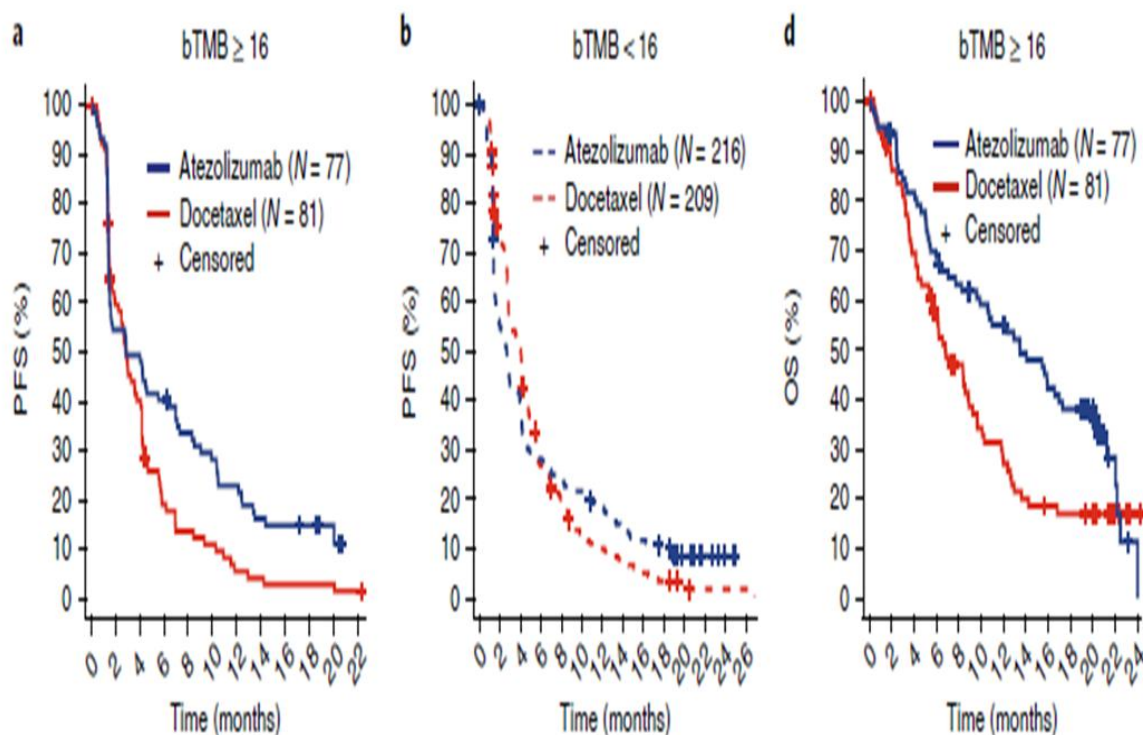
Στις μέρες μας, η έκφραση του PD L1 αποτελεί έναν πολύ σημαντικό βιοδείκτη για τον καθορισμό της θεραπείας ασθενών με προχωρημένο ΜΜΚΠ. Η χορήγηση αναστολέων την έκφρασης του PD 1 υποδοχέα σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της συνολικής τους επιβίωσης. Ωστόσο η διαθεσιμότητα κατάλληλου ιστού για ανάλυση του μοριακού προφίλ του όγκου, συμπεριλαμβανομένων των EGFR μεταλλαγών, ALK αναδιατάξεων και το φορτίο μεταλλαγών του όγκου (TMB), περιορίζεται όλο και περισσότερο. Ειδικότερα παραπάνω από το 30% των ασθενών που πάσχουν από ΜΜΚΠ, δεν διαθέτουν επαρκή ποσότητα ιστού για μοριακές αναλύσεις και η πραγματοποίηση βιοψίας ιστού αποτελεί μια απειλητική για τη ζωή τους διαδικασία. Έτσι, είναι επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης νέων μη επεμβατικών μεθόδων για τον εντοπισμό των ασθενών που θα μπορούσαν να επωφεληθούν από την αντι- PD L1 μονοθεραπεία. Η αναστολή τόσο της PD 1 πρωτεΐνης όσο και του προσδέτη της (PD L1) ως θεραπεία του ΜΜΚΠ έχει δείξει θαύματα αποτελέσματα. Ωστόσο η υπερέκφραση του PD L1 από μόνη της δεν δικαιολογεί το μεγάλο κλινικό όφελος των ασθενών με θετικούς για τον PD L1 όγκους, από την ανοσοθεραπεία. Επομένως η εξέταση για την έκφραση του PD L1 αποτελεί μεταξύ πολλών

από τους πιο σημαντικούς βιοδείκτες και έχει κατακτήσει σπουδαία κλινική χρησιμότητα για τον προσδιορισμό της πρώτης γραμμής θεραπείας σε ανθενείς με ΜΜΚΠ.

Κάποιες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα, υποστηρίζουν ότι με την κατάλληλη τεχνολογία NGS είναι εφικτός ο προσδιορισμός του φορτίου μεταλλαγών των όγκου σε υγρή βιοψία κάτι πολύ καινοτόμο στον τομέα της μοριακής ογκολογίας καθώς με αυτόν τον ανώδυνο και ακίνδυνο τρόπο είναι δυνατή η διάκριση των ασθενών που θα μπορούσαν να επωφεληθούν από τη θεραπεία με atezolizumab. Κάτι τέτοιο δεν θα έπρεπε να μας εκπλήσσει καθώς με την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος από του αναστολείς σημείων ελέγχου (immune checkpoint inhibitors) , αναγνωρίζονται τα καρκινικά κύτταρα που φέρουν στην επιφάνεια τους νεοαντιγόνα που προέρχονται από το μετάλλαγμα του όγκου . Πιθανότατα όσα περισσότερα νεοαντιγόνα είναι παρόντα στον οργανισμό των ασθενών τόσο μεγαλύτερη είναι η ενεργοποιητική δραστηριότητα των Τ ανοσοκυττάρων για την εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων.

### Μέτρηση του TMB στο πλάσμα και στον ιστό. Ποια η συμφωνία των αποτελεσμάτων των δυο μεθόδων?

Για τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων της μέτρησης του TMB στο πλάσμα (b TMB) και στον ιστό (t TMB) βασιστήκαμε στη μελέτη του Gandara et al. όπου πραγματοποιήθηκε η σύγκριση των δυο μεθόδων. Στη μελέτη αυτή αναφέρθηκε ότι η μέτρηση του TMB στο πλάσμα των ασθενών αποτέλεσε σημαντικό βιοδείκτη της πορείας των ασθενών στην θεραπεία με atezolizumab. Οι ασθενείς με TMB> 16 παρουσίασαν σημαντική αύξηση του PFS ύστερα από θεραπεία με atezolizumab σε σύγκριση με docetaxel. Επίσης στη συγκεκριμένη μελέτη αποδείχθηκε ότι το b TMB και η έκφραση του PD L1 αποτελούν δυο ανεξάρτητους βιοδείκτες. Ωστόσο ασθενείς με TMB>16 και αυξημένη έκφραση του PD L1 παρουσίασαν σημαντικά αυξημένο κλινικό όφελος από τη θεραπεία με atezolizumab. (36)



Πορεία των ασθενών ύστερα από θεραπεία με atezolizumab συγκριτικά της θεραπείας με docetaxel ανάλογα με τη μέτρηση του φερόμενου φορτίου μεταλλαγών του όγκου στο πλάσμα. Παρατηρούμε ότι ασθενείς με b TMB > 16 παρουσιάζουν σημαντικό κλινικό πλεονέκτημα από τη θεραπεία με atezolizumab. (36)

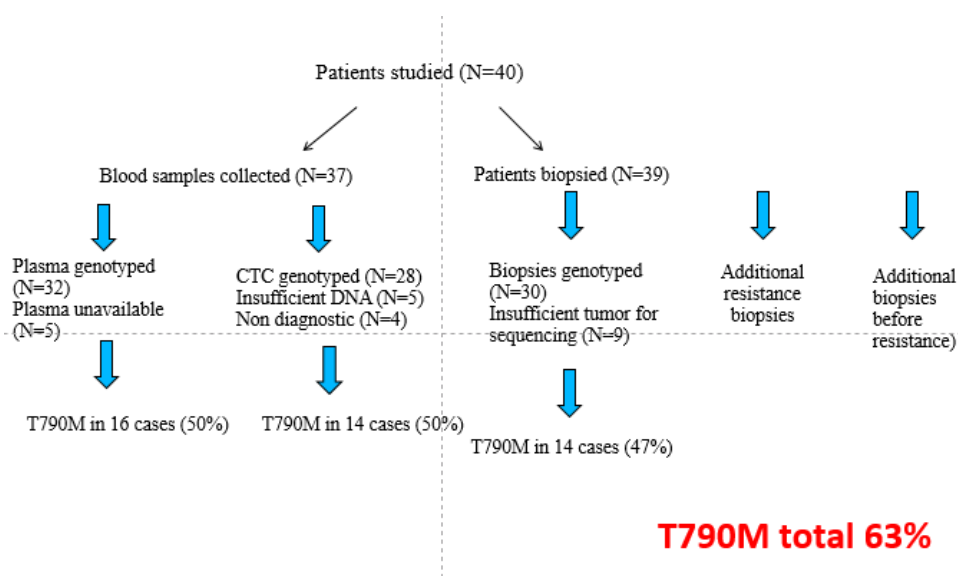
Διαπιστώθηκε επίσης πως η απόκλιση μεταξύ των δυο αυτών μεθόδων μπορεί να οφείλεται σε τεσσέρις κυρίως παράγοντες:

1. Από το διάστημα που μπορεί να μεσολάβησε μεταξύ της λήψης των δυο τύπων δειγμάτων.
2. Από τον αλγόριθμο που χρησιμοποιείται σε κάθε μια από τις δυο τεχνικές για τον υπολογισμό του TMB. Πιο συγκεκριμένα, η μέτρηση του TMB από τον ιστό (t TMB) περιλαμβάνει τόσο τον υπολογισμό των SNVs (singlenucleotide variants) όσο και των indels (προσθήκες και απαλοιφές) όταν η συχνότητα των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων είναι >5% ενώ ο αλγόριθμος που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του TMB( b TMB) στο πλάσμα βασίζεται στον υπολογισμό μόνο των SNVs για συχνότητα παρουσίας μεταλλαγμένων αλληλομόρφων >0,5%.
3. Διαφορές μπορεί να προκύπτουν και εξαιτίας της ετερογένειας του όγκου όσον αφορά το μοριακό του προφίλ.
4. Η συσχέτιση των δυο μεθόδων εξαρτάται επίσης και από το στάδιο της νόσου.

## CTCs versus ct DNA analysis

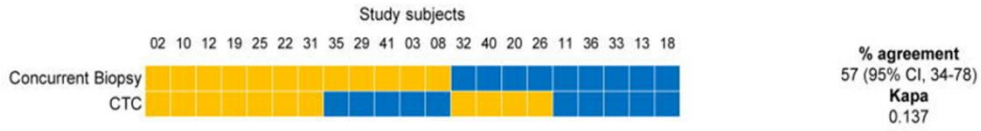
Στη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα ένα βασικό πρόβλημα που αντιμετωπίζεται είναι η εμφάνιση ανθεκτικότητας σε στοχευμένη θεραπεία με TKIs (στις περισσότερες περιπτώσεις μέσα σε 12-24 μήνες ύστερα από την έναρξη της θεραπείας). Περισσότερες από τις μισές περιπτώσεις ανθεκτικότητας οφείλονται στην εμφάνιση της T790M. Καθώς όμως πλέον έχουν αναπτυχθεί τρίτης γενεάς αναστολείς οι οποίοι παρακάμπτουν την ύπαρξη της μεταλλαγής αντίστασης T790M η ανίχνευση της έχει αποκτήσει ακόμη μεγαλύτερη σημασία για την καθοδήγηση της θεραπευτικής στρατηγικής. Σε μια μελέτη των Tilak K. Sundaresan et al. (37) αναλύθηκαν 40 ασθενείς με EGFR μεταλλαγμένους όγκους οι οποίοι εκδήλωσαν αντίσταση στη στοχευμένη θεραπεία με σκοπό να συγκριθεί το ποσοστό της εμφάνισης της μεταλλαγής αντίστασης T790M σε βιοψία με την ταυτόχρονη λήψη και ανάλυση CTC και ctDNA. Συνολικά 30 ασθενείς είχαν αρκετό υλικό βιοψίας για ανάλυση και σε αυτούς η T790M ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 47%. Όταν λήφθηκαν υπόψη και άλλες βιοψίες των ασθενών διαθέσιμες εκτός του χρονικού ορίου των 30 ημερών από την αιμοληψία το ποσοστό της T790M έφτασε στο 63%.

Από τους 37 ασθενείς στους οποίους πραγματοποιήθηκε αιμοληψία, οι 28 είχαν αρκετό γενετικό υλικό για ανάλυση. Σε αυτούς η μεταλλαγή T790M ήταν παρούσα στο 50% των περιπτώσεων. Το ίδιο ακριβώς ποσοστό βρέθηκε στους ασθενείς στους οποίους έγινε ανάλυση ctDNA. Η ανάλυση των ασθενών στους οποίους έγινε ταυτόχρονος γονοτυπικός έλεγχος σε βιοψία και CTCs έδειξε συμφωνία 57%. Όταν όμως λήφθηκαν υπόψη όλες οι διαθέσιμες βιοψίες το ποσοστό αυτό ήταν 74%. Η ανάλυση των ασθενών στους οποίους έγινε ταυτόχρονος γονοτυπικός έλεγχος σε βιοψία και ctDNA έδειξε συμφωνία 60%. Όταν όμως λήφθηκαν υπόψη όλες οι διαθέσιμες βιοψίες το ποσοστό αυτό ήταν 61%.

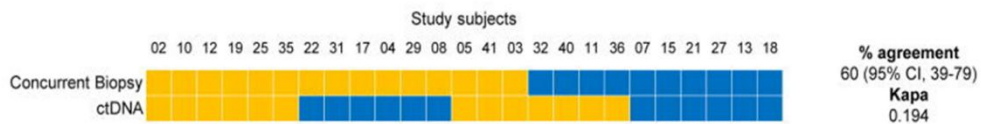


Σχεδιάγραμμα αποτελεσμάτων της μελέτης των Tilak K. Sundaresan et al. (37)

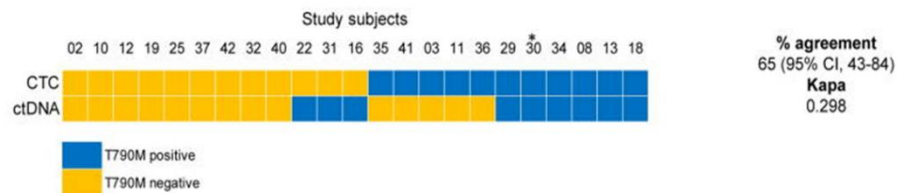
**A.**



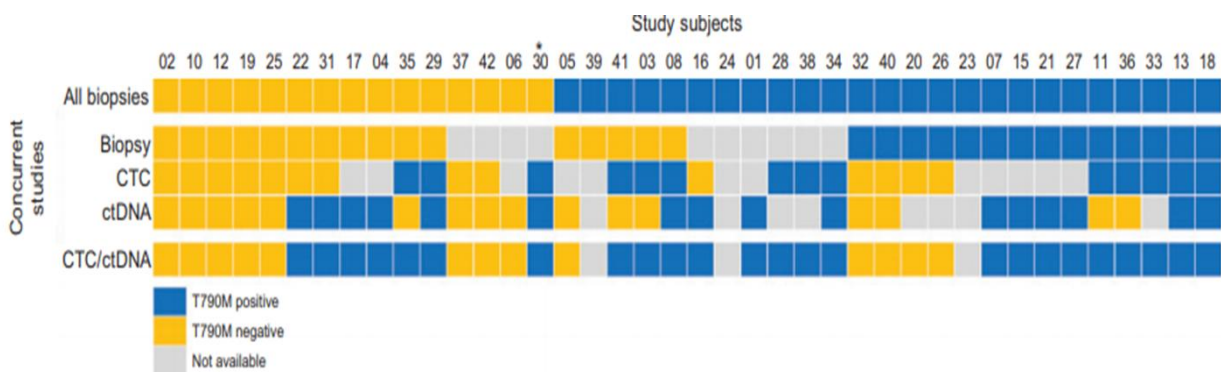
**B.**



**C.**



A. Ταυτόχρονη βιοψία ιστού και CTCs ανάλυση. (Concordance 57% / additional biopsies 74%) B. Η ανάλυση των ασθενών στους οποίους έγινε ταυτόχρονος μοριακός έλεγχος σε βιοψία ιστού και ctDNA. (concordance 60% / additional biopsies 61%). C. Ταυτόχρονη ανάλυση cf DNA και CTCs. (concordance 65% / additional biopsies 69%) (37)



Λεπτομερής ανάλυση των αποτελεσμάτων των τριων μεθόδων ως προς τον εντοπισμό της T790M μεταλλαγής.

Επομένως προκύπτει πως και για τις τρεις πλατφόρμες το ποσοστό ανίχνευσης της T790M ήταν 50% και ότι τα αποτελέσματα των αναλύσεων και των δυο υγρών βιοψιών είναι συγκρίσιμα με αυτά της κλασικής



βιοψίας, αλλά όχι ταυτόσημα. Επίσης όπως προκύπτει από τη συγκεκριμένη μελέτη, σε μια δεδομένη χρονική στιγμή της εξέλιξης της νόσου καθένας από τους τρεις τύπους αναλύσεων δεν έδωσε αποτελέσματα για το ¼ των ασθενών.

Όταν λήφθηκαν υπόψη τα αποτελέσματα και των δυο υγρών βιοψιών ( ctDNA και CTCs ανάλυση) για την ανίχνευση της T790M διαπιστώθηκε ότι 14 ασθενείς όπου η βιοψία ιστού ήταν μη διαθέσιμη εξαιτίας ανεπάρκειας ιστού, έφεραν τη μεταλλαγή αντίστασης. (35%)

**Όταν λήφθηκαν υπόψη τα αποτελέσματα και των τριών πλατφόρμων η μεταλλαγή T790M ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 73%.**

Παρόλο που τα αποτελέσματα των αναλύσεων των δυο τύπων υγρής βιοψίας όσον αφορά την αξιολόγηση κινδύνου για μεταστατική υποτροπή / εξέλιξη, στρωματοποίηση ασθενούς, παρακολούθηση θεραπειών σε πραγματικό χρόνο, προσδιορισμός θεραπευτικών στόχων και μηχανισμών αντίστασης ήταν συγκρίσιμα, περεταίρω μελέτες απαιτούνται για τη διαπίστωση της της υπεροχής ενός από τους δύο βιοδείκτες (ctDNA ή CTCs). Ειδικότερα ο Alan σε μια μελέτη του έκανε λόγο για την προέλευση αυτών των δυο βιοδεικτών. Τα CTCs αφορούν άθικτα κύτταρα που διαφεύγουν από την περιοχή του όγκου ή από την περιοχή της μεταστατικής εστίας (μπορεί να είναι βιώσιμη ή μη) και απελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος ενώ το cfDNA μπορεί να προέρχεται είτε από τα φυσιολογικά κύτταρα από τα οποία αποβάλλεται είτε από κύτταρα που έχουν υποβληθεί σε νέκρωση ή απόπτωση. Επιπρόσθετα, περιγράφηκαν εκτιμήσεις σχετικά με τις δυνητικές αναλύσεις που θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν μετά την απομόνωση κάθε βιολογικού δείκτη. Τα CTCs μας δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης τόσο σε γενωμικό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο ενώ το cfDNA μας δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης μόνο του DNA του. Με την εξέλιξη της Βιολογίας δίνεται στους ερευνητές πλέον η δυνατότητα καλλιέργειας των απομονωμένων CTCs δίνοντας έτσι τη δυνατότητα αξιολόγησης της θεραπευτικής αποτελεσματικότητας. Τέλος, για την αξιολόγηση CTC και cfDNA, απαιτούνται τόσο ευαίσθητες τεχνικές ανάλυσης όσο και ευαίσθητες τεχνικές απομόνωσής τους. Στον πίνακα που ακολουθεί αναγράφονται τα πλεονεκτήματα καθενός από τους δυο βιοδείκτες.

CTCs	cfDNA
•FDA approved technology	•Easy enrichment/isolation from plasma
•Approved Prognostic value in Breast, Colorectal and Prostate cancer	•Clinically validated test for EGFR mutation detection in NSCLC/ predictive marker
•Viable cells in vivo/vitro studies	•Resistance mutation analysis
•Single cell analysis	•Easy enrichment/isolation from plasma
•Resistance mutation analysis	•Clinically validated test for EGFR mutation detection in NSCLC/ predictive marker
•DNA, RNA, FISH, FLOW CYTOMETRY ANALYSIS	•Resistance mutation analysis
•Lower CTCs number in the non metastatic setting	
•Require sensitive and often expensive isolation technology	
•Challenging to store long term	
•EMT Transition of CTCs	

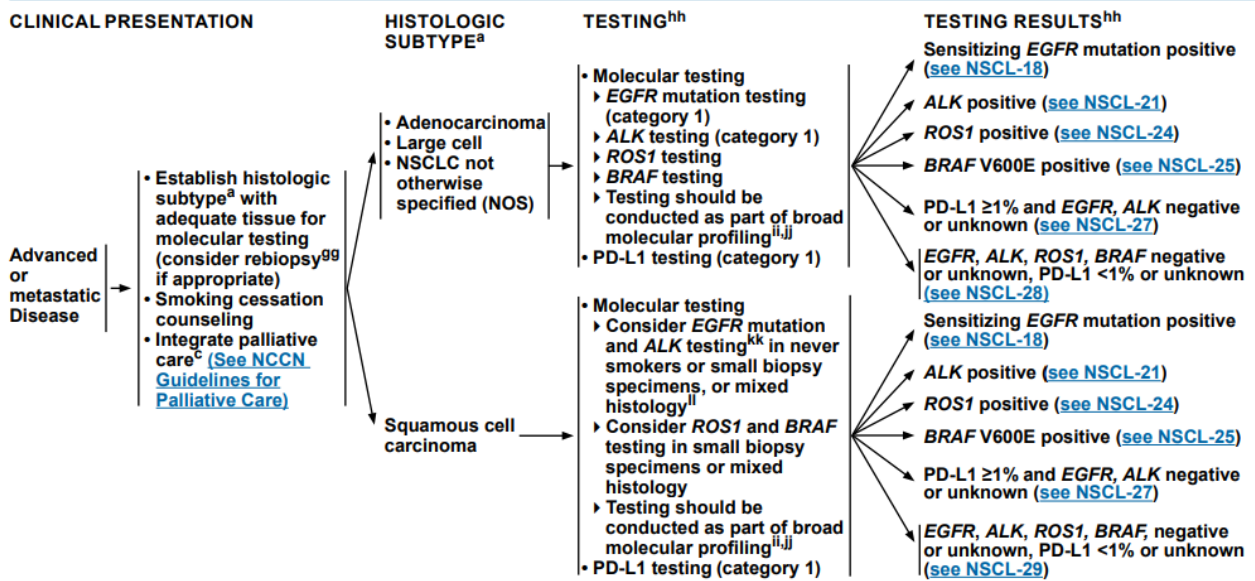
NCCN GUIDELINES VERSION 4.2019

([https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/default.aspx](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx))



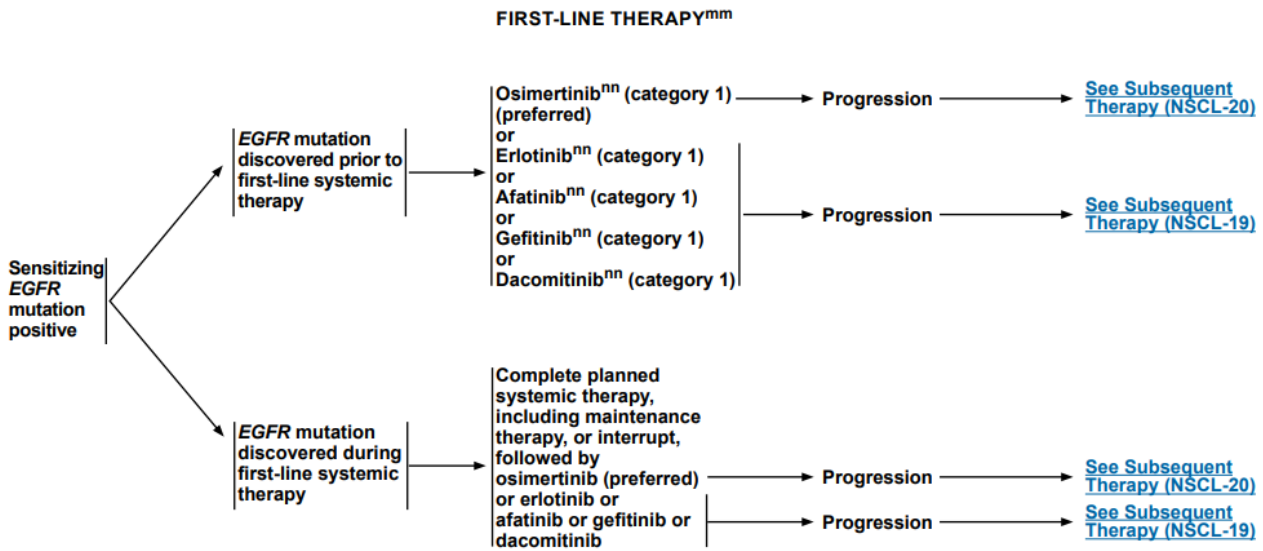
**NCCN Guidelines Version 4.2019  
Non-Small Cell Lung Cancer**

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

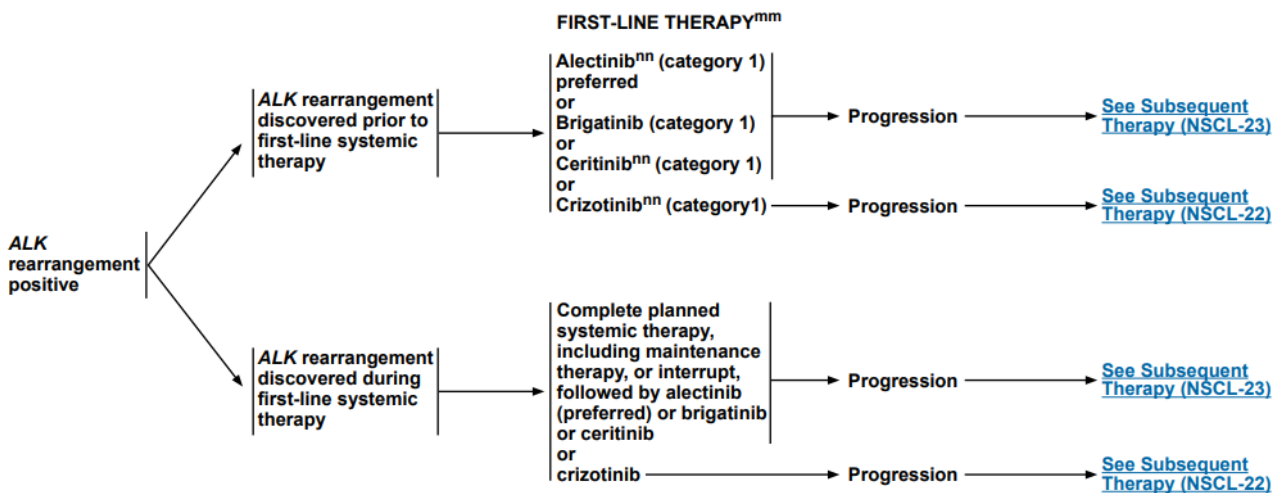




## SENSITIZING EGFR MUTATION POSITIVE<sup>hh</sup>



## ALK REARRANGEMENT POSITIVE<sup>hh</sup>

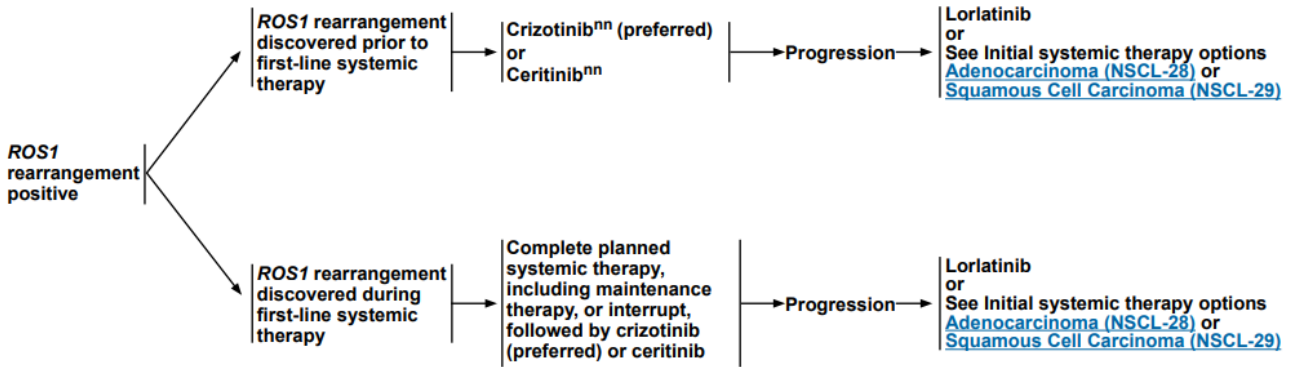




ROS1 REARRANGEMENT POSITIVE<sup>hh</sup>

FIRST-LINE THERAPY<sup>mmm</sup>

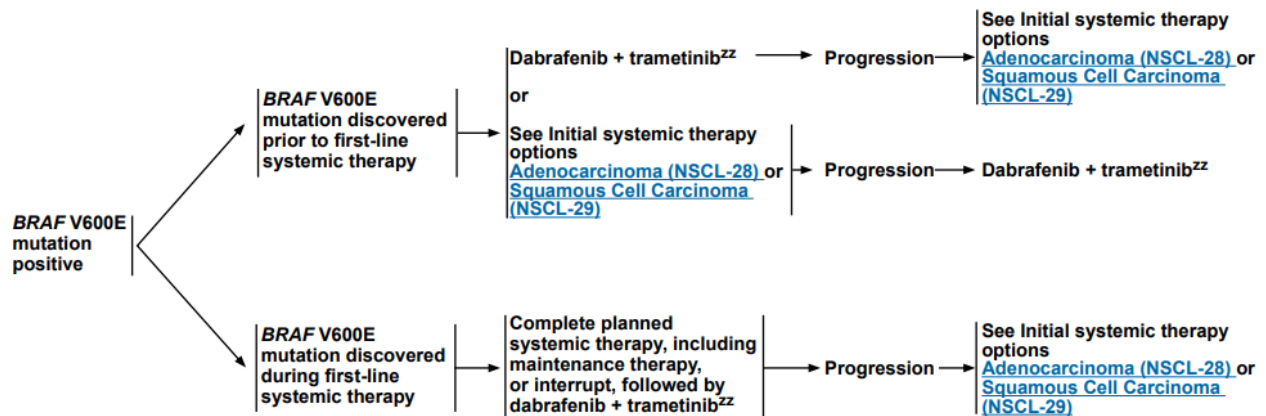
SUBSEQUENT THERAPY<sup>mmm</sup>



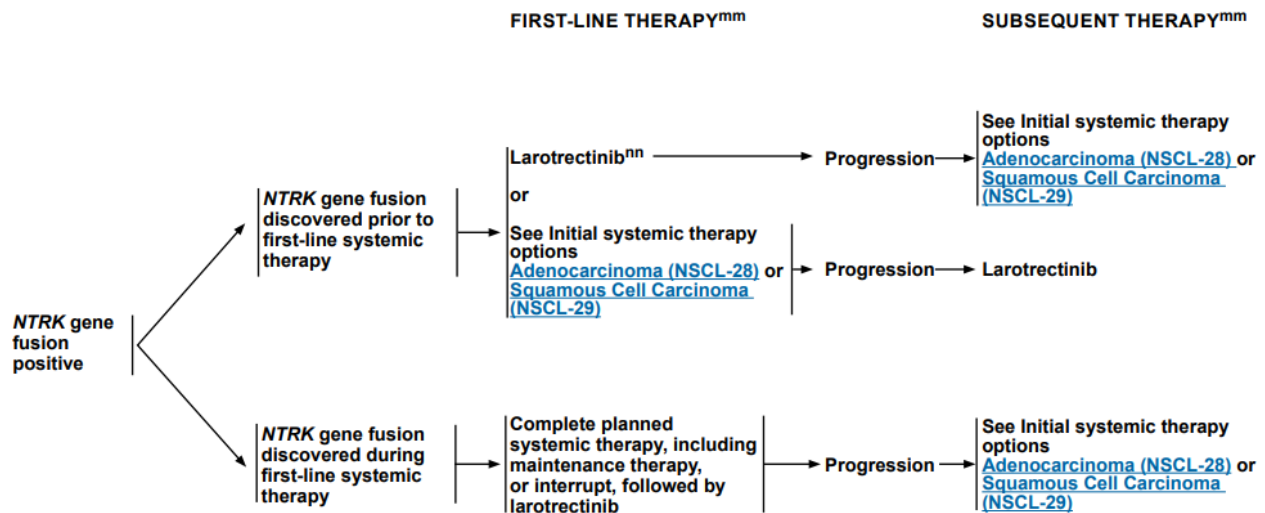
BRAF V600E MUTATION POSITIVE<sup>hh</sup>

FIRST-LINE THERAPY<sup>mmm</sup>

SUBSEQUENT THERAPY<sup>mmm</sup>



**NTRK GENE FUSION POSITIVE**



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η τεχνολογία NGS κατέστησε δυνατή την ανίχνευση τυχόν μεταλλαγών σε ένα πολύγονιδιακό πάνελ ακόμα και σε υλικό στο οποίο η συγκέντρωση του γενετικού υλικού είναι πολύ χαμηλή.

Ωστόσο, οι γιατροί συχνά απαιτούν την εξέταση μόνο των “ παραδοσιακών” βιοδεικτών όπως είναι τα γονίδια EGFR και ALK. Παρόλα αυτά, βασιζόμενοι στα δικά μας πειράματα, αποτελέσματα των οποίων έχουν κατατεθεί στο PLOS ONE επιστημονικό περιοδικό αν η ανάλυση περιοριζόταν μόνο σε αυτά τα γονίδια, μια μετάλλαξη θα είχε ανιχνευθεί στο 13,23% των περιπτώσεων . Επιπλέον, ένας πρόσφατα εγκεκριμένος βιοδείκτης για NSCLC είναι η μετάλλαξη p.V600E στο γονίδιο BRAF. Ο εντοπισμός αυτής της παραλλαγής αυξάνει το ποσοστό των θετικών ασθενών για ένα εγκεκριμένο βιοδείκτη στο 14,89% . Οι μεταλλάξεις ERBB2 στο NSCLC, αποτελούνται κυρίως από προσθήκη στο εξώνιο 20 και εντοπίζονται στο 1-3% των ασθενών. Επιπροσθέτως, μεταλλάξεις που αφορούν απαλοιφή στο εξώνιο 14 του MET εντοπίζονται στο 1-4% των περιπτώσεων (38). Και οι δύο τροποποιήσεις ERBB2 και MET θεωρούνται κλινικά σημαντικοί

βιοδείκτες απόκρισης στη θεραπεία και περιλαμβάνονται στις κατευθυντήριες γραμμές του NCCN ([www.nccn.org](http://www.nccn.org)). Στην ομάδα μας οι μεταβολές ERBB2 και MET παρατηρήθηκαν σε ποσοστό 3,31% και 0,83% αντίστοιχα.

Περαιτέρω ανάλυση βιοδεικτών θα μπορούσε επίσης να συμβάλει στη διευκρίνιση του μοριακού προφίλ του όγκου του ασθενούς και να δώσει πρόσθετες κλινικές σημαντικές πληροφορίες. Για παράδειγμα, η ανάλυση των μεταλλάξεων KRAS, η οποία είναι παρούσα στο 15-25% των ασθενών, υποτίθεται ότι είναι ένας προγνωστικός βιοδείκτης χειρότερης έκβασης της θεραπείας στην περίπτωση αδenoκαρκινώματος του πνεύμονα (NSCLC). Επιπλέον, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι οι ασθενείς που φέρουν τη συγκεκριμένη μεταλλαγή παρουσιάζουν χαμηλή ανταπόκριση στη στοχευμένη θεραπεία με EGFR TKIs. (39, 40)

Αρκετές μελέτες επιβεβαίωσαν την κλινική χρησιμότητα της ανάλυσης ctNA στην ανίχνευση μεταλλαγών που προέρχονται από όγκο με MMKP καθώς και σε άλλους τύπους όγκων. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα, στους 36 ασθενείς με διαθέσιμο ιστό και πλάσμα παρατηρήθηκε 72,73% ποσοστό συσχέτισης μεταλλαγών μεταξύ των δύο υλικών. Αυτή η συμφωνία είναι ακόμη μεγαλύτερη όταν εξετάζονται μόνο οι κλινικά σχετιζόμενες με θεραπεία μεταλλαγές (EGFR, BRAF, ERBB2, KRAS, NRAS). Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι πρόκειται για τις λεγόμενες “driver mutations” που εμφανίζονται νωρίς στην εξέλιξη του όγκου. Για αυτές τις μεταλλάξεις επιτεύχθηκε ευαισθησία 84,2% με concordance 88,9%. Συνήθως, όταν διεξάγονται συγκριτικές μελέτες με δείγματα ιστού και υγρές βιοψίες προκειμένου να υπολογιστεί η ειδικότητα της μεθόδου λαμβάνουμε υπόψη τα αποτελέσματα των πρώτων ως “gold standard”.

Όσον αφορά την απορία πολλών ογκολόγων γιατρών για την κλινική χρησιμότητα των υγρων βιοψιών στον τομέα της διάγνωσης ο Bishal Gyawali και οι συνεργάτες του προτείνουν σαν πρώτο βήμα τη πραγματοποίηση υγρής βιοψίας αφενός λόγω της εύκολης δειγματοληψίας και του μικρότερου χρονικού διαστήματος που μεσολαβεί για την ολοκλήρωση της εξέτασης και αφετέρου λόγω μειωμένου κόστους. Σε περίπτωση μη ανίχνευσης κλινικά σχετιζόμενων μεταλλαγών προτείνουν βιοψία από ιστό. (33) Τελός, βάση της μελέτης των Tilak K. Sundaresan και των συνεργατών τους που παρουσιάστηκε προηγουμένως παρατηρήθηκε ότι όταν λήφθηκαν υπόψη τα αποτελέσματα και των δυο υγρών βιοψιών ( ctDNA και CTCs ανάλυση) για την ανίχνευση της T790M διαπιστώθηκε ότι 14 ασθενείς όπου η βιοψία ιστού ήταν μη διαθέσιμη εξαιτίας ανεπάρκειας ιστού, έφεραν τη μεταλλαγή αντίστασης (35%). Ενώ όταν λήφθηκαν υπόψη τα αποτελέσματα και των τριών πλατφόρμων (βιοψία ιστού, ctDNA analysis, CTCs analysis) η μεταλλαγή T790M ανιχνεύθηκε σε ποσοστό 73%. (37)

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της συμφωνίας των δυο μεθόδων εφαρμόστηκαν επίσης και για δείγματα που αφορούσαν ασθενείς με καρκίνο του παχέως εντέρου. Πιο συγκεκριμένα, από τους 37

ασθενείς για τους οποίους εξετάστηκε ταυτόχρονα δείγμα ιστού και πλάσμα στους 22 εντοπίστηκε συμφωνία των αποτελεσμάτων του NGS στον ιστό και στο πλάσμα με sensitivity και specificity 81,48% και 97,3 % αντίστοιχα.

Σπουδαίοι στο χώρο της Μοριακής Ογκολογίας επιστήμονες παρέθεσαν την αποψη τους σχετικά με την κλινική χρησιμότητα των υγρών βιοψιών (41):

*Dedic:* Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) και το κυκλοφορούν DNA του όγκου (ctDNA) προσφέρουν υπόσχεση στη βελτίωση της πρόγνωσης στη συστηματική θεραπεία. Το ASCO 2018 παρέχει νέα δεδομένα για περαιτέρω υποστήριξη της κλινικής εγκυρότητας για τη χρήση των υγρών βιοψιών στην πρόγνωση του καρκίνου του μαστού. Επίσης παρουσιάστηκαν νέα αποτελέσματα που επικυρώνουν τη συσχέτιση μεταξύ CTCs και κλινικών αποτελεσμάτων στον καρκίνο του μαστού, ανεξάρτητα από τον μοριακό υποτύπο, τη θέση της νόσου και τη γραμμή θεραπείας. Ένα κατώτατο όριο 5 CTCs θα μπορούσε να προβλέψει την άσχημη μεταστατική νόσο. Οι υγρές βιοψίες θα μπορούσαν επίσης να μας βοηθήσουν να προβλέψουμε την αντίσταση στη θεραπεία, όχι μόνο να αντιμετωπίσουμε την αντίσταση, αλλά και να μην χάνουμε χρόνο στη θεραπεία που δεν θα λειτουργήσει.

*De Mattos Arruda:* Στο ASCO 2018, παρουσιάστηκε μια σειρά πιθανών βιοδεικτών, με βάση τα αποτελέσματα πειραμάτων σε βιοψίες ιστού και υγρές βιοψίες (ctDNA και CTCs) για την πρόγνωση και τη διάγνωση του καρκίνου του μαστού. Ο Vidula και οι συνεργάτες του (42) αξιολόγησαν την επίδραση των αποτελεσμάτων της γονοτύπησης δειγμάτων ιστού και του ctDNA στην επιλογή της κατάλληλης θεραπείας σε ασθενείς με MBC (μεταστατικό καρκίνο μαστού) και απέδειξε ότι η εξέταση του ctDNA των ασθενών οδήγησε σε υψηλότερο ρυθμό ανίχνευσης μεταλλαγών και μεγαλύτερη εφαρμογή συμβατικής θεραπείας σε σύγκριση με τα δείγματα από ιστό. Επίσης οι ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκε θεραπεία με βάση τα αποτελέσματα του plasma NGS σημείωσαν αυξημένο ρυθμό συνολικής επιβίωσης. Αυτά τα νέα ευρήματα απαιτούν επιβεβαίωση με πρόσθετες μελέτες.

Με την συγκεκριμένη μελέτη καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα:

- 1) Το NGS στο πλάσμα και στον ιστό αποτελούν δυο μεθόδους συμπληρωματικές καθώς όπως αποδείχθηκε με το συνδυασμό τους αυξάνεται πιθανότητα εντοπισμού κλινικά στοχεύσιμων μεταλλαγών.
- 2) Η προηγμένη τεχνολογία του NGS σε σύγκριση με τη μέθοδο του cobas παρά το υψηλότερο κόστος παρουσιάζει το πλεονέκτημα εξέτασης ενός πολυγονιδιακού πάνελ ταυτόχρονα.
- 3) Η αντίσταση στη θεραπεία μπορεί να επέλθει και από μια πληθώρα άλλων μηχανισμών και μεταλλαγών τις οποίες μόνο το NGS είναι ικανό να ταυτοποιήσει.

# REFERENCES

1. Didkowska J, Wojciechowska U, Manczuk M, Lobaszewski J. Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide. *Ann Transl Med.* 2016;4(8):150.
2. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, et al. 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;2(8):706-14.
3. Oberndorfer F, Mullauer L. Molecular pathology of lung cancer: current status and perspectives. *Curr Opin Oncol.* 2018;30(2):69-76.
4. Kashima J, Kitadai R, Okuma Y. Molecular and Morphological Profiling of Lung Cancer: A Foundation for "Next-Generation" Pathologists and Oncologists. *Cancers (Basel).* 2019;11(5).
5. Li T, Kung HJ, Mack PC, Gandara DR. Genotyping and genomic profiling of non-small-cell lung cancer: implications for current and future therapies. *J Clin Oncol.* 2013;31(8):1039-49.
6. Chirieac LR, Dacic S. Targeted Therapies in Lung Cancer. *Surg Pathol Clin.* 2010;3(1):71-82.
7. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004;350(21):2129-39.
8. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Janne PA, Kocher O, Meyerson M, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2005;352(8):786-92.
9. Wang S, Cang S, Liu D. Third-generation inhibitors targeting EGFR T790M mutation in advanced non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol.* 2016;9:34.
10. Stewart EL, Tan SZ, Liu G, Tsao MS. Known and putative mechanisms of resistance to EGFR targeted therapies in NSCLC patients with EGFR mutations-a review. *Transl Lung Cancer Res.* 2015;4(1):67-81.
11. Arcila ME, Oxnard GR, Nafa K, Riely GJ, Solomon SB, Zakowski MF, et al. Rebiopsy of lung cancer patients with acquired resistance to EGFR inhibitors and enhanced detection of the T790M mutation using a locked nucleic acid-based assay. *Clin Cancer Res.* 2011;17(5):1169-80.
12. Tian T, Li X, Zhang J. mTOR Signaling in Cancer and mTOR Inhibitors in Solid Tumor Targeting Therapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3).
13. Janku F, Yap TA, Meric-Bernstam F. Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(5):273-91.
14. Scheffler M, Bos M, Gardizi M, Konig K, Michels S, Fassunke J, et al. PIK3CA mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): genetic heterogeneity, prognostic impact and incidence of prior malignancies. *Oncotarget.* 2015;6(2):1315-26.
15. Wang ZF, Ren SX, Li W, Gao GH. Frequency of the acquired resistant mutation T790 M in non-small cell lung cancer patients with active exon 19Del and exon 21 L858R: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer.* 2018;18(1):148.
16. Costa DB. Kinase inhibitor-responsive genotypes in EGFR mutated lung adenocarcinomas: moving past common point mutations or indels into uncommon kinase domain duplications and rearrangements. *Transl Lung Cancer Res.* 2016;5(3):331-7.
17. Ko B, Paucar D, Halmos B. EGFR T790M: revealing the secrets of a gatekeeper. *Lung Cancer (Auckl).* 2017;8:147-59.
18. Wu SG, Shih JY. Management of acquired resistance to EGFR TKI-targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer. *Mol Cancer.* 2018;17(1):38.
19. Tan C-S, Kumarakulasinghe NB, Huang Y-Q, Ang YLE, Choo JR-E, Goh B-C, et al. Third generation EGFR TKIs: current data and future directions. *Molecular Cancer.* 2018;17(1):29.
20. Tan CS, Kumarakulasinghe NB, Huang YQ, Ang YLE, Choo JR, Goh BC, et al. Third generation EGFR TKIs: current data and future directions. *Mol Cancer.* 2018;17(1):29.
21. Tan CS, Cho BC, Soo RA. Next-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in epidermal growth factor receptor -mutant non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2016;93:59-68.



22. Chabon JJ, Simmons AD, Lovejoy AF, Esfahani MS, Newman AM, Haringsma HJ, et al. Circulating tumour DNA profiling reveals heterogeneity of EGFR inhibitor resistance mechanisms in lung cancer patients. *Nat Commun.* 2016;7:11815.
23. Ho CC, Liao WY, Lin CA, Shih JY, Yu CJ, Chih-Hsin Yang J. Acquired BRAF V600E Mutation as Resistant Mechanism after Treatment with Osimertinib. *J Thorac Oncol.* 2017;12(3):567-72.
24. Madic J, Jovelet C, Lopez J, Andre B, Fatien J, Miran I, et al. EGFR C797S, EGFR T790M and EGFR sensitizing mutations in non-small cell lung cancer revealed by six-color crystal digital PCR. *Oncotarget.* 2018;9(100):37393-406.
25. Ansari J, Yun JW, Kompelli AR, Moufarrej YE, Alexander JS, Herrera GA, et al. The liquid biopsy in lung cancer. *Genes Cancer.* 2016;7(11-12):355-67.
26. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Math M, Larkin J, Endesfelder D, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012;366(10):883-92.
27. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem.* 2015;61(1):112-23.
28. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med.* 2014;6(224):224ra24.
29. Yang M, Forbes ME, Bitting RL, O'Neill SS, Chou PC, Topaloglu U, et al. Incorporating blood-based liquid biopsy information into cancer staging: time for a TNMB system? *Ann Oncol.* 2018;29(2):311-23.
30. Li X, Zhou C. Comparison of cross-platform technologies for EGFR T790M testing in patients with non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2017;8(59):100801-18.
31. Kou R, Lam H, Duan H, Ye L, Jongkam N, Chen W, et al. Benefits and Challenges with Applying Unique Molecular Identifiers in Next Generation Sequencing to Detect Low Frequency Mutations. *PLoS One.* 2016;11(1):e0146638.
32. Belchis DA, Tseng LH, Gniadek T, Haley L, Lokhandwala P, Illei P, et al. Heterogeneity of resistance mutations detectable by nextgeneration sequencing in TKI-treated lung adenocarcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(29):45237-48.
33. Aggarwal C, Thompson JC, Black TA, Katz SI, Fan R, Yee SS, et al. Clinical Implications of Plasma-Based Genotyping With the Delivery of Personalized Therapy in Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol.* 2019;5(2):173-80.
34. Yang N, Li Y, Liu Z, Qin H, Du D, Cao X, et al. The characteristics of ctDNA reveal the high complexity in matching the corresponding tumor tissues. *BMC Cancer.* 2018;18(1):319.
35. Khagi Y, Goodman AM, Daniels GA, Patel SP, Sacco AG, Randall JM, et al. Hypermutated Circulating Tumor DNA: Correlation with Response to Checkpoint Inhibitor-Based Immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2017;23(19):5729-36.
36. Gandara DR, Paul SM, Kowanetz M, Schleifman E, Zou W, Li Y, et al. Blood-based tumor mutational burden as a predictor of clinical benefit in non-small-cell lung cancer patients treated with atezolizumab. *Nature Medicine.* 2018;24(9):1441-8.
37. Sundaresan TK, Sequist LV, Heymach JV, Riely GJ, Janne PA, Koch WH, et al. Detection of T790M, the Acquired Resistance EGFR Mutation, by Tumor Biopsy versus Noninvasive Blood-Based Analyses. *Clin Cancer Res.* 2016;22(5):1103-10.
38. Awad MM, Oxnard GR, Jackman DM, Savukoski DO, Hall D, Shivdasani P, et al. MET Exon 14 Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer Are Associated With Advanced Age and Stage-Dependent MET Genomic Amplification and c-Met Overexpression. *J Clin Oncol.* 2016;34(7):721-30.
39. Garzon M, Villatoro S, Teixido C, Mayo C, Martinez A, de Los Llanos Gil M, et al. KRAS mutations in the circulating free DNA (cfDNA) of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Transl Lung Cancer Res.* 2016;5(5):511-6.
40. Wood K, Hensing T, Malik R, Salgia R. Prognostic and Predictive Value in KRAS in Non-Small-Cell Lung Cancer: A Review. *JAMA Oncol.* 2016;2(6):805-12.
41. Balic M, Dedic N, De Mattos-Arruda L, Gampenrieder S. News from ASCO 2018. *Breast Care (Basel).* 2018;13(4):298-302.

42. Vidula N, Juric D, Niemierko A, Spring L, Moy B, Malvarosa G, et al. Comparison of tissue genotyping (TG) vs circulating tumor DNA (ctDNA) for selection of matched therapy and impact on clinical outcomes among patients with metastatic breast cancer (MBC). *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36(15\_suppl):1020-.