



Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Σχολή Επιστημών Υγείας

Ιατρικό Τμήμα

Μεταπτυχιακό πρόγραμμα «Βασικές Ιατρικές Επιστήμες (ΒΒΕ)»

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης(ΜΔΕ)

**Ο ΡΟΛΟΣ ΚΑΙ Η ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ
ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ ΣΤΟΝ ΜΗ
ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ
ΠΝΕΥΜΟΝΑ**

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ: ΚΑΛΗΣΠΕΡΑΤΗ ΠΟΛΥΞΕΝΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΜΑΓΚΛΑΡΑ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

ΕΤΟΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΕΓΚΡΙΣΗΣ: 2021



Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Σχολή Επιστημών Υγείας

Ιατρικό Τμήμα

Μεταπτυχιακό πρόγραμμα «Βασικές Ιατρικές Επιστήμες (ΒΒΕ)»

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης(ΜΔΕ)

**Ο ΡΟΛΟΣ ΚΑΙ Η ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ
ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ ΣΤΟΝ ΜΗ
ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ
ΠΝΕΥΜΟΝΑ**

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ: ΚΑΛΗΣΠΕΡΑΤΗ ΠΟΛΥΞΕΝΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΜΑΓΚΛΑΡΑ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

ΕΤΟΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΕΓΚΡΙΣΗΣ: 2021

Η έγκριση της Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)

Καλησπεράτη Πολυξένη

Τίτλος ΜΔΕ: Ο ρόλος και η κλινική χρησιμότητα της υγρής βιοψίας στον μη μικροκυτταρικό
καρκίνο του πνεύμονα

Ημερομηνία παρουσίασης: 16/07/2021

Εξεταστική επιτροπή: Μαγκλάρα Αγγελική, Επίκουρος Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας
Ιατρικού Τμήματος

Μπαϊρακτάρη Ελένη, Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας Ιατρικού Τμήματος

Λεονταρίτης Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας Ιατρικού Τμήματος

Η διαδικασία επικυρώνεται από

Την/ον διευθυντή του ΠΜΣ ΒΒΕ

Την/ον πρόεδρο του Τμήματος

Στην οικογένεια μου για όλη την στήριξη και την αγάπη τους

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η νόσος του καρκίνου αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα δημόσιας υγείας και παρά την πρόοδο της ιατρικής επιστήμης εξακολουθεί να είναι μία από τις σπουδαιότερες προκλήσεις παγκοσμίως. Η εισαγωγή και η διευρυμένη χρήση της μοριακής διαγνωστικής για την διαχείριση και τον έλεγχο του καρκίνου αποτέλεσε ορόσημο στην αντιμετώπιση αυτής της ασθένειας. Τα τελευταία χρόνια, μία καινοτόμα και εναλλακτική μέθοδος διάγνωσης, η υγρή βιοψία, έφερε επανάσταση στην κλινική ογκολογία μέσω του εύρους εφαρμογών της σε ποικίλους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του πνεύμονα.

Σκοπός της διεκπεραίωσης της διπλωματικής αυτής είναι να διευκρινίσει την έννοια της μοριακής διαγνωστικής, να αναφέρει κάποια ιστορικά και γενικά στοιχεία για την υγρή βιοψία και τον καρκίνο του πνεύμονα και να αναλύσει τον ρόλο αυτής της μεθόδου στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.

Η εργασία ξεκινάει με κάποια γενικά και επιδημιολογικά στοιχεία γύρω από τον καρκίνο καθώς επίσης και με την ανάλυση της χρησιμότητας και των κυριότερων τεχνικών της μοριακής διαγνωστικής. Εν συνεχεία, γίνεται μία προσέγγιση γύρω από την υγρή βιοψία, εστιάζοντας στους βιοδείκτες και στις τεχνικές που την περικλείουν. Στο κύριο μέρος της εργασίας, εισάγεται η έννοια του καρκίνου του πνεύμονα και παρουσιάζονται αναλυτικά οι σχετικές θεραπευτικές επιλογές και οι αξιόπιστοι βιοδείκτες. Τέλος, αναλύεται διεξοδικά ο ρόλος της υγρής βιοψίας σε όλα τα στάδια στον καρκίνο του πνεύμονα, εστιάζοντας στον κύριο ιστολογικό υπότυπό του, τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και επιπλέον γίνεται μία αναφορά στον δευτερεύοντα ιστολογικό υπότυπό του, τον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μαγκλάρια Αγγελική για την επικοινωνία, τον χρόνο και την καθοδήγησή της στην διαδικασία αυτή.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	14
1.2. ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΟΓΚΩΝ.....	16
1.2.1. Η ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	18
1.2.2. Ο ΠΡΟΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ (SCREENING)	18
1.2.3. Η ΔΙΑΓΝΩΣΗ.....	19
1.2.4. Η ΠΡΟΓΝΩΣΗ	20
1.2.5. Η ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΙ Η ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	20
1.3. ΒΑΣΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ	22

2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: Η ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ - ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟ DNA

2.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	25
2.2. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ	25
2.3. ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΥΓΡΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ	31
2.3.1. Ελεύθερο κυκλοφορούν DNA(circulating free DNA-cfDNA) VS Κυκλοφορούν καρκινικό DNA(circulating tumor DNA-ctDNA)	33
2.3.1.1. ΠΡΟΑΝΑΛΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ctDNA-cfDNA.....	37
2.3.1.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΟΥ ctDNA	38
2.3.1.2.1. ΤΕΧΝΙΚΕΣ PCR	39
2.3.1.2.2. ΤΕΧΝΙΚΕΣ NGS.....	45
2.3.2. Ριβονουκλεϊκό οξύ(Ribonucleic acid-RNA)	47
2.3.3. Ογκοεπιμορφωμένα αιμοπετάλια(tumor educated platelets-TEPs).....	49
2.3.4. Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (circulating tumor cells-CTCs).....	51
2.3.5. Εξωκυτταρικά κυστίδια(Extracellular vesicles-EVs)	55

3^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

3.1. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΚΑΙ ΒΑΣΙΚΑ/ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	60
3.2. ΚΥΡΙΕΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΕΠΙΛΟΓΕΣ ΚΑΙ ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	65
3.2.1. ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ	66
3.2.2. ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ.....	67

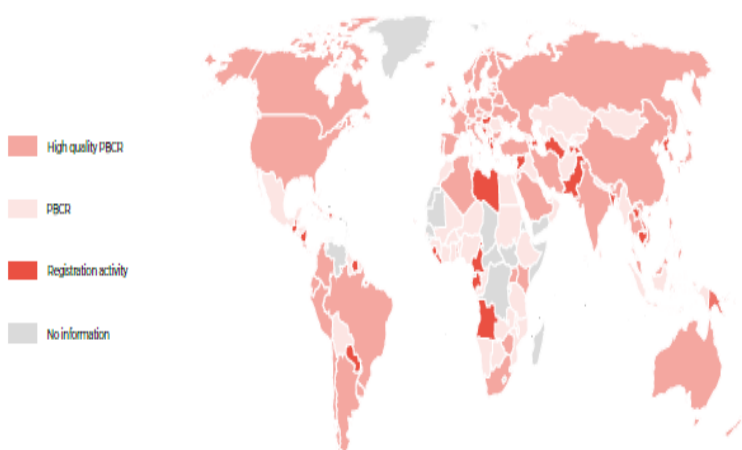
3.3. ΔΕΙΚΤΕΣ ΥΓΡΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ	69
3.3.1. ctDNA.....	75
3.3.1.1. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ EGFR	78
3.3.1.2. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ALK.....	85
3.3.1.3. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ MET	92
3.3.1.4. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ HER2 (ERBB)	93
3.3.1.5. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ KRAS	95
3.3.1.6. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ROS	97
3.3.1.7. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ RET.....	98
3.3.1.8. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ BRAF	99
3.3.1.9. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ PI3Ks.....	100
3.3.1.10. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ NTRK.....	100
3.3.1.11. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ FGFR	101
3.3.1.12. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ DDR2.....	102
3.3.1.13. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ MEK1	102
3.3.2. CTC	103
3.3.2.1. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ EGFR	107
3.3.3. MicroRNA (MiRNA)	109
3.3.4. ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ	111
3.3.5. ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ	113
3.3.6. TAAs και αυτοαντισώματα (TAAbs)	115
3.4. Ο ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ (SCLC).....	117
3.4.1. cfDNA-ctDNA.....	117
3.4.2. CTC	118
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	121
SUMMARY	122
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	124

1^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ : ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

1.1. ΓΕΝΙΚΑ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Παρόλο που οι αρχαίοι Έλληνες χρησιμοποίησαν πρώτοι τον όρο “καρκίνος” για την συγκεκριμένη νόσο, φαίνεται να εντοπίζεται σε ακόμη παλαιότερες χρονικές περιόδους. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν ευρήματα που πιστοποιούν την εμφάνιση οστεοσαρκώματος σε οστά κεφαλής και αυχένα σε μούμιες στην Αρχαία Αίγυπτο. Ο Ιπποκράτης όμως είναι εκείνος που μέσα από τα κείμενα του απέδωσε σε αυτή την νόσο τον όρο “καρκίνος”. Τον 17^ο με 18^ο αιώνα επικρατούσε η άποψη ότι ήταν μια μεταδοτική νόσος. Από τα τέλη του 19^{ου} έως τις αρχές του 20^{ου}, επικρατούσε η πεποίθηση ότι προκαλείται από την επιδείνωση κάποιου τραύματος (Πατελάρου, et al, 2011). Μάλιστα, το 1845 αναφέρεται συστηματικά η πρώτη περίπτωση της νόσου (Shuncong, et al, 2019). Όλους αυτούς τους αιώνες η άποψη ότι ο καρκίνος είναι μία ανίατη ασθένεια ακολουθούσε τις διάφορες θεωρίες και αυτό ήταν που ενίσχυσε τόσο πολύ το αίσθημα του φόβου που επικρατεί στον κοινό νο. Πλέον η επιστήμη έχει απομυθοποιήσει πολλές από αυτές τις αντιλήψεις και έχει κατορθώσει να διαμορφώσει μια πιο σαφή εικόνα τόσο για την φύση της νόσου όσο και για τα αίτια της (Πατελάρου, et al, 2011).

Ως γνωστόν, ο καρκίνος καλύπτει ένα ευρύ φάσμα ασθενειών που χαρακτηρίζονται από ανεξέλεγκτη και ως επί το πλείστον επιθετική ανάπτυξη κυττάρων, η οποία καθοδηγείται είτε από την αρνητική ρύθμιση των γονιδίων που καταστέλλουν τον όγκο είτε από την θετική ρύθμιση των γονιδίων που προάγουν τον όγκο (Shuncong, et al, 2019). Μελέτες έχουν δείξει ότι αυτή η νόσος είναι αποτέλεσμα της έκθεσης του ατόμου σε καρκινογόνους παράγοντες και εξαρτάται άμεσα από κοινωνικοοικονομικούς συντελεστές. Οι συχνότεροι παράγοντες κινδύνου παγκοσμίως με βάση τα πιο πρόσφατα δεδομένα είναι η χρήση καπνού και αλκοόλ, η υποκατανάλωση φρούτων και λαχανικών, η απουσία σωματικής άσκησης, οι κληρονομικές μεταλλάξεις και η έκθεση σε λοιμογόνους-περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως ο ιός ανθρωπίνων θηλωμάτων HPV, ο HIV, η ηπατίτιδα Β και C, οι χημικές ουσίες και η ιονίζουσα ακτινοβολία (Πατελάρου, et al, 2011). Στις μέρες μας, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ο καρκίνος αποτελεί την δεύτερη αιτία θανάτου παγκοσμίως, μετά τα καρδιαγγειακά νοσήματα και μπορεί να εμφανισθεί σε οποιαδήποτε ηλικία (η συχνότητα εμφάνισής του συνήθως αυξάνεται συναρτήσει της ηλικίας) και φύλο (Πατελάρου, et al, 2011).



Εικόνα 1: Παγκόσμιος χάρτης με καταγεγραμμένα πληθυσμιακά μητρώα καρκίνου Η αντιστοιχία τόσο των καταχωρήσεων καρκίνου όσο και των στατιστικών θνησιμότητας είναι περιορισμένη και άνιση. Περίπου μία στις τρεις χώρες έχει δεδομένα υψηλής επίπτωσης (Gelbrand, et al, 2020).

Οι πιο συχνές αιτίες θανάτου παγκοσμίως είναι κατά φθίνουσα σειρά :

- Ο καρκίνος του πνεύμονα
- Ο καρκίνος του στομάχου
- Ο καρκίνος του ήπατος
- Ο καρκίνος του παχέος εντέρου
- Ο καρκίνος του μαστού([Tzoganakos, et al, 2020](#)).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το 70% των θανάτων συμβαίνουν σε χώρες με χαμηλό και μεσαίο εισόδημα, όπως φαίνεται στην Εικ.1 ενώ η κύρια αιτία για το 1/3 αυτών θεωρείται η χρήση προϊόντων καπνού([Πατελάρου, et al, 2011](#)).

Επιπλέον, σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία του Π.Ο.Υ., κάθε χρόνο περίπου 7,6 εκατομμύρια άνθρωποι χάνουν τη ζωή τους από καρκίνο και οι νέες διαγνώσεις παγκοσμίως ανέρχονται περίπου σε 11 εκατομμύρια ετησίως([Tzoganakos, et al, 2020](#)). Πιο συγκεκριμένα, το 2018 καταγράφηκαν 18,1 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις και 10 εκατομμύρια θάνατοι([Gelbrand, et al, 2020](#)). Οι θάνατοι αναμένεται να φθάσουν τα 11 εκατομμύρια ετησίως έως το 2030([Tzoganakos, et al, 2020](#)). Ακόμα, το 2035 ο αριθμός των διαγνώσεων εκτιμάται ότι θα φτάσει τα 24 εκατομμύρια([Van Meter, et al, 2016](#)) και μέχρι το 2040 τα 29-37 αντιστοίχως([Gelbrand, et al, 2020](#)). Τέλος, υπολογίζεται ότι ένας στους πέντε ανθρώπους θα εμφανίσουν κάποιο τύπο καρκίνου πριν την ηλικία των 75 ετών ([Gelbrand, et al, 2020](#)).

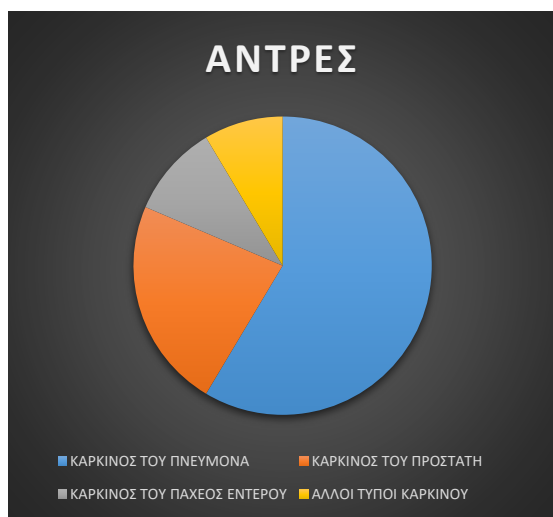
Ενδεικτικά, στον Πιν.1 αναφέρονται παραδείγματα χωρών με τις διαγνώσεις καρκίνου και τους αντίστοιχους θανάτους σε διαφορετικές χρονικές περιόδους :

Πίνακας 1: Περιστατικά και θάνατοι καρκίνου ανά χώρα

ΧΩΡΑ	ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΑ	ΘΑΝΑΤΟΙ
ΚΙΝΑ (2015) (Shuncong, et al, 2019)	4.292.000	2.814.000
ΗΠΑ (2016) (Chen, et al, 2018)	1.685.210	595.690
ΗΠΑ (2018) (De Rubis, et al, 2019)	1.735.350	609.640
ΗΠΑ (2019) (Shuncong, et al, 2019)	1.762.450	606.880
ΕΥΡΩΠΗ (/ΕΤΟΣ) (Tzoganakos, et al, 2020)	3,2.000.000	1.000.000

Στην Ελλάδα, το 1988 ιδρύεται το Ελληνικό Αρχείο Νεοπλασιών (EAN) με σκοπό τη μελέτη και τον έλεγχο του καρκίνου([Παπαδάκου, 2017](#)). Σύμφωνα με τα στοιχεία του Ο.Ο.Σ.Α. (Οργανισμός Οικονομικής Προστασίας και Ανάπτυξης), η θνησιμότητα από την νόσο στην χώρα μας παραμένει γενικά χαμηλότερη απ' ότι στις υπόλοιπες ανεπτυγμένες χώρες. Συγκεκριμένα, μεταξύ των 34 χωρών μελών του Ο.Ο.Σ.Α, η Ελλάδα κατατασσόταν το 2004 στη 19η θέση ως προς τη θνησιμότητα στους άνδρες και στην 23η στις γυναίκες. Όμως, η ευνοϊκή θέση της χώρας είναι σε κάποιο βαθμό πλασματική λόγω ελλείψεων στη διάγνωση, σφαλμάτων στην ταξινόμηση και κυρίως λόγω της έλλειψης του εθνικού αρχείου νεοπλασιών([Tzoganakos, et al, 2020](#)).

Στα Σχ.1, Σχ.2 φαίνονται οι κυριότερες αιτίες θανάτου στα δύο φύλα, όπως αυτές καταγράφηκαν([Tzoganakos, et al, 2020](#)) :



Σχήμα 1: Κύριες αιτίες θανάτου από καρκίνο στους άνδρες Η κυριότερη αιτία θανάτου από καρκίνο στους άνδρες είναι ο καρκίνος του πνεύμονα και ακολουθούν ο καρκίνος του προστάτη και του παχέος εντέρου, οι οποίοι παρουσιάζουν σταθερά αυξητικές τάσεις και άλλοι με μικρότερη επίπτωση ([Tzoganakos, et al, 2020](#)).

Σχήμα 2: Κύριες αιτίες θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες Η κυριότερη αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες είναι ο καρκίνος του πνεύμονα και ακολουθούν ο καρκίνος του μαστού και του παχέος εντέρου και άλλοι, με μικρότερη θνησιμότητα ([Tzoganakos, et al, 2020](#)).

Τέλος, από αρκετές μελέτες φαίνεται ότι η θνησιμότητα στην χώρα μας διαφοροποιείται και μεταξύ των γεωγραφικών διαμερισμάτων ([Tzoganakos, et al, 2020](#)), καθώς για τα πιο συχνά νεοπλασμάτα παρατηρείται υψηλότερη συχνότητα στο Βορρά σε σχέση με το Νότο ([BeStrong, 2014](#)).

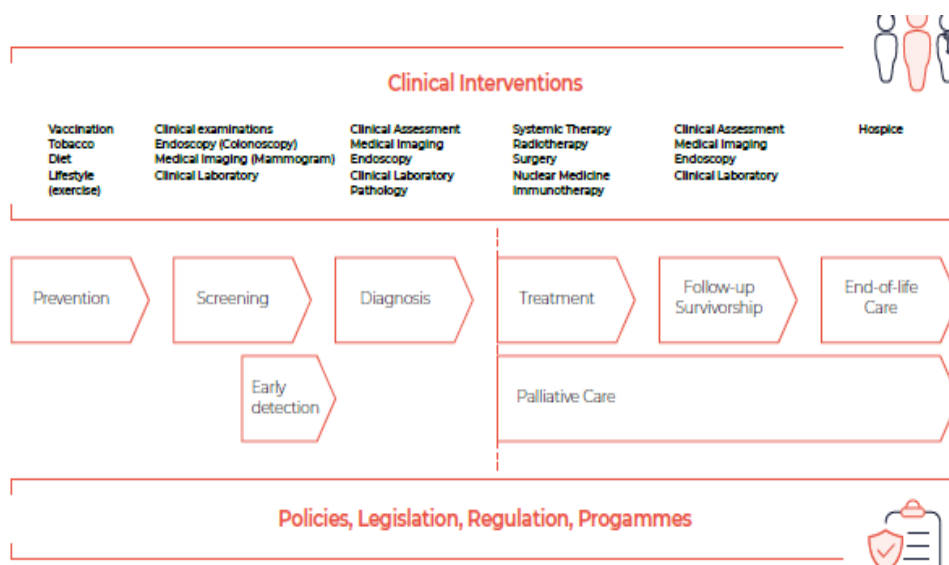
Παρόλο αυτά, τα τελευταία χρόνια έχει επιτευχθεί παράταση της επιβίωσης για πολλούς τύπους καρκίνου, όπως για τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC), το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HCC), τον καρκίνο του μαστού και το πολλαπλό μυέλωμα. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε βελτίωση επιβίωσης τις τελευταίες τέσσερις δεκαετίες σε στερεές κακοήθειες όπως το σάρκωμα και ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (SCLC) ([Shuncong, et al, 2019](#)). Συνολικά, η 5ετής επιβίωση παγκοσμίως υπολογίζεται ότι κυμαίνεται μεταξύ 30 και 60%, όμως το ποσοστό αυτό διαφέρει σημαντικά όχι μόνο από χώρα σε χώρα και από πόλη σε πόλη, αλλά και από νοσοκομείο σε νοσοκομείο μέσα στην ίδια πόλη ([BeStrong, 2014](#)).

1.2. ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΟΓΚΩΝ

Έτσι, τις τελευταίες δεκαετίες καθώς δεν έχει επιτευχθεί πλήρης θεραπεία του καρκίνου ([Shuncong, et al, 2019](#)), ο έλεγχος και η καταπολέμησή του αφορά τόσο τις αναπτυσσόμενες όσο και τις αναπτυγμένες χώρες. Πρωταρχικοί στόχοι στον διεθνή αγώνα κατά του καρκίνου αποτελούν η μείωση της νοσηρότητας και της θνησιμότητας ασθενών, η εξάλειψη της ανεπαρκούς θεραπείας, η έγκαιρη εφαρμογή κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής, η ελάττωση του κόστους της υγειονομικής περίθαλψη, καθώς και η βελτίωση της

ποιότητας ζωής των καρκινοπαθών. Απαραίτητες προϋποθέσεις για την υλοποίηση αυτών των στόχων είναι η συστηματική εφαρμογή παρεμβάσεων προγραμμάτων πρόληψης, η έγκαιρη διάγνωση, η θεραπεία και η παρηγορητική φροντίδα ([Πατελάρου, et al, 2011](#)). Συνοπτικά θα αναφερθούμε στην :

- **Πρωτογενής πρόληψη**, η οποία αφορά την ενημέρωση και την ευαισθητοποίηση των πολιτών και την γνώση αυτών όσον αφορά τους παράγοντες κινδύνου, με απώτερο σκοπό την υιοθέτηση ενός υγιεινότερου τρόπου ζωής ([Ζαφράκας, et al, 2009](#)), καθώς επίσης και τον εμβολιασμό υγιών ατόμων ([Ελληνική Μαιευτική και Γυναικολογική Εταιρεία, 2014](#)).
- **Δευτερογενής πρόληψη**, η οποία αναφέρεται στον μαζικό προσυμπτωματικό έλεγχο και αντίστοιχα στην προτροπή του πληθυσμού για συμμετοχή σε αυτόν, μέσω κατάλληλης πληροφόρησης αλλά και εξασφάλισης εύκολης πρόσβασης. Επίσης, αφορά την πρώιμη διάγνωση προκαρκινικών καταστάσεων αλλά και την ανίχνευση του καρκίνου σε αρχικά στάδια ([Ζαφράκας, et al, 2009](#)). Επιπλέον, σχετίζεται με διαγνωστικές και επεμβατικές ενέργειες για την επιβράδυνση ή την διακοπή εξέλιξης μίας νόσου μετά την έγκαιρη διάγνωσή της κατά τα αρχικά στάδια ([Ελληνική Μαιευτική και Γυναικολογική Εταιρεία, 2014](#)).
- **Τριτογενής πρόληψη**, η οποία αναφέρεται στην πρώιμη και έγκαιρη διάγνωση υποτροπών της νόσου μετά την αρχική διάγνωση, αλλά και στην θεραπεία στο πλαίσιο της μετέπειτα παρακολούθησης ([Ζαφράκας, et al, 2009](#)).



Εικόνα 2: Οι κλινικές παρεμβάσεις κατά τη διάρκεια της διαχείρισης του καρκίνου και παραδείγματα επιπέδων φροντίδας Μπορεί να χρησιμοποιηθεί η πρόγνωση, ο προσυμπτωματικός έλεγχος και η διάγνωση τόσο για να ανιχνευθούν έγκαιρα οι προκαρκινικές ή πρώιμες, προκλινικές βλάβες σε φαινομενικά υγιείς ανθρώπους χωρίς συμπτώματα όσο και για να γίνει κατάλληλη, έγκαιρη διάγνωση σε άτομα με συμπτώματα και σημάδια ασθένειας. Η θεραπεία, η παρακολούθηση μετά το πέρας της θεραπείας για κίνδυνο υποτροπής και η καθολική φροντίδα του ασθενούς συνδέονται άμεσα με την εξασφάλιση καλύτερης και ποιοτικότερης ζωής των καρκινοπαθών ([Gelbrand, et al, 2020](#)).

Επιπροσθέτως, κρίνεται απαραίτητη η αξιοποίηση της βιοιατρικής τεχνολογίας ([Πατελάρου, et al, 2011](#)). Αυτό έγινε σε αρκετά σημαντικό βαθμό μέσω μιας πολλά υποσχόμενης μεθόδου και ορόσημο για την σημερινή εποχή, της μοριακής διαγνωστικής. Η πρόοδος στην μοριακή

διαγνωστική, βρίσκεται στην καρδιά της υγειονομικής περίθαλψης([Van Meter, et al, 2016](#)). Με τον όρο αυτό εννοούμε την εφαρμογή των τεχνικών της μοριακής βιολογίας στην ανάλυση βιολογικών δεικτών στο ανθρώπινο γονιδίωμα(genome) και στο πρωτέωμα (proteome). Οι κυριότεροι στόχοι της μοριακής ανάλυσης, όπως φαίνονται στην Εικ.2, είναι:

1.2.1. Η ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Ποικίλα διαγνωστικά τεστ χρησιμοποιούνται για την αναζήτηση βιοδεικτών που υποδηλώνουν υψηλό ρίσκο κινδύνου εμφάνισης ενός καρκίνου. Για παράδειγμα, οι γυναίκες που εμφανίζουν γονιδιακές παραλλαγές στα γονίδια BRAC1 ή BRAC2 έχουν πάνω από 85% πιθανότητα να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού καθόλη την διάρκεια της ζωής τους, συγκριτικά με ένα 13% αντίστοιχο ποσοστό γυναικών οι οποίες δεν φέρουν τις συγκεκριμένες παραλλαγές. Αυτή η πιθανότητα αυξάνεται ακόμα περισσότερο σε γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό κακοήθειας. Επομένως, μία γυναίκα μπορεί να ελεγχθεί διαγνωστικά για τις αντίστοιχες μεταλλάξεις γονιδίων και εάν είναι θετική να επιλέξει την καταλληλή μορφή θεραπείας. Μία εξ αυτών και η συχνότερη είναι η προγραμματισμένη μαστογραφία έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος εμφάνισης του αντίστοιχου καρκίνου([Van Meter, et al, 2016](#)).

1.2.2. Ο ΠΡΟΣΥΜΠΤΩΜΑΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ (SCREENING)

Ο προσυμπτωματικός έλεγχος είναι ο έλεγχος για προκαρκινικές ή προκλινικές βλάβες σε φαινομενικά υγιείς ανθρώπους χωρίς συμπτώματα ([Gelbrand, et al, 2020](#)). Συνήθως συνίσταται σε ασθενείς που έχουν υψηλό κίνδυνο εμφάνισης ενός συγκεκριμένου καρκίνου ή σε καρκινοπαθείς για να ανιχνευθεί η ασθένεια όσο το δυνατόν νωρίτερα ([Van Meter, et al, 2016](#)) και να προταθούν αμέσως για τη διάγνωση και τη θεραπεία. Τα προγράμματα προληπτικού ελέγχου είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά για τους κοινούς τύπους καρκίνου([Tzoganakos, et al, 2020](#)). Ο προσυμπτωματικός έλεγχος ή αλλιώς το λεγόμενο screening είναι εύκολος στην διαχείριση, ασφαλής, προσιτός, είναι ένα αποδεκτό τεστ για ταχεία ανατροπή των αποτελεσμάτων, και ακόμα πολύ ακριβής, έχει δηλαδή υψηλή ευαισθησία για την ελαχιστοποίηση των μη διαγνωσμένων καρκίνων και υψηλή ειδικότητα για την αποφυγή των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Επιπλέον, έχει υψηλή θετική προγνωστική αξία, επειδή ο επιπολασμός της νόσου είναι αρκετά υψηλός και αναπαραγωγίμα αποτελέσματα, κάτι το οποίο σημαίνει ότι η ερμηνεία του τεστ είναι πιο πολύ αντικειμενική παρά υποκειμενική ([Gelbrand, et al, 2020](#)).

Ωστόσο, υπάρχει πολύ μεγάλη πιθανότητα σφάλματος που μπορεί να προέρχεται από τον ανεπαρκή έλεγχο και περιλαμβάνει ψευδώς θετικά και ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα δοκιμών, υπερδιάγνωση και, σε σπάνιες περιπτώσεις, σημαντικό τραυματισμό ή θάνατο που σχετίζεται με την εξέταση ή τη διάγνωση. Τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα απαιτούν επιβεβαίωση με πρόσθετα διαγνωστικά τεστ και αυξάνουν το περιττό άγχος στους συμμετέχοντες, ενώ στα ψευδώς αρνητικά τεστ τα αποτελέσματα μπορεί να καθυσυχάσουν άτομα που έχουν πραγματικά την ασθένεια και να καθυστερήσει η έγκαιρη διάγνωση και η άμεση θεραπεία. Η υπερδιάγνωση είναι η ανίχνευση ενός καρκίνου που μπορεί να μην έχει γίνει κλινικά εμφανής κατά τη διάρκεια της ζωής του ατόμου και είναι αρνητική συνέπεια του ελέγχου, καθώς οδηγεί σε περιττή διάγνωση και θεραπεία. Η υπερδιάγνωση είναι δύσκολο να μετρηθεί. Παρόλα αυτά, όλα τα πιθανά σφάλματα μπορεί να μειωθούν με τη στόχευση των καταλληλότερων ηλικιακών ομάδων και την ολοένα και καλύτερη κατανόηση των μη επιθετικών μορφών του καρκίνου ([Gelbrand, et al, 2020](#)).

Ένα κοινό παράδειγμα προσυμπτωματικού ελέγχου είναι ο εμβολιασμός για τον ιό ανθρώπινων θηλωμάτων HPV και συγκεκριμένα για τους υπότυπους HPV₁₆ και HPV₁₈, ο οποίος σχετίζεται έντονα με τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας(Tzoganakos, et al, 2020). Παλαιότερα, η ανίχνευση αυτού γινόταν μέσω τεστ Παπανικολάου(τεστ ΠΑΠ). Πλέον, υπάρχουν οι αντίστοιχες μοριακές μέθοδοι οι οποίες ανιχνεύουν τους υπότυπους του HPV και καθώς αυτοί ενέχουν υψηλότερο κίνδυνο για μελλοντικές κυτταρικές ανωμαλίες(Van Meter, et al, 2016), όπως η επίμονη λοίμωξη του γεννητικού συστήματος(Tzoganakos, et al, 2020), σηματοδοτείται η έναρξη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας(Van Meter, et al, 2016). Στην Ευρώπη έχουν εγκριθεί δύο προληπτικά εμβόλια κατά του HPV. Η χρήση αυτών συνίσταται σε όλα τα κορίτσια ηλικίας 12 έως 15 ετών(Tzoganakos, et al, 2020).

Ένα επιπλέον παράδειγμα είναι ο εμβολιασμός για την ηπατίτιδα Β(HBV) και την ηπατίτιδα C(HCV), οι οποίες προκαλούν χρόνια λοίμωξη και συνδέονται άμεσα με τον καρκίνο του ήπατος. Εδώ και μια εικοσαετία υπάρχει αποτελεσματικό εμβόλιο κατά του HBV, αλλά τα ποσοστά κάλυψης από το εμβόλιο αυτό ποικίλλουν από χώρα σε χώρα. Δεδομένου ότι ο εκλεκτικός εμβολιασμός μόνο των ομάδων υψηλού κινδύνου δεν φαίνεται να αποδίδει, απαιτείται καθολικός εμβολιασμός όλων των παιδιών έναντι του HBV(Tzoganakos, et al, 2020). Για παράδειγμα, σε ιδιαίτερα ενδημικές χώρες όπως η Κίνα, υπάρχουν προγράμματα εμβολιασμού για την ηπατίτιδα Β κατά τη γέννηση, τα οποία έχουν μειώσει σημαντικά την επίπτωση πρωτοπαθούς καρκίνου του ήπατος(Gelbrand, et al, 2020).

1.2.3. Η ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Ο σκοπός της διάγνωσης είναι να αναζητήσει άμεσα ή έμμεσα στοιχεία για την σωματική μετάλλαξη των μοριακών όγκων, ιδανικά νωρίτερα από την μετατροπή καλοήθειας σε κακοήθεια(Murray, 2011). Επίσης μετρώνται η παρουσία, τα επίπεδα, οι δραστηριότητες συγκεκριμένων πρωτεϊνών ή γονιδίων(Van Meter, et al, 2016) που προκύπτουν από την πρωτογενή θέση του όγκου(Murray, 2011) και βρίσκονται στους ιστούς, στο αίμα ή σε άλλα σωματικά υγρά για να εντοπιστεί ο καρκίνος και ο υπότυπος(Van Meter, et al, 2016). Ωστόσο, δεν είναι σαφές σε ποιο στάδιο ανάπτυξης ενός πρωτογενούς συμπαγούς όγκου αυτοί οι βιοδείκτες θα γίνουν ανιχνεύσιμοι σε αυτά τα υγρά(Murray, 2011). Για παράδειγμα, υπάρχουν πολλοί υπότυποι λευχαιμίας με μοναδικούς συνδυασμούς βιοδεικτών(Van Meter, et al, 2016) οι οποίοι όμως δεν είναι ανιχνεύσιμοι σε κάθε στάδιο ανάπτυξης ενός όγκου και είναι απαραίτητο να έχουν κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά(Murray, 2011). Έτσι, εξετάζοντας τις γονιδιωματικές μεταλλάξεις και ταυτοποιώντας το σωστό υπότυπο, η διάγνωση θα καθοδηγήσει την σωστή θεραπευτική επιλογή για έναν συγκεκριμένο ασθενή(Van Meter, et al, 2016).

Η έγκαιρη διάγνωση του διηθητικού καρκίνου σε άτομα με συμπτώματα και σημάδια ασθένειας είναι απαραίτητη, καθώς ο μέσος χρόνος που απαιτείται για να επωφεληθεί ένα άτομο από τον έλεγχο των καρκινικών γενετικών μεταλλάξεων φαίνεται ότι μπορεί να ξεπερνάει τα 10 έτη, ενώ η πρώιμη διάγνωση μπορεί να έχει άμεσο αντίκτυπο. Η διάγνωση είναι πιο εφικτή από τον προσυμπτωματικό έλεγχο, εκτός από τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας που τόσο η έγκαιρη διάγνωση όσο και η διαλογή είναι αναγκαίες. Επιπλέον, καρκίνοι οι οποίοι διαγιγνώσκονται σε μικρή ηλικία (<5 ετών) οφείλονται πιθανότατα σε γενετικές μεταλλάξεις οι οποίες είτε κληρονομήθηκαν είτε έλαβαν χώρα στην ενδομήτρια ζωή(Παπαδάκου, 2017). Η μείωση της εμφάνισης καρκίνου που παρατηρείται μετά την ηλικία των 84 ετών, πιθανότατα οφείλεται, στην πλημμελή διερεύνηση για διάγνωση που γίνεται στα άτομα αυτής της ηλικίας(Παπαδάκου, 2017).

Ένα κοινό παράδειγμα είναι η μαστογραφία, η οποία συνδέεται όπως ήδη αναφέρθηκε με τον καρκίνο του μαστού. Η μαστογραφία μπορεί να ανιχνεύσει τυχόν αλλοιώσεις στο μαστό προτού ακόμη αναπτυχθεί όγκος που μπορεί να ανιχνευθεί με ψηλάφηση και είναι εξαιρετικά αποτελεσματική στην πρόληψη του καρκίνου του μαστού. Η εξέταση πρέπει να γίνεται τακτικά μετά την ηλικία των 50 ετών, ενώ σε γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό ή άλλους παράγοντες κινδύνου για καρκίνο του μαστού, ο τακτικός έλεγχος με μαστογραφία πρέπει να ξεκινά νωρίτερα ([Tzoganakos, et al, 2020](#)).

Ένα ακόμα κοινότυπο παράδειγμα είναι η εξέταση PSA, η οποία ανιχνεύει τον καρκίνο του προστάτη. Δεν υπάρχουν συστάσεις για καθολική χρήση του τεστ, αλλά το τεστ PSA συνίσταται στους άνδρες με παράγοντες κινδύνου για καρκίνο του προστάτη μετά την ηλικία των 50 ετών ([Tzoganakos, et al, 2020](#)).

Τέλος, η εξέταση για καρκίνο του παχέος εντέρου και του ορθού (ορθοκολικός καρκίνος) συνίσταται και στα δύο φύλα στις αναπτυγμένες χώρες. Ο κίνδυνος αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας. Η προληπτική εξέταση μπορεί να οδηγήσει σε έγκαιρη ανίχνευση τυχόν πολυπόδων και στην αφαίρεσή τους πριν αυτοί καταστούν κακοήθεις, καθώς και στην ανίχνευση τυχόν νεοπλασμάτων σε πρώιμο στάδιο. Όλοι οι άνδρες και οι γυναίκες άνω των 50 ετών θα πρέπει να υποβάλλονται σε προληπτική εξέταση ([Tzoganakos, et al, 2020](#)).

1.2.4. Η ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Η αξία των πιο ευαίσθητων και ισχυρών διαγνωστικών τεστ, ικανών να ανιχνεύσουν προκακοήθεις βλάβες ή καρκίνους σε όλο και πιο πρώιμο στάδιο είναι σαφής. Ωστόσο, δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα για έγκαιρη ανίχνευση και για θεραπεία. Μόλις διαγνωστεί η ασθένεια και καθοριστεί το στάδιο της νόσου, γίνεται η πρόγνωση χωρίς περαιτέρω μοριακές εξετάσεις. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχει μεγάλη σαφήνεια σχετικά με την φύση ή την ένταση της ασθένειας ([Murray, 2011](#)). Τα προγνωστικά τεστ χρησιμοποιούνται κυρίως για την εκτίμηση της σοβαρότητας της νόσου και τον κίνδυνο υποτροπής. Αυτό έχει ως άμεσο αποτέλεσμα την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας, παραδείγματος χάριν πόσο επιθετική πρέπει να είναι σε ιδιαίτερα αυξημένο κίνδυνο επανάληψης, αποτρέποντας αυτή την επανάληψη ([Van Meter, et al, 2016](#)).

Το τεστ OncotypeDxTM αποτελεί ένα ευρέως διαδεδομένο παράδειγμα. Συγκεκριμένα, βασιζόμενο στην ανάλυση της έκφρασης 21 γονιδίων, ποσοτικοποιεί την πιθανότητα επανεμφάνισης της νόσου σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού όταν είναι θετικό σε ορμονικούς υποδοχείς πρώιμου σταδίου. Αυτή η δοκιμή εκτός από την παροχή εξατομικευμένης πιθανότητας υποτροπής της νόσου, έχει επίσης αποδειχθεί ότι είναι χρήσιμη για την εκτίμηση του πιθανού όφελους της χημειοθεραπείας, κάτι το οποίο εκτός από προγνωστική έχει και αξία πρόβλεψης ([Murray, 2011](#)).

1.2.5. Η ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΙ Η ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΤΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Η θεραπεία αναφέρεται στην εξάλειψη μιας ασθένειας ή κατάστασης χωρίς υποτροπή. Ωστόσο, η υποτροπιάζουσα φύση (μέσα σε μήνες ή χρόνια) μετά την ύφεση κάνει τον παραδοσιακό ορισμό της θεραπείας ανέφικτο και σπάνια αναφέρεται στην ογκολογία ([Shuncong, et al, 2019](#)). Η θεραπεία του καρκίνου συνεπάγεται όχι μόνο αριθμητικά μεγάλο χρόνο επιβίωσης, αλλά και ίσο προσδόκιμο ζωής μεταξύ των ασθενών που αντιμετωπίζονται σωστά και των αντίστοιχων ατόμων χωρίς καρκίνο. Ένα εύλογο και

εμπειρικό κριτήριο για την ανθεκτικότητα είναι η διατήρηση της επιβίωσης χωρίς υποτροπή για περισσότερο από 10 χρόνια μετά από αποτελεσματικές θεραπείες. Ωστόσο, μία ευρέως αποδεκτή έννοια για τη θεραπεία του καρκίνου στην κλινική αναφέρεται στη διατήρηση της πλήρους ύφεσης για πέντε έτη([Shuncong, et al, 2019](#)).

Έτσι, η θεραπεία του καρκίνου αποσκοπεί στην αφαίρεση ή την εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων, την παράταση του προσδόκιμου ζωής και τη βελτίωση της ποιότητας ζωής των πασχόντων. Οι κύριες μέθοδοι θεραπείας είναι η χειρουργική επέμβαση, η ακτινοθεραπεία και η χημειοθεραπεία, ενώ ταχεία είναι η ανάπτυξη καινοτόμων, στοχευμένων θεραπειών, όπως οι βιολογικές θεραπείες(μονοκλωνικά αντισώματα), οι αντι-αγγειογενετικές θεραπείες, η γονιδιακή θεραπεία([Tzoganakos, et al, 2020](#)) και η ανοσοθεραπεία. Ωστόσο, η θεραπεία με θεραπευτική πρόθεση με αυτές τις μεθόδους είναι κυρίως επιλέξιμη για ασθενείς με εντοπισμένη νόσο ή με ευαίσθητων στη θεραπεία καρκίνων και ως εκ τούτου η συμβολή τους στην θεραπευτικότητα της νόσου είναι σχετικά περιορισμένη([Shuncong, et al, 2019](#)). Αντιθέτως, στην εξατομικευμένη(στοχευμένη) ιατρική ουσιαστικά αντί να αντιμετωπίζεται κάθε άτομο με καρκίνο με τον ίδιο τρόπο, γίνεται εξατομίκευση των δοκιμών και θεραπειών σε κάθε κρίσιμο για τον ασθενή στάδιο. Έτσι, με την αναδρομική ανάλυση ασθενών των οποίων η ασθένεια έχει διαγνωστεί και αντιμετωπιστεί στο παρελθόν, πιο ενημερωμένες και ακριβείς προβλέψεις μπορούν πλέον να γίνουν για την παρακολούθηση της πορείας της νόσου και την πιθανή ανταπόκριση ενός διαγνωσθέντος ασθενούς στο φάρμακο ή στην θεραπεία([Murray, 2011](#)). Οι επιλεγμένες νέες θεραπείες για τον καρκίνο βελτιώνουν σημαντικά το προσδόκιμο και την ποιότητα ζωής, αλλά πολλές καινοτόμες θεραπείες παρέχουν μόνο μέτρια οφέλη([Gelbrand, et al, 2020](#)).

Επιπροσθέτως, υπάρχουν σημαντικά προβλήματα: πρώτον, το κόστος της στοχευμένης θεραπείας είναι εξαιρετικά ογκώδες σε ορισμένες περιπτώσεις. Για παράδειγμα, σύμφωνα με την ΠΟΥ EML το κόστος για καρκίνο του μαστού θετικού HER2 πρώιμου σταδίου, θα αντιπροσώπευε περίπου 10 χρόνια μέσου ετήσιου μισθού στην Ινδία και τη Νότια Αφρική και αντίστοιχα 1,7 χρόνια στις ΗΠΑ. Η ακτινοθεραπεία απαιτεί την απαραίτητη υποδομή, συνήθης συντήρηση, βιώσιμη χρηματοδότηση και κατάλληλα εκπαιδευμένο εργατικό δυναμικό([Gelbrand, et al, 2020](#)). Επιπλέον, το κόστος για την λήψη ενός καινούριου αντικαρκινικού παράγοντα (από την ανακάλυψη έως την αδειοδότηση) είναι υπερβολικά αυξημένο(εκτιμάται ότι υπερβαίνει το 1 δις σήμερα). Ακόμα, το ποσοστό φθοράς για την λήψη αυτών των φαρμάκων στην αδειοδότηση, συχνά αποτυγχάνοντας από την Φάση 2 στην Φάση 3, είναι υπερβολικά υψηλό. Παρόλα αυτά, για να αντιμετωπιστεί αυτή η κατάσταση βρέθηκαν νέοι μοριακοί βιοδείκτες, καθώς επίσης και πρωτεομικά και γονιδιωματικά μονοπάτια για διαγνωστικούς, προγνωστικούς και προβλεπτικούς σκοπούς καθώς και για τον διαχωρισμό ασθενών και για την διάσωση των αποτυχημένων θεραπευτικών παραγόντων([Murray, 2011](#)).

Ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα είναι το KRAS τεστ, στο οποίο γίνεται έλεγχος για τον εντοπισμό μεταλλάξεων του γονιδίου αυτού οι οποίες βρίσκονται σε παγκρετικό καρκίνο, καρκίνο παχέος εντέρου, πνεύμονα και άλλων. Το 40% των ασθενών με KRAS μετάλλαξη παχέος εντέρου δεν ανταποκρίνεται με θεραπεία αντι-EGFR. Αυτά τα φάρμακα συνήθως προτείνονται για ασθενείς με φυσιολογικό μη μεταλλαγμένο KRAS γονίδιο([Van Meter, et al, 2016](#)).

Ένα ακόμα παράδειγμα διαγνωστικού τεστ για να καθοδηγήσει την επιλογή θεραπείας είναι το γονίδιο BRAF στο μελάνωμα. Το φάρμακο βεμουραφενίμη λειτουργεί μόνο για ασθενείς που έχουν θετικό αποτέλεσμα για την μετάλλαξη V600E BRAF, οπότε η εξέταση της

συγκεκριμένης μετάλλαξης πριν την επιλογή φαρμάκου είναι απαραίτητη ([Van Meter, et al, 2016](#)).

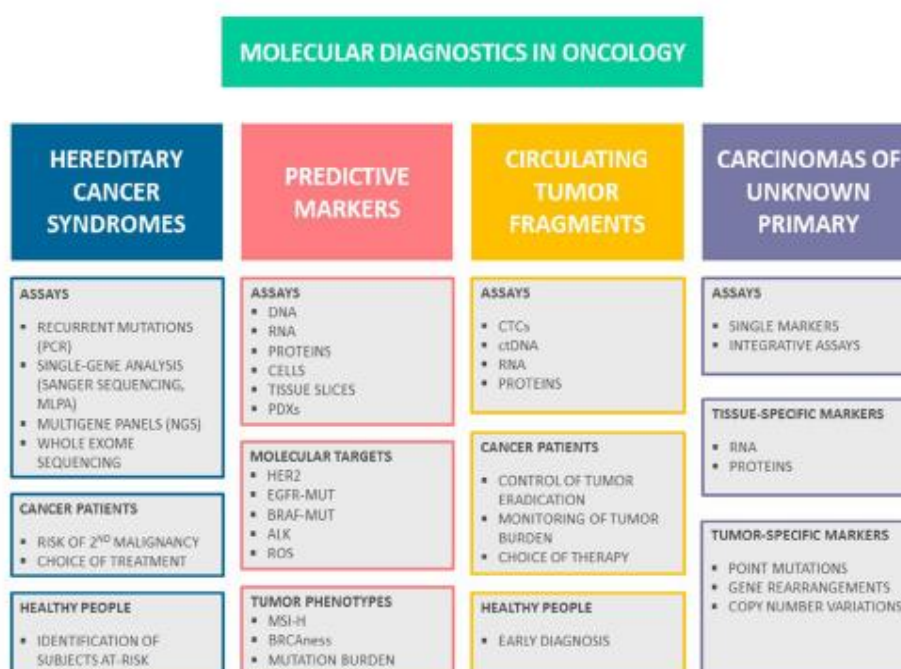
Τέλος, για ασθενείς με χρόνια μυελογενή λευχαιμία, ένας τύπος καρκίνου του αίματος, οι γιατροί μπορούν να κάνουν ανάλυση μετάλλαξης, η οποία αναζητά νέες μεταλλάξεις στο γονίδιο BCR-ABL κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Αυτή η δοκιμή μπορεί να γίνει πολλές φορές καθώς η θεραπεία εξελίσσεται για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας για να αποφασιστεί εάν η θεραπεία θα πρέπει να τροποποιηθεί ανάλογα ή όχι ([Van Meter, et al, 2016](#)).

1.3. ΒΑΣΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ

Οι επενδύσεις του NCI (Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου) στην έρευνα για τη γονιδιωματική του καρκίνου μετέβαλαν την κατανόηση των ανθρώπων για αυτή την νόσο, προώθησαν τη διεξαγωγή κλινικών εξετάσεων, ελέγχοντας την αποτελεσματικότητα των θεραπειών κατά του καρκίνου και άλλαξαν τον τρόπο με τον οποίο οι ογκολόγοι επέλεγαν την εκάστοτε θεραπεία για τους ασθενείς. Αυτές οι επενδύσεις παρήγαγαν πολύτιμους πόρους όπως το The Cancer Genome Atlas (TCGA), το οποίο είναι ένας διαθέσιμος στο κοινό κατάλογος πληροφοριών για τα γονιδιώματα του καρκίνου που καλύπτουν περισσότερους από 30 τύπους καρκίνου. Με τη βοήθεια αυτής της γνώσης και των εξελίξεων στην τεχνολογία γονιδιωματικής αλληλούχησης, οι ογκολόγοι χρησιμοποίησαν όλο και περισσότερο θεραπείες με βάση συγκεκριμένες γενωμικές ανωμαλίες που εντοπίζονται στον όγκο ενός ασθενούς. Αυτές οι γονιδιωματικές πληροφορίες προέρχονταν συχνά από ένα μοριακό διαγνωστικό τεστ ([National Cancer Institute, 2020](#)). Έτσι πλέον, η μοριακή διαγνωστική είναι μέρος της εργαστηριακής ιατρικής και βασίζεται στην ανίχνευση μεμονωμένων βιολογικών μορίων ([Sokolenko, et al, 2018](#)) ή βιοδεικτών, σε δείγματα ιστού και υγρών ενός ασθενούς ([National Cancer Institute, 2020](#)).

Η εμφάνιση των πρακτικών εφαρμογών της μοριακής ογκολογίας αποδόθηκε σε μεγάλο βαθμό στην ανάπτυξη φιλικών προς το χρήστη μεθόδων μοριακής ανάλυσης. Η εφεύρεση της PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) οδήγησε σε τεράστια πρόοδο στον κλινικό έλεγχο του DNA: οι τεχνικές που βασίζονται σε PCR απαιτούν σχετικά απλή οργάνωση και υποδομή, χρησιμοποιούν ελάχιστες ποσότητες βιολογικού υλικού και είναι εξαιρετικά συμβατές με την κλινική ρουτίνα. Η ανάπτυξη της ανοσοϊστοχημείας (IHC), δηλαδή, η μέθοδος που επιτρέπει την οπτικοποίηση συγκεκριμένου αντιγόνου μέσα στον ιστό, χρονολογείται από τα μέσα του 20^{ου} αιώνα. Η IHC προσαρμόστηκε για τον κλινικό προσδιορισμό του επιπέδου έκφρασης του υποδοχέα οιστρογόνων (ER) πριν από τριάντα χρόνια. Αυτό ήταν μια πραγματικά ιστορική πρόοδος στην εξατομικευμένη ογκολογία, καθώς άλλαξε την ιατρική στάση απέναντι στην πιο κοινή ογκολογική ασθένεια, δηλαδή τον καρκίνο του μαστού (BC), προσαρμόζοντας την ενδοκρινική θεραπεία σε εργαστηριακή δοκιμή. Προς το παρόν, μερικές συμβατικές δοκιμασίες στοχευμένης πρωτεΐνης, π.χ. IHC ή ο προσδιορισμός των ειδικών όγκων δεικτών ορού (PSA, CA-125, κ.λπ.), σπάνια συζητώνται στο πλαίσιο των μοριακών διαγνωστικών. Ο τελευταίος όρος εφαρμόζεται συνήθως σε προσδιορισμούς που βασίζονται σε DNA ή RNA καθώς επίσης και σε ορισμένες σύγχρονες εξελιγμένες πρωτεϊνικές τεχνολογίες ([Sokolenko, et al, 2018](#)).

Υπάρχουν δύο δρόμοι όπου οι μοριακές δοκιμές έχουν γίνει μέρος της τυπικής διαχείρισης ασθενών. Πρώτον, η αναγνώριση των ατόμων με κληρονομικό σύνδρομο καρκίνου είναι πλέον καθημερινή πρακτική στην κλινική ογκολογία. Δεύτερον, υπάρχει ένας αριθμός δοκιμών, οι οποίες βοηθούν στην επιλογή της πιο αποτελεσματικής θεραπείας με βάση τα μοριακά χαρακτηριστικά των ιστών του όγκου ή κάποιες άλλες βιολογικές παραμέτρους κακοήθους νόσου. Υπάρχουν μερικές επιπλέον εφαρμογές, οι οποίες παραμένουν στο στάδιο της ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, μερικές από τις σύγχρονες τεχνικές προσανατολισμένες σε μόρια ουσιαστικά δεν έχουν όριο ευαισθησίας, επομένως υπάρχουν εντατικές προσπάθειες για την εφαρμογή αυτών των δοκιμών για την παρακολούθηση των υπολειμμάτων καρκινοπάθειας και για την έγκαιρη ανίχνευση του όγκου. Επιπλέον, το DNA και οι προσδιορισμοί RNA μπορούν να βοηθήσουν στη διάκριση μεταξύ διακριτών ιστολογικής προέλευσης όγκων, η οποία είναι κατάλληλη για τη διάγνωση καρκίνων άγνωστης αρχικής προέλευσης (CUP) (Sokolenko, et al, 2018), όπως φαίνεται στην Εικ.3.



Εικόνα 3: Μοριακή διαγνωστική στην ογκολογία Εξετάσεις για κληρονομικά σύνδρομα καρκίνου χρησιμοποιούνται πλέον στην ρουτίνα τόσο για την ταυτοποίηση των ατόμων που διατρέχουν κίνδυνο όσο και για την εξατομίκευση της συστηματικής θεραπείας. Υπάρχει ένας αριθμός προγνωστικών δοκιμών που περιλαμβάνει είτε την ανάλυση μεμονομένων στόχων φαρμάκων είτε την ταυτοποίηση συγκεκριμένων φαινότυπων όγκου, που βοηθούν στην επιλογή αντικαρκινικών φαρμάκων. Η παρακολούθηση κακοήθων ασθενειών μπορεί να επιτευχθεί μέσω μοριακής ανίχνευσης υπολειμματικών θραυσμάτων όγκου, όπως είναι το ελεύθερο καρκινικό DNA, RNA, τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα και άλλα (Sokolenko, et al, 2018).

Τέλος, χρησιμοποιούνται κάποιες επιπρόσθετες τεχνικές, όπως :

- I. οι μικροσυστοιχίες (DNA, Protein microarrays)
- II. οι κυτταρογενετικές τεχνικές (FISH : Φθορίζων εντοπισμένος/Επιτόπιος υβριδισμός)
- III. οι τεχνικές αλληλούχισης του DNA (Sanger, NGS sequencing)
- IV. οι τεχνικές ενίσχυσης του DNA (LCR : Αλυσιδωτή αντίδραση λιγάσης, NASBA : Ενίσχυση βάσει αλληλουχίας νουκλεϊκού οξέος, PCR)

Επομένως, η μοριακή διαγνωστική, μέσω αυτών των τεχνικών, εφαρμόζει τις αρχές της σε μία πληθώρα εφαρμογών που αφορούν τον προγεννητικό έλεγχο, την διάγνωση μολυσματικών-λοιμωδών νοσών και γενετικών ασθενειών, την φαρμακογονιδιωματική, τον προσδιορισμό μοριακών βιοδεικτών σε διάφορες νόσους αλλά κυρίως τον καρκίνο και συγκεκριμένα την μοριακή ταξινόμηση των όγκων αλλά και την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας για αυτόν είτε μέσω ιστικής βιοψίας είτε μέσω υγρής βιοψίας([Sokolenko, et al, 2018](#)).

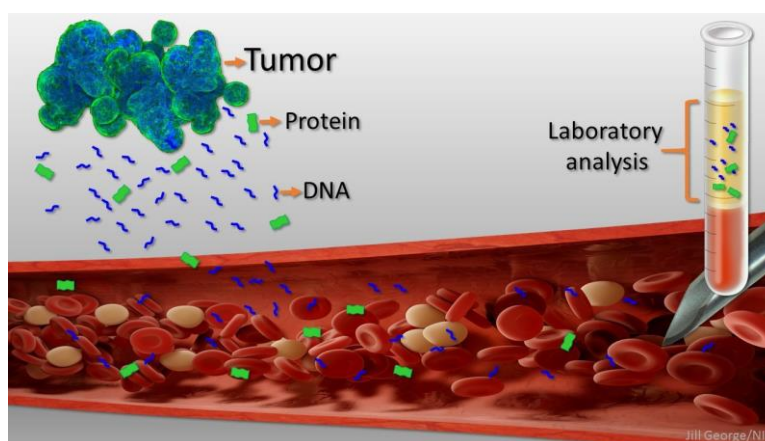
2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ : Η ΥΓΡΗ ΒΙΟΨΙΑ - ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟ DNA

2.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Κατά την τελευταία δεκαετία, τα μοριακά διαγνωστικά τεστ έχουν γίνει όλο και πιο δημοφιλή, με προτίμηση τη χρήση της ιστολογικής βιοψίας (Leers, 2019). Ωστόσο, λόγω περιορισμών αυτής της μεθόδου (που θα αναφερθούν παρακάτω), η δυνατότητα ανίχνευσης των μοριακών συστατικών των συμπαγών όγκων κυρίως μέσω συλλογή αίματος, με σημαντικές επιπτώσεις στην έρευνα αλλά και στη φροντίδα των καρκινοπαθών ασθενών, έγειρε αξιοσημείωτο ενδιαφέρον στην ογκολογική κοινότητα, η οποία για να περιγράψει αυτή την προσέγγιση χρησιμοποίησε τον όρο υγρή βιοψία (Siravegna, et al, 2017).

Η υγρή βιοψία είναι μία μη επεμβατική μέθοδος μοριακής διαγνωστικής για την ανάλυση κυκλοφορούντων συστατικών (γενετικό υλικό, πρωτεΐνες κ.α.) που προέρχονται από τους συμπαγείς όγκους και εντοπίζονται σε διάφορα υγρά του σώματος κυρίως στο αίμα (Leers, 2019) (Εικ.4).

Εκτός από το αίμα, πολλά άλλα σωματικά υγρά, όπως τα ούρα, το σάλιο, το σπέρμα, τα υγρά βρογχοσκόπησης, οι υπεζωκοτικές-πλευριτικές συλλογές (ασκίτης), το εγκεφαλονωτιαίο υγρό και δείγματα κοπράνων (Siravegna, et al, 2017) μπορούν να περιέχουν γενετικές πληροφορίες που προέρχονται από όγκο (Siravegna, et al, 2017) και για αυτό τα



Εικόνα 4 : Η ανάλυση συστατικών υγρής βιοψίας. Μέσω της υγρής βιοψίας αναλύονται γενετικό υλικό (DNA, RNA) πρωτεΐνες και άλλα συστατικά που βρίσκονται σε συμπαγείς όγκους (GEN, 2019).

συλλέγουμε, τα αναλύουμε (De Rubis, et al, 2019) και τα εκμεταλλευόμαστε για διαγνωστικούς σκοπούς, (Siravegna, et al, 2017) αλλά και για διαλογή και πρόγνωση (De Rubis, et al, 2019). Πολλές μελέτες έχουν δείξει τη δυνατότητα των υγρών βιοψιών για τον προσδιορισμό του γονιδιωματικού προφίλ ασθενών με καρκίνο, παρακολουθώντας την απόκριση στη θεραπεία, ποσοτικοποιώντας την ελάχιστη υπολειπόμενη ασθένεια και αξιολογώντας την εμφάνιση της ανθεκτικότητας στη θεραπεία και της αντοχής του ασθενούς στα φάρμακα (Siravegna, et al, 2017).

2.2. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΡΗΣΙΜΟΤΗΤΑ

Αυτός ο εναλλακτικός τρόπος βιοψίας (η υγρή βιοψία) αντιπροσωπεύει ένα καινοτόμο εργαλείο ογκολογίας ακρίβειας για να ξεπεραστούν οι τρέχοντες περιορισμοί που σχετίζονται με τις βιοψίες ιστών (De Rubis, et al, 2019). Προς το παρόν, όπως γνωρίζουμε, τα

μοριακά τοπία συμπαγών όγκων δημιουργούνται κατά κύριο λόγο με χειρουργική ή ιστική βιοψία(Siravegna, et al, 2017). Αυτή είναι και το “gold standard”(μεθοδολογικό πρότυπο) για την αρχική παθολογική διάγνωση και τον μοριακό έλεγχο. Η ιστική βιοψία χορηγεί τόσο ιστολογική ερμηνεία όσο και αξιολόγηση των μεταλλάξεων ή των αλλαγών που δεν οφείλονται στο DNA(π.χ. οφείλονται στην έκφραση της λήψης ορμονών ή άλλων πρωτεϊνών). Μαζί, αυτά παίζουν μεγαλύτερο ρόλο στην διάγνωση αλλά και στις αποφάσεις θεραπείας. Ωστόσο, με την μέθοδο αυτή εξακολουθούν να υπάρχουν σημαντικά ζητήματα που αφορούν κυρίως το όφελος από την απόκτηση του ιστού(Leers, 2019). Έτσι, υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα των υγρών έναντι των συμβατικών βιοψιών ιστού και οι τεχνολογικές εξελίξεις στην απομόνωση δείγματος(π.χ. η ανάπτυξη τσιπ εκχύλισης νουκλειικού οξέος για ελαχιστοποίηση του χειρισμού δειγμάτων) καθώς και οι εξελικτικά ανώτερες πλατφόρμες ανίχνευσης(π.χ. η ανάπτυξη υψηλής ανάλυσης κυτταρομετρίας ροής ή η μέθοδος Western blot για μεμονωμένα κύτταρα (scWB))την κάνουν ακόμα περισσότερο προσιτή(De Rubis, et al, 2019). Επιπλέον, μελέτες ελέγχου μεγάλης κλίμακας έχουν δείξει υψηλή συμφωνία ποσοστών μεταξύ 80% και 90% για πλάσμα και δείγματα ιστών που εξάγονται ταυτόχρονα, ειδικά όσον αφορά τις μεταλλάξεις στα βασικά “γονίδια-οδηγοί” (Leers, 2019).

Έτσι, τα τελευταία χρόνια, η υγρή βιοψία γίνεται όλο και περισσότερο διαδεδομένη, καθώς εκτός από την μη επεμβατική της φύση, είναι ακίνδυνη καθώς είναι ελάχιστα διεισδυτική(συλλογή κυρίως από περιφερικό αίμα(Leers, 2019)). Επίσης, υπάρχει δυνατότητα επανάληψης καθώς η συλλογή γίνεται κατά κύριο λόγο από το αίμα με αποτέλεσμα να είναι μία πιο εύκολη και ανώδυνη διαδικασία και η παρακολούθηση της εξέλιξης του όγκου συμβαίνει σε πραγματικό χρόνο, με έμμεση συνέπεια την συνήθως γρήγορη εξαγωγή των αποτελεσμάτων. Στο αντίθετο άκρο είναι η κλασική βιοψία ιστού η οποία, όντας επεμβατική, φέρει μεγάλο ρίσκο για παρενέργειες και συχνά είναι μία επώδυνη διαδικασία. Λόγω της περιορισμένης πρόσβασης στον όγκο, το να αποκτηθεί ένα δείγμα ιστού για ιστολογική ανάλυση είναι συχνά δύσκολο. Η πρόσβαση σε ορισμένους όγκους μπορεί να γίνει μόνο με αναρρόφηση με βελόνα(FNAs) (π.χ. καρκίνος του πνεύμονα) που οδηγεί σε πολύ λίγο υλικό για γονότυπο, ενώ η λήψη δειγμάτων από διαφορετικό ιατρικό κέντρο μπορεί να είναι προβληματική. Επιπλέον, λόγω της φύσης της, δεν είναι δυνατή η επανάληψη και δεν υπάρχει δυνατότητα μελέτης του προφίλ του ιστού σε πραγματικό χρόνο για αυτό και είναι αρκετά χρονοβόρα ως μέθοδος (Leers, 2019).

Ένα επιπλέον σημαντικό όφελος των υγρών βιοψιών σχετίζεται με την καλύτερη ποιότητα του DNA. Για την ιστοπαθολογία, η τυπική διαδικασία είναι η σταθεροποίηση του ιστού με φορμαλίνη και/ή η ενσωμάτωση σε παραφίνη του ιστού. Η σταθεροποίηση με φορμαλίνη οδηγεί σε διασταυρούμενες αντιδράσεις των πυρηνικών πρωτεϊνών, ενώ η ενσωμάτωση σε παραφίνη μπορεί να καταλήξει σε πήξη ιστονών λόγω θερμοκρασίας επεξεργασίας άνω των 50 °C. Και οι δύο αυτές διαδικασίες δεν περιλαμβάνονται στην υγρή βιοψία, και ως εκ τούτου, αυτό μειώνει τις πιθανότητες κατώτερης ποιότητας DNA. Εξάλλου, ολόκληρη η διαδικασία στην ιστοπαθολογία χρειάζεται πολύ περισσότερο χρόνο για να διεκπαιρωθεί από την υγρή βιοψία. Αυτό οφείλεται σε επιπλέον προ-αναλυτικά βήματα που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του DNA από την σταθεροποίηση του ιστού με φορμαλίνη και τις ενσωματώσεις σε παραφίνη. Εκτός αυτού, η διαδικασία της μακροαποικοδόμησης που απαιτείται για εξαγωγή αρκετού περιεχόμενου ιστού, στην ιστοπαθολογία μπορεί να ολοκληρωθεί σε 25–27 ημέρες, σε σύγκριση με μόλις 10–12 ημέρες που χρειάζεται στην υγρή βιοψία(Leers, 2019).

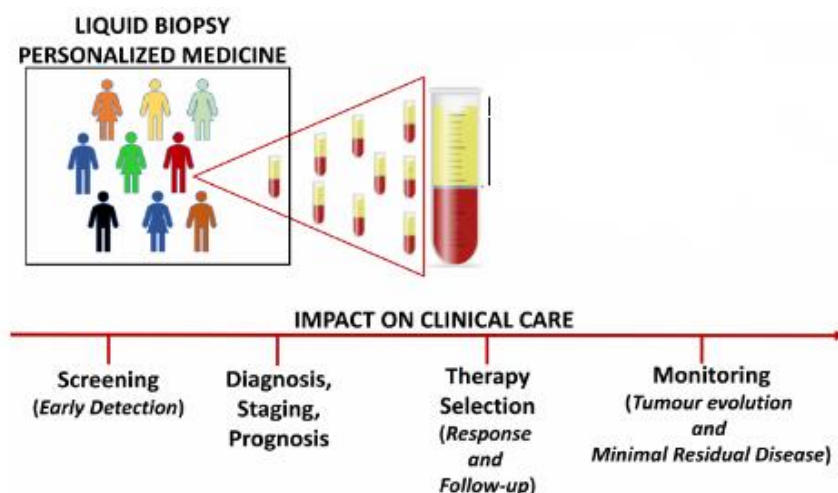
Περισσότερα γίνονται πλέον κατανοητά για την ποικιλομορφία του όγκου, τόσο για τους όγκους που προέρχονται από διαφορετικούς ασθενείς(ετερογένεια μεταξύ των όγκων) όσο και για τους μεμονωμένους όγκους(ετερογένεια εντός του όγκου), λόγω της ευρείας-κλίμακας ανάλυσης αλληλουχίας συμπαγών καρκίνων. Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι οι όγκοι περιλαμβάνουν πολλαπλούς γενετικά διακριτούς υποκλώνους που αναπτύσσονται ακολουθώντας ένα μοτίβο διακλαδισμένης εξέλιξης. Αυτός ο τύπος ενδοογκικής ετερογένειας ευθύνεται εν μέρει για την αποτυχία της θεραπείας και της ανθεκτικότητας στα φάρμακα. Οι Gerlinger et al.([Gerlinger, et al, 2012](#)) απέδειξαν ότι ένα μόνο δείγμα ιστικής βιοψίας μπορεί να παρουσιάζει ένα τμήμα γενετικών παρεκκλίσεων (συμπεριλαμβανομένων των μεταλλάξεων, της αλληλικής ανισορροπίας και της πλοειδίας), οι οποίες υπάρχουν στον όγκο στο σύνολό του. Η ενδοογκική ετερογένεια μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις για τις προσεγγίσεις στην εξατομικευμένη ιατρική, οι οποίες εξαρτώνται από τα δείγματα ιστικής βιοψίας που υποδεικνύουν τα μεταλλαξογόνα τοπία. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για τις παλαιότερες ιστικές βιοψίες. Οι ιστολογικές βιοψίες παρέχουν ένα στιγμιότυπο της ενδοογκικής ετερογένειας σε ένα συγκεκριμένο χρονικό στιγμιότυπο, αλλά μπορεί να δώσουν λίγες πληροφορίες σχετικά με τις πιθανές εξελικτικές διαδρομές των υποκλωνικών πληθυσμών. Αποτυγχάνουν δηλαδή να συλλάβουν ενδοογκική και διαμεταστατική γενετική ετερογένεια, επηρεάζοντας την ακρίβεια της δοκιμής. Λόγω της μη επεμβατικής φύσης της υγρής βιοψίας, είναι δυνατόν να ληφθούν χρονικές μετρήσεις του συνολικού φορτίου του όγκου, πέραν της ταξινόμησης συγκεκριμένων μεταλλάξεων που προκύπτουν κατά τη διάρκεια της θεραπείας([Leers, 2019](#)).

Τέλος, υπάρχει σημαντικά μειωμένο διαδικαστικό κόστος στις υγρές βιοψίες σε σύγκριση με το αυξημένο κόστος περίθαλψης των ασθενών των ιστολογικών βιοψιών([Leers, 2019](#)).

Ωστόσο, υπάρχουν μερικά βασικά μειονεκτήματα της υγρής βιοψίας :

- Η ανάλυση υλικού όγκου που λαμβάνεται με υγρές βιοψίες απαιτεί πολύ ευαίσθητες τεχνικές, οι οποίες είναι διαθέσιμες μόνο τα τελευταία 5 χρόνια. Επιπλέον ένα κρίσιμο ζήτημα, που επηρεάζει την ευαισθησία των τεχνικών της υγρής βιοψίας, είναι ότι το DNA μπορεί να οφείλεται και σε άλλες αιτίες(φλεγμονή, πληγή, κτλ)([Siravegna, et al, 2017](#)).
- Υπάρχει αδυναμία ως προς τη διάγνωση της νόσου(τα συστατικά ανιχνεύονται πιο αποτελεσματικά σε ασθενείς με υψηλό φορτίο νόσου)([Leers, 2019](#)).
- Η υγρή βιοψία είναι απίθανο να έχει υψηλή προστιθέμενη αξία για την αρχική επιλογή βέλτιστων φαρμάκων([Sokolenko, et al, 2018](#))
- Επί του παρόντος λίγες μέθοδοι είναι κλινικά επικυρωμένες, οπότε υπάρχει μια δυσκολία στην εφαρμογή στην κλινική πράξη([Leers, 2019](#)).

Παρόλο αυτά, υπάρχουν πολλοί τομείς ογκολογίας στους οποίους η νέα αυτή προσέγγιση μπορεί να έχει χρησιμότητα και κλινικό όφελος, όπως φαίνεται και στην Εικ.5.



Εικόνα 5: Οι κλινικές εφαρμογές της υγρής βιοψίας σε όλα τα στάδια του καρκίνου. Η υγρή βιοψία χρησιμοποιείται για τον προσυμπτωματικό έλεγχο, την διάγνωση, την πρόγνωση, την επιλογή της θεραπείας καθώς και για την απόκριση στη εξέλιξη του όγκου και στην ελάχιστη υπολειμματική νόσο (Raimondi, et al, 2017).

• **Προσυμπτωματικός έλεγχος και έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου:** Δοκιμασμένοι και ελεγμένοι βιοδείκτες για την έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου είναι επειγόντως απαραίτητοι, ειδικά για όγκους που συνήθως ανακαλύπτονται σε μεταγενέστερα στάδια, όπως συμβαίνει παραδείγματος χάριν στον καρκίνο του πνεύμονα και του παγκρέατος. Ένας πιθανός βιοδείκτης χρειάζεται υψηλή ειδικότητα σε συνδυασμό με υψηλή ευαισθησία. Εξαιτίας του υψηλού ποσοστού σφάλματος των μεθόδων προσδιορισμού αλληλουχίας του DNA, η ανίχνευση σπάνιων σωματικών καρκινικών μεταλλάξεων σε υγρές βιοψίες είναι ανεπαρκής. Ακόμα και με τις πρόσφατες εξελίξεις στην ευαισθησία των τεχνολογιών που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και την ανάλυση του ctDNA, ένα έγκυρο τεστ για την έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου παραμένει αόριστο. Για παράδειγμα, χρησιμοποιώντας μια εξέταση αίματος για τον προσυμπτωματικό έλεγχο του πληθυσμού θα χρειαζόταν εξαιρετικά επίπεδα εξειδίκευσης (Leers, 2019). Ωστόσο, η έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου επιτρέπει την έναρξη της θεραπείας νωρίτερα και μπορεί να πραγματοποιηθεί χειρουργική επέμβαση εάν ο όγκος διαγνωστεί σε πρώιμο στάδιο. Για συμπτωματικούς ασθενείς, η ευαίσθητη και ειδική ανίχνευση καρκίνου μπορεί να επιταχύνει το χρόνο για τη διάγνωση και τη θεραπεία. Σε επίπεδο πληθυσμού, ο έλεγχος για βιοδείκτες της νόσου θα μπορούσε να επιτρέψει την έγκαιρη επέμβαση σε προ-συμπτωματικά άτομα (Wan, et al, 2017).

Ο Dharajiya και οι συνεργάτες του (Dharajiya, et al, 2018) πρόσφατα έδειξαν ότι κατά την ανάλυση του αίματος μιας μεγάλης ομάδας πρότυπων δειγμάτων υγιών ατόμων ($n = 450.000$) για μη επεμβατική προγεννητική εξέταση (NIPT), ένα μη φυσιολογικό γονιδιωματικό προφίλ βρέθηκε για 10 από τις 100.000 περιπτώσεις. Αυτό αποδόθηκε κυρίως σε κακοήγη μητρικό όγκο και δεν συμβαδίζει με τις εμβρυικές ανωμαλίες. Επίσης, ο Krimmel και οι συνεργάτες του (Krimmel, et al, 2016) παρουσίασαν μια ακολουθία μεθόδων που αυξάνουν την ευαισθησία της υγρής βιοψίας. Μέσω της ενσωμάτωσης μιας τεχνικής διπλής αλληλουχίας, που επιτρέπει ανεξάρτητα τη μοριακή σήμανση και των δύο κλώνων του DNA, σπάνια καρκινικά κύτταρα στο περιτοναϊκό υγρό ήταν ανιχνεύσιμα. Το αποτέλεσμα παρείχε επιβεβαίωση ευρείας, χαμηλής συχνότητας, σωματικές μεταλλάξεις TP53 (εξαρτώμενες από την ηλικία) σε μη καρκινικούς ιστούς. Οι καρκίνοι εντοπίστηκαν ξεχωριστά από τα control με 82% ευαισθησία και 90% ειδικότητα από το συνολικό φορτίο των μεταλλάξεων TP53. Παρόλο

αυτά, ο εντοπισμός ενός καρκίνου σε ένα συγκεκριμένο όργανο από ένα θετικό τεστ υγρής βιοψίας μπορεί να αποτελέσει πρόκληση, καθώς πολλοί τύποι καρκίνων έχουν κοινές μεταλλάξεις γονιδίων όπως EGFR, KRAS, TP53 ή BRAF([Leers, 2019](#)).

- **Πρόγνωση, υπολειμματική νόσος και κίνδυνος υποτροπής:** Αρκετές πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η εξαγωγή του ctDNA μετά την ολοκλήρωση των θεραπειών μπορεί να λειτουργήσει ως δείκτης ασθενών που έχουν ενδείξεις στην ακτινογραφία υπολειμμάτων καρκίνων άγνωστης αρχικής προέλευσης. Η παρακολούθηση των μεταλλάξεων του ctDNA με ddPCR μπορεί να ανιχνεύσει MRD(ελάχιστη υπολειμματική νόσο) σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, ενώ επιτρέπει επίσης την πρόωμη ταυτοποίηση ασθενών που διατρέχουν κίνδυνο υποτροπής όγκου([Leers, 2019](#)). Η εκτίμηση του κινδύνου εξέλιξης είναι απαραίτητη για την επιλογή της έκτασης ή της επιθετικότητας της θεραπείας. Μετά τη θεραπεία με θεραπευτική πρόθεση, ο εντοπισμός ασθενών με υπολειμματική νόσο που διατρέχουν υψηλό κίνδυνο υποτροπής μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιπλέον για να στρωματοποιήσει τους ασθενείς σε ανοσοενισχυτική θεραπεία. Έτσι, η αποτελεσματική διαστρωμάτωση θα απέτρεπε ασθενείς χαμηλού κινδύνου από υπερβολική θεραπεία([Wan, et al, 2017](#)).

Ο Chaudhuri και οι συνάδελφοί του([Chaudhuri, et al, 2017](#)) με περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι η ανίχνευση του ctDNA πριν από την ακτινογραφική εξέλιξη είναι πιθανή σε ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία για εντοπισμένο καρκίνο του πνεύμονα. Αυτό επεκτάθηκε σε προφίλ μετάλλαξης ctDNA που σχετίζεται με θετικές αποκρίσεις σε TKIs ή με αναστολείς σε σημεία ανοσοποιητικού ελέγχου. Τέλος, έχουν βρεθεί παρόμοια ευρήματα σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου σταδίου II([Leers, 2019](#)).

- **Επιλογή Θεραπείας:** Η εισαγωγή ενός ευρέος φάσματος νέων μοριακά στοχευμένων και ανοσοθεραπευτικών παραγόντων απαιτούν βελτιωμένα εργαλεία για το μοριακό προφίλ ασθενών και για τη διαστρωμάτωση της θεραπείας. Προς το παρόν, οι βιοψίες ιστού είναι το πρότυπο για την λήψη καρκινικού DNA. Ωστόσο, οι ιστικές βιοψίες δεν μπορούν πάντα να ληφθούν και η ερμηνεία τους μπορεί να συγχέεται από την ετερογένεια εντός του όγκου, η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα και επιλογή μη βέλτιστης θεραπείας([Wan, et al, 2017](#)). Η αποτελεσματικότητα των στοχευμένων φαρμάκων επηρεάζεται από μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν θεραπευτικούς στόχους ή από κατασταλτικές πρωτεΐνες σηματοδότησης. Τα τελευταία χρόνια, σημαντικές εξελίξεις έχουν γίνει όσον αφορά την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών, όπως οι ενεργές μεταλλάξεις στον επιδερμικό υποδοχέα αυξητικού παράγοντα (EGFR) που επηρεάζουν την θεραπεία αντι-EGFR στον καρκίνο του πνεύμονα και τα ιογενή ομόλογα ογκογονικά γονίδια του σαρκώματος των αρουραίων Kirsten(KRAS). Η προηγούμενη μετάλλαξη επηρεάζει μια κατασταλτική πρωτεΐνη του EGFR, και έχει καθοριστικό ρόλο στη θεραπεία κατά του EGFR για τον ορθοκολικό καρκίνο(CRC). Επί του παρόντος, ογκογονικές μεταλλάξεις στα KRAS και NRAS, επηρεάζοντας περίπου το 55% των ασθενών με CRC και θεωρώντας ότι είναι ένας προγνωστικός παράγοντας της έλλειψης απόκρισης στην αντι-EGFR θεραπεία(π.χ. με κετουξιμάμπη και πανιτουμουμάμπη), αξιολογούνται περιοδικά σε δείγματα όγκων. Η παρακολούθηση της δυναμικής των διακριτών ανθεκτικών υποκλώνων καθίσταται δυνατή με την ανάλυση του cfDNA, και κατά τη διαδοχική θεραπεία και ακόμη και μετά τη διακοπή([Leers, 2019](#)).

Οι Siravegna et al.([Siravegna, et al, 2015](#)) έδειξαν ότι οι προκύπτουσες μεταλλάξεις RAS κατά την αντι-EGFR θεραπεία σε ασθενείς με CRC μπορεί να είναι μη ανιχνεύσιμες σε cfDNA μετά το τέλος της anti-EGFR θεραπείας και ότι ένας μεγάλος αριθμός αυτών των ασθενών μπορεί να ωφεληθεί από επανεισαγωγή της θεραπείας κατά του EGFR. Η υγρή βιοψία είναι ιδιαίτερα πολύτιμη κατά τη διάρκεια πολυάριθμων ανιχνεύσεων για πρώιμα στοιχεία

επανάληψης ή αντίστασης όταν ένας ασθενής υποβληθεί σε στοχευμένη θεραπεία με πολλαπλές μεταστάσεις. Πληροφορίες για τις χρονικές μετρήσεις του συνολικού φορτίου του όγκου, καθώς και ταυτοποίηση μεταλλάξεων που προέρχονται από συγκεκριμένη θεραπεία μπορούν όλα να ληφθούν. Η αντίσταση είναι ένα συχνό φαινόμενο για σχεδόν όλες τις θεραπείες όγκου λόγω ετερογένειας όγκου, κλωνικών εξελίξεων και επιλογής. Ο έλεγχος για T790M σε επίκτητη αντίσταση με εγκεκριμένη μέθοδο έχει ενσωματωθεί σε τυπική φροντίδα ασθενή, χάρη στην κανονιστική έγκριση της οσιμερτινίμπης στις ΗΠΑ, Ευρώπη και Ιαπωνία. Κλινικά αποτελέσματα των ασθενών επιδεικνύοντας θετικά στο T790M αποτελέσματα γονότυπου πλάσματος με την οσιμερτινίμπη (υγρή βιοψία) είναι συγκρίσιμα με τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν κατά τη θεραπεία του θετικού σε όγκο T790M αποτελέσματα γονότυπου ([Leers, 2019](#)).

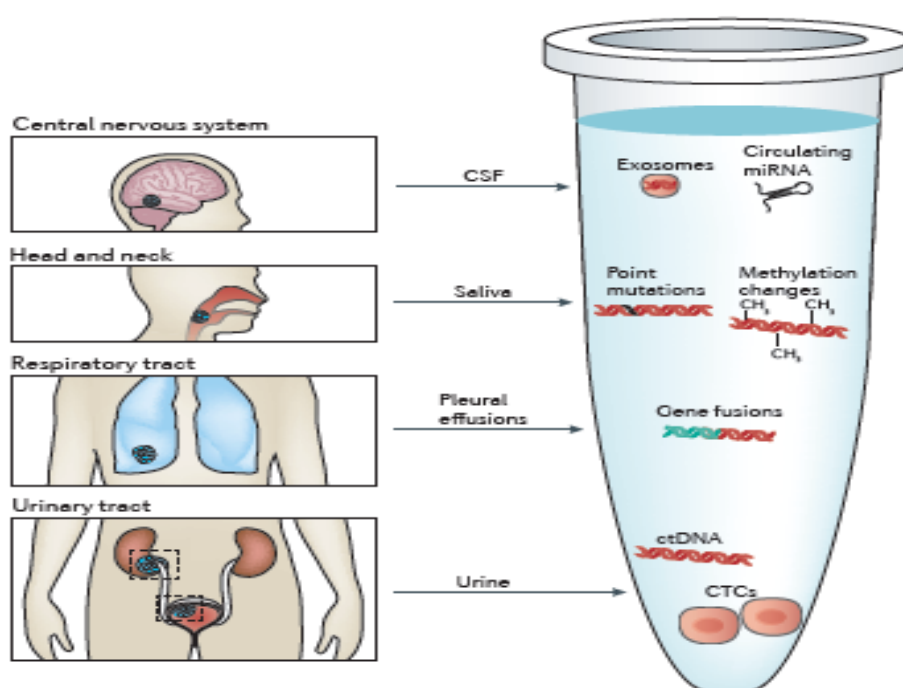
• **Παρακολούθηση της επιβάρυνσης της νόσου:** Η παρακολούθηση της θεραπείας, η οποία πραγματοποιείται επί του παρόντος χρησιμοποιώντας απεικονιστικές ή μοριακές μεθόδους, μπορεί να εντοπίσει απόκριση ή εξέλιξη, επιτρέποντας στους κλινικούς γιατρούς και ασθενείς να προσαρμόσουν ανάλογα τη θεραπεία. Οι τρέχουσες μέθοδοι έχουν περιορισμένη ακρίβεια ή σχετίζονται με υλικοτεχνική επιβάρυνση ή έκθεση σε ακτινοβολία. Ο ιδανικός προσδιορισμός παρακολούθησης πρέπει να επαναλαμβάνεται σειριακά με την πάροδο του χρόνου, με ελάχιστο κίνδυνο για τους ασθενείς, και πρέπει να παρέχει ακριβή ανάγνωση του φορτίου του όγκου ([Wan, et al, 2017](#)). Επιπλέον, υπάρχει μία σχέση μεταξύ του μεγέθους του όγκου και του ποσού της νέκρωσης. Ως γνωστόν, το καρκινικό DNA εκκρίνεται και από τις περιοχές νέκρωσης. Επομένως, μια φυσική υπόθεση είναι ότι το ποσό του ctDNA θα μπορούσε να συνδεθεί με το μέγεθος του όγκου. Προηγούμενα αποτελέσματα που δείχνουν αυξημένα επίπεδα ctDNA σε ασθενείς προχωρημένου σταδίου, σε σύγκριση με το αρχικό στάδιο, υποστηρίζουν αυτή την υπόθεση. Ο σύντομος χρόνος ημιζωής του ελεύθερου cfDNA (περίπου 2 h) είναι ένα πλεονέκτημα κατά τη μέτρηση σε πραγματικό χρόνο του φορτίου του όγκου σε απόκριση στη θεραπεία. Συγκριτικά, πολλοί τυπικοί δείκτες όγκου ορού (π.χ. καρκινοεμβρυονικό αντιγόνο [CEA] και αντιγόνο καρκίνου 125 [CA-125]) που είναι στην τρέχουσα κλινική χρήση έχουν χρόνο ημιζωής μέρες έως εβδομάδες. Αν και ορισμένες μελέτες έχουν δείξει μια προσωρινή αύξηση στην απελευθέρωση του ctDNA μετά την έναρξη της θεραπείας, τα επίπεδα μειώνονται δραματικά μετά από 1-2 εβδομάδες λόγω της απόκρισης. Επαναλαμβανόμενες αναλύσεις κατά τη διάρκεια της περιόδου θεραπείας είναι δυνατόν να πραγματοποιηθούν με υγρές βιοψίες - που μπορεί επίσης να υποδείξουν τις θεραπευτικές αποκρίσεις και την εμφάνιση της αντίστασης σε πραγματικό χρόνο ([Leers, 2019](#)).

Σύμφωνα με τους Tie et al ([Tie, et al, 2015](#)), παρεμβάσεις στο ctDNA κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας έχουν σχετιστεί με την απόκριση του ασθενούς στα αρχικά στάδια της θεραπείας. Επαναλαμβανόμενες ctDNA μετρήσεις θα μπορούσαν να ενσωματωθούν με τα αποτελέσματα από την καθημερινότητα βασισμένες σε απεικονιστικές εκτιμήσεις κατά την αξιολόγηση του όγκου της νόσου και της ανταπόκρισης σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες για να δώσουν νέες πληροφορίες. Από την μελέτη του καρκίνου του παχέος εντέρου από τους Diehl και συναδέλφους ([Diehl, et al, 2008](#)), δείχτηκε ότι το ctDNA ήταν παρατηρήσιμο σε όλους τους ασθενείς πριν από τη χειρουργική επέμβαση, και ότι η επαναλαμβανόμενη δειγματοληψία αίματος παρουσίασε διακυμάνσεις στα επίπεδα ctDNA, που σχετίζονται με την έκταση της χειρουργικής εκτομής. Επιπλέον, ασθενείς με διακριτά επίπεδα ctDNA μετά τη χειρουργική επέμβαση υποτροπίασαν συνήθως εντός ενός έτους. Με τεχνολογίες για την παρακολούθηση του cfDNA ολόένα και περισσότερο προσιτές και οικονομικά αποδοτικές, η δυνατότητά τους να εντοπίσουν σε αρχικό στάδιο ενδείξεις απόκρισης ή εξέλιξης είναι

καίριας σημασίας για την κλινική διαχείριση. Η ανίχνευση της μετεγχειρητικής υπολειμματικής ασθένειας μέσω ευαίσθητων τεχνικών της υγρής βιοψίας θα μπορούσε να ενθαρρύνει τους ασθενείς που έχουν θεραπευτεί να υποβληθούν σε δυνητικά τοξική, πρόσθετη χημειοθεραπεία(Leers, 2019).

2.3. ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΥΓΡΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ

Είναι ευρέως γνωστό ότι οι όγκοι σχεδόν πάντα ρίχνουν κάποια ποσότητα των θραυσμάτων τους στον χώρο γύρω τους. Αυτά τα θραύσματα μπορεί να εκδηλώνονται με κακοήθη κύτταρα ή συστάδες τους, καθώς και με διάφορες πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, μικρά μόρια, κ.λπ. Κατά συνέπεια, όλα αυτά τα μόρια μπορεί να συλλεχθούν σε διάφορα σωματικά υγρά(ορός, σάλιο, ούρα κ.λπ.) και χρησιμεύουν ως καρκινικοί βιοδείκτες(Sokolenko ,et al, 2018)(Εικ.6).

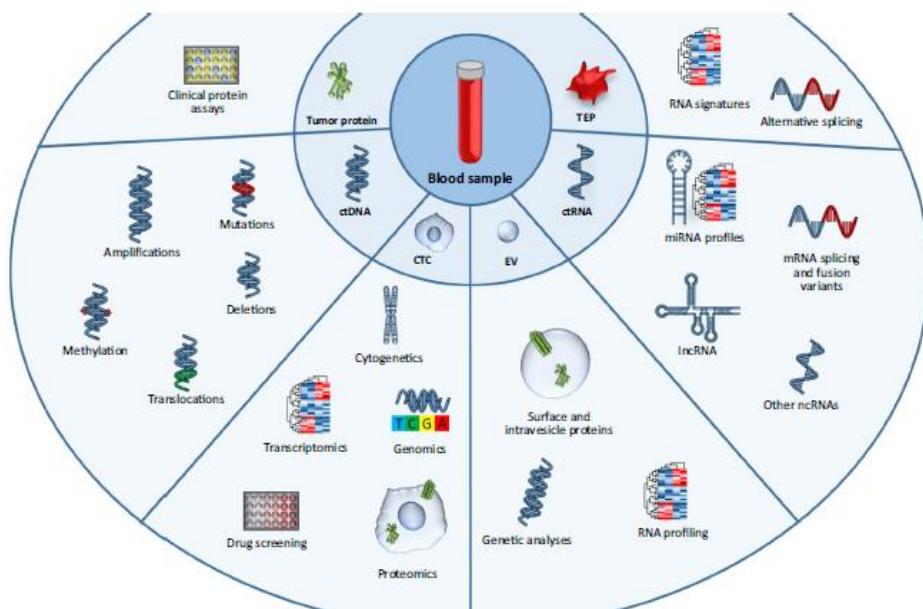


Εικόνα 6: Άλλες πηγές υγρής βιοψίας Σχηματική αναπαράσταση διαφορετικών σωματικών υγρών(εκτός του αίματος) που μπορεί να περιέχει μοριακές πληροφορίες που προέρχονται από όγκο, συγκεκριμένα, ούρα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF), σάλιο και υπεζωκοτικές συλλογές. Ο εντοπισμός του πρωτογενούς όγκου και οποιωνδήποτε μεταστατικών βλαβών επηρεάζουν την παρουσία κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων, καρκινικών κυττάρων και μικροσωματιδίων σε μεμονωμένα σωματικά υγρά. Όπως υποδεικνύεται, σημειακές μεταλλάξεις, συντήξεις γονιδίων, και μεταβολές μεθυλίωσης που σχετίζονται με τον καρκίνο μπορούν να ανιχνευθούν μέσω ανάλυσης του DNA ή του mRNA που προέρχεται από αυτά τα υλικά όγκου που μεταδίδονται στο αίμα (Siraveqna,et al,2017).

Ένας βιοδείκτης είναι ουσιαστικά ένα βιολογικό μόριο που, όταν μετριέται στο σώμα, μπορεί να υποδηλώνει την παρουσία φυσιολογικών ή παθολογικών διαδικασιών. Μοριακοί διαγνωστικοί έλεγχοι προσδιορίζουν έναν υπάρχων καρκίνο, ή την πιθανότητα ενός ατόμου να αναπτύξει έναν συγκεκριμένο τύπο καρκίνου, από ανάλυση συγκεκριμένων βιοδεικτών.

Οι μοριακοί έλεγχοι μπορούν να ανιχνεύσουν μόνο ορισμένες παραλλαγές γονιδίων ή να χαρτογραφήσουν ολόκληρη την ακολουθία ενός στοχευμένου τμήματος του DNA για την ανίχνευση όλων των μεταλλάξεων στην αλληλουχία. Οι βιοδείκτες καρκίνου είναι συνήθως αλλαγές στις γενετικές δομές ή στις πρωτεΐνες (ή στα επίπεδα των πρωτεϊνών) που σχετίζονται με τον καρκίνο και μπορούν να μετρηθούν με ακρίβεια. Ως εφαρμογή στην διαχείριση του καρκίνου, τα μοριακά διαγνωστικά τεστ αναγνωρίζουν και μετράνε αυτούς τους καρκινικούς βιοδείκτες προκειμένου να προβλεφθεί η πιθανότητα ενός ατόμου να αναπτύξει έναν συγκεκριμένο τύπο καρκίνου, να προσδιοριστεί ένας υπάρχων καρκίνος, να μετρηθεί πόσο έχει εξελιχθεί ο καρκίνος, να γίνει η πρόγνωση, να υποδείξει ποια θεραπευτική επιλογή μπορεί να λειτουργεί καλύτερα, να προσδιορίσει τον κίνδυνο ότι ο καρκίνος μπορεί να επανεμφανιστεί (τον κίνδυνο υποτροπής) και να παρακολουθήσει την πρόοδο της νόσου ή της θεραπείας (Van Meter, et al, 2016).

Έτσι, το κυκλοφορούν καρκινικό περιβάλλον, που ορίζεται ως το υποσύνολο των κυκλοφορούντων συστατικών που προέρχεται από καρκινικό ιστό, μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα ή έμμεσα ως πηγή βιοδεικτών καρκίνου σε υγρές βιοψίες. Αυτά τα συστατικά περιλαμβάνουν κυκλοφορούντες πρωτεΐνες όγκου, κυκλοφορούντα καρκινικά νουκλεϊκά οξέα (ctDNA και ctRNA), κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), εξωκυτταρικά κυστίδια (EVs) και ογκοεπιμορφωμένα αιμοπετάλια (TEPs) (De Rubis, et al, 2019). Το κυκλοφορούν καρκινικό DNA (ctDNA) είναι το μόνο συστατικό του οποίου η κλινική εφαρμογή έχει εγκριθεί από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA). Τα υπόλοιπα (CTCs, EVs, ctRNA, TEPs) είναι σχετικά νέα συστατικά του κυκλοφορούντος καρκινικού περιβάλλοντος, πολλά υποσχόμενα σε κάθε στάδιο της αντιμετώπισης του καρκίνου (De Rubis, et al, 2019) (Εικ.7).

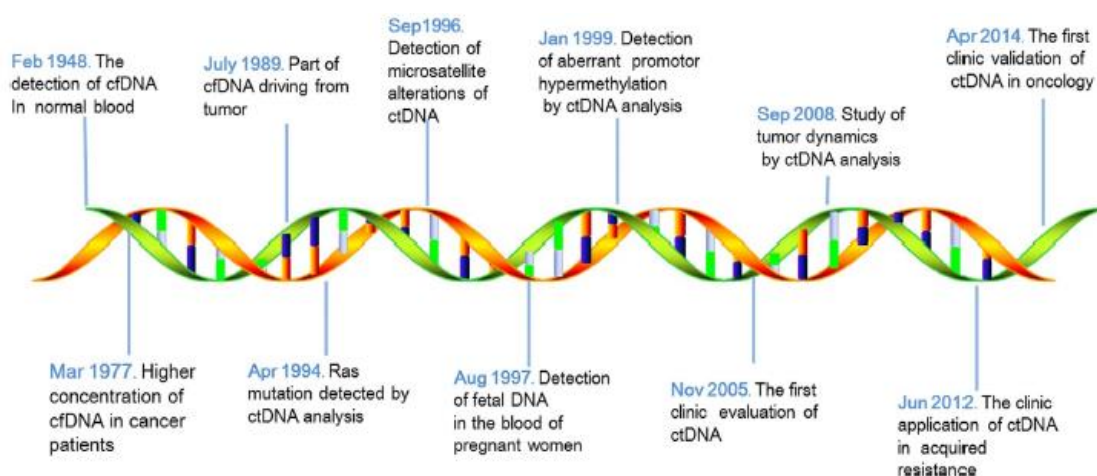


Εικόνα 7 : Οι καρκινικοί βιοδείκτες και οι πληροφορίες τους Το κυκλοφορούν καρκινικό περιβάλλον περιλαμβάνει όλα τα προερχόμενα από τον όγκο στοιχεία που ελευθερώνονται στην κυκλοφορία του αίματος και μπορούν να χρησιμοποιηθούν, άμεσα ή έμμεσα, ως καρκινικοί βιοδείκτες. Περιλαμβάνει κυκλοφορούσες πρωτεΐνες όγκου, DNA κυκλοφορούντος όγκου (ctDNA), κυκλοφορούντα νεοπλασματικά κύτταρα (CTCs), εξωκυτταρικά κυστίδια (EVs) που προέρχονται από όγκο και τα συστατικά τους, RNA κυκλοφορούντος όγκου (ctRNA) και ογκοεπιμορφωμένα αιμοπετάλια (TEPs). Κάθε

ένα από αυτά τα στοιχεία παρέχει ένα ή περισσότερα επίπεδα πληροφοριών. Η μέτρηση της συγκέντρωσης μεμονωμένων πρωτεϊνών ή πλαισίων που περιλαμβάνουν πολλαπλές πρωτεΐνες όγκου είναι το ισχύον χρυσό πρότυπο στη διαχείριση του καρκίνου. Οι ανιχνεύσιμες πληροφορίες από το ctDNA περιλαμβάνουν: μεταλλάξεις, διαγραφές, ενισχύσεις γονιδίων, πρότυπα μεθυλίωσης και μετατοπίσεις. Τα CTC παρέχουν μια πλούσια πηγή γονιδιωματικών, πρωτεωμικών, μεταγραφικών, και κυτταρογενετικών πληροφοριών και μπορούν να καλλιεργηθούν *ex vivo* για την εκτέλεση εξατομικευμένων δοκιμών ευαισθησίας στα φάρμακα. Τα συστατικά των EV παρέχουν ένα “μοριακό δακτυλικό αποτύπωμα” των καρκινικών κυττάρων προέλευσης και το DNA, το RNA τους αλλά και η περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνη (τόσο επιφανειακή όσο και ενδοαυλική) παρέχουν μια πλούσια πηγή βιοδεικτών καρκίνου. Το ctRNA, συμπεριλαμβανομένου του EV κυκλοφορούν RNA, περιλαμβάνει διαφορετικές κατηγορίες RNA. Μεταξύ αυτών, οι πίνακες έκφρασης miRNA και η έκφραση μακράς μη κωδικοποίησης (lnc) RNA είναι καλές πηγές για ποσοτικές πληροφορίες για βιοδείκτες. Ποιοτικές πληροφορίες, όπως η παρουσία ειδικών για τον όγκο εναλλακτικών ματίσματος και γονιδιακών συντήξεων, μπορούν επίσης να ληφθούν από αυτή την πηγή. Τα αιμοπετάλια από ασθενείς με καρκίνο ή TEPs αποτελούν επίσης πηγή πληροφοριών για βιοδείκτες, καθώς περιέχουν RNAs που προέρχονται από όγκο και προκαλούνται από όγκο εναλλακτικά συναρμολογημένα αντίγραφα(De Rubis, et al, 2019).

2.3.1. Ελεύθερο κυκλοφορούν DNA(circulating free DNA-cfDNA) VS Κυκλοφορούν καρκινικό DNA(circulating tumor DNA-ctDNA)

Οι υγρές βιοψίες θα πρέπει τελικά να ενσωματωθούν στην κλινική πρακτική, εστιάζοντας στην υγρή βιοψία του ctDNA η οποία είναι αναμφισβήτητα η πιο κλινικά προηγμένη προσέγγιση(Siravegna, et al, 2017).



Εικόνα 8: Η χρονολογική σειρά των κυριότερων σημαντικών ανακαλύψεων για το ct- και cf- DNA. Η ανίχνευση του cfDNA στο αίμα έγινε για πρώτη φορά το 1948, ενώ το 1994, 1996 και 1999 εντοπίστηκαν μεταλλάξεις, αλλοιώσεις και υπερμεθυλιώσεις του ctDNA αντίστοιχα. Επιπλέον, τον Απρίλιο του 2014 έγινε η πρώτη κλινική επικύρωση του ctDNA στην ογκολογία(Zhang, et al, 2019).

Όπως φαίνεται στην Εικ.8, η πρώτη επίδειξη του κυκλοφορούντος DNA πραγματοποιήθηκε το 1948 από τους MANDEL AND METAIS(Guibert, et al, 2020). Ωστόσο, η ανακάλυψη του DNA έγινε το 1953 και η ταυτοποίηση του ελεύθερου κυκλοφορούντος DNA ξεκίνησε τη δεκαετία του 60 με περιγραφή DNA στον ορό του αίματος ασθενών με συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο. Το 1989 αποκαλύφθηκε η παρουσία ελεύθερου κυκλοφορούντος καρκινικού DNA, ενώ το 1997 ανακαλύπτεται ότι στο αίμα της εγκύου κυκλοφορεί εμβρυικό DNA(Thierry, et al, 2016). Το ελεύθερο κυκλοφορούν καρκινικό DNA (cfDNA) αντιστοιχεί στο cfDNA που

εντοπίζεται στο αίμα, αλλά και σε άλλα σωματικά υγρά όπως ούρα, υπεζωκοτικό υγρό, εγκεφαλονωτιαίο υγρό ή υπερκείμενο που προέρχεται από δείγμα κυτταρολογίας([Guibert, et al, 2020](#)).

Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής λειτουργίας, μια συνεχής διαδικασία της αποικοδόμησης των κυττάρων συμβαίνει σχεδόν σε όλους τους ιστούς ως μέρος του κυτταρικού θανάτου. Υπάρχουν δύο σημαντικές διαδικασίες κυτταρικής αποικοδόμησης: νέκρωση και απόπτωση. Τα αποπτωτικά και τα νεκρωτικά υπολείμματα συνήθως εκκαθαρίζονται από μακροφάγα. Ωστόσο, κατά την αποικοδόμηση των κυττάρων, μικρά θραύσματα περιεχομένου κυττάρων απελευθερώνονται στην κυκλοφορία για νεφρική κάθαρση. Αυτοί οι κλώνοι DNA αποσυντίθενται και χύνονται στο περιφερικό αίμα ως μικρότερα θραύσματα. Συγκεκριμένα, η απόπτωση παράγει θραύσματα DNA ~ 180 ζευγών βάσεων (bp)(και πολλαπλάσια αυτού), ενώ η νέκρωση οδηγεί σε πολύ μεγαλύτερα θραύσματα(> 1000 bp)([Leers, 2019](#))(Εικ.9). Εναλλακτικά, in vitro μελέτες έχουν δείξει ότι το DNA μπορεί να απελευθερωθεί με έναν ενεργό μηχανισμό στον οποίο τα καρκινικά κύτταρα απελευθερώνουν αυθόρμητα θραύσματα DNA στην κυκλοφορία([Levy, et al, 2016](#)). Επιπλέον, υπάρχουν διάφορες αιτίες της απελευθέρωσης του cfDNA στο σώμα των θηλαστικών ανάλογα με την υγεία ενός οργανισμού, την ηλικία, τις ασκήσεις, τη φλεγμονή και την παθοφυσιολογία μιας ασθένειας([Pinzani, et al, 2021](#)).

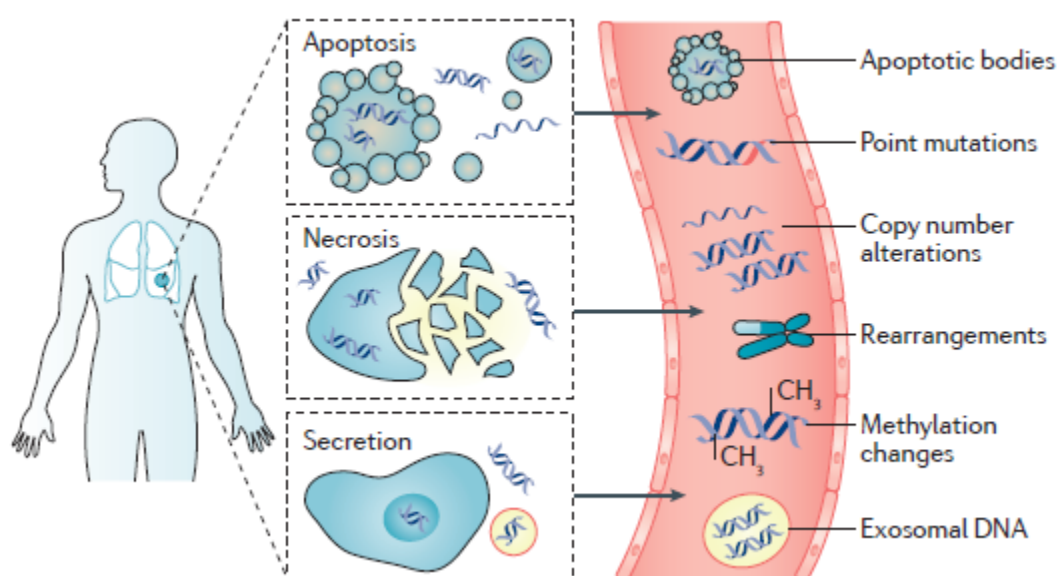
Και οι δύο τύποι μεγεθών θραυσμάτων μπορούν να παρατηρηθούν στο αίμα των καρκινοπαθών. Συνήθως, οι ασθενείς με καρκίνο έχουν υψηλότερα επίπεδα κυκλοφορούν cfDNA από υγιή άτομα([Leers, 2019](#)). Πιο συγκεκριμένα, η ποσότητα DNA πλάσματος είναι πολύ υψηλότερη σε ασθενείς με καρκίνο($5-1500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) από ό, τι σε υγιείς ασθενείς ($1-5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), με την αλληλική συχνότητα (AF, το κλάσμα μεταλλαγμένων / άγριου τύπου αλληλόμορφα) στο αίμα να είναι πολύ μεταβλητή σε ασθενείς με καρκίνο([Guibert, et al, 2020](#)). Πολλαπλές μελέτες έχουν αναφέρει αυξημένη συγκέντρωση cfDNA σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα σε σύγκριση με υγιή δείγματα-control και αύξηση συγκέντρωσης cfDNA σε προχωρημένη νόσο σε σύγκριση με προηγούμενα στάδια της νόσου([Levy, et al, 2016](#)).

Καθώς ο όγκος αυξάνεται σε μέγεθος, ο κυτταρικός κύκλος επιταχύνεται και επομένως ο αριθμός των αποπτωτικών και νεκρωτικών κυττάρων αυξάνεται. Η συγκέντρωση του cfDNA στην κυκλοφορία του αίματος εξαρτάται από τη θέση, το μέγεθος και την αγγείωση του όγκου, που μπορεί επίσης να εξηγήσει συχνά την ευρεία μεταβλητότητα που φαίνεται στα επίπεδα του cfDNA. Ο κύριος προγνωστικός παράγοντας για την ευαισθησία ενός συγκεκριμένου γονότυπου πλάσματος είναι η συγκέντρωση που προέρχεται από καρκινικό cfDNA που βρέθηκε στο πλάσμα. Αυτό υπολογίζεται από τον ρυθμό έκκρισης με τον οποίο τα καρκινικά κύτταρα απελευθερώνουν DNA στην κυκλοφορία, σε σύγκριση με το ρυθμό αποβολής μέσω νεφρικής κάθαρσης. Η διαδικασία αποβολής cfDNA δεν είναι εντελώς κατανοητή, αλλά έχουν προταθεί θεωρίες σχετικές με πτυχές της βιολογίας των όγκων, όπως ο μιτωτικός ρυθμός, η νέκρωση και η αγγείωση, ανάλογα με τον πολλαπλασιασμό τους επί του συνολικού αριθμού των υπάρχων καρκινικών κυττάρων([Leers, 2019](#)).

Τόσο η δυνατότητα παρακολούθησης δυναμικών αλλαγών στη βιολογία του όγκου κατά τη διάρκεια της θεραπείας όσο και οι πληροφορίες για την ογκογονική ετερογένεια κατέστη δυνατές με ανάλυση cfDNA. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει μεγάλη ποικιλία στη συγκέντρωση του cfDNA, που κυμαίνεται από μερικά νανογραμμάρια (ng) / mL έως αρκετές χιλιάδες (ng) / mL. Υπάρχουν πιθανοί μεθοδολογικοί λόγοι για αυτό, με τους κυριότερους να αφορούν την έλλειψη προ-αναλυτικής και αναλυτικής συνοχής που περιβάλλει το cfDNA. Πιο

συγκεκριμένα, το μικροπεριβάλλον που χρησιμοποιείται, οι συνθήκες αποθήκευσης, η πιθανή μεροληψία κατά την επιλογή ασθενών, η συλλογή δειγμάτων πλάσματος στο μη βέλτιστο χρόνο αλλά και διαφορές στις τεχνικές μεθόδους που εφαρμόζονται στην εξαγωγή και ποσοτικοποίηση του cfDNA είναι παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση και τον κατακερματισμό του. Επί του παρόντος, δεν υπάρχει τυπική διαδικασία λειτουργίας(SOP) για ανάλυση cfDNA(Leers, 2019).

Το cfDNA συνδέεται με έναν αριθμό παθήσεων, συμπεριλαμβανομένης της νεφρικής νόσου τελικού σταδίου, του εμφράγματος του μυοκαρδίου, του εγκεφαλικού επεισοδίου, του τραύματος και του καρκίνου του πνεύμονα. Πολλές μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του cfDNA και των κυτταρικών τραυματισμών και νέκρωσης, διαδικασίες σχετικές με την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και την διάδοση (Levy, et al, 2016).

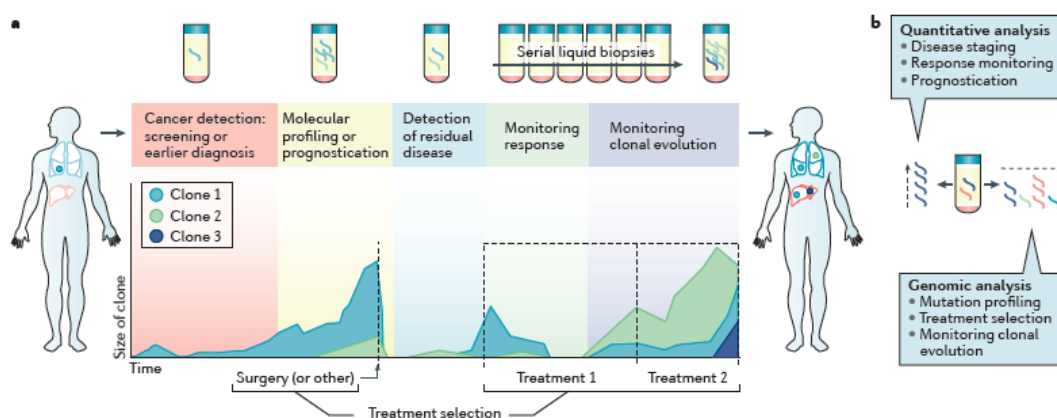


Εικόνα 9: Προέλευση και εύρος αλλαγών στο cfDNA Τα κύτταρα απελευθερώνουν cfDNA μέσω ενός συνδυασμού απόπτωσης, νέκρωσης και έκκρισης. Το cfDNA μπορεί να προκύψει από καρκινικά κύτταρα αλλά και από κύτταρα στο κυκλοφορούν καρκινικό περιβάλλον, ανοσοποιητικά κύτταρα ή άλλα όργανα του σώματος. Στην κυκλοφορία του αίματος, το cfDNA μπορεί να υπάρχει είτε ως ελεύθερο είτε να σχετίζεται με εξωκυτταρικά κυστίδια όπως τα εξωσώματα. Πολλαπλές κατηγορίες γενετικών και επιγενετικών αλλοιώσεων μπορούν να βρεθούν στο cfDNA(Wan,et al,2017).

Εκτός από το cfDNA από μη κακοήγη (κυρίως αιμοποιητικά) κύτταρα, τα δείγματα αίματος μπορεί να περιέχουν ελάχιστες ποσότητες ctDNA που προέρχονται από πρωτογενείς και μεταστατικές περιοχές. Τα επίπεδα ctDNA στο πλάσμα δείχνουν μεγάλη μεταβλητότητα εντός και μεταξύ των τύπων όγκων. Το ctDNA απομονώνεται στο αίμα (πλάσμα και ορός) καθώς και σε άλλα σωματικά υγρά όπως ούρα, σάλιο, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, υπεζωκοτική συλλογή, ασχητικό υγρό, σπέρμα, μητρικό γάλα, λεμφικά και περιτοναϊκά υγρά, αναρροφήσεις μυελού των οστών, προστατικό υγρό, περιτοναϊκή πλύση(lavage), γαστρικός χυμός, δείγματα χολής και κοπράνων. Το ctDNA είναι μονόκλωνο ή δίκλωνο DNA που παρουσιάζει πολλά μοριακά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με τον καρκίνο, όπως μεταλλάξεις ενός νουκλεοτιδίου, παραλλαγές αριθμού αντιγράφων (CNVs), μεθυλίωση και δομικές αλλαγές ή αναδιατάξεις(Pinzani, et al, 2021).

Όπως και στο cfDNA, έτσι και στο ctDNA υπάρχουν τρεις πιθανές προελεύσεις του: (i) αποπτωτικά ή νεκρωτικά καρκινικά κύτταρα (ii) ενεργά καρκινικά κύτταρα του καρκινικού ιστού (iii) CTC. Ωστόσο, δύο είναι οι κύριες διαδικασίες που εμπλέκονται στην απελευθέρωση του ctDNA στο αίμα: η παθητική απελευθέρωση DNA μέσω κυτταρικού θανάτου είτε με απόπτωση είτε με νέκρωση και η ενεργή έκκριση DNA με απελευθέρωση EVs. Ως συνέπεια της ενζυματικής διάσπασης του DNA κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, τα προκύπτοντα θραύσματα DNA εξακολουθούν να τυλίγονται γύρω από μεμονωμένα νουκλεοσώματα και το μήκος με τον σύνδεσμο είναι περίπου 166 ή 320 bp, εάν το DNA τυλίγεται γύρω από δύο νουκλεοσώματα, και έως 1.000 bp εάν απελευθερωθεί από φαγοκυττάρωση νεκρωτικών κυττάρων. Ο ρυθμός απόρριψης του ctDNA στην κυκλοφορία εξαρτάται από τη θέση, το φορτίο, το μέγεθος και την αγγειακότητα του όγκου, το στάδιο του καρκίνου, την κυτταρική εναλλαγή αλλά και από την απόκριση στη θεραπεία, η οποία οδηγεί σε διαφορά στα επίπεδα ctDNA που βρίσκονται στο αίμα από 0,01 έως 90%. Εκτιμάται ότι ασθενείς με φορτίο όγκου 100 g σε μέγεθος απελευθερώνουν το 3,3% του καρκινικού DNA στην κυκλοφορία σε καθημερινή βάση και ότι ο χρόνος ημίσειας ζωής του ctDNA στην κυκλοφορία του αίματος κυμαίνεται από 16 λεπτά έως 2,5 ώρες (Pinzani, et al, 2021).

Το ctDNA αντιπροσωπεύει ένα πολλά υποσχόμενο βιοδείκτη και η πρώτη και πιο σημαντική εφαρμογή του ως βιοδείκτης ήταν η ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων, λόγω της υψηλής ευαισθησίας του στη διάκρισή του από τα τυπικά θραύσματα(cfDNA). Έχει προταθεί ότι τα αποτελέσματα από τις μεταλλάξεις του ctDNA μπορεί να υποδεικνύουν ένα πιο ακριβές προφίλ μετάλλαξης του όγκου σε πραγματικό χρόνο, σε σύγκριση με την αναδρομική μελέτη της σταθεροποίησης του ιστού με φορμαλίνη και/ή της ενσωμάτωσης σε παραφίνη του ιστού(FFPE), που εξαγεται από βιοψίες ή χειρουργικές επεμβάσεις, λόγω της απελευθέρωσης του καρκινικού DNA στην κυκλοφορία κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Leers, 2019). Επιπλέον, οι πληροφορίες που λαμβάνονται από την γονιδιωματική ανάλυση του ctDNA αφορούν την σταδιοποίηση και πρόγνωση της νόσου, την επιλογή στοχευμένων θεραπειών, την ελάχιστη επεμβατική παρακολούθηση της πορείας της νόσου και την αξιολόγηση της υπολειπόμενης νόσου μετά από θεραπευτική χειρουργική επέμβαση (Εικ.10) (Pinzani, et al, 2021).



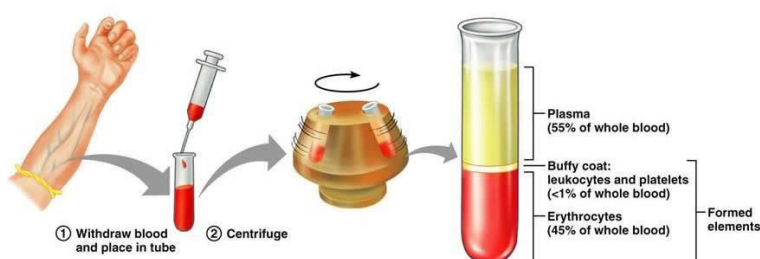
Εικόνα 10: Εφαρμογές ανάλυσης του ct-DNA κατά τη διάρκεια της διαχείρισης της νόσου α | Μία σχηματική χρονική πορεία για έναν υποθετικό ασθενή που υποβάλλεται σε χειρουργική επέμβαση(ή άλλη αρχική θεραπεία), έχει υποτροπή της νόσου και στη συνέχεια λαμβάνει συστηματική θεραπεία. Υποδεικνύονται οι πιθανές εφαρμογές υγρών βιοψιών κατά τη διάρκεια της περίθαλψης αυτού του ασθενούς. Ο ασθενής ξεκινά με μία μόνο εστίαση της νόσου, αλλά εμφανίζονται πολλές μεταστάσεις και διακριτοί κλώνοι(απεικονίζονται σε διαφορετικά χρώματα) μετά τη θεραπεία. β | Οι πληροφορίες

που εξάγονται από το ctDNA μπορούν να ταξινομηθούν, σε γενικές γραμμές, ως ποσοτικές πληροφορίες (δηλαδή, που σχετίζονται με το φορτίο του όγκου) ή γονιδιωματικές πληροφορίες. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του ctDNA σε ένα μόνο χρονικό σημείο μπορεί να επιτρέψει τη σταδιοποίηση και την πρόγνωση της νόσου και η γονιδιωματική ανάλυση μπορεί να υποδείξει την επιλογή των στοχευμένων θεραπειών. Επομένως, η διαμήκης ανάλυση επιτρέπει την ποσοτική παρακολούθηση του φορτίου του όγκου για την παρακολούθηση της απόκρισης στην θεραπεία, για παράδειγμα, και με σύγκριση των γονιδιωματικών προφίλ με την πάροδο του χρόνου, η κλωνική εξέλιξη μπορεί να παρακολουθείται ([Wan, et al, 2017](#)).

2.3.1.1. ΠΡΟΑΝΑΛΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΟΥ ctDNA-cfDNA

Το κυκλοφορούν DNA (τόσο το cf-DNA όσο και το ct-DNA) είναι ευάλωτο στην αποδόμηση λόγω του μικρού μεγέθους και της απλοϊκής δομής του. Αυτό μεγεθύνεται από την παρουσία δραστηριότητας νουκλεάσης (DNAse I ή II) στο αίμα, η οποία μπορεί να είναι έως και 100 × περισσότερη σε δείγματα ούρων ([Leers, 2019](#)).

Η ανάλυση του ctDNA από το πλάσμα έχει το πλεονέκτημα ότι η συλλογή δείγματος είναι απλή, καθώς έχει ενσωματωθεί στην κλινική ρουτίνα πολλών εργαστηρίων (Εικ.11).



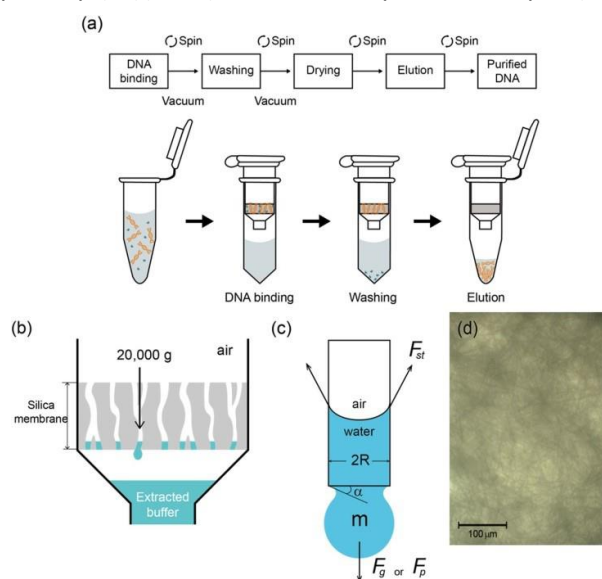
Ωστόσο, το ποσό του ctDNA στο πλάσμα επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως το

Εικόνα 11: Διαδικασία ανάλυσης ctDNA Περίπου 10mL αίματος ασθενών συλλέγονται σε ειδικά φιαλίδια (EDTA tubes) έτσι ώστε να φυγοκεντρηθούν και να αναλυθεί το αίμα σε πλάσμα και στα ερυθροκύτταρα ([Segura, et al, 2020](#)).

μέγεθος ή την θέση του όγκου, οι οποίοι μπορεί να περιορίσουν την ευαισθησία αυτής της προσέγγισης στον έλεγχο βιοδεικτών. Σωματικά υγρά, όπως υπεζωκοτική συλλογή (PE), εγκεφαλονωτιαία υγρό (CSF), ασκίτης (ASC) και περικαρδιακή συλλογή (PC), λαμβάνονται περιστασιακά από διάφορες κλινικές καταστάσεις, όπως π.χ. η υποτροπή του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα κατά τη διάρκεια της κλινικής διαχείρισης. Αν και η συλλογή είναι πιο επεμβατική από εκείνη του αίματος, το υπερκείμενο από άλλα σωματικά υγρά περιέχει περισσότερο ctDNA από το αντίστοιχο του πλάσματος, καθιστώντας τα πιο ευαίσθητα για τον καρκινικό φαινότυπο. Επιπλέον, η εγγύτητα ορισμένων σωματικών υγρών στην περιοχή του όγκου μπορεί να είναι χρήσιμη για τη λήψη μοριακών πληροφοριών από τοπικές μεταστάσεις, όπως αυτές στον εγκέφαλο, στον οποίο η ποσότητα του DNA που απελευθερώνεται στο αίμα είναι συνήθως πολύ χαμηλή ([Pérez-Barríos, et al, 2021](#)).

Προηγούμενη έρευνα έδειξε ότι η συγκέντρωση του cfDNA είναι υψηλότερη στον ορό από ότι στο πλάσμα για τα ίδια δείγματα αίματος, τα οποία έχουν αποδοθεί σε λύση των λευκοκυττάρων η οποία μπορεί να συμβεί κατά την πήξη. Η ποσότητα του φυσιολογικού DNA που αποκτήθηκε μέσω λύσης λευκοκυττάρων είναι πολύ χαμηλότερη στο πλάσμα, η οποία ελαχιστοποιείται περαιτέρω όταν το αίμα τοποθετείται σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν σταθεροποιητή λευκοκυττάρων. Το K₃EDTA είναι το προτιμώμενο αντιπηκτικό στον χειρισμό του ctDNA και μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατάλληλα σωληνάρια για διατήρησή του έως 6 ώρες πριν από την απομόνωση του πλάσματος. Προηγούμενη μελέτη έχει δείξει ότι η περίοδος επεξεργασίας μπορεί να παραταθεί έως 48 ώρες μέσω της χρήσης σωληνάρων σταθεροποίησης λευκοκυττάρων (π.χ. δοκιμαστικοί σωλήνες Streck ή CellSave) χωρίς να περιλαμβάνει ανίχνευση ή ποσοτικοποίηση του ctDNA. Αυτό έχει αποδειχθεί στο

πεδίο της ανάλυσης του cfDNA του εμβρύου από τους Hidestrand et al. (Hidestrand, et al, 2012). Δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά σε συγκέντρωση cfDNA για δείγματα που αποστέλλονται σε δοκιμαστικούς σωλήνες EDTA σε σύγκριση με εκείνους τους δοκιμαστικούς σωλήνες σταθεροποίησης των cfDNA λευκοκυττάρων που επέτρεψαν άμεση επεξεργασία. Ωστόσο, υπάρχουν επίσης στοιχεία ότι τα επίπεδα cfDNA σε δείγματα αίματος που εξήχθησαν από cfDNA δοκιμαστικούς σωλήνες συλλογής αίματος DNA™ παρέμειναν σταθερά έως 14 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτή η περίοδος σταθεροποίησης μειώθηκε όταν προήλθε αίμα από τη συλλογή σωληνών K₃EDTA. Η επίδραση της λύσης λευκοκυττάρων μπορεί να ελαχιστοποιηθεί με αφαίρεση του κυψελοειδούς διαμερίσματος μέσω οποιασδήποτε διήθησης ή φυγοκέντρωσης μόλις συλλεχθεί το αίμα. Αυτό γίνεται είτε εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο χαμηλής φυγοκέντρωσης ενός σταδίου είτε με συνδυασμένη προσέγγιση δύο βημάτων (χαμηλή ταχύτητα, ακολουθούμενη με υψηλή ταχύτητα). Μελέτες έχουν αναφέρει μια προτίμηση για το πρωτόκολλο δύο βημάτων, που απεικονίζεται στην Εικ.12. Μια πρόσφατη ανασκόπηση σχετικά με τις προ-αναλυτικές μεταβλητές για το ctDNA σημείωσε ότι ο αντίκτυπος της περιόδου αποθήκευσης και της θερμοκρασίας του μη επεξεργασμένου ολικού αίματος είναι μεταβλητή. Αφενός, η αποθήκευση κατεψυγμένου πλάσματος πριν από την απομόνωση DNA φαίνεται να μην επηρεάζει την επακόλουθη ανάλυση ctDNA, ενώ από την άλλη πλευρά, η αποικοδόμηση του DNA και η μείωση στην ανίχνευση του ctDNA μπορεί να προκύψει από πολλαπλούς κύκλους κατάψυξης-απόψυξης (Leers, 2019).



Εικόνα 12: Διαδικασία απομόνωσης cfDNA Το πλάσμα απομονώνεται μέσω πρωτόκολλου φυγοκέντρωσεων και με εμπορικά διαθέσιμα κιτ (silica membrane, magnetic beads) από περίπου 2-3 mL πλάσματος απομονώνεται τελικά το cfDNA (Lee, et al, 2018).

2.3.1.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΟΥ ctDNA

Το DNA απαιτεί περαιτέρω ανάπτυξη πολύ ευαίσθητων, προηγμένων τεχνολογιών μοριακής ανίχνευσης, καθώς και ειδικές για ctDNA μεθόδους απομόνωσης. Πρόσφατες εξελίξεις στην εξατομικευμένη διαχείριση του καρκίνου έχουν επιτευχθεί και έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στις υπερευαίσθητες για τον μοριακό χαρακτηρισμό μεθόδους, όπως τεχνολογίες NGS και PCR τρίτης γενιάς (π.χ. ddPCR) (Minji, et al, 2018). Ένα ευρύ φάσμα προσβάσιμων μοριακών τεχνικών υπάρχουν για την ανίχνευση και την ανάλυση διαφόρων μεταλλάξεων DNA. Αυτές κυμαίνονται από real time αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR) για τις κύριες μεταλλάξεις μέχρι μεθόδους στοχευμένης αλληλουχίας μετάλλαξης (Leers, 2019), οι οποίες μπορούν να ανιχνεύσουν χαμηλά επίπεδα cfDNA στο πλάσμα ή στον ορό και να αναγνωρίσουν σχετικές γενετικές αλλοιώσεις (Levy, et al, 2016).

Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων μεθόδων φαίνονται στον Πιν.2 και περιλαμβάνουν ψηφιακή αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με σταγονίδια PCR (ddPCR), ενίσχυση μαγνητικών σφαιριδίων-γαλακτώματος (BEAMing) (Leers, 2019), βαθιά αλληλούχηση και

ενίσχυση του πυρίμαχου συστήματος μεταλλάξεων (ARMS) (Levy, et al, 2016). Ένας περιορισμός αυτών των βασισμένων σε PCR μεθόδων είναι ότι μπορούν μόνο να εντοπίσουν κύριες μεταλλάξεις σε μικρό αριθμό γονιδίων και δεν μπορούν να αντιμετωπίσουν το πλήρες φάσμα των μεταλλάξεων που μπορεί να προκύψει από την απόκτηση αντίστασης λόγω στοχευμένης θεραπείας (Leers, 2019).

Πίνακας 2: Διαγνωστικές προσεγγίσεις για τον εντοπισμό γενετικών αλλοιώσεων (Levy, et al, 2016).

Method	Analysis	Allele-specific?	Sensitivity	Specificity
Quantitative PCR	Quantitative	No	High	Low (nontumor and tumor-derived DNA)
Sanger sequencing	Qualitative	Yes	Very low	High
Pyrosequencing	Qualitative	Yes	Low	Low
ARMS	Qualitative	Yes	Low	High
TAM-Seq	Qualitative	Yes	High	High
PNA clamp analysis	Qualitative	Yes	Low	High
Emulsion PCR (droplet digital PCR)	Qualitative	Yes	High	High
BEAMing	Qualitative	Yes	High	High
NGS	Quantitative and qualitative	No	High (varies depending on method)	High

Abbreviations: ARMS, amplification refractory mutation system; BEAMing, beads, emulsion, amplification, and magnetics; NGS, next-generation sequencing; PCR, polymerase chain reaction; PNA, peptide nucleic acid; TAM-Seq, tagged-amplification deep sequencing.

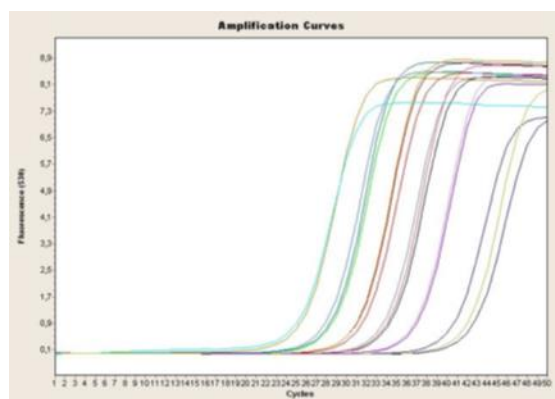
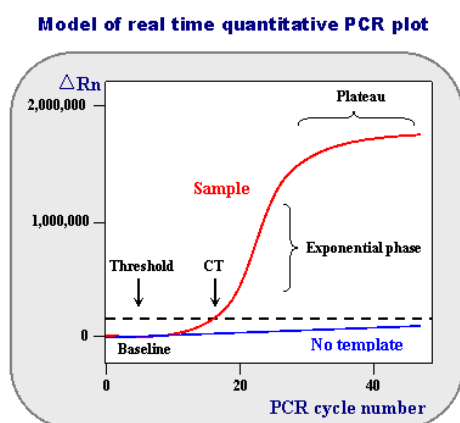
2.3.1.2.1. ΤΕΧΝΙΚΕΣ PCR

✓ PCR πραγματικού χρόνου (RT-PCR)

Η PCR πραγματικού χρόνου (qPCR) είναι μία ποσοτική μέθοδος, υπερευαίσθητη που μετρά την συγκέντρωση των προϊόντων της PCR στην εκθετική φάση. Επιτυγχάνει τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του RNA ενός συγκεκριμένου γονιδίου σε ένα δείγμα και έτσι μελετάται η γονιδιακή έκφραση και μετρά φθορισμό σε πραγματικό χρόνο κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, παρέχοντας πληροφορίες και για τη συγκέντρωση του DNA. Ο φθορισμός είναι ανάλογος της συγκέντρωσης του προϊόντος. Διαφέρει από το κλασικό PCR επειδή η ένταση του φθορίζοντος φωτός που εκπέμπεται από τους ανιχνευτές καταγράφεται σε κάθε κύκλο, ο οποίος επιτρέπει την εκτίμηση της ποσότητας του κάθε δείγματος με βάση τον αριθμό κύκλων που απαιτούνται για να ληφθεί ένα σήμα φθορισμού κατωφλίου (Rolfo, et al, 2018) (Εικ.13,14).

Στο πρώτο σύστημα PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR, R-T PCR) χρησιμοποιείται αφ' ενός βρωμιούχο αιθίδιο και αφ' ετέρου μια κάμερα CCD για την παρακολούθηση της εξέλιξης των αντιδράσεων ενίσχυσης μέσα σε ένα κλειστό σωλήνα αντίδρασης. Σήμερα, υπάρχουν αρκετοί ιχνηθέτες (ανιχνευτές ή εκκινήτες) και πολλές φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται στην R-T PCR. Οι παρεμβαλλόμενες σε δίκλωνο μόριο DNA (dsDNA) χρωστικές παρουσιάζουν ελάχιστο ή καθόλου φθορισμό όταν είναι "ελεύθερες" σε διάλυμα, ενώ δημιουργούν ποσοτική αύξηση του φθορισμού, όταν δεσμεύονται σε dsDNA.

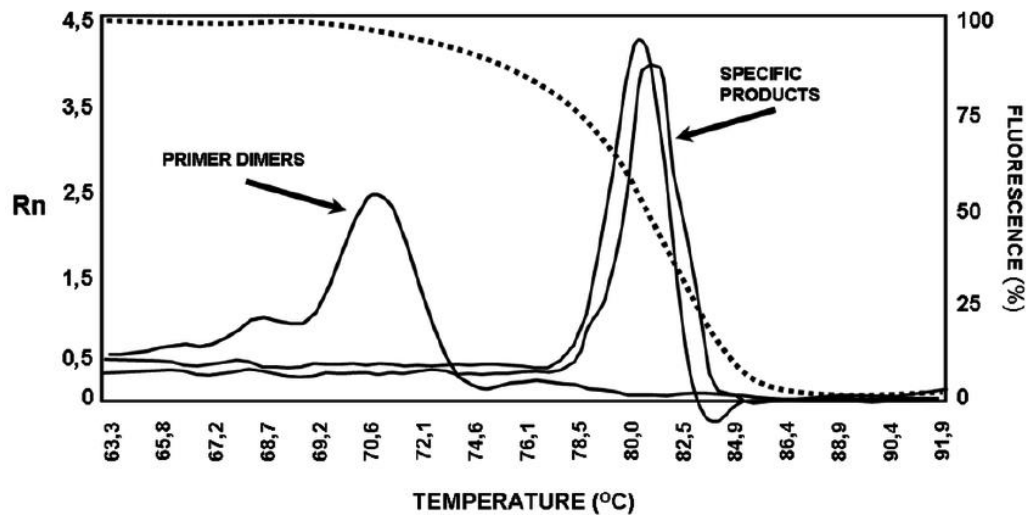
Η R-T PCR, σε αντίθεση με τη συμβατική PCR, επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του DNA μέσα σε ένα μεγάλο δυναμικό εύρος. Τα στάδια της ενίσχυσης και της ανάλυσης πραγματοποιούνται μέσα σε κλειστό σωλήνα, ώστε να μη χρειάζονται περαιτέρω τεχνικές ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού των προϊόντων ενίσχυσης (amplicons). Για τον ποσοτικό προσδιορισμό, η R-T PCR εκμεταλλεύεται την αναλογική σχέση του πρώτου κύκλου στον οποίο το προϊόν ενίσχυσης είναι σε ανιχνεύσιμη ποσότητα (threshold circle ή Ct) με τον αρχικό αριθμό των αντιγράφων του νουκλεϊκού στόχου (Κυριαζής, et al, 2013).



Εικόνα 13: Μοντέλο της ποσοτικής RT-PCR
Baseline: κύκλος PCR στον οποίο το σήμα βρίσκεται κάτω από τα όρια ανίχνευσης του μηχανήματος **Threshold:** Το σημείο στο οποίο ο φθορισμός αυξάνεται αισθητά πάνω από το υπόβαθρο. Το κατώφλι μπορεί να τοποθετηθεί οπουδήποτε στην εκθετική φάση **CT, Threshold Cycle:** Αριθμός κύκλου στον οποίο ο φθορισμός του προϊόντος φτάνει το επίπεδο φθορισμού κατωφλίου (NCBI, 2017).

Εικόνα 14 : Ανάλυση αποτελεσμάτων με καμπύλες ενίσχυσης ενός κύκλου αντίδρασης με φθορισμό Η ανίχνευση του σήματος σε πραγματικό χρόνο επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του αρχικού υλικού μετρώντας τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για την παραγωγή προϊόντος σε προκαθορισμένο επίπεδο. Η αρχική ποσότητα DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη με το Ct DNA: $A > B > C$ (Kang, 2017).

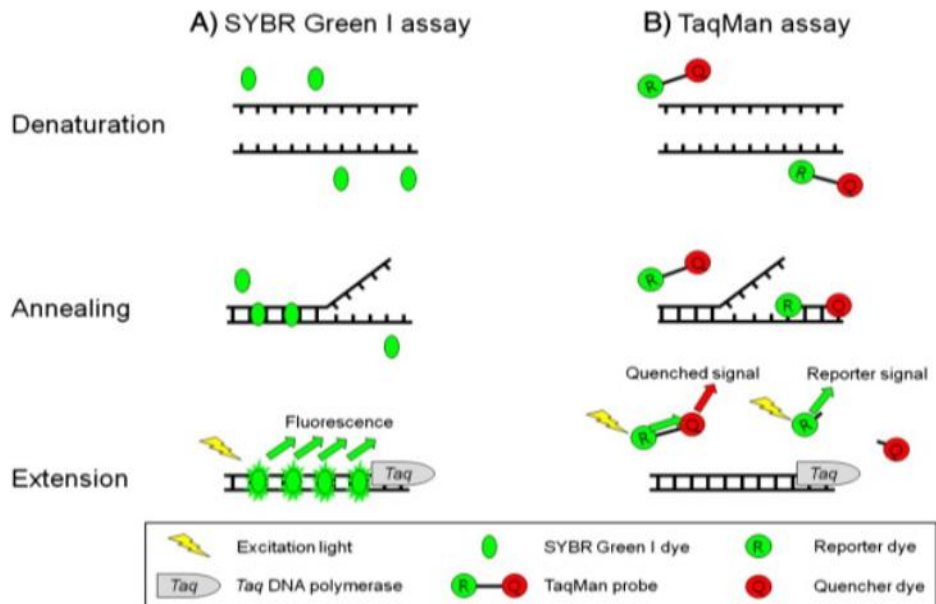
Η επαλήθευση της ενίσχυσης της ορθής αλληλουχίας μπορεί να επιτευχθεί με ανάλυση της καμπύλης τήξης του DNA. Σε περίπτωση χρησιμοποίησης παρεμβαλλόμενων χρωστικών, (οι χρωστικές δεσμεύονται στο δίκλωνο DNA και φθορίζουν) μετράται η κινητική της αποδιάταξης του ενισχυμένου θραύσματος, ώστε να αποτυπωθεί η κλίση της καμπύλης τήξης σε σχέση με τη θερμοκρασία που επιτρέπει την τήξη του προϊόντος. Στις περιπτώσεις χρήσης ιχνηθέτη(οι ιχνηθέτες υβριδοποίησης δεσμεύονται μόνο στο προϊόν της PCR και φθορίζουν, ενώ αυτοί που είναι ενσωματωμένοι σε εκκινητές σημαίνουν το προϊόν της PCR), τα υβρίδια αυτού με το προϊόν μπορούν να αναλυθούν με παρόμοιο τρόπο, μόνο που η θερμοκρασία τήξης προσδιορίζεται μέσω της αποδιάταξης του ιχνηθέτη από τον DNA-στόχο και όχι από τη θερμοκρασία τήξης του προϊόντος ενίσχυσης. Και στις δύο περιπτώσεις, η θερμοκρασία τήξης (T_m) είναι ανάλογη με το ποσοστό GC (γουανίνη-κυτοσίνη) στο εκάστοτε μελετώμενο δίκλωνο μόριο, από την απόλυτη σειρά των βάσεων στη μελετώμενη αλληλουχία και από το μήκος αυτής (Κυριαζής, et al, 2013)(Εικ.15).



Εικόνα 15: Melting Curve Analysis Ως θερμοκρασία τήξης ορίζεται η θερμοκρασία στην οποία το 50% του DNA μετουσιώνεται. Εκτός από την ποσοτική ανάλυση του προϊόντος της PCR, γίνεται και ποιοτική ανάλυση με βάση τη μελέτη της καμπύλης τήξης (melting curve analysis) που παρέχει πληροφορίες για το σημείο τήξης (T_m) των ενισχυμένων αλληλουχιών ([Castellanos, et al, 2013](#)).

Αναφορικά τα συστήματα ανίχνευσης της qPCR, όπως απεικονίζονται στην Εικ.16 είναι :

- DNA-specific (intercalating) dyes (SYBR Green)
- Hybridization probes (Cleavage-based assay: TaqMan Assays και Locked nucleic acids (LNA), Displaceable probe assays: molecular beacons και Dual-oligo FRET probes, Probes incorporated directly into the primers: Amplifluor & Scorpions) ([Dharmaraj, .](#)).



Εικόνα 16: qPCR συστήματα ανίχνευσης Το SYBR® Green είναι χρωστική δέσμευσης dsDNA που παρεμβάλλεται μη ειδικώς στο dsDNA, επιτρέποντας τη μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος PCR. Κατά την αποδιάταξη του DNA η χρωστική απελευθερώνεται και ο φθορισμός μειώνεται δραστικά. Στο στάδιο της επέκτασης, με την βοήθεια της Taq DNA πολυμεράσης, η χρωστική SYBR® δεσμεύεται σε όλα τα δίκλιωνα μόρια DNA, οπότε το αποτέλεσμα είναι μια αύξηση της έντασης φθορισμού ανάλογα με την ποσότητα του παραγόμενου προϊόντος PCR. Οι ανιχνευτές TaqMan είναι ολιγονουκλεοτίδια που έχουν μια φθορίζουσα χρωστική αναφοράς προσαρτημένη στο άκρο 5' και μια χρωστική σθέσης που συνδέεται με το άκρο 3'. Αυτοί οι ανιχνευτές έχουν σχεδιαστεί για υβριδισμό σε μια εσωτερική περιοχή ενός προϊόντος PCR. Στην μη υβριδισμένη κατάσταση, η εγγύτητα των μορίων φθορίου και σθέσης εμποδίζει την ανίχνευση σήματος φθορισμού από τον ανιχνευτή. Κατά τη διάρκεια της PCR, όταν η πολυμεράση αναπαράγει ένα εκμαγείο στο οποίο συνδέεται ένας ανιχνευτής TaqMan, η δραστηριότητα 5'-νουκλεάσης της Taq DNA πολυμεράσης διασπά τον ανιχνευτή. Αυτό αποσυνδέει τις χρωστικές φθορισμού και σθέσης και η FRET(μεταφορά ενέργειας συντονισμού φθορισμού) δεν συμβαίνει πλέον. Έτσι, η ένταση του φθορισμού αυξάνεται σε κάθε κύκλο, ανάλογα με την ποσότητα της διάσπασης του ανιχνευτή(Dharmaraj,)

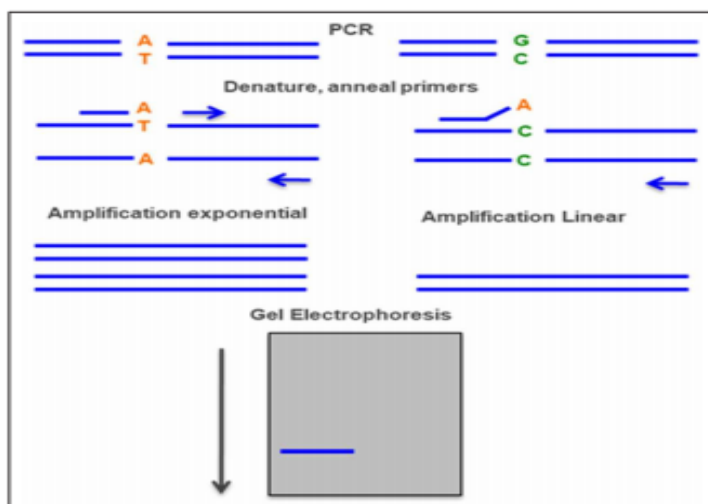
Έτσι, η συγκεκριμένη τεχνική (qPCR ή RT-PCR) συνεισφέρει σε μελέτες έκφρασης των γονιδίων, στον προσδιορισμό ιογενών και βακτηριακών φορτίων καθώς επίσης και στην διάκριση των αλληλομόρφων.

✓ ALLELE SPECIFIC PCR

Η allele-specific PCR βασίζεται στον υβριδισμό με ανιχνευτές ολιγονουκλεοτιδίων συγκεκριμένων αλληλομόρφων (ASO), οι οποίοι είναι βραχέα (συνήθως 19-21 νουκλεοτίδια) μονοκλωνικά τμήματα DNA με την συγκεκριμένη αλληλουχία κάθε πολυμορφικού ή μεταλλαγμένου νουκλεοτιδίου στο γονίδιο. Αυτοί οι ανιχνευτές συνήθως επισημαίνονται με φθορίζων χρωστικές. Το ενισχυμένο από PCR DNA είναι διακεκομμένο σε φίλτρα και υβριδοποιείται με τους ανιχνευτές που αντιστοιχούν στις φυσιολογικές και μεταλλαγμένες αλληλουχίες για κάθε μία από τις συχνές γονιδιακές μετατροπές (ταυτοποίηση των μεταλλάξεων στα εξώνια 18-21 του γονιδίου EGFR (συνολικά 42 μεταλλάξεις). Επιπλέον, πραγματοποιείται και ποιοτική ανίχνευση(Pignatelli, et al, 2019). Η κυριότερη υποκατηγορία της ALLELE SPECIFIC PCR που αξίζει να αναφερθεί είναι η ARMS PCR:

✓ ARMS PCR (Amplification Refractory Mutation System)

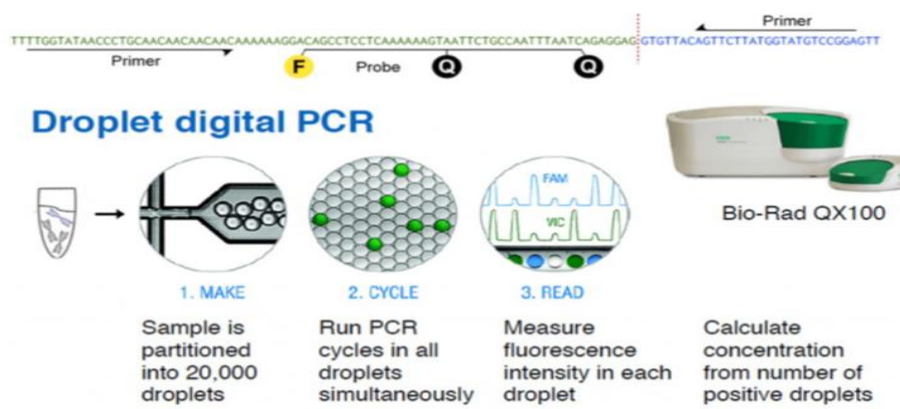
Στην ARMS PCR γίνονται δύο εναλλακτικές αντιδράσεις για κάθε μία παθολόγο παραλλαγή. Και οι δύο αντιδράσεις χρησιμοποιούν τον ίδιο εκκινητή στο ένα άκρο αλλά στο άλλο άκρο κάθε αντίδραση χρησιμοποιεί έναν εκκινητή ο οποίος αντιστοιχεί είτε στην κανονική είτε στην μεταλλαγμένη αλληλουχία(3' άκρο) συνεπώς πραγματοποιείται ενίσχυση μόνο στην περίπτωση ύπαρξης μετάλλαξης(Εικ.17). Επίσης, χρησιμοποιείται η Taq polymerase, η οποία δεν λειτουργεί ως εξωνουκλεάση 5'-3'(Pignatelli, et al, 2019).



Εικόνα 17 : Η τεχνική της ARMS PCR Στην τεχνική της ARMS PCR, οι δύο αντιδράσεις πραγματοποιούνται ταυτόχρονα, με τον ίδιο εκκινητή (primer) στο ένα άκρο και δύο διαφορετικούς εκκινητές (primer) στο άλλο άκρο, εκ των οποίων ο ένας αντιστοιχεί στην φυσιολογική ακολουθία και ο άλλος στην μεταλλαγμένη (3' άκρο). Το ποσοστό της ενίσχυσης είναι πολύ υψηλότερο με τον συγκεκριμένο εκκινητή και μπορεί να ανιχνευθεί από ηλεκτροφόρηση πηκτής ([Pignatelli, et al, 2019](#)).

✓ DROPLET DIGITAL PCR

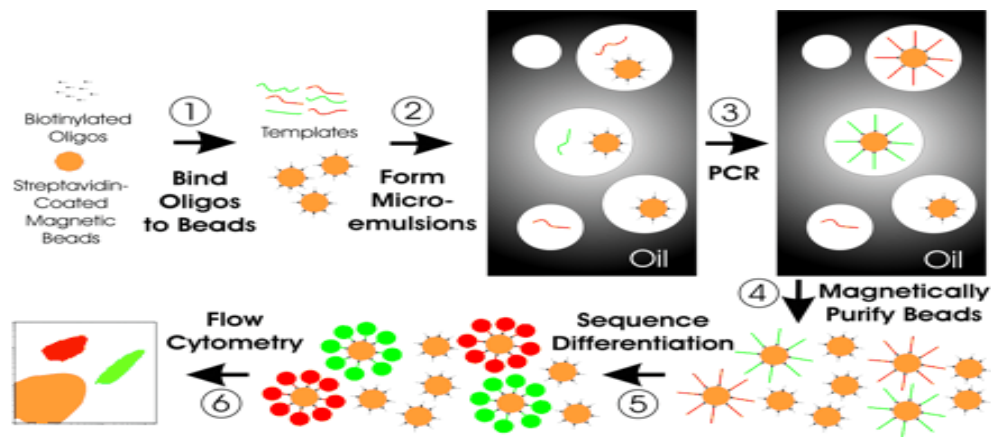
Η ddPCR είναι μια μέθοδος που βασίζεται σε γαλάκτωμα δείγματος και κλασμάτωση σε σταγονίδια, που ξεπερνά την ακρίβεια του κλασικού PCR. Συγκεκριμένα, το ddPCR λειτουργεί μέσω τεχνολογίας chip που χωρίζει το δείγμα με τρόπο έτσι ώστε κάθε σταγονίδιο να έχει 1 ή 0 μόρια DNA για να ενισχυθεί. Καταγράφοντας το σήμα από κάθε σταγονίδιο αποκαλύπτει μια αναλογία θετικών και αρνητικών σταγονιδίων, και χρησιμοποιώντας τη διανομή Poisson, επιτρέπει μια εκτίμηση της αρχικής αναλογίας μεταλλαγμένου προς WT DNA. Αυτή η ποσοτικοποίηση θεωρείται πιο ακριβής από αυτή που εκτελείται με qPCR ([Rolfo, et al, 2018](#)) (Εικ.18).



Εικόνα 18: Η τεχνική της droplet digital PCR Στην τεχνική αυτή, αρχικά το δείγμα διαχωρίζεται σε χιλιάδες σταγονίδια. Στην συνέχεια πραγματοποιούνται ταυτόχρονα οι κύκλοι της PCR για όλα τα σταγονίδια και μετράται η ένταση του φθορισμού κάθε σταγονιδίου. Τέλος, υπολογίζεται η συγκέντρωση από τον αριθμό των θετικών σταγονιδίων ([TADEO, 2016](#)).

✓ BEAMING

Η BEAMing (ενίσχυση μαγνητικών σφαιριδίων-γαλακτωμάτων) βασίζεται στις ίδιες αρχές του ddPCR αλλά με πρότυπα δείγματα DNA συνδεδεμένα σε μαγνητικά μικροσφαιρίδια πριν από τον σχηματισμό μικρογαλακτώματος. Μετά την ενίσχυση αυτών, χιλιάδες αντίγραφα DNA επικαλύπτουν κάθε σφαιρίδιο. Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια μπορεί να απομονωθούν μέσω φυγοκέντρησης ή μέσω καθαρισμού με μαγνήτη. Η ποσότητα του ενισχυμένου DNA που περιέχει μια συγκεκριμένη μετάλλαξη που μας ενδιαφέρει είναι αρκετή για να επιτρέψει την ακριβή ποσοτικοποίησή του. Εν τέλει, χρησιμοποιείται είτε οπτική σάρωση είτε κυτταρομετρία ροής για τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA στα σφαιρίδια. Αυτό το DNA μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω αλληλούχηση με μεθόδους υψηλής απόδοσης. Αν και αυτή η τεχνική είναι πιο ευαίσθητη από την qPCR, η χρήση της BEAMing συνεπάγεται υψηλό κόστος που μπορεί να μην είναι εφικτό στην καθημερινότητα. Επίσης, η καμπύλη μάθησης για αυτή την τεχνική είναι απότομη (Rolfo, et al, 2018) (Εικ.19).



Εικόνα 19 : Η τεχνική BEAMING Βήμα 1: Μαγνητικά σφαιρίδια επικαλυμμένα ομοιοπολικά με στρεπταβιδίνη δεσμεύονται σε βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια (ολιγο). Βήμα 2: Ένα υδατικό μείγμα που περιέχει όλα τα απαραίτητα συστατικά για PCR συνδεδεμένα με σφαιρίδια εκκινητές και πρότυπο δείγμα DNA αναδεύεται μαζί με ένα μείγμα ελαίου / απορρυπαντικού για τη δημιουργία μικρογαλακτωμάτων. Τα υδατικά διαμερίσματα (λευκοί κύκλοι στο γκρι στρώμα λαδιού) περιέχουν κατά μέσο όρο λιγότερο από ένα μόριο εκμαγείου και λιγότερο από ένα σφαιρίδιο. Τα κόκκινα και πράσινα πρότυπα αντιπροσωπεύουν δύο μόρια προτύπων, οι αλληλουχίες των οποίων διαφέρουν από ένα ή πολλά νουκλεοτίδια. Βήμα 3: Τα μικρογαλακτώματα έχουν κύκλο θερμοκρασίας όπως σε ένα συμβατικό PCR. Εάν ένα πρότυπο DNA και ένα σφαιρίδιο υπάρχουν μαζί σε ένα μόνο υδατικό διαμέρισμα, τα ολιγονουκλεοτίδια που συνδέονται με σφαιρίδια δρουν ως εκκινητές για ενίσχυση. Οι ευθείες κόκκινες και πράσινες γραμμές που συνδέονται με τα σφαιρίδια αντιπροσωπεύουν προϊόντα επέκτασης από τα δύο διαφορετικά είδη προτύπων. Βήμα 4: Τα γαλακτώματα είναι διαχωρισμένα και τα σφαιρίδια καθαρίζονται με μαγνήτη. Βήμα 5: Μετά την μετουσίωση, τα σφαιρίδια επάγονται με ολιγονουκλεοτίδια που μπορούν να διακρίνουν μεταξύ των αλληλουχιών των διαφορετικών ειδών προτύπων. Στη συνέχεια χρησιμοποιούνται αντισώματα σημασμένα με φθορισμό για την επισήμανση των δεσμευμένων ανιχνευτών υβριδοποίησης, που καθιστούν τα σφαιρίδια που περιέχουν προϊόν PCR ως κόκκινα ή πράσινα μετά από κατάλληλη διέγερση με λέιζερ. Βήμα 6: Η κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιείται για να μετρήσει τα κόκκινα και πράσινα σφαιρίδια (Nayak, et al, 2007).

2.3.1.2.2. ΤΕΧΝΙΚΕΣ NGS

Οι προσδιορισμοί που βασίζονται σε PCR που περιγράφονται μέχρι στιγμής στοχεύουν μόνο μία έως τρεις θέσεις σε ένα προκαθορισμένο γονίδιο, αλλά αποτυγχάνουν το multiplex σε πολλά γονίδια και τον εντοπισμό πιο πολύπλοκων γονιδιωματικών αλλαγών, όπως γονίδια σύντηξης. Η αλληλουχία επόμενης γενιάς (NGS) είναι μια μέθοδος αλληλουχίας υψηλής απόδοσης που μπορεί ταυτόχρονα να ανιχνεύσει μεταβλητές περιοχές του γονιδιώματος και να ανιχνεύσει σωματικές μεταλλάξεις, συμπεριλαμβανομένων παραλλαγές απλού νουκλεοτιδίου (SNV), παραλλαγές αριθμού αντιγράφων (CNV), εισαγωγές / διαγραφές ή συντήξεις γονιδίων([Guibert, et al, 2020](#)).

Ξεκινώντας το 2005, η αλληλούχηση επόμενης γενιάς (NGS) επέτρεψε μια ολοκληρωμένη περιγραφή του γονιδιώματος του καρκίνου με πρωτοφανή ένταση. Συνεργατικά έργα όπως το The Cancer Genome Atlas (TCGA) και το International Cancer Genome Consortium (ICGC) έχουν χαρακτηρίσει γενετικές ανωμαλίες πολλαπλών καρκίνων χρησιμοποιώντας NGS, χρησιμοποιώντας τις γνώσεις για τη γονιδιωματική του καρκίνου για να επιταχύνουν τις ανακαλύψεις των αιτιών καρκίνου και για να βελτιώσουν την διάγνωση και θεραπεία. Εκτός αυτού, αναδυόμενες τεχνικές εξελίξεις έχουν καταστήσει το κόστος του NGS να μειωθεί δραματικά και να φτάσει στο σημείο όπου ένα ολόκληρο ανθρώπινο γονιδίωμα θα μπορούσε να υποβληθεί σε αλληλούχηση για λιγότερο από 1000 \$, αυξάνοντας την προσβασιμότητά του σε ερευνητές([Zhang, et al, 2017](#)). Έτσι, η αλληλούχηση επόμενης γενιάς (NGS) γίνεται ολοένα και πιο διαδεδομένη, λόγω της μείωσης του χρόνου(βελτίωση ταχύτητας και ακρίβειας) και των χρημάτων που χρειάζεται είτε για την αναγνώριση συγκεκριμένων γονιδιακών αλληλουχιών είτε για την αλληλουχία ολόκληρου του γονιδιώματος ενός ασθενούς. Η ικανότητα αποτελεσματικότερης δημιουργίας γενετικών δεδομένων προωθεί τις γνώσεις για τη γονιδιωματική του καρκίνου αποκαλύπτοντας πιο γρήγορα άγνωστες στο παρελθόν γενετικές παραλλαγές που σχετίζονται με αυτόν. Ερευνητικά προγράμματα μεγάλης κλίμακας, συμπεριλαμβανομένων αυτών που χρησιμοποιούν NGS, έχουν ήδη εντοπίσει ένα σημαντικό αριθμό μεταλλάξεων ή άλλων μοριακών αλλαγών σε διαφορετικούς καρκίνους που θα μπορούσαν να είναι πιθανοί βιοδείκτες για νέα διαγνωστικά τεστ και στόχοι για νέες θεραπείες και φάρμακα. Επιπλέον απαιτείται έρευνα για τον προσδιορισμό της σημασίας και το δυναμικό καθενός από αυτούς τους βιοδείκτες([Van Meter, et al, 2016](#)).

Ο όρος αλληλούχηση επόμενης γενιάς (NGS) – επίσης αναφέρεται ως αλληλούχηση υψηλής απόδοσης - περιλαμβάνει διάφορες πλατφόρμες που εντοπίζουν την αλληλουχία του νουκλεϊκού οξέος μέσω ενός μεγάλου αριθμού παράλληλων ενδείξεων και επακόλουθη ευθυγράμμιση αυτών με πρότυπο γονιδιωματικής αναφοράς. Για παράδειγμα, η βαθιά αλληλούχηση εκτελεί δεκάδες χιλιάδες των αναγνώσεων του ίδιου σκέλους και μπορεί να χρησιμοποιήσει στατιστικές προσεγγίσεις για να ελέγξει μια μετάλλαξη και να ορίσει τη συχνότητά της. Μεταλλάξεις μίας βάσης, μικρές εισαγωγές και διαγραφές, μεγάλες γονιδιωματικές διαγραφές ή ενισχύσεις και αναδιατάξεις, όπως οι αντιστροφές και οι μετατοπίσεις, μπορεί να είναι όλες πιθανές για να εντοπιστούν με NGS. Αυτή η μεθοδολογία μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην αλληλούχηση ολόκληρων γονιδιωμάτων, ολόκληρων εξωμάτων, ή τμημάτων από λίγες έως εκατοντάδες στοχευμένες περιοχές εξονίων ή ιντρονίων. Τα στοχευμένα πλαίσια έχουν τα πλεονεκτήματα της υψηλότερης απόδοσης, καλύτερης ευαισθησίας, αποτελεσματικής χρήσης περιορισμένου DNA, χαμηλότερου κόστους ανά αναλύσεις και ενός ευρύτερου φάσματος ανίχνευσης μετάλλαξης. Γενικότερα, για στοχευμένα πλαίσια υπάρχουν δύο τύποι εμπλουτισμού στόχου: 1) η υβριδική σύλληψη, η οποία ανιχνεύει ολόκληρη την κωδικοποιημένη ακολουθία ογκογόνων και γονιδίων

καταστολής όγκων και τα ιντρόνια επιλεγμένων γονιδίων και παρέχει πληροφορίες για τις αλλαγές ολόκληρου του φάσματος του DNA και 2) PCR, η οποία έχει σχεδιαστεί ως μέθοδος για κύριες μεταλλάξεις, δηλαδή προσδιορισμό αλληλουχίας σε προκαθορισμένες περιοχές γονιδίων. Η δεύτερη προσέγγιση έχει υψηλή ευαισθησία για μεταλλάξεις αλλά χαμηλότερη για μικρές εισαγωγές ή διαγραφές και συνήθως δεν ανιχνεύει αντίγραφα αριθμών (ενισχύσεις και διαγραφές) και συντήξεις γονιδίων, σε αντίθεση με άλλες προσεγγίσεις NGS (Rolfo, et al, 2018). Η αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS), λόγω της μαζικά “παράλληλης” φύσης της, επιτρέπει την ταυτόχρονη αλληλούχιση πολλών εκατομμυρίων μεμονωμένων μορίων DNA. Αυτό παρέχει στους επιστήμονες και στους κλινικούς ιατρούς τόσο εξαιρετική ευαισθησία όσο και ειδικότητα για την ανίχνευση μεταλλαγμένου DNA σε στερεούς ιστούς και σε σωματικά υγρά (Murray, 2011).

Έτσι, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι που βασίζονται στο NGS και στη συνέχεια επικυρώθηκαν για ανίχνευση μετάλλαξης του ctDNA σε ασθενείς με NSCLC. Δύο από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες πλατφόρμες αλληλούχισης είναι η Illumina (Σαν Ντιέγκο, Καλιφόρνια), η οποία χρησιμοποιεί χημεία για την σύνθεση της αλληλουχίας του DNA και ταυτόχρονα αναγνωρίζει βάσεις DNA, ενώ τις ενσωματώνει σε κλώνο νουκλεϊκού οξέος, μέσω οπτικής απεικόνισης τεσσάρων χρωμάτων των νουκλεοτιδίων με φθορισμό, και η Torrent (ThermoFisher Scientific, Waltham, Μασαχουσέτη), που χρησιμοποιεί επίσης χημεία για την σύνθεση της αλληλουχίας του DNA αλλά αντί να χρησιμοποιεί οπτικά σήματα, χρησιμοποιεί ημιαγωγό για τη μέτρηση της μεταβολής του pH λόγω της απελευθέρωσης ενός H₂ μετά την προσθήκη ενός νουκλεοτιδίου. Υπάρχουν διακρίσεις μεταξύ των δύο πλατφορμών που ο χρήστης πρέπει να γνωρίζει, όπως αναφορές σφαλμάτων ανάγνωσης pH και υψηλότερο ποσοστό σφαλμάτων αλληλούχισης με την Ion Torrent σε σχέση με την πλατφόρμα Illumina. Επιπλέον, η προετοιμασία της βιβλιοθήκης είναι κρίσιμη για την ακρίβεια και την ικανότητα για την ανίχνευση συντήξεων και μικρών εισαγωγών ή διαγραφών επομένως, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να πραγματοποιήσει τεχνικές μελέτες επικύρωσης για να προσδιορίσει το κατώτερο όριο ανίχνευσης και να λάβει υπόψη το πλεονέκτημα / μειονέκτημα κάθε τεχνολογίας. Συγκεκριμένα, τα κέντρα Medicare και Medicaid Services πρόσφατα δημοσίευσαν ένα άρθρο που υποστηρίζει τη χρήση του NGS στην καθημερινή κλινική πρακτική (Rolfo, et al, 2018).

Ανεξάρτητα από την πλατφόρμα που χρησιμοποιείται, η μέθοδος NGS χαρακτηρίζεται από τέσσερα στάδια: δημιουργία μιας σύντομης βιβλιοθήκης DNA θραύσματος, ενίσχυση θραύσματος ενός μόνο κλώνου, μαζική παράλληλη αλληλούχιση και ανάλυση δεδομένων (Malapelle, et al, 2016). Έτσι, πολλές μεγάλες φαρμακευτικές εταιρείες διερευνούν τη σκοπιμότητα χρήσης NGS για την ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων σε γονίδια όπως τα TP53, KRAS και EGFR στο cfDNA, ως υποκατάστατα δείκτες για την παρουσία όγκου. Επιπλέον, η τεράστια ικανότητα αυτής της τεχνικής επιτρέπει την πολυπλεξία, έτσι ώστε πολλά γονίδια με σημαντικές μεταλλάξεις να μπορούν να αλληλουχηθούν ταυτόχρονα (Murray, 2011).

Ακόμα, το NGS έχει τρία μεγάλα πλεονεκτήματα έναντι της πρώτης γενιάς αλληλουχίας Sanger. Το σημαντικότερο είναι η υψηλή απόδοση του, κάνοντας δοκιμές χιλιάδων γονιδίων ή ακόμη και ολόκληρου του γονιδιώματος. Επιπροσθέτως, επιδεικνύει εξαιρετική επίδοση στους ελέγχους με συμβατότητα DNA χαμηλού ρυθμού και φαίνεται να είναι πιο οικονομικά αποδοτικό σε μαζικά παράλληλη αλληλούχιση (Zhang, et al, 2017).

Τέλος, μία πρόσφατη μελέτη των Paweletz et al. (Paweletz, et al, 2016) ανέφεραν ότι η NGS θα μπορούσε να εντοπίσει μεταλλάξεις που υπάρχουν σε αραιώσεις DNA σε 0,4% αλληλική

συχνότητα με 100% ευαισθησία/ειδικότητα χρησιμοποιώντας μια πλατφόρμα αλληλουχίας επιτραπέζιου υπολογιστή([Mamdani, et al, 2017](#)).

Μία από τις σημαντικότερες τεχνικές προκλήσεις που χρειάζεται να ξεπεραστεί, ανεξάρτητα από την επιλεγμένη μέθοδο, είναι η ανίχνευση και η αναγνώριση του μεγάλου εύρους μεταλλάξεων στο ctDNA, λόγω του ότι αντικατοπτρίζει μόνο μια μικρή ποσότητα του συνολικού cfDNA(<1,0%). Καθώς η ποσότητα του ctDNA προσεγγίζει το όριο ανίχνευσης των διαθέσιμων μεθόδων, μειώνεται η εμπιστοσύνη στην ύπαρξη βασικών αλλαγών. Αυτό πρέπει να ληφθεί υπόψη κατά την ερμηνεία των κλινικών ελεγχών του cfDNA. Οι ευαίσθητες και ειδικές μέθοδοι που αναπτύχθηκαν κατά το παρελθόν επιτρέπουν την ανίχνευση και απαρίθμηση μοναδικών μεταλλαγμένων παραλλαγών στα σύνθετα μίγματα DNA. Μία πολλά υποσχόμενη καινοτομία πρόσφατα προτάθηκε από την ομάδα του De Carvalho. Αναπτύχθηκε ένα ευαίσθητο, βασισμένο σε ανοσοκαθίζηση πρωτόκολλο για την ανάλυση του πρότυπου της μεθυλίωσης των μικρών ποσοτήτων cfDNA. Το πρωτόκολλο αυτό μπορεί επίσης να διακρίνει μεταξύ των καρκινοπαθών και των υγιών ατόμων χρησιμοποιώντας μεγάλης-κλίμακας πρότυπα μεθυλίωσης του DNA, τα οποία έχουν εμπλουτιστεί με ειδικά ογκογονικά τμήματα. Ένα άλλο τεχνικό εμπόδιο που πρέπει να ξεπεραστεί είναι ότι η απαιτούμενη ευαισθησία δεν έχει εισαχθεί ακόμα σε διάφορες μεθόδους που βασίζονται στην ανίχνευση μεταλλάξεων ctDNA. Ακόμη και με πολύ ευαίσθητες τεχνικές που σχετίζονται με την ανίχνευση ctDNA, το συνολικό αποτέλεσμα περιορίζεται από τα εγγενή προβλήματα που προκαλούνται από την ανεπαρκή ποσότητα αντιγράφων DNA που είναι διαθέσιμα για ανάλυση([Leers, 2019](#)).

Πολλά αποτελέσματα πάσχουν από στατιστικά λάθη δειγματοληψίας και μία μείωση στον αριθμό των κλινικά σχετικών στόχων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν όταν υπάρχουν μόνο μερικά νανογραμμάρια κυκλοφορούντος DNA είναι διαθέσιμη. Η ανεπάρκεια των υλικών λειτουργεί ως “glass ceiling” στην υγρή βιοψία επειδή, ακόμη και με βελτιώσεις στην ευαισθησία των μοριακών τεχνικών ανάλυσης, αυτές δεν μπορεί να ξεπεράσουν τους περιορισμούς από την εισαγωγή του DNA. Υπάρχουν μέθοδοι που λειτουργούν ως επίλυση αυτού του ζητήματος. Για παράδειγμα, η duplex PCR, όπου αναλύονται δύο στόχοι ανά αντίδραση, και η προ-ενίσχυση δείγματος επιτρέπει και την αύξηση του αριθμού των δοκιμών που θα πραγματοποιηθούν ενώ ταυτόχρονα μειώνει το προαπαιτούμενο μέγεθος του δείγματος. Τέλος, η επιλογή του σωστού πάνελ συγκεκριμένων καρκινικών γονιδιωματικών παρεκκλίσεων είναι ζωτικής σημασίας και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την κλινική του εφαρμογή. Για παράδειγμα, όταν χρησιμοποιείται για τον έλεγχο καρκινοπαθών ή για την έγκαιρη ανίχνευση ασθένειας σε “υγιή” άτομα, οι γονιδιωματικές παρεκκλίσεις σε έναν ασθενή είναι άγνωστες([Leers, 2019](#)).

2.3.2. Ριβονουκλεϊκό οξύ(Ribonucleic acid-RNA)

Το κλάσμα του ελεύθερου κυκλοφορούντος κυτταρικού RNA που προέρχεται από καρκινικά κύτταρα αναφέρεται ως ctRNA. Η ύπαρξη εξωκυτταρικού RNA τεκμηριώθηκε για πρώτη φορά το 1978 και η πρώτη αναφορά ως πιθανός βιοδείκτης καρκίνου δημοσιεύθηκε αρκετά χρόνια αργότερα. Σε σύγκριση με το DNA, το RNA είναι ένα σχετικά ασταθές μόριο, ο χρόνος ημιζωής του οποίου είναι στο πλάσμα 15 δευτ. Η σταθερότητα ενισχύεται από τη συσχέτιση του με τις πρωτεΐνες, με τα σύμπλοκα πρωτεολιπιδίων και με τα εξωσώματα([De Rubis, et al, 2019](#)).

Σχεδόν όλοι οι γνωστοί υπότυποι του RNA έχουν βρεθεί σε συστηματική κυκλοφορία και, σε κάποιο βαθμό ο καθένας έχει τη δυνατότητα να χρησιμεύσει ως βιοδείκτης καρκίνου.

Παρόμοια με άλλα συστατικά του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, το ctRNA είναι μια πηγή ποσοτικών και ποιοτικών πληροφοριών. Στην πραγματικότητα, αν και τα προφίλ έκφρασης κωδικοποιητικών και ncRNAs αντιπροσωπεύουν την πιο σημαντική πηγή πληροφοριών, ο προσδιορισμός των ειδικών για τον όγκο αντιγράφων σύντηξης ή εναλλακτικών συμβάντων ματίσματος είναι επίσης δυνατός. Οι πιο σημαντικές κατηγορίες ctRNA ενδεχομένως κατάλληλες ως βιοδείκτες είναι τα mRNAs, τα miRNAs, και τα μακρά ncRNAs (lncRNAs) ([De Rubis, et al, 2019](#)). Το 1996, η ανίχνευση της κυκλοφορίας των mRNAs περιγράφηκε για πρώτη φορά στο αίμα των ασθενών με μελάνωμα, και αμέσως μετά, οι υπόλοιπες μορφές RNA (miRNA και lncRNAs) ταυτοποιήθηκαν στην κυκλοφορία ασθενών με συμπαγείς καρκίνους ([Siravegna, et al, 2017](#)).

Η ανάλυση όλων των RNA πραγματοποιείται με τεχνικές που κυμαίνονται από qRT-PCR ή dPCR μεμονωμένων ή μικρών πλασίων RNAs σε RNASeq για τον ολοκληρωμένο χαρακτηρισμό των RNA (ειδικά miRNAs). Το κυκλοφορούν εξωσωμικό mRNA έχει χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση της μεταλλαγμένης κατάστασης των KRAS και BRAF σε ασθενείς με CRC και το εξωσωματικό EGFRvIII mRNA έχει πιθανότητα διάγνωσης από θετικά EGFRvIII υψηλής ποιότητας γλοιώματα. Σε μια άλλη αναφορά, η ανίχνευση ανδρογόνων παραλλαγής ματίσματος υποδοχέα 7 (AR-V7) σε πλασμικά εξωσώματα με ddPCR αποδείχθηκε καλή στην πρόβλεψη αντοχής στην ορμονική θεραπεία στον καρκίνο του προστάτη. Πολλοί καρκίνοι του πνεύμονα που σχετίζονται με γονιδιακές συγχωνεύσεις αναγνωρίζονται επίσης εύκολα τόσο σε κυστιδιακό όσο και σε μη κυτταρικό mRNA και έχουν αξία ως βιοδείκτες. Μεταξύ του μη κυτταρικού κλάσματος των ctRNAs, η αντίστροφη μεταγραφάση της τελομεράσης στους ανθρώπους (hTERT, καταλυτική υπομονάδα του συμπλόκου τελομεράσης) του mRNA έδειξε μεγαλύτερη διαγνωστική και προγνωστική ακρίβεια από το PSA για καρκίνο του προστάτη. Όσον αφορά τα miRNAs, τα επίπεδα εξωσωμικών miR-196a και miR-1246 στο πλάσμα έχουν τη δυνατότητα για την έγκαιρη διάγνωση των καρκίνων του παγκρέατος, και έχει αποδειχθεί ότι τα πλαίσια των miRNA είναι αξιόπιστοι βιοδείκτες για τη διάγνωση ή την πρόγνωση του καρκίνου του πνεύμονα. Πιο πρόσφατα, το εξωσωμικό miRNA του ορού αποδείχθηκε ότι ήταν ένα καινοτόμο εργαλείο για την διαφορική διάγνωση γλοιωμάτων. Μια νέα πολλά υποσχόμενη πηγή βιοδεικτών RNA είναι τα lncRNAs. Για παράδειγμα, εξωσώματα πλάσματος σε επίπεδα LINC00152 έχουν συνδεθεί με καρκίνο του στομάχου και ο συνδυασμός δύο mRNA και ενός lncRNA σε εξωσώματα ορού έχει διαγνωστικό δυναμικό για CRC. Επιπλέον, ο εξωσωμικός ορός HOTAIR lncRNA έχει δυνατότητα εφαρμογής στη διάγνωση και την πρόγνωση πολλαπλών μορφών του γλοιοβλαστώματος. Πιο πρόσφατα, ένα πλαίσιο από πέντε κυκλοφορούντα lncRNAs μελετήθηκαν ως πολλά υποσχόμενα διαγνωστικοί βιοδείκτες για τον καρκίνο του στομάχου ([De Rubis, et al, 2019](#)).

Μέχρι σήμερα, οι εκδηλώσεις του cfRNA στο κλινικό περιβάλλον είναι επί του παρόντος ασαφείς ([Siravegna, et al, 2017](#)), ενώ οι πιο σημαντικοί περιορισμοί στην εφαρμογή των ctRNAs στο κλινικό περιβάλλον περιλαμβάνουν τα προαναλυτικά και τα αναλυτικά βήματα. Αν και τα κυκλοφορούντα RNA προφυλάσσονται λόγω της σύνδεσής τους με διαφορετικά μόρια και δομές, είναι ασταθή στο πλάσμα εάν φυλάσσονται σε 4°C, και περιορίζονται από την ταχύτητα εξαγωγής. Επιπλέον, διαφορετικά πρωτόκολλα εξαγωγής έχουν διαφορετικούς ρυθμούς ανάκτησης και προς το παρόν δεν υπάρχει συναίνεση για ένα βέλτιστο πρωτόκολλο εξαγωγής. Και πάλι, οι συσκευές lab-on-a-chip φαίνεται να προσφέρουν μια πιθανή λύση σε αυτό το ζήτημα, επιτρέποντας γρήγορο και ολοκληρωμένο καθαρισμό και ανάλυση των δειγμάτων ελαχιστοποιώντας ταυτόχρονα τον χειρισμό τους. Μια απόδειξη της έννοιας αυτού είναι η μικροσυσκευή που αναπτύχθηκε από τους Potrich et al. ([Potrich, et al, 2014](#)), η

οποία είναι ικανή να εκχυλίζει επιλεκτικά miRNAs από υπερκείμενα κυτταροκαλλιέργειας και να επιτρέπει in situ αντίστροφη μεταγραφή και ανάλυση qPCR. Ένα άλλο παράδειγμα είναι το Integrated Comprehensive Droplet Digital Detection (IC 3D), μια πλατφόρμα μικρορευστών ικανή να ποσοτικοποιήσει εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις miRNA απευθείας από το πλάσμα μέσα σε 3 ώρες(De Rubis, et al, 2019).

Τέλος, τα κυκλικά RNA (circRNAs) έχουν πρόσφατα εισαχθεί στον ογκολογικό τομέα μετά την αποκάλυψη ότι είναι πολύ άφθονα, πολύ συντηρημένα σε διάφορα είδη και παρουσιάζουν συγκεκριμένη έκφραση σε στάδια ιστού και ανάπτυξης. Αυτή η αυστηρά ρυθμιζόμενη, δυναμική έκφραση circRNA, σύμφωνα με την έκφραση των mRNAs, microRNAs και lncRNAs, μεταβάλλεται τόσο στους συμπαγείς όγκους όσο και στις αιματολογικές κακοήθειες και πιθανότατα συμβάλλει στην ογκογένεση (Pinzani, et al, 2021).

2.3.3. Ογκοεπιμορφωμένα αιμοπετάλια(tumor educated platelets-TEPs)

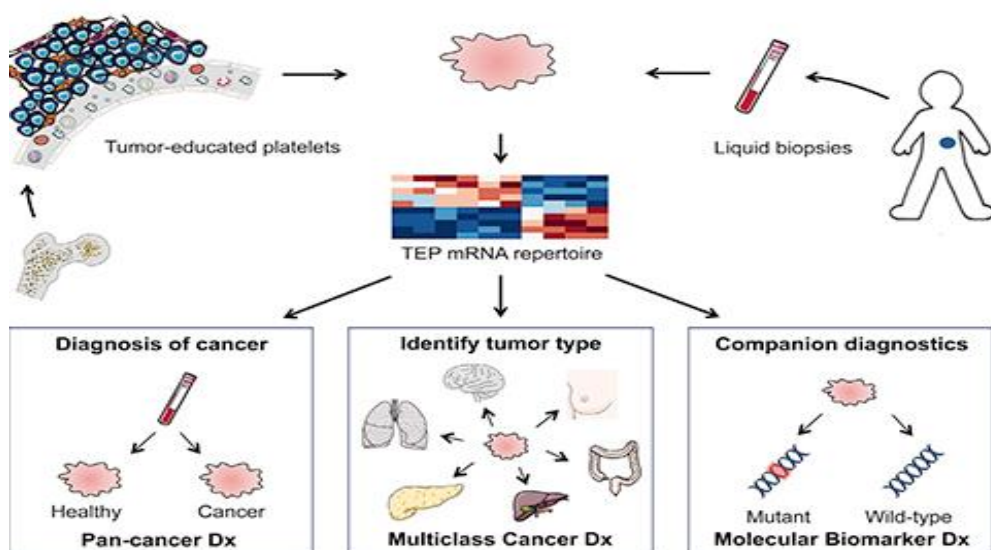
Τα TEPs είναι ίσως τα πιο πρόσφατα συστατικά του περιβάλλοντος του όγκου που πρέπει να ληφθούν υπόψη για ανάλυση βιοδείκτη(Εικ.20). Η έννοια των ογκοεπιμορφωμένων αιμοπεταλίων από τον καρκίνο αναφέρεται για πρώτη φορά το 2010 (Calverley, et al, 2010) και το 2011(Nilsson, et al, 2011) με τις παρατηρήσεις ότι: (i) σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του πνεύμονα, 197 γονίδια αιμοπεταλίων μειορυθμίστηκαν και αρκετά γονίδια υπέστην μάλιστα σε σύγκριση με τα controls και (ii) στο γλοίωμα, τα κυστίδια μεμβράνης που εκκρίνονται από καρκινικά κύτταρα ήταν ικανά να μεταφέρουν RNA που προέρχεται από όγκο(μεταλλαγμένο) σε αιμοπετάλια, όπως φάνηκε από την συνεστιακή μικροσκοπία και την RT-PCR (De Rubis, et al, 2019). Όσον αφορά τα γονίδια αιμοπεταλίων (επειδή τα αιμοπετάλια δεν περιέχουν πυρήνα επομένως δεν έχουν δικό τους DNA), περιέχουν κυτταροπλασματικό προ-mRNA που προέρχεται από μεγακαρυοκύτταρα, συνδέεται σε mRNA και μεταφράζεται σε λειτουργική πρωτεΐνη ως απόκριση σε εξωτερική διέγερση μέσω ενεργοποίησης επιφανειακού υποδοχέα και εξωτερικής σηματοδότησης(Calverley, et al, 2010).



Εικόνα 20: Η δομή των αιμοπεταλίων Τα αιμοπετάλια είναι μικρά, δισκοειδή, διάφανα, κυτταρικά θραύσματα(Geddes, 2012).

Η ανάλυση του περιεχομένου RNA αιμοπεταλίων προέκυψε πρόσφατα ως εναλλακτική, εξαιρετικά ευαίσθητη και ακριβής μέθοδος για διαγνωστική με βάση το αίμα στον καρκίνο. Έτσι, αυτό το RNA όγκου προσροφημένου από αιμοπετάλια (platelet resorbed tumor RNA, prtRNA) έχει αποτελέσει έναν πολλά υποσχόμενο δείκτη υγρής βιοψίας. Το prtRNA πιθανά είναι ένας πιο ευαίσθητος και ευκολότερα ανιχνεύσιμος δείκτης, συγκριτικά με το ctDNA, καθώς παράγεται σε μεγαλύτερες ποσότητες και μπορεί να απομονωθεί σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις(De Rubis, et al, 2019).

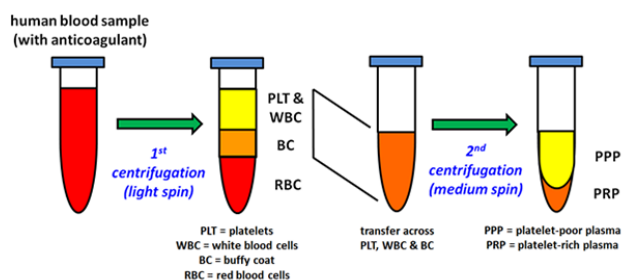
Τα αιμοπετάλια, όπως φαίνεται στην Εικ.21, είναι πυρηνικά κύτταρα αίματος που προέρχονται από μεγακαρυοκύτταρα μετά από κυτταρική ανακατανομή των οργανιδίων.



Εικόνα 21: Απαρχή και χρησιμότητα αιμοπεταλίων Τα αιμοπετάλια προκύπτουν από τα μεγακαρυοκύτταρα στον μυελό των οστών. Γίνεται προσρόφηση καρκινικού RNA, το οποίο είναι εξαρτώμενο από εξωγενή σήματα-μάτισμα (RNA splicing). Τα σήματα που προέρχονται από τον όγκο είναι: Αυξητικοί παράγοντες, Κυτταροκίνες, Εξωσώματα, Νουκλεϊκά Οξέα, Μόρια Εξωκυτταρικής Μήτρας και Αλληλεπίδραση με υποδοχείς (Best, et al, 2015).

Έχουν πολλαπλές λειτουργίες και πολύ μικρή διάρκεια ζωής. Ως εκ τούτου, αν και τα αιμοπετάλια δεν περιέχουν τα δικά τους RNAs, είναι σε θέση να δεσμεύσουν εκείνα τα RNA που απελευθερώνονται στην κυκλοφορία από άλλα κύτταρα, μέσω μηχανισμών που εξαρτώνται από εξωσώματα αλλά και ανεξάρτητων μηχανισμών (Pasini, et al, 2019).

Τα αιμοπετάλια είναι πολύ δεκτικά κύτταρα που μπορούν να προσαρμόζονται εύκολα στο περιβάλλον και είναι πολύ δραστήρια στην έκκριση ρυθμιστικών παραγόντων και εξωσωμάτων (EVs). Λόγω αυτών των ιδιοτήτων, τα αιμοπετάλια θεωρείται ότι συμβάλλουν σημαντικά στην εξέλιξη του καρκίνου και στην μετάσταση, όχι μόνο λόγω του ρόλου τους στη διαδικασία πήξης, αλλά και επειδή δημιουργούν ένα μικροπεριβάλλον που προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα από την έκκριση αυτών από το ανοσοποιητικό σύστημα και διευκολύνει την δικιά τους εξαγγείωση στους συνδεδεμένους ιστούς. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να προετοιμάσουν τη θέση τους εκκρίνοντας EVs που θα μεταφέρουν ογκογονικά RNA σε κυκλοφορούντα αιμοπετάλια, τα οποία θα μπορούσαν στη συνέχεια να απελευθερώσουν αυτά τα RNA σε μεταστατικές θέσεις. Αυτά τα



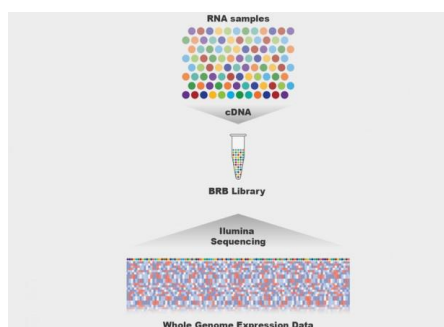
Εικόνα 22: Απομόνωση αιμοπεταλίων από ολικό αίμα Το αίμα φυγοκεντρείται για τον σχηματισμό των τριών στιβάδων και στη συνέχεια το πλάσμα φυγοκεντρείται ξανά για την απομόνωση των αιμοπεταλίων (TGA, 2019).

λεγόμενα ογκοειμορφωμένα αιμοπετάλια (Εικ.22) που έχουν αλλάξει το προφίλ έκφρασης RNA τους σε απόκριση σε επαφή με καρκινικά κύτταρα, αντανακλούν το μοριακό αποτύπωμα του καρκινικού ιστού, με σημαντικές διαγνωστικές συνέπειες (Pasini, et al, 2019).

Το 2015, οι Best et al. (Best, et al, 2015) ανέφεραν ότι η αλληλουχία των αιμοπεταλίων που σχετίζεται με το RNA απέδωσε περίπου 5000 RNAs που εκφράστηκαν με διαφορετικό τρόπο μεταξύ καρκινοπαθών και υγιών control, με συνολική ευαισθησία 97%, ειδικότητα 94% και ακρίβεια 95%. Μέσω αυτής της ανάλυσης διακρίθηκαν ασθενείς με NSCLC με εντοπισμένους και μεταστατικούς όγκους από υγιή άτομα με 75% ακρίβεια, παρέχοντας χρήσιμες πληροφορίες για τον πρωτογενή όγκο (Pasini, et al, 2019). Έτσι, χαρακτήρισαν TEPs που εξάγονται από μια ομάδα ασθενών σε έξι τύπους καρκίνου μέσω RNA-Seq, με εντοπισμό της θέσης του όγκου σε ιστό με ακρίβεια 71%. Αυτό άνοιξε το δρόμο για τη διάγνωση πολλαπλών διαφορετικών καρκίνων (De Rubis, et al, 2019). Οι συγγραφείς επίσης ταυτοποίησαν με ακρίβεια μεταλλαγμένα γονίδια EGFR, KRAS και ενισχυμένους όγκους MET, με ειδικότητα 81%, 85% και 75%, αντίστοιχα, και με ευαισθησία 90%, 94% και 100%, αντίστοιχα (Pasini, et al, 2019).

Σε πιο πρόσφατη εργασία, η ίδια ομάδα (Best, et al, 2017) εφάρμοσε αλγόριθμους βελτιστοποίησης ομάδας σωματιδίων (particle-swarm optimization-PSO) για RNA-Seq βιβλιοθήκες αιμοπεταλίων (Εικ.23) για τη δημιουργία ενός πίνακα βιοδεικτών ικανών να διακρίνουν τους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα από υγιή άτομα και από άτομα με φλεγμονώδεις παθήσεις των πνευμόνων (De Rubis, et al, 2019).

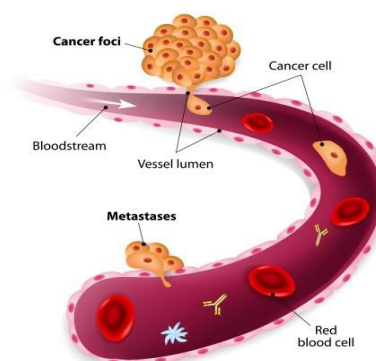
Παρά τον κίνδυνο των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων και την πιθανότητα συστηματικών παραγόντων που δεν σχετίζονται με τον καρκίνο, η ανάλυση περιεχομένου RNA αιμοπεταλίων υπόσχεται τη βελτίωση της τρέχουσας διαγνωστικής NSCLC και την πρόβλεψη της πορείας της νόσου κατά την ανάπτυξη μεταλλάξεων αντοχής στα φάρμακα. Δεδομένου ότι τα αιμοπετάλια, καθαυτά, είναι τεράστιοι συλλέκτες του RNA που προέρχεται από EV, η ανίχνευση που προέρχεται από ctRNA στα αιμοπετάλια θα μπορούσε να βοηθήσει στην παράκαμψη των προβλημάτων που περιέχουν αντίγραφα μεταλλάξεων ή αναδιατάξεων (Pasini, et al, 2019).



Εικόνα 23: Απομόνωση και ανάλυση RNA από τα αιμοπετάλια Από δείγματα RNA δημιουργείται η λεγόμενη BRB βιβλιοθήκη και μέσω της αλληλούχισης Illumina προκύπτουν τα δεδομένα της έκφρασης ολόκληρου του γονιδιώματος (GEN, 2019).

2.3.4. Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (circulating tumor cells-CTCs)

Η πρώτη περιγραφή ελεύθερων κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (CTCs) έγινε το 1869 όταν ο Tomas Ashworth κατέγραψε ομάδες καρκινικών κυττάρων στον ορό πανομοιότυπες με αυτές του όγκου σε νεκροτομή (Malapelle, et al, 2016). Από τη δεκαετία του 1970, το ενδιαφέρον για τα CTC αυξήθηκε σταδιακά χάρη στην πρόοδο στις μεθόδους ανίχνευσης που βασίζονται στις τεχνικές της μοριακής βιολογίας. Τα τελευταία 20 χρόνια, οι νέες τεχνολογίες για εμπλουτισμό, ανίχνευση και χαρακτηρισμό των CTC με υψηλότερη ευαισθησία έχουν αναπτυχθεί

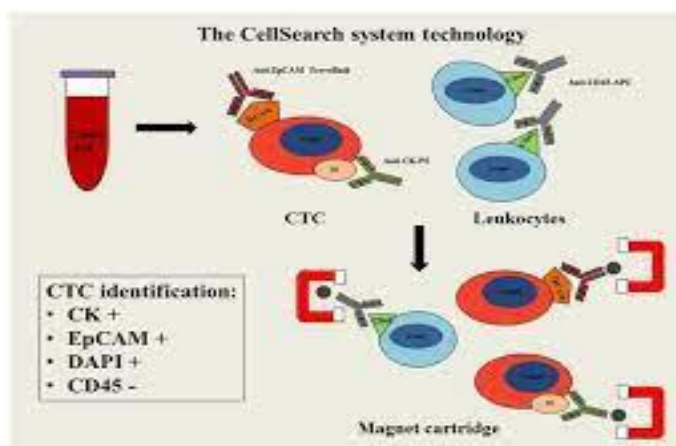


Εικόνα 24 : Η κυκλοφορία των CTC Τα καρκινικά κύτταρα απελευθερώνονται στην κυκλοφορία μέσω εστιών καρκίνου ή μεταστατικών όγκων (VYCAP, 2011).

επιτρέποντας την αρίθμηση των CTC σε διαφορετικούς συμπαγείς καρκίνους([Buscail, et al, 2019](#)).

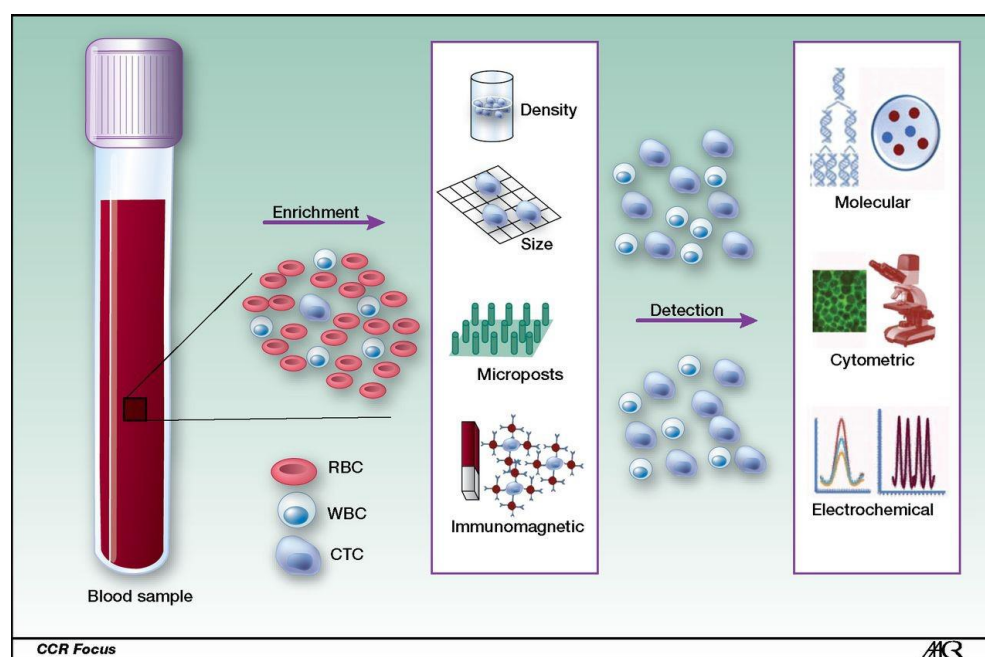
Η απελευθέρωση CTCs στην κυκλοφορία του αίματος, όπως απεικονίζεται στην Εικ.24, ωφελείται από μια αλλαγή στον φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων και χαρακτηρίζεται από απώλεια των επιθηλιακών δεικτών(νήματα κυτταροκερατίνης και E-καντερίνης) και την απόκτηση μερισμικών μεσεγχυματικών δεικτών όπως η βιμεντίνη. Αυτή η επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) αυξάνει την πλαστικότητα των CTCs, διευκολύνοντας τη μετακίνηση και την διείσδυση([Guibert, et al, 2020](#)). Εναλλακτικά, η απελευθέρωση γίνεται μέσω παθητικής απόρριψης από τον πρωτογενή όγκο. Αυτός ο τελευταίος μηχανισμός υποστηρίζεται από την παρουσία συσσωματωμάτων CTC ή μικροεμβολής κυκλοφορούντος όγκου (CTM) στο αίμα([De Rubis, et al, 2019](#)). Τα CTC μπορεί να μετακινηθούν ως συστάδες κυττάρων(ονομάζεται μικροεμβολή κυκλοφορούντος όγκου), τα οποία είναι πιθανό να επιβιώσουν καλύτερα στην κυκλοφορία του αίματος από ό, τι τα μεμονωμένα CTC. Μπορούν επίσης να φέρουν το δικό τους “χώμα” (στρωματικά κύτταρα από τον πρωτογενή όγκο) για να αυξήσουν το μεταστατικό δυναμικό([Guibert, et al, 2020](#)). Τα CTC περιέχουν διάφορα κυτταρικά και υποκυτταρικά συστατικά που μπορεί να χρησιμοποιούνται για περαιτέρω λεπτομερή ανάλυση π.χ. άθικτο DNA για ανάλυση γνωστής μετάλλαξης και ανακάλυψη νέων δεικτών, RNA για το προφίλ έκφρασης γονιδίων, και διάφορους βιοδείκτες για πρωτεωμική ανάλυση([Minji, et al, 2018](#)). Αν και είναι εξαιρετικά σπάνια (>5 για μεταστατικό καρκίνο μαστού / προστάτη και > 3 CTC για μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου ανά 7,5 mL αίματος([Rolfo, et al, 2014](#)) και περίπου 1-10 CTCs / 10⁶ κύτταρα αίματος σε 1 mL αίματος ([Minji, et al, 2018](#)), κυκλοφορούντα νεοπλασματικά κύτταρα (CTCs) απομονωμένα από το περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο, αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση έναντι των επεμβατικών βιοψιών ως πηγή όγκου ιστού για την ανίχνευση, τον χαρακτηρισμό και την παρακολούθηση όλων των καρκίνων μη-αιμοποιητικής προέλευσης([Pasini, et al, 2019](#)).

Έχουν αναπτυχθεί δύο βασικές προσεγγίσεις για απομόνωση CTC: 1) μέθοδοι που βασίζονται στην έκφραση αντιγόνου(αντιγόνα που δεν εκφράζονται στα κύτταρα του αίματος, αλλά δεν είναι ειδικά για τα καρκινικά κύτταρα) και 2) μέθοδοι με βάση τα βιοφυσικά χαρακτηριστικά(πυκνότητα και μέγεθος, υψηλότερα σε CTC από ό, τι στα κύτταρα του αίματος, μαζί με κυτταροπαθολογικά κριτήρια κακοήθειας). Το Cellsearch (Εικ.25) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη και εγκεκριμένη από τον FDA αμερικανική μέθοδος για μοριακούς ελέγχους καρκίνου του μαστού, του παχέος εντέρου και του προστάτη, που απομονώνει τα κύτταρα από το αίμα χρησιμοποιώντας επιθηλιακά ειδικά αντισώματα



Εικόνα 25: Το CellSearch System Το σύστημα αυτό χρησιμοποιεί θετική επιλογή της διαμεμβρανικής γλυκοπρωτεΐνης η οποία εκφράζεται σε επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα(EpCam+), κερατίνες οι οποίες αποτελούν μέρος του κυτταροσκελετού των επιθηλιακών κυττάρων και αρνητική επιλογή της φωσφατάσης η οποία εκφράζεται στην επιφάνεια όλων των λευκοκυττάρων(CD45-), έτσι ώστε να απομονωθούν και να αναλυθούν στη συνέχεια τόσο τα CTC όσο και τα λευκοκύτταρα([Truini, et al, 2014](#)).

(θετική επιλογή μορίου προσκόλλησης επιθηλιακών κυττάρων, αρνητική επιλογή CD45)([Guibert, et al, 2020](#)). Ωστόσο, τα κακοήθη CTC συχνά χάνουν τα επιθηλιακά τους αντιγόνα και αποκτούν κάποιο μεσεγχυματικό δείκτη κατά τη διάρκεια της EMT και το γεγονός ότι δεν είναι όλα τα κυκλοφορούντα επιθηλιακά κύτταρα κακοήθη, εξηγεί την έλλειψη στην ευαισθησία και την ειδικότητα αυτών των προσεγγίσεων. Η απομόνωση κατά μέγεθος επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων βασίζεται στην απομόνωση των CTC ανάλογα με το μέγεθός τους (μέχρι και 20 μm σε σύγκριση με 8-10 μm για τα λευκά αιμοσφαίρια) και επιτρέπει μια αξιόπιστη κυτομορφολογική ανάλυση των απομονωμένων κυττάρων και ανοσοκυτταροχημισμό, ανοσοφθορισμό ή in situ υβριδισμό για την ανίχνευση αναδιατάξεων ή ενισχύσεων. Η microfluidic τεχνολογία(Εικ.26) αντιπροσωπεύει πιθανώς την πιο ελκυστική προσέγγιση για απομόνωση CTC και έχει αναφερθεί από το 2007 με τον όρο "CTC-chip" : Τα CTC συνδέονται σε αντισώματα(μόρια προσκόλλησης επιθηλιακών κυττάρων)-επικαλυμμένα microposts υπό επακριβώς ελεγχόμενες συνθήκες στρωτής ροής. Αυτό επέτρεψε την ανίχνευση CTCs στο 99% (115 στους 116) ασθενών με διάφορους συμπαγείς όγκους. Το Pasortix χρησιμοποιεί μία παρόμοια προσέγγιση αλλά απομονώνει τα καρκινικά κύτταρα με βάση τη συμπιεσιμότητα καθώς και το μέγεθός τους(τεχνολογία chip). Αυτή η τεχνολογία έχει χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη και του μαστού για γονότυπο μονοκυττάρων, αποκαλύπτοντας μοριακή ετερογένεια σε CTCs. Η τεχνολογία Vortex εκμεταλλεύεται επίσης την τεχνολογία chip και χρησιμοποιεί στρωτές στροφές μικροσκοπικής κλίμακας για την απομόνωση και την συγκέντρωση CTCs από αίμα, με βάση τις φυσικές τους ιδιότητες(μέγεθος, σχήμα και συμπιεσιμότητα). Αυτή η προσέγγιση έχει τα πλεονεκτήματα της αυτοματοποίησης, της ανεξάρτητης έκφρασης αντισωμάτων(για αποφυγή ψευδών αρνητικών λόγω EMT), και έχει ως αποτέλεσμα δείγματα CTC υψηλής καθαρότητας με χαμηλή μόλυνση λευκών αιμοσφαιρίων και ακέραια κύτταρα, διευκολύνοντας περαιτέρω μοριακές αναλύσεις ή την καλλιέργεια. Έτσι, καταβάλλονται προσπάθειες για τη βελτίωση της ευαισθησίας αυτών των τεχνολογιών και την αύξηση της καθαρότητας δειγμάτων των CTC, όμως η σμίκρυνση των πλατφορμών μικρορευστών συνεχίζεται([Guibert, et al, 2020](#)).



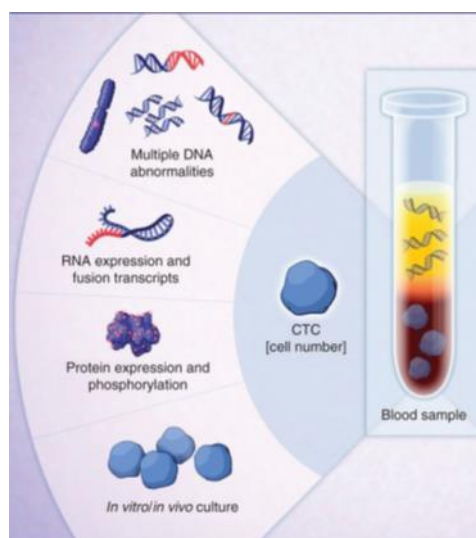
Εικόνα 26: Εμπλουτισμός και ανάλυση των CTC Σε αρχικό στάδιο γίνεται εμπλουτισμός των CTC και διαχωρίζονται με βάση την πυκνότητα, το μέγεθος, το ηλεκτρικό φορτίο και με βάση τον

ανοσομαγνητισμό. Έπειτα, αναλύονται σε μοριακό, κυτταρομετρικό και ηλεκτροχημικό πεδίο (Yap, et al, 2014).

Ακόμα κι αν το 99,9% των αιμολυτικών κυττάρων καθαρίζονται, η καθαρότητα των απομονωμένων CTC είναι κάτω από 1%, που είναι στο όριο ανίχνευσης των επί του παρόντος διαθέσιμων τεχνικών μοριακής ανάλυσης. Επομένως, είναι μεγάλη πρόκληση να απομονωθούν CTC με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα (Minji, et al, 2018).

Τα απομονωμένα CTC καλλιεργούνται in vitro για τον καθορισμό της μόνιμης CTC κυτταρικής σειράς για περαιτέρω μελέτες. Επιπλέον, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διάφορα in vivo, ex vivo και in vitro πειράματα σε πειραματικές μελέτες. Εμφυτεύματα που προέρχονται από CTC (CDX), μοντέλα ξενομοσχεύματος που προέρχονται από ασθενή (PDXs) και ex vivo-καλλιεργημένα CTC μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη διαλογή φαρμάκων, τα οποία μπορούν να συμβάλουν στην εξατομικευμένη θεραπεία (Minji, et al, 2018).

Το πιο σημαντικό, συγκριτικά με τη βιοψία μιας θέσης, είναι ότι η ανάλυση CTC δίνει μια ολοκληρωμένη εικόνα του συνολικού περιεχομένου όγκου και της ετερογένειας εντός του όγκου που προκύπτει από την διακλαδισμένη κλωνική εξέλιξη. Η χρησιμότητα της ανάλυσης ενός μόνο κυττάρου των CTC, όπως δείχνει και η Εικ.27, έγκειται κυρίως στην παροχή παράλληλων πληροφοριών σχετικά με το προφίλ μετάλλαξης του καρκινικού κυττάρου, στην αλλαγή αριθμού αντιγράφων (CNA), στην γονιδιωματική αναδιάταξη και στην γονιδιακή έκφραση. Μια κρίσιμη τεχνική πρόκληση για την ανίχνευση CTC πηγάζει από τη σπανιότητα τους, π.χ., ένα κύτταρο ανά χιλιοστόλιτρο αίματος, μεταξύ εκατομμυρίων λευκοκυττάρων υποβάθρου (Εικ.28). Η κατασταλτική ρύθμιση του μεγάλου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) για την αποφυγή ανίχνευσης του ανοσοποιητικού συστήματος και για να μπορέσουν να μετακινηθούν στην κυκλοφορία του αίματος, μαζί με την έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται

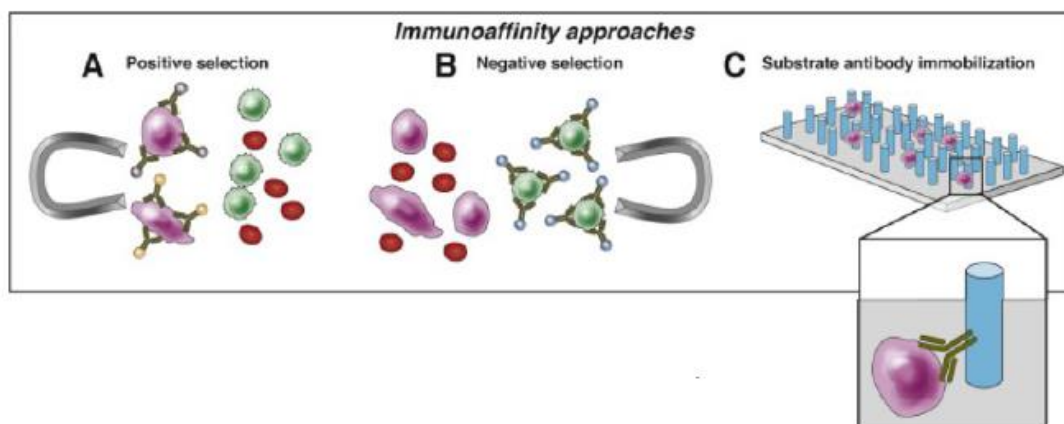


Εικόνα 27: Μοριακή ανάλυση των CTCs Η μοριακή ανάλυση των CTCs περιλαμβάνει: Αριθμό CTCs, DNA μεταλλάξεις, αναδιατάξεις, RNA έκφραση, έκφραση μεταγράφων σύντηξης, πρωτεϊνική έκφραση και φωσφορυλίωση και καλλιέργεια in vitro (Haber, et al, 2014).

στο EMT, φαίνεται να είναι προαπαιτούμενα των CTC για την έναρξη διείσδυσης οργάνων. Οι πρόσφατες εξελίξεις στην απομόνωση των CTC επέτρεψαν την ακριβή γενετική ανάλυση των ανθεκτικών στα φάρμακα CTC κλώνων με συγκεκριμένα αποτυπώματα άμεσης κλινικής σημασίας. Τέτοια δεδομένα υποστηρίζουν την ιδέα ότι τα CTCs μπορεί ταυτόχρονα να παρέχουν μια επισκόπηση της γονιδιωματικής του όγκου και της γονιδιακής έκφρασης, και ότι ο χαρακτηρισμός τους μπορεί να είναι ένας βασικός παράγοντας καθώς αυτά τα κύτταρα είναι τελικά υπεύθυνα για μετάσταση (Pasini, et al, 2019).

Οι μετρήσεις CTC λειτουργούν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες τόσο κατά την έναρξη όσο και κατά την παρακολούθηση σε ασθενείς με NSCLC που έχουν μεταλλάξεις EGFR ή ALK-που έχουν υποστεί κανονική χημειοθεραπεία ή στοχευμένες θεραπείες. Σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο που λαμβάνουν συστηματική θεραπεία, οι χρονικές αλλαγές στον αριθμό CTCs έχει αποδειχθεί ότι συσχετίζεται με την κλινική έκβαση, όπως μετράται από την

πρότυπη ακτινογραφία(Pasini, et al, 2019).

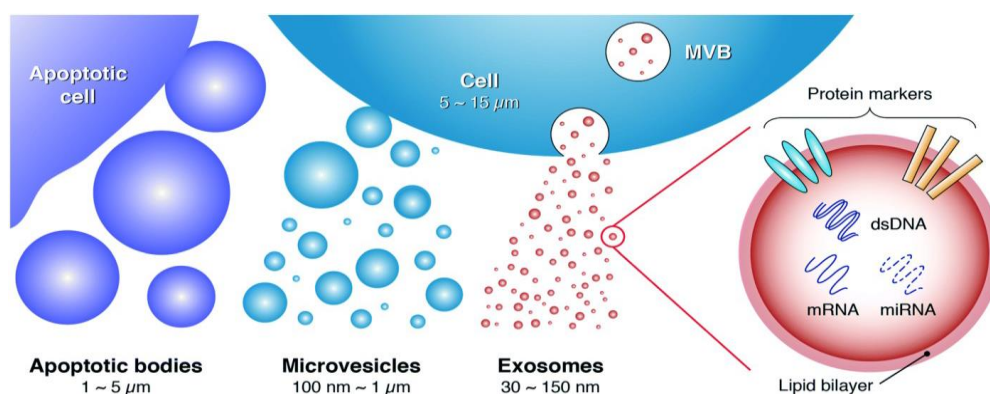


Εικόνα 28: Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός CTC **A:** Χρήση αντισωμάτων έναντι πρωτεΐνων-δεικτών που εκφράζονται στην επιφάνεια των CTCs (θετική επιλογή). **B:** Όταν τα αντισώματα είναι ειδικά για τα κύτταρα του αίματος (αρνητική επιλογή). **C:** Ένωση αντισωμάτων με μαγνητικά σφαιρίδια μέσω των οποίων πραγματοποιείται ο διαχωρισμός και κυτταρομετρία ροής(Τα CTCs παρουσιάζουν φαινότυπο EpCAM+ CD45-)(Nagrath, et al, 2016).

Συνοπτικά, υπάρχουν ενδείξεις ότι απομονωμένα CTC μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες για τον προσδιορισμό της φτωχής αρχικής πρόγνωσης και την πρόβλεψη υποτροπής (Minji, et al, 2018). Έτσι, η μελέτη των CTCs θα μπορούσε να έχει ευρείες επιπτώσεις στην αποσαφήνιση της λειτουργικής δυνατότητας εφαρμογής νέων βιοδεικτών, βελτιώνοντας ταυτόχρονα την κλινική διαχείριση του καρκίνου. Ωστόσο, η τεχνολογία CTC πρέπει να είναι αξιόπιστη, αναπαραγωγίμη και εύρωστη, με κλινική εγκυρότητα για να εξασφαλιστεί η σταθερότητα των αποτελεσμάτων. Για το λόγο αυτό, προτιμάται η χρήση του cfDNA για ελέγχους μεταλλάξεων που επιδιώκουν να ορίσουν βιοδείκτες άμεσης κλινικής χρησιμότητας(Pasini, et al, 2019).

2.3.5. Εξωκυτταρικά κυστίδια(Extracellular vesicles-EVs)

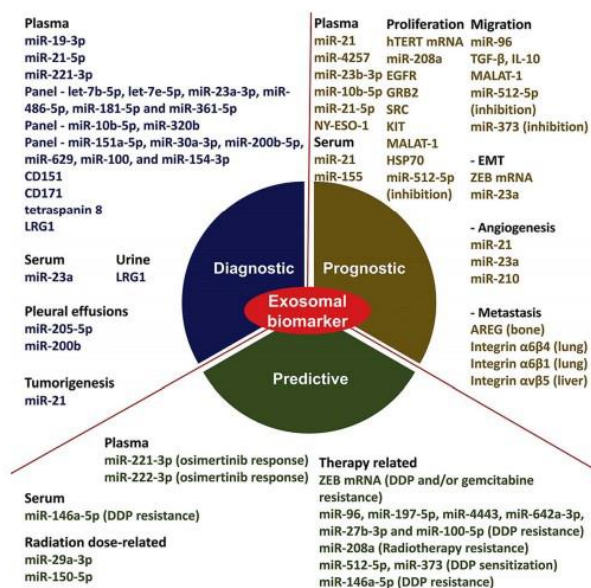
Τα εξωσώματα περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1983 από τους Pan και Johnstone (Siravegna, et al, 2017) ως μεμβρανώδη σωματίδια που απελευθερώνονται από όλους τους τύπους κυττάρων στον εξωκυττάριο χώρο υπό φυσιολογικές και παθολογικές θερμικές συνθήκες και από μια ποικιλία σωματικών υγρών(ειδικά αίμα)(De Rubis, et al, 2019). Έχουν μέγεθος 40-100 nm (Siravegna, et al, 2017), είναι εξαιρετικά άφθονα (10-11 /mL πλάσματος) και περιέχουν RNA, DNA, και πρωτεΐνες (Rolfo, et al, 2014)(Εικ.29). Κυρίως κύτταρα αίματος, ενδοθηλιακά κύτταρα, ανοσοκύτταρα, αιμοπετάλια και κύτταρα λείου μυός απελευθερώνουν τα εξωσώματα.Τα εξωσώματα μπορεί να εκχυλίζονται από σωματικά υγρά με κανονικής πυκνότητας βαθμίδα φυγοκέντρησης. Εναλλακτικά, τα εξωσώματα μπορούν να απομονωθούν μέσω υπερφυγοκέντρησης, να γίνουν ορατά μέσω μετάδοσης της μικροσκοπίας, ή επιλέγονται με βάση την παρουσία συγκεκριμένων πρωτεϊνικών δεικτών, όπως οι πρωτεΐνες τετρασπανίνης CD63, CD9 και CD81(Siravegna, et al, 2017) καθώς και ακολουθώντας διαφορετικούς τύπους ερεθισμάτων, συμπεριλαμβανομένων πρωτεασών, ADP, θρομβίνης, φλεγμονώδων κυτοκίνων, αυξητικών παραγόντων, βιομηχανικής διάτμησης, επαγωγών στρες, αλλά και αποπτωτικών σημάτων(De Rubis, et al, 2019).



Εικόνα 29: Η δομή και απελευθέρωση των εξωσωμάτων Τα εξωσώματα είναι κυστίδια τα οποία εκκρίνονται από τα κύτταρα με την διαδικασία της εξωκυττάρωσης και περιέχουν γενετικό υλικό, όπως dsDNA, mRNA, miRNA, πρωτεΐνες και λιπίδια(Contreras-Naranjo, et al, 2017).

Η ανακάλυψη της πανταχού παρουσίας μεγάλου αριθμού εξωκυτταρικών κυστιδίων (EVs) στα σωματικά υγρά, σε συνδυασμό με τις τεχνικές αναβαθμίσεις για τον καθαρισμό EVs, πρόκειται να κάνουν μία σημαντική βελτίωση στην ανίχνευση νέων βιοδεικτών όγκου, από συνήθεις εξετάσεις αίματος. Η διερεύνηση της λειτουργικής συνάφειας της ροής EV στην κυκλοφορία βρίσκεται σε εξέλιξη, αν και ο βασικός ρόλος στην επικοινωνία μεταξύ κυττάρων και στη μεταφορά βιολογικού υλικού, συνήθως λειτουργικού microRNAs (miRNAs), αγγελιαφόρων RNA (mRNAs) ή πρωτεϊνών, μέσα στα κύτταρα-δέκτες, είναι τώρα ευρέως αποδεκτός. Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα EVs μπορεί να εμπλέκονται άμεσα στην ανθεκτικότητα

του καρκίνου στην θεραπεία. Οι πληροφορίες που προέρχονται από EV(Εικ.30) θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την έγκαιρη διάγνωση της μεταστατικής τάσης ενός πρωτογενούς όγκου. Τα όγκο EVs μπορούν να προωθήσουν τη μετάσταση σε συγκεκριμένα όργανα των τύπων καρκινικών κυττάρων από τους οποίους προήλθαν, προετοιμάζοντας την προ-μεταστατική θέση μέσω της εμπλοκής της οδού σηματοδότησης φυσιολογικών κυττάρων, ενώ επιτρέπουν επίσης την περαιτέρω πρόσληψη κακοηθών EVs. Για παράδειγμα, η μετατροπή κυττάρων σταθερής κατάστασης(χωρίς δυνατότητα πολλαπλασιασμού) σε προ-ογκογονικό φαινότυπο με EVs όγκου θα μπορούσε να διεγείρεται από τη μεταφορά των κυτταρικών πρωτεϊνικών κινάσων, και από τον σύνδεση της φωσφορυλιωμένης πρωτεϊνικής κινάσης σε EVs και από το γεγονός ότι στον καρκινικό ιστό θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως προγνωστικοί βιοδείκτες



Εικόνα 30: Βιοδείκτες υγρής βιοψίας που προέρχονται από εξωσώματα σε πολλούς τύπους καρκίνου Ερευνητικές μελέτες αξιολογούν την αποτελεσματικότητα της ανίχνευσης μεταλλάξεων στο εξωσωμικό DNA και δείκτες microRNAs(μικρού μήκους RNAs τα οποία δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες) από εξωσώματα σε πολλούς τύπους καρκίνου(Cui,et al,2018).

της εξέλιξης του όγκου κατά τη διάρκεια της θεραπείας με TKI. Η παρακολούθηση της παρουσίας EV που προέρχονται από όγκο, με εξετάσεις αίματος και η διερεύνηση του περιεχομένου κυστιδίων μπορεί να αποδειχθεί ζωτικής σημασίας για την ταχεία και ακριβή διάγνωση ή για την ανίχνευση πρώιμου όγκου. Παράλληλη εξέταση για αντιγονικό EV και ανάλυση βιοδεικτών EV κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης θα μπορούσε να βοηθήσει στον καθορισμό της καλύτερης εξατομικευμένης θεραπείας και επίσης να προβλέψει την αντίσταση([Pasini, et al, 2019](#)).

Έτσι, καθώς έπρεπε να βρεθεί ένας απλός τρόπος για την εξάλειψη των περιττών κυτταρικών συστατικών από το κυτταρόπλασμα των κυττάρων, την τελευταία δεκαετία, τα EV έχουν αναγνωριστεί ως θεμελιώδεις διαμεσολαβητές της διακυτταρικής επικοινωνίας, που ρυθμίζουν και συμμετέχουν σε μια πληθώρα φυσιολογικών και παθολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Με βάση τη βιογένεσή τους, το περιεχόμενο και τα εκκριτικά μονοπάτια, τα EV μπορούν να χωριστούν σε δύο ευρείες κατηγορίες: εξωσώματα και μικροσωματίδια. Σε σύγκριση με το ctDNA και τα CTCs, η εφαρμογή των οποίων στην κλινική διάγνωση του καρκίνου παρεμποδίζεται από προκλήσεις στην απομόνωσή, στην αναλυτική ευαισθησία, στην σταθερότητα, τα πιθανά πλεονεκτήματα των EV είναι πολλά. Τα EV παράγονται συνήθως και απελευθερώνονται σε άφθονες ποσότητες και σε μεγαλύτερες ποσότητες σε σύγκριση με τα CTC. Ομοίως, η σταθερότητα του φυσαλιδώδους φορτίου διατηρείται μέσω της προστασίας της εξωτερικής λιπιδικής μεμβράνης. Παρόμοια με το ctDNA και τα CTC, τα EV μπορούν να αποτελέσουν πηγή ποσοτικών και ποιοτικών πληροφοριών. Οι ποσοτικές πληροφορίες που περιλαμβάνουν αριθμούς EV μπορούν να υποδηλώσουν την παρουσία κακοήθους νόσου και το φορτίο του όγκου. Για παράδειγμα, τα επίπεδα εξωσωμάτων που κυκλοφορούν αυξάνονται στον καρκίνο του στήθους και του παγκρέατος και ο αριθμός των κυκλοφορούντων μικροσωματιδίων (MPs) είναι υψηλότερος σε ασθενείς με πολλαπλό μύελωμα (MM) σε σύγκριση με υγιή άτομα. Επιπλέον, τα κυκλοφορούντα επίπεδα των MP έδειξαν δυνατότητες διάγνωσης και πρόγνωσης του προχωρημένου NSCLC. Το περιεχόμενο RNA των EVs, συμπεριλαμβανομένων τόσο RNA κωδικοποίησης όσο και μη κωδικοποίησης (nc), έχει μελετηθεί ευρέως. Το DNA περιεχόμενο των εξωσωμάτων πρόσφατα κέρδισε την προσοχή ως πηγή βιοδείκτη σε μια μελέτη στην οποία μεταλλάξεις στα KRAS και TP53 ανιχνεύθηκαν σε εξωσώματα ορού από ασθενείς με παγκρεατικό καρκίνο. Σε μια άλλη μελέτη, ο προσδιορισμός των εξωσωμικών μεταλλάξεων KRAS αποδείχθηκε καλύτερος από τα επίπεδα CA 19-9 για την προγνωστική στρωματοποίηση ασθενών με αδενοκαρκίνωμα του παγκρεατικού πόρου(PDAC). Επιπλέον, ποιοτικές πληροφορίες μέσω του μοριακού χαρακτηρισμού των συστατικών EV, συμπεριλαμβανομένων νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών, είναι οι πιο εύκολα λαμβανόμενες. Τα EV μεταφέρουν πρωτεΐνες στον αυλό και τη μεμβράνη τους, και έχουν δημοσιευτεί πολλές αναφορές αποδεικνύοντας τον σημαντικό ρόλο των πρωτεϊνών EV ως πιθανοί βιοδείκτες καρκίνου([De Rubis, et al, 2019](#)).

Επιπλέον, σε σύγκριση με τα θραύσματα ctDNA, εκ των οποίων μόνο δύο αντίγραφα υπάρχουν ουσιαστικά στο καρκινικό κύτταρο προέλευσης, το mRNA που προέρχεται από γονίδιο υψηλής έκφρασης θα μπορούσε να υπάρχει σε χιλιάδες αντίγραφα ανά κύτταρο και μπορεί να απελευθερωθεί στο περιβάλλον(εντός EV ή ως cfRNA) σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Ως εκ τούτου, η ανάλυση των εξωσωμικών mRNA μπορεί να είναι επωφελής, ειδικά σε ασθενείς με περιορισμένες ποσότητες ανιχνεύσιμου ctDNA([Siravegna, et al, 2017](#)).

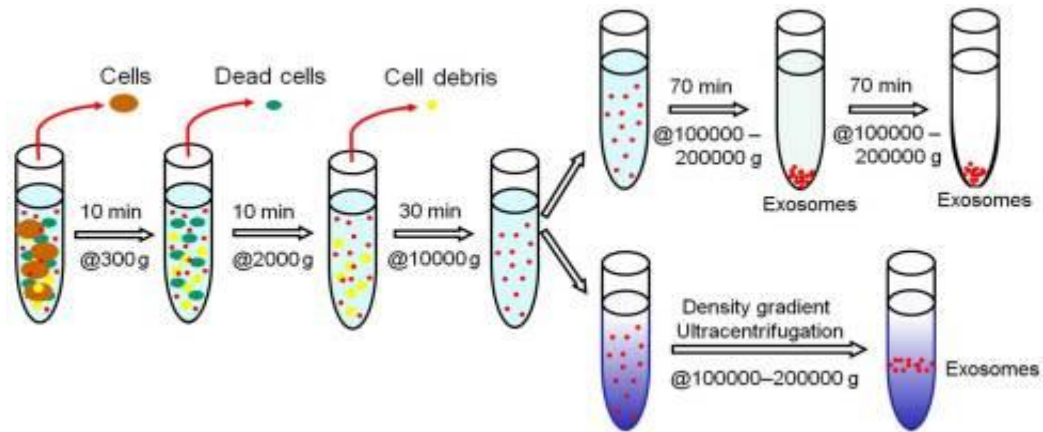
Ένας σημαντικός περιορισμός στην κλινική εφαρμογή των EV ως βιοδείκτες υγρών βιοψιών είναι η έλλειψη τυποποιημένων πρωτοκόλλων για χειρισμό δειγμάτων, απομόνωση και

ανάλυση EV, τα οποία θα μπορούσαν να επηρεάσουν την αναπαραγωγικότητα στο κλινικό περιβάλλον. Χρησιμοποιούνται συχνά διαδικασίες απομόνωσης EV που περιλαμβάνουν πολλά βήματα χειρισμού βιολογικών δειγμάτων και μπορεί να υποβάλουν EV σε διαφορετικούς τύπους φυσικής και χημικής προσβολής, η οποία μπορεί να προκαλέσει βλάβη και / ή να τροποποιήσει τις βιολογικές και φυσικές τους ιδιότητες. Ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την αναπαραγωγικότητα των μελετών EV είναι η έλλειψη τυποποιημένων οδηγιών που ορίζουν την ονοματολογία και τον ορισμό EV, και τα πειράματα ελέγχου που απαιτούνται για επικύρωση. Για να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί, η Διεθνής Εταιρεία Εξωκυτταρικών Κυστιδίων έδωσε πρόσφατα ολοκληρωμένες οδηγίες και προτάσεις. Παρόμοια με τα CTC, οι συμβατικές στρατηγικές απομόνωσης EV, οι οποίες παρουσιάζονται στον Πιν.3, εκμεταλλεύονται τις φυσικές (πυκνότητα και μέγεθος) και βιολογικές ιδιότητες (έκφραση επιφανειακών δεικτών).

Πίνακας 3: Τεχνικές απομόνωσης και χαρακτηρισμού των εξωσωμάτων (Chiriacò, et al, 2018).

Isolation Method	Isolation Principle	Advantages/Limitations
Differential centrifugation	EV separation based on particle density, size and shape	<ul style="list-style-type: none"> - Commonly used; standardized; vesicle enrichment as pellet; EV subtypes isolation by density gradient centrifugation - Vesicle aggregation; protein and soluble factors contamination; low recovery; laborious
Polymer-based precipitation	EV precipitation using polymers altering solubility	<ul style="list-style-type: none"> - Easy and inexpensive; high yield; effective with small amount of starting material; preservation of bioactivity - Co-precipitation of protein contaminants and polymeric materials; not suitable for large scale studies; long incubation times
Size-exclusion chromatography (SEC)	EV isolation by gel filtration chromatography based on size	<ul style="list-style-type: none"> - Inexpensive; reproducible; high yield and purity; preservation of integrity and activity. - Specific equipment; not suitable for large scale studies; long run times.
Immunoaffinity capture-based techniques	EV immuno-purification using magnetic beads conjugated with antibodies direct toward specific EV surface markers	<ul style="list-style-type: none"> - Sensitivity; specificity; high purity; EV subtypes isolation. - Expensive; antibody cross-reactivity; low yield

Προσεγγίσεις με βάση την πυκνότητα, όπως η διαφορική φυγοκέντρηση και / ή υπερφυγοκέντρηση και η διαβάθμιση πυκνότητας, είναι από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους για απομόνωση EV. Μεταξύ αυτών, η διαφορική υπερφυγοκέντρηση (Εικ.31) θεωρείται το gold standard, ειδικά για τον καθαρισμό των εξωσωμάτων. Αν και χρησιμοποιούνται ευρέως, αυτές οι τεχνικές βασίζονται σε ακριβό εξοπλισμό, είναι χρονοβόρες, και δεν εγγυώνται καθαρές αποδόσεις, που συχνά οδηγούν σε συμβιβασμό μεταξύ καθαρότητας και ανάκτησης (De Rubis, et al, 2019).



Εικόνα 31: Απομόνωση εξωσωμάτων μέσω υπερφυγοκέντρησης Στην πρώτη φυγοκέντρηση(300 g,10 min) στο υπερκείμενο έχουμε τα κύτταρα. Στην δεύτερη φυγοκέντρηση(2000 g,10 min) στο υπερκείμενο υπάρχουν τα νεκρά κύτταρα. Μέσω της τρίτης φυγοκέντρησης(10000g, 30 min) διαχωρίζονται τα κυτταρικά θραύσματα. Στη τελευταία φυγοκέντρηση(100000g, 70minX2) απομονώνονται τα εξωσώματα(Li, et al, 2017).

Παρόλο που βασικά τεχνικά και πρακτικά ζητήματα οδηγούν κυρίως στη συλλογή ετερογενών πληθυσμών κυστίδιων άγνωστης προέλευσης, που περιορίζουν τη χρήση των εξωσωμάτων στην καθημερινή εργαστηριακή πρακτική, οι προκύπτουσες τεχνολογίες πιθανότατα θα ξεπεράσουν αυτούς τους περιορισμούς στο όχι πολύ μακρινό μέλλον(Pasini, et al, 2019).

3^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ : Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

3.1. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΚΑΙ ΒΑΣΙΚΑ/ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ένα είδος καρκίνου που προσβάλλει την τραχεία (αναπνευστικός σωλήνας), τους βρόγχους (αεραγωγοί) ή τους αερόσακους που βρίσκονται στους πνεύμονες (πνευμονικές κυψελίδες)([Grigoriu, et al, 2016](#)).

Επιδημιολογικές μελέτες, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν μετά το Β΄ παγκόσμιο πόλεμο, έδειξαν τις αιτίες του καρκίνου του πνεύμονα([Παπαδάκου, 2017](#)). Ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου δεν οφείλεται στον ξαφνικό μετασχηματισμό του επιθηλιώματος των βρόγχων αλλά στο τελικό στάδιο καρκινογένεσης πολλαπλών σταδίων, με σταδιακά αυξανόμενες γενετικές και επιγενετικές αλλαγές. Ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας για αυτό τον καρκίνο είναι η έκθεση στα καρκινογόνα συστατικά του καπνού([Wadowska, et al, 2020](#)). Ειδικότερα, ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα είναι ανάλογος του αριθμού των τσιγάρων που καπνίζονται, καθώς και των χρόνων που έχουν μεσολαβήσει από την έναρξη του καπνίσματος. Μετά τη διακοπή του καπνίσματος, ο σχετικός κίνδυνος μειώνεται περίπου κατά 50% μετά από 5 χρόνια και κατά 80% μετά από 10 χρόνια. Τόσο η επίπτωση όσο και η θνησιμότητα ανά ηλικία και φύλο σε διαφορετικές χώρες εξηγούνται σχεδόν αποκλειστικά από αλλαγές στις εθνικές συνήθειες καπνίσματος([Παπαδάκου, 2017](#)). Το μέγεθος του τσιγάρου και ο χρόνος που αυτό παραμένει στο στόμα είναι, επίσης, σημαντικά, ενώ τα τσιγάρα με φίλτρο, καθώς και αυτά με λιγότερη πίσσα και νικοτίνη είναι λιγότερο επιβλαβή([Παπαδάκου, 2017](#)). Από ιστολογική άποψη, το κάπνισμα προκαλεί κυρίως πλακώδη, μικροκυτταρικά, μεγαλοκυτταρικά και σε μικρότερο βαθμό αδενοκαρκινώματα. Από το 1981, όταν αναφέρθηκε για πρώτη φορά η συσχέτιση μεταξύ παθητικού καπνίσματος και καρκίνου του πνεύμονα, πάνω από 30 επιδημιολογικές μελέτες εξέτασαν το θέμα αυτό. Οι περισσότερες έρευνες έγιναν σε μη καπνίστριες γυναίκες και η κυρίαρχη έκθεση που μελετήθηκε ήταν οι καπνιστικές συνήθειες του συζύγου. Συνολικά, από αυτές τις έρευνες προέκυψε, ότι υπάρχει συνήθως θετική, ανάλογη με την έκθεση, συσχέτιση μεταξύ παθητικού καπνίσματος και καρκίνου του πνεύμονα. Η συσχέτιση αυτή ήταν απίθανο να οφείλεται σε τυχαίους παράγοντες και δεν συγχέεται με κανέναν από τους καθιερωμένους παράγοντες κινδύνου για τον καρκίνο του πνεύμονα. Αρκετοί μελετητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το παθητικό κάπνισμα πρέπει να θεωρείται σαν διαπιστωμένη αιτία καρκίνου του πνεύμονα στον άνθρωπο, με σχετικό κίνδυνο περίπου ίσο με 1,3([Παπαδάκου, 2017](#)).

Παρόλο που το κάπνισμα συνδέεται με ποσοστό μεγαλύτερο του 80% όλων των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα, πολλοί άνθρωποι που δεν έχουν καπνίσει ποτέ ή δεν έχουν εκτεθεί ποτέ σε παθητικό κάπνισμα εμφανίζουν καρκίνο του πνεύμονα. Άλλα αίτια περιλαμβάνουν την έκθεση σε:

- Ατμοσφαιρική ρύπανση (συμπεριλαμβανομένων των εκπομπών καυσαερίων των κινητήρων ντίζελ)
- Συνθήκες που επικρατούν σε περιβάλλον εργασίας (αμίαντος, σκόνη ξύλου, αναθυμιάσεις συγκόλλησης, αρσενικό, βιομηχανικά μέταλλα, π.χ. βηρύλλιο και χρώμιο)

- Ατμοσφαιρική ρύπανση εσωτερικού χώρου (ραδόνιο ή καπνό λόγω καύσης άνθρακα)

Είναι πιθανόν να υπάρχουν και άλλα αίτια, ενώ ακόμα περισσότερα αναμένεται να προσδιοριστούν στο μέλλον. Επιπλέον, αυξημένο κίνδυνο να εμφανίσουν καρκίνο του πνεύμονα διατρέχουν τα άτομα που πάσχουν από χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), από πνευμονική ίνωση, από καρκίνο της κεφαλής, του τραχήλου (λαιμού) ή του οισοφάγου καθώς επίσης και από λέμφωμα ή καρκίνο του μαστού (αντιμετώπιση με ακτινοθεραπεία θώρακος). Ακόμα, τα γονίδια μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο για κάποιες μορφές καρκίνου του πνεύμονα. Σε περίπτωση που υπάρχει ιστορικό καρκίνου του πνεύμονα στην οικογένεια, οι πιθανότητες να αναπτυχθεί η πάθηση ενδέχεται να είναι ακόμα περισσότερες, αλλά αυτό δεν ισχύει σε όλες τις περιπτώσεις([Grigoriu, et al, 2016](#)).

Επιπροσθέτως, αξίζει να αναφερθεί ότι η Υπηρεσία Περιβαλλοντικής Προστασίας των Η.Π.Α εκτιμά ότι περίπου 14.000 θάνατοι από καρκίνο του πνεύμονα, κυρίως σε καπνιστές, προκαλούνται ετησίως από έκθεση σε ραδόνιο, καθιστώντας έτσι το ραδόνιο τη 2η σημαντικότερη αιτία πρόκλησης καρκίνου του πνεύμονα. Τέλος, η διατροφή μπορεί να επηρεάσει τον κίνδυνο για την εμφάνιση αυτής της νόσου. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι, μεταξύ καπνιστών, αυτοί που καταναλώνουν περισσότερα φρούτα και λαχανικά έχουν μικρότερο κίνδυνο για καρκίνο του πνεύμονα, αν και δεν υπάρχει κοινή ομολογία σχετικά με συγκεκριμένα θρεπτικά συστατικά των τροφών αυτών που να ευθύνονται για την προστατευτική δράση([Παπαδάκου, 2017](#)).

Όσον αφορά τα πιο συνήθη συμπτώματα, συνήθως ο ασθενής υποφέρει από χρόνια βήχα (διάρκειας μεγαλύτερης των τριών εβδομάδων), αποβολή φλέγματος με αίμα ή κηλίδες αίματος με τον βήχα(αιμόπτυση), αδικαιολόγητη απώλεια βάρους και αδικαιολόγητη δύσπνοια (λαχάνιασμα([Grigoriu, et al, 2016](#))και επιδείνωση αναπνοής([Kapeleris, et al, 2018](#))). Ακόμα, ενδείξεις του καρκίνου αυτού είναι η ανορεξία, η κόπωση, η δυσφορία στο στήθος, στα οστά, στον ώμο καθώς και το πρήξιμο στον λαιμό. Τέλος, ως πιο βαριά συμπτώματα συχνά αναφέρονται η μυϊκή αδυναμία, ο βράγχος φωνής (αδύναμη, βραχνή ή εξασθενημένη φωνή), ο συριγμός (υψηλής συχνότητας σφύριγμα κατά την αναπνοή λόγω απόφραξης της αναπνευστικής οδού), η πληκτροδακτυλία (διόγκωση) των δακτύλων των χεριών και των ποδιών([Grigoriu, et al, 2016](#)) και η πνευμονία που δεν μπορεί να επιλυθεί ([Kapeleris, et al, 2018](#)). Συχνά, τα αρχικά συμπτώματα δεν γίνονται αντιληπτά, επειδή αποδίδονται σε άλλες συνήθεις παθήσεις([Grigoriu, et al, 2016](#)). Επομένως, εφόσον η μειονότητα είναι κατά το πλείστον ασυμπτωματική, συνήθως η νόσος ανιχνεύεται τυχαία από την διερεύνηση άλλων ασθενειών ή σε προγράμματα ελέγχου([Kapeleris, et al, 2018](#)).

Κατά τον 20 αιώνα παρατηρήθηκε έξαρση του καρκίνου του πνεύμονα η οποία κορυφώθηκε στο τέλος του αιώνα([Παπαδάκου, 2017](#)). Ωστόσο, η ασθένεια αυτή έχει δείξει μείωση της επίπτωσης και της θνησιμότητας τις τελευταίες δεκαετίες([Villalobos, et al, 2017](#)). Παρ' όλα αυτά, συνεχίζει να είναι ο πιο συχνά διαγνωσμένος καρκίνος στους άντρες παγκοσμίως και να αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο([Wadowska, et al, 2020](#)), όπως φαίνεται στα σχ. 3 και 4. Κάθε χρόνο, περίπου 1,8 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις καρκίνου του πνεύμονα διαγιγνώσκονται παγκοσμίως. Ειδικότερα, το 2012, η επίπτωση εκτιμήθηκε σε 1,8 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις, αντιπροσωπεύοντας το 12,9% όλων των νέων περιπτώσεων καρκίνου που έχουν διαγνωστεί παγκοσμίως([Kapeleris, et al, 2018](#)) ενώ περίπου 1,6 εκατομμύρια άνθρωποι πέθαναν από καρκίνο του πνεύμονα. Μάλιστα, εκτιμάται ότι ο

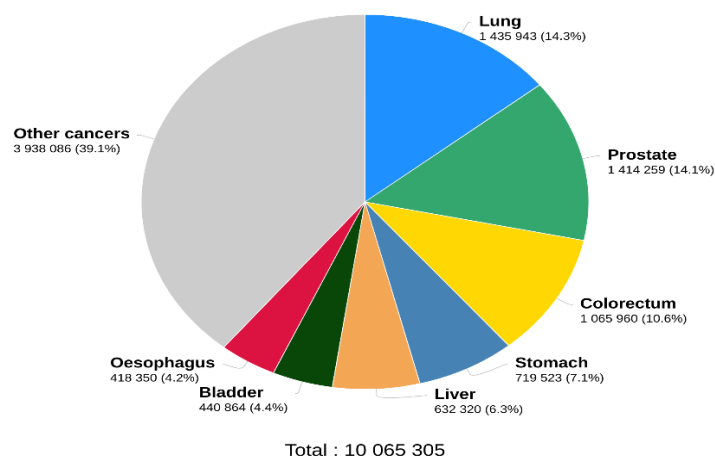
αριθμός των θανάτων από αυτή την νόσο θα αυξηθεί σε 3 εκατομμύρια το 2035([Wadowska, et al, 2020](#)).

Έρευνες στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής έδειξαν ότι, η μεγαλύτερη αύξηση στη θνησιμότητα από καρκίνο του πνεύμονα στους άντρες, παρατηρήθηκε από το 1930, όπου χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το πιστοποιητικό θανάτου, μέχρι και το 1991. Από το 1992 μέχρι και το 1996 παρατηρήθηκε μείωση. Στις γυναίκες αντίστοιχα, δεν υπήρξε ανάλογη αύξηση στη θνησιμότητα μέχρι το 1960, πιθανόν λόγω της καθυστερημένης έναρξης του καπνίσματος σε σχέση με τους άντρες. Έτσι, η αναλογία θανάτων ανδρών και γυναικών είχε μειωθεί σε 2:1 από 7:1 που ήταν το 1964, ενώ τα ποσοστά θανάτου από καρκίνο του πνεύμονα στις γυναίκες αυξάνονταν γρηγορότερα από αυτά οποιασδήποτε άλλης μορφής καρκίνου([Παπαδάκου, 2017](#)). Πλέον, στις Η.Π.Α., παραμένει ένας από τους καρκίνους με την υψηλότερη συχνότητα και κατατάσσεται πρώτος στους θανάτους που σχετίζονται με καρκίνο. Το 2015 εκτιμήθηκαν 221.200 νέες περιπτώσεις, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 13% όλων των καρκίνων που έχουν διαγνωστεί και συνέβησαν 158.040 θάνατοι, εκπροσωπώντας το 27% όλων των θανάτων από καρκίνο([Villalobos, et al, 2017](#)). Την επόμενη χρονιά, το 2016, παρέμεινε μια καταστροφική ασθένεια με 228.190 διαγνωσμένα κρούσματα και 159.480 θανάτους που σχετίζονται με καρκίνο στις ΗΠΑ([Poroyko, et al, 2018](#)).

Σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για το 2018 που δόθηκαν στη δημοσιότητα, περίπου 10.000 άνθρωποι κάθε χρόνο εκδηλώνουν καρκίνο του πνεύμονα. Τα στοιχεία για τη χώρα μας είναι άκρως απογοητευτικά και ακολουθούν τα ποσοστά καπνιστών. Στην Ελλάδα, σύμφωνα με την Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρεία, καπνίζει το 37% των ενηλίκων και 15.000 άτομα πεθαίνουν λόγω του εθισμού τους στο τσιγάρο και φυσικά λόγω των νοσημάτων που προκαλεί (χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, καρκίνο κ.ά.). Ειδικότερα, στους άνδρες, ο πιο συχνά διαγνωσμένος καρκίνος, ακολουθώντας την παγκόσμια επίπτωση, είναι ο καρκίνος του πνεύμονα με 7.862 περιστατικά(20% της νόσου), ενώ ακολουθεί ο καρκίνος του προστάτη με ποσοστό 16,6%, ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης, που σχετίζεται επίσης με το κάπνισμα, και ο καρκίνος του παχέος εντέρου και του νεφρού με ποσοστά 10,7% και 3,9% αντίστοιχα. Αντιθέτως, στις γυναίκες ο συχνότερος τύπος καρκίνου -ακολουθώντας και εδώ τα παγκόσμια δεδομένα- είναι ο καρκίνος του μαστού ο οποίος καταμετρά 7.734 άτομα τον χρόνο (27,2% της νόσου), ενώ ακολουθεί ο καρκίνος του παχέος εντέρου, του τραχήλου της μήτρας με ποσοστό 7,9%, του πνεύμονα και του θυρεοειδούς με ποσοστά 7,4% και 4,2% αντίστοιχα([Δεβετζόγλου, 2020](#)).

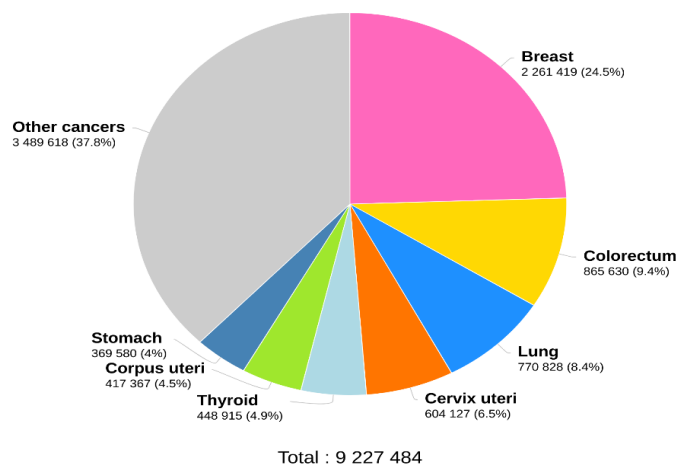
Επιπλέον, παγκοσμίως, ο συνολικός κίνδυνος καρκίνου του πνεύμονα σε όλη τη διάρκεια ζωής ενός ατόμου είναι περίπου 1:13 για τους άνδρες και 1:16 για τις γυναίκες([Cagle, et al, 2012](#)) και ευθύνεται σχεδόν για έναν στους πέντε θανάτους από καρκίνο. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι στη χώρα μας ο καρκίνος του πνεύμονα στερεί τη ζωή σε 7.000 ανθρώπους ετησίως και έχει σταθερά αυξητική τάση που συμπορεύεται με τα υψηλά ποσοστά καπνιστών, καθώς η Ελλάδα είναι πρώτη σε κατανάλωση τσιγάρων και δεύτερη σε κατανάλωση καπνού στην Ευρωπαϊκή Ένωση ([Λινάρδου, 2018](#)).

Estimated number of new cases in 2020, worldwide, males, all ages



Σχήμα 3: Ο αριθμός των καταγεγραμμένων περιπτώσεων παγκοσμίως διάφορων τύπων καρκίνων για τους άντρες το 2020 Όπως φαίνεται στο διάγραμμα, ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ο πιο κοινός τύπος καρκίνου για τους άνδρες, ακολουθεί ο καρκίνος του προστάτη και έπειτα ο ορθοκολικός καρκίνος, ο καρκίνος του στομάχου και άλλοι. Ο καρκίνος του πνεύμονα αντιπροσωπεύει το 14,3% του παγκόσμιου πληθυσμού, με 1.435.943 καταγεγραμμένες περιπτώσεις ([UICC, 2020](#)).

Estimated number of new cases in 2020, worldwide, females, all ages

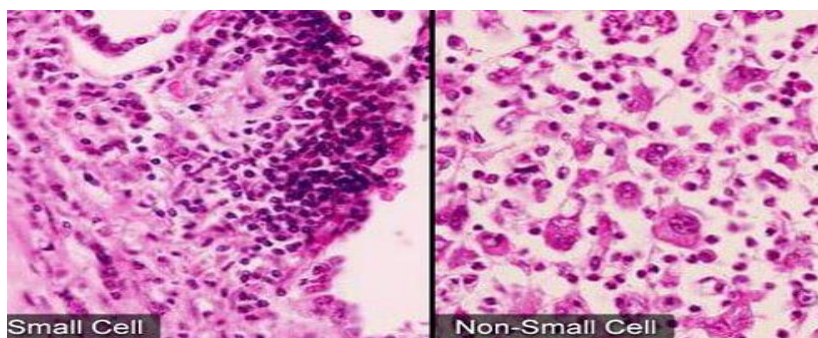


Σχήμα 4: Ο αριθμός των καταγεγραμμένων περιπτώσεων παγκοσμίως διάφορων τύπων καρκίνων για τις γυναίκες το 2020 Όπως φαίνεται στο διάγραμμα, ο καρκίνος του μαστού είναι ο συχνότερος τύπος καρκίνου για τις γυναίκες, ακολουθεί ο ορθοκολικός καρκίνος και έπειτα ο καρκίνος του πνεύμονα που αντιπροσωπεύει το 8,4% του παγκόσμιου πληθυσμού, με 770.828 καταγεγραμμένες περιπτώσεις ([UICC, 2020](#)).

Ο καρκίνος του πνεύμονα έχει σχετικά φτωχή πρόγνωση και η 5-ετής επιβίωση κυμαίνεται από 4% έως 17%, ανάλογα με το στάδιο της νόσου κατά τη στιγμή της διάγνωσης της (Wadowska, et al, 2020). Συγκεκριμένα, όσον αφορά το 5ετές ποσοστό επιβίωσης, το οποίο μειώνεται καθώς σταδιοποιείται περαιτέρω η νόσος, υπάρχει μία διαφοροποίηση, η οποία κυμαίνεται από λιγότερο από 5% στο στάδιο IV έως πάνω από 70% στο στάδιο I και ειδικά, σχεδόν 100% για αδenoκαρκίνωμα in situ (AIS) και για ελάχιστα επεμβατικό αδenoκαρκίνωμα (MIA) (Liang, et al, 2018). Ακόμα, υπάρχει εκτιμώμενο ποσοστό επιβίωσης 18% πέραν των 5 ετών για όλα τα στάδια σε συνδυασμό, με κακές εκβάσεις κυρίως λόγω της καθυστερημένης διάγνωσης (Kapeleris, et al, 2018).

Παρότι η αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα, ειδικά σε προχωρημένα στάδια, είναι δύσκολη, σήμερα, με τις τεράστιες προόδους στην ογκολογική έρευνα, υπάρχουν ποικίλες επιλογές. Η ενημέρωση και η ευαισθητοποίηση για πρόληψη, για διακοπή του καπνίσματος αλλά και για τις καινοτόμες θεραπείες είναι πρωταρχικής σημασίας (Λινάρδου, 2018).

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι μια ετερογενής ασθένεια που περιλαμβάνει διάφορους υποτύπους με παθολογική και κλινική σημασία (Villalobos, et al, 2017). Ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC) είναι ο συχνότερος κυτταρικός υπότυπος. Αντιπροσωπεύει περίπου το 80% των περιπτώσεων (Kapeleris, et al, 2018) του καρκίνου, σύμφωνα με πρόσφατες δημοσιεύσεις (Cagle, et al, 2012) και έχει τρεις κύριους ιστολογικούς υπότυπους: το αδenoκαρκίνωμα, το καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων (επιδερμοειδές) και το αδιαφοροποίητο καρκίνωμα μεγάλων κυττάρων. Το αδenoκαρκίνωμα αντιπροσωπεύει το 40% των περιπτώσεων, αν και αυξάνεται με σχετική συχνότητα και συνήθως ξεκινά σε βλέννα που εκκρίνουν επιθηλιακά κύτταρα (Kapeleris, et al, 2018). Μέχρι σήμερα, οι περισσότεροι επικυρωμένοι και διερευνητικοί προγνωστικοί βιοδείκτες έχουν ταυτοποιηθεί στο αδenoκαρκίνωμα, σε σύγκριση με άλλους τύπους κυττάρων, και η IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer), η ATS (American Thoracic Society), και η ERS (European Respiratory Society), η οποία λαμβάνει υπόψη την μοριακή παθολογία αυτών των όγκων, έχουν προτείνει μία νέα ταξινόμηση υποτύπου του αδenoκαρκινώματος. Η τρέχουσα ταξινόμηση αυτού από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας αναγνωρίζει αρκετούς ξεχωριστούς μορφολογικούς υποτύπους αδenoκαρκινώματος και συγκεκριμένα το θηλώδες, το ακίνητο, το στερεό και το λεπιδικό. Τα περισσότερα αδenoκαρκινώματα των πνευμόνων εμφανίζουν συνδυασμούς μορφολογικών προτύπων (Cagle, et al, 2012). Άλλοι υπότυποι, όπως το σαρκωτομικό καρκίνωμα, το νευροενδοκρινικό καρκίνωμα μεγάλων κυττάρων και άλλοι, αντιπροσωπεύουν ένα πολύ μικρό ποσοστό των συνολικών περιπτώσεων του NSCLC. Έτσι, η πιο πρόσφατη ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του πνεύμονα που δημοσιεύτηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας το 2015 ενσωματώνει σχετικές πτυχές της γενετικής και της ανοσοϊστοχημείας (IHC) διαφορετικών υποτύπων όγκου (Villalobos, et al, 2017). Επιπλέον, το καρκίνωμα των πνευμόνων μικρών κυττάρων (SCLC) είναι ο άλλος κύριος υπότυπος του καρκίνου του πνεύμονα (Kapeleris, et al, 2018) (Εικ.32).



Εικόνα 32: Η ιστολογική απεικόνιση του μικροκυτταρικού(αριστερά) και του μη μικροκυτταρικού(δεξιά) καρκίνου του πνεύμονα(Conrad Stöppler, 2020) Στο μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (SCLC), όπως φαίνεται με το μικροσκόπιο, τα κύτταρα περιέχουν πυκνούς νευροεκκριτικούς κόκκους (κυστίδια που περιέχουν νευροενδοκρινικές ορμόνες), που συσχετίζουν τον όγκο με ενδοκρινικό / παρανεοπλασματικό σύνδρομο, σε αντίθεση με το μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα όπου αυτοί οι κόκκοι κυττάρων είναι πιο αραιοί(Wikipedia).

Η υψηλή ετερογένεια μεταξύ των διαφορετικών ιστοτύπων του καρκίνου του πνεύμονα μπορεί να παρέχει μια εξήγηση για τη μεγάλη διακύμανση σε θεραπευτικές αντιδράσεις, καθώς και για στρατηγικές που θα μπορούσαν να είναι διαφορετικές για έναν συγκεκριμένο όγκο ή παρόμοιες για διαφορετικούς τύπους όγκων. Το βασικό βήμα στη διάγνωση και στη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα είναι η συμπερίληψη μοριακών ταξινομήσεων στην κλινική ταξινόμηση του καρκίνου του πνεύμονα. Ένα στοχευμένο παράδειγμα είναι μια νέα ονοματολογία για τον υποτύπο αδenoκαρκινώματος που προτείνεται από το The Cancer Genome Atlas Consortium (TCGA). Η ταξινόμηση αυτή (TCGA0s) ενσωμάτωσε τους μεταγραφικούς υποτύπους με τις ιστοπαθολογικές και ανατομικές κατηγορίες μεταλλάξεων και περιλαμβάνει τους προαναφερθέντες υποτύπους που χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένες γενετικές τροποποιήσεις(Wadowska, et al, 2020).

3.2. ΚΥΡΙΕΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΕΠΙΛΟΓΕΣ ΚΑΙ ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Έτσι, υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί υπότυποι καρκίνου του πνεύμονα, οι οποίοι απαιτούν μια σειρά από διαφορετικές θεραπείες(Grigoriu, et al, 2016). Οι επιλογές θεραπείας για τον καρκίνο του πνεύμονα εξαρτώνται από το μέγεθος και τη θέση του όγκου, τον ιστολογικό τύπο του καρκίνου του πνεύμονα, το εάν ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί(ASCO, 2020) και το στάδιο στο οποίο βρίσκεται(Grigoriu, et al, 2016), τη γενική κατάσταση υγείας του ατόμου(ASCO, 2020), τις προσωπικές προτιμήσεις του(Grigoriu, et al, 2016), την ηλικία του αλλά και από τις παρενέργειες της εκάστοτε μεθόδου(Βλάσση, et al, 2019). Οι μέθοδοι αντιμετώπισης μπορεί να επικεντρώνονται είτε στη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα (θεραπευτικές αγωγές) είτε στο να βοηθήσουν να ζήσει περισσότερο και με καλύτερη ποιότητα ζωής ο ασθενής με την νόσο(παρηγορητικές θεραπείες)(Grigoriu, et al, 2016). Επιπροσθέτως, οι επιλογές θεραπείας εξαρτώνται από την πρόθεση της θεραπείας και μπορεί να περιλαμβάνουν τοπική-περιφερειακή θεραπεία όπως χειρουργική επέμβαση, καθοδηγούμενη απεικονιστική αφαίρεση, συμπεριλαμβανομένης της ριζικής χημειο-ακτινοθεραπείας, στερεοτακτική αφαιρετική ακτινοβολία, θερμική αφαίρεση ή κρυοθεραπεία ή συστηματική θεραπεία όπως χημειοθεραπεία, στοχευόμενοι παράγοντες και ανοσοθεραπεία, μαζί με νέους παράγοντες υπό τρέχουσα έρευνα σε κλινικές δοκιμές(Kapeleris, et al, 2018).

Ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα συχνά αντιμετωπίζεται με έναν συνδυασμό αυτών των θεραπειών(ASCO, 2020), με συχνότερη εφαρμογή της χειρουργικής μεθόδου(Grigoriu, et al, 2016). Ο στόχος της χειρουργικής επέμβασης είναι να αφαιρεθεί εντελώς ο όγκος του πνεύμονα με ένα όριο υγιών ιστών, που ονομάζεται περιθώριο, και οι κοντινοί λεμφαδένες. Ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα συχνά αντιμετωπίζεται με χημειοθεραπεία ή/και ακτινοθεραπεία, και επίσης μπορεί να συνιστάται ανοσοθεραπεία (ASCO, 2020). Ωστόσο, εάν ο ασθενής έχει διαγνωσθεί με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα(ΜΚΠ) σε πολύ πρώιμο στάδιο που να μην έχει εξαπλωθεί, κάποιοι γιατροί ενδέχεται να προτείνουν χειρουργική θεραπεία. Εάν ο καρκίνος έχει εξαπλωθεί, τότε η χειρουργική αντιμετώπιση είναι απίθανο να αποτελεί τη σωστή μέθοδο θεραπείας για την συγκεκριμένη περίπτωση(Grigoriu, et al, 2016). Κατά τη λήψη των αποφάσεων θεραπείας, μπορεί επίσης να εξεταστεί η συμμετοχή σε κλινική δοκιμή. Οι κλινικές δοκιμές αποτελούν μια επιλογή που πρέπει να εξεταστεί για τη θεραπεία και τη φροντίδα σε όλα τα στάδια του καρκίνου(ASCO, 2020). Όσον αφορά τις ανεπιθύμητες ενέργειες της θεραπείας κατά του καρκίνου του πνεύμονα μπορούν συχνά να προληφθούν ή να αντιμετωπιστούν με τη βοήθεια κατάλληλης ιατρικής ομάδας. Αυτό ονομάζεται παρηγορητική ή υποστηρικτική φροντίδα και αποτελεί σημαντικό μέρος του συνολικού πλάνου θεραπείας (ASCO, 2020).

3.2.1. ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η ανοσοθεραπεία είναι μια σύγχρονη μέθοδος θεραπείας που είναι πολύ διαδεδομένη στην αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα και τα αποτελέσματά της επιτυγχάνονται με πιο φυσικό τρόπο(Βλάχωση, et al, 2019). Τα τελευταία χρόνια, έχοντας αναγνωρίσει τη δομή και τη λειτουργία του ανοσοποιητικού μας συστήματος, έχουν σχεδιαστεί καινοτόμα φάρμακα, αντισώματα που επιτρέπουν την επανενεργοποίηση της άμυνάς μας ενάντια στον καρκίνο, διαθέτοντας εξειδικευμένη ανοσολογική απόκριση εναντίον των καρκινικών κυττάρων και δημιουργώντας αντίστοιχα “κύτταρα μνήμης”, ώστε το θεραπευτικό αποτέλεσμα να έχει μακρόχρονη διάρκεια(Λινάρδου, 2018). Οι ερευνητές βρίσκονται συνεχώς σε αναζήτηση νέων θεραπειών και τρόπων να επιμηκύνουν το προσδόκιμο ζωής και να βελτιώσουν την ποιότητα ζωής του ασθενή. Για αυτό, μελετώνται νέοι συνδυασμοί χημειοθεραπείας, νέων μορφών ακτινοθεραπείας και ανοσοθεραπείας (Βλάχωση, et al, 2019). Αυτή η νέα στρατηγική-ορόσημο εκτός από την αντιμετώπιση πολλών όγκων, άρχισε πρόσφατα να εφαρμόζεται και στον καρκίνο του πνεύμονα και έχει αλλάξει το τοπίο και τις επιλογές στον αλγόριθμο αντιμετώπισης, προσφέροντας σημαντική ελπίδα για μακρόχρονη επιβίωση σε πολλούς ασθενείς. Ήδη υπάρχει σημαντική εμπειρία με την ανοσοθεραπεία στο μελάνωμα, ενώ ανοσοθεραπευτικοί παράγοντες εγκρίθηκαν ή βρίσκονται σε προχωρημένη κλινική ανάπτυξη για καρκίνο του πνεύμονα, καρκίνο κεφαλής-τραχήλου, καρκίνο ουροδόχου κύστης, καρκίνο νεφρού, λεμφώματα και άλλους όγκους. Σήμερα, για τον καρκίνο του πνεύμονα, μετά από αποτυχία της αρχικής θεραπείας με χημειοθεραπεία, η ανοσοθεραπεία μπορεί να προσφέρει αποκρίσεις, με διάρκεια και βελτίωση της επιβίωσης, με τρία εγκεκριμένα αντισώματα(Λινάρδου, 2018). Επιπλέον, αυτός ο τύπος βιολογικής θεραπείας, έχει επιδείξει μερικά ελπιδοφόρα αποτελέσματα σε άτομα με πλακώδη καρκίνο του πνεύμονα προχωρημένου σταδίου αλλά και με ΜΜΚΠ προχωρημένου σταδίου(Grigoriu, et al, 2016). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας ανοσοθεραπεία σε υποομάδα ασθενών με προχωρημένο καρκίνο του πνεύμονα, που οι όγκοι τους έχουν υψηλή έκφραση ενός νέου ανοσολογικού βιοδείκτη, του PDL-1, απεδείχθη ότι αυτή μπορεί να αντικαταστήσει τη χημειοθεραπεία από την πρώτη γραμμή αντιμετώπισης, προσφέροντας σημαντικές και μακρόχρονες αποκρίσεις ενώ υπερδιδυλασιάζει τη συνολική επιβίωση σε σχέση με την κλασική χημειοθεραπεία. Μετά από τις σημαντικές αυτές επιτυχίες της ανοσοθεραπείας ως μονοθεραπείας, εν καιρώ ήρθαν

και τα πρώτα θετικά αποτελέσματα από την εφαρμογή της συνδυαστικά με κλασική χημειοθεραπεία, ή με άλλες ανοσοθεραπείες ή ακόμα και με τριπλούς συνδυασμούς με χημειοθεραπεία και βιολογικούς παράγοντες. Έτσι, στα ετήσια παγκόσμια συνέδρια των αμερικανικών εταιριών Κλινικής Έρευνας και Κλινικής Ογκολογίας αντίστοιχα, ανακοινώθηκαν σημαντικά δεδομένα για μονοθεραπεία και συνδυασμούς ανοσοθεραπείας στον καρκίνο του πνεύμονα, που έρχονται να αλλάξουν ολοκληρωτικά τον τρόπο με τον οποίο θεραπεύεται αυτή η νόσος. Ακόμα, νέοι βιοδείκτες, όπως το φορτίο μεταλλάξεων σε έναν όγκο, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ασθενείς που θα ωφεληθούν σημαντικά μόνο με συνδυασμούς ανοσοθεραπειών, χωρίς καθόλου χημειοθεραπεία. Επιπλέον, όταν συνδυαστούν όλες οι μέθοδοι, χημειοθεραπεία με ανοσοθεραπεία, ή ακόμα και με βιολογικούς παράγοντες, μπορεί να αυξηθεί σημαντικά η απόκριση και η συνολική επιβίωση των ασθενών, ακόμα και αυτών με νόσο κακής πρόγνωσης, και ανεξάρτητα από την έκφραση του βιοδείκτη. Τέλος, η ανοσοθεραπεία λόγω των εντυπωσιακών αποτελεσμάτων της, παίζει πλέον πολύ σημαντικό ρόλο και σε πιο πρώιμα στάδια του καρκίνου του πνεύμονα, όταν η νόσος είναι μόνο τοπικά προχωρημένη π.χ. σε ασθενείς με νόσο σταδίου III. Ουσιαστικά, μετά την κλασική χημειο-ακτινοθεραπεία, η προσθήκη της ανοσοθεραπείας ως θεραπεία συντήρησης τριπλασίασε την επιβίωση χωρίς υποτροπή της νόσου και αύξησε σημαντικά τη συνολική επιβίωση, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που ανακοινώθηκαν στο παγκόσμιο συνέδριο του καρκίνου του πνεύμονα στον Καναδά, και είναι αδιαμφισβήτητα χωρίς προηγούμενο, προσφέροντας μια από τις σημαντικότερες εξελίξεις των τελευταίων χρόνων στην αντιμετώπιση πιο αρχικών σταδίων αυτής της δύσκολης νόσου και φέροντας αισιοδοξία ότι η μακρόχρονη επιβίωση και για τους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα είναι εφικτή([Λινάρδου, 2018](#)).

Παρόλα αυτά, οι πρόσφατες κλινικές επιτυχίες των προσεγγίσεων ανοσοθεραπείας στον καρκίνο του πνεύμονα έχουν δημιουργήσει πρόσθετες προκλήσεις για την επιστημονική κοινότητα και για τους παθολόγους έτσι ώστε να αναπτύξουν προγνωστικούς βιοδείκτες απόκρισης σε αυτές τις θεραπείες και έχουν επισημάνει την ανάγκη για σωστή προμήθεια και επεξεργασία δειγμάτων ιστού από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα ([Villalobos, et al, 2017](#)).

Προκειμένου να διαπιστωθεί, εάν ο τύπος του καρκίνου του πνεύμονα από τον οποίο πάσχει κάποιος μπορεί να αντιμετωπιστεί με στοχευμένη θεραπεία, θα χρειαστεί να υποβληθεί σε μια μοριακή διαγνωστική εξέταση. Οι εξετάσεις αυτές συνίστανται στην ανάλυση των βιολογικών δεικτών ενός δείγματος ιστού από τον όγκο του ασθενούς και βοηθούν στην ανεύρεση περισσότερων στοιχείων όσον αφορά το εάν ένα συγκεκριμένο φάρμακο ή μια στοχευμένη θεραπεία θα μπορούσαν να έχουν αποτέλεσμα στην εκάστοτε περίπτωση. Η εξέταση αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί τη στιγμή της διάγνωσης ή σε μεταγενέστερο στάδιο της θεραπείας([Grigoriu, et al, 2016](#)).

3.2.2. ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

Αν και οι θεραπευτικές βελτιώσεις που παρατηρήθηκαν στις κλινικές δοκιμές για τον καρκίνο του πνεύμονα ήταν μέτριες, η ανακάλυψη του πρώτου μικρού μορίου αναστολέα στον καρκίνο του πνεύμονα την τελευταία δεκαετία έφερε την ελπίδα ότι θα αυξηθεί ο αριθμός των διαθέσιμων μορίων-αναστολέων στο εγγύς μέλλον για τη μείωση του πόνου και της θνησιμότητας σε ασθενείς με αυτήν την καταστροφική ασθένεια([Cagle, et al, 2012](#)). Έτσι, ως αποτέλεσμα της προόδου που έχουν σημειώσει οι ειδικοί όσον αφορά την κατανόηση της βιολογίας του καρκίνου του πνεύμονα, κατέστη δυνατή η ανάπτυξη νέων φαρμάκων με

δράση κατά συγκεκριμένων τμημάτων του όγκου([Grigoriu, et al, 2016](#)). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν μονοκλωνικά αντισώματα που αναστέλλουν τη δράση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα καθώς και οι αναστολείς της τυροσινικής κινάσης με ένδειξη τον προχωρημένο, μεταστατικό ή υποτροπιάζοντα καρκίνο του πνεύμονα([GEORGAKOPOULOS, 2015](#)).

Οι λεγόμενες βιολογικές ή στοχευμένες θεραπείες([Grigoriu, et al, 2016](#)) καθορίζονται βάσει της γενετικής διαταραχής του τύπου του καρκίνου που έχει ο κάθε ασθενής. Αυτού του είδους οι θεραπείες αναστέλλουν το μηχανισμό δράσης του εκάστοτε κυττάρου. Για παράδειγμα, στην περίπτωση του αδενοκαρκινώματος εξετάζεται αν ο όγκος φέρει κάποιες γενετικές μεταλλάξεις, στις οποίες θα στοχεύσουν τα ειδικά φάρμακα([Βλάσση, et al, 2019](#)). Ειδικότερα, οι στοχευμένες θεραπείες κατά συγκεκριμένων μορφών του καρκίνου του πνεύμονα συνίστανται πλέον σε φαρμακευτικές αγωγές διαθέσιμες υπό τη μορφή δισκίων, π.χ. οι αναστολείς του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) στοχεύονται με τα φάρμακα ερλοτινίμη ή γεφτινίμη, καθώς αυτά έχουν ιδιαίτερα ωφέλιμα αποτελέσματα για ανθρώπους, των οποίων ο όγκος δεν μπορεί να αφαιρεθεί χειρουργικά. Επίσης, το φάρμακο κριζοτινίμη αποδεικνύεται ιδιαίτερα αποτελεσματικό ως αναστολέας της κινάσης του αναπλαστικού λεμφώματος(ALK). Γενικά, η δράση των φαρμάκων αυτών συνίσταται στην αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων και στον έλεγχο αυτής για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ο ασθενής μπορεί να παίρνει τα δισκία στο σπίτι, χωρίς να χρειάζεται να επισκέπτεται μια κλινική, όπως θα έκανε στην περίπτωση της χημειοθεραπείας. Επιπλέον, οι στοχευμένες θεραπείες είθισται να έχουν λιγότερες παρενέργειες σε σχέση με άλλες μεθόδους θεραπείας. Ωστόσο, δεν έχουν πάντα θετικά αποτελέσματα για όλους τους ασθενείς, καθώς η αποτελεσματικότητά τους εξαρτάται και από το είδος του όγκου. Ακόμα, η δυνατότητα πρόσβασης ή μη σε αυτά τα φάρμακα μπορεί να εξαρτάται από τις συστάσεις που ισχύουν στη κάθε χώρα σχετικά με τη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα και τη χρηματοδότηση από τα εθνικά συστήματα υγειονομικής περίθαλψης([Grigoriu, et al, 2016](#)).

Τα τελευταία 10 χρόνια, έχουν εγκριθεί 4 στοχευμένες θεραπείες για την θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα: γεφτινίμη το 2002, ερλοτινίμη το 2003, βεβασιζουμάμη το 2006 και κριζοτινίμη το 2011. Έτσι λοιπόν, με την ανάπτυξη νέων στοχευμένων θεραπειών, έχουν τεθεί τεράστιες προσπάθειες προς ταυτοποίηση προγνωστικών βιοδεικτών και δυνητικά φαρμακευτικών μοριακών αλλοιώσεων, ειδικά ενάντια σε γνωστές μεταλλάξεις ενεργοποίησης. Αν και έχουν περιγραφεί πολλές μεταλλάξεις στο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα, η κατάσταση μετάλλαξης παραμένει άγνωστη σε περισσότερο από το 50% των περιπτώσεων. Μέχρι σήμερα, μπορούμε να εντοπίσουμε θεραπευτικούς στόχους μόνο στο 20% των καρκίνων των πνευμόνων([Cagle, et al, 2012](#)).

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της δύναμης των στοχευμένων θεραπειών σε μια προσέγγιση εξατομικευμένης ιατρικής αποδείχθηκε το 2004 από τους Lynch et al.([Lynch, et al, 2004](#)) και Paez et al.([Paez, et al, 2004](#)) που απέδειξαν ότι οι ασθενείς με υπάρχων μεταλλάξεις EGFR στους όγκους αυτών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα παρουσίασαν μια δραματική απόκριση στην γεφτινίμη, τον αναστολέα τυροσινικής κινάσης (TKI) του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα(EGFR), κάνοντας αυτή την μέθοδο πραγματικότητα για ένα υποσύνολο ασθενών με NSCLC. Ωστόσο, η χρήση ακριβών συστημικών στοχευμένων θεραπειών, έχει παραδοσιακά απαιτήσει επεμβατικές βιοψίες για να εκτιμήσει στοχευόμενες εκτροπές όγκων. Αυτό αποτελεί πρόκληση για την παρακολούθηση των καρκίνων του πνεύμονα λόγω της απαίτησης διαμήκους

δειγματοληψίας όγκων. Μοριακές στοχευμένες θεραπείες όπως αυτές με αναστολείς της τυροσινικής κινάσης (TKIs) σε μεταλλάξεις του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) και με αναστολείς της κινάσης του αναπλαστικού λεμφώματος (ALK) στην ALK αναδιάταξη σε ασθενείς με NSCLC έχουν πρόσφατα προχωρήσει στη διαχείριση του καρκίνου του πνεύμονα για περιορισμένο ποσοστό ασθενών. Ωστόσο, για να καθοριστεί επιλεξιμότητα για τέτοιες στοχευμένες θεραπείες, έχουν γίνει βιοψίες όγκων παραδοσιακά που ήταν απαραίτητο, αυξάνοντας την πιθανότητα αντίστοιχων επιπλοκών. Ακόμη και σε ασθενείς που αναπτύσσουν αντίσταση στην πρώτη σειρά EGFR TKIs, οι υγρές βιοψίες χρησιμοποιώντας ctDNA πλάσματος ανιχνεύουν μόνο μεταλλάξεις T790M στο 80% των περιπτώσεων, ιδιαίτερα σε ασθενείς χαμηλού μεταλλακτικού φορτίου, κάνοντας μια επαναλαμβανόμενη βιοψία ξανά απαραίτητη. Έτσι, η ετερογένεια εντός του όγκου(στην πρωτογενή εστία) ή μεταξύ της πρωτογενής εστίας και της θέσης στην οποία ο όγκος μεταναστεύει, δημιουργεί δυνατότητες μεροληπτικής δειγματοληψίας, η οποία μπορεί να καλύψει το πραγματικό γενετικό προφίλ του καρκίνου. Τέλος, η προοπτική της διαμήκους δειγματοληψίας έτσι ώστε να παρακολουθείται η ανάπτυξη της θεραπευτικής αντοχής στις θεραπείες είναι εξίσου περιορισμένη εάν οι επεμβατικές βιοψίες είναι απαραίτητες ([Kapeleris, et al, 2018](#)).

3.3. ΔΕΙΚΤΕΣ ΥΓΡΗΣ ΒΙΟΨΙΑΣ

Τα τελευταία χρόνια, ο εντοπισμός μοριακών ανωμαλιών σε μεγάλο ποσοστό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα επέτρεψε την εμφάνιση εξατομικευμένων στοχευμένων θεραπειών, άνοιξε νέους ορίζοντες και δημιούργησε νέες προσδοκίες για αυτούς τους ασθενείς ([Villalobos, et al, 2017](#)). Έτσι, με την πρόοδο των μη επεμβατικών διαγνωστικών μεθόδων ενισχύθηκε η δυνατότητα ανίχνευσης καρκίνου του πνεύμονα([Wadowska, et al, 2020](#)) και η χρήση προγνωστικών βιοδεικτών για τον εντοπισμό όγκων που θα μπορούσαν να αποκριθούν σε στοχευμένες θεραπείες σήμαινε μια αλλαγή στο πρότυπο της διάγνωσης του καρκίνου του πνεύμονα([Villalobos, et al, 2017](#)). Ωστόσο παρά τις εξελίξεις στην έγκαιρη ανίχνευση και στην τυπική θεραπεία μόνο το 10-15% των νέων περιπτώσεων διαγιγνώσκονται στο κλινικό πρώιμο στάδιο. Συνολικά ένα 75% των ασθενών έχουν διαγνωστεί με καρκίνο του πνεύμονα στο προχωρημένο στάδιο, όταν οι επιλογές θεραπείας είναι πλέον περιορισμένες. Αυτό συμβαίνει καθώς τα διαγνωστικά εργαλεία που χρησιμοποιούνται αυτήν τη στιγμή - δηλαδή, ακτινογραφία θώρακος και κυτταρολογία πτυέλων - δεν είναι αρκετά ευαίσθητα στη διάγνωση μη μικροκυτταρικού καρκινώματος του πνεύμονα (NSCLC), ενώ δείκτες όγκου, όπως CEA (καρκινοεμβρυονικό αντιγόνο), CYFRA 21-1, NSE (ειδική για νευρώνες ενολάση) ή το SCCA (αντιγόνο καρκινώματος πλακωδών κυττάρων) δεν κάνουν τη διάγνωση πιθανή στο πρώιμο στάδιο του καρκίνου του πνεύμονα([Wadowska, et al, 2020](#)).

Έτσι, καθυστερημένη διάγνωση είναι μια σημαντική υποκείμενη αιτία για την προχωρημένη παρουσίαση της νόσου. Όπως ξέρουμε, το ετήσιο ποσοστό θνησιμότητας για καρκίνο του πνεύμονα είναι υψηλότερο από ό, τι για τους καρκίνους του παχέος εντέρου, του μαστού και του προστάτη σε συνδυασμό. Η πλειονότητα των ασθενών που παρουσιάζουν προχωρημένο στάδιο στη διάγνωση συμβάλλει σε αυτό το κακό αποτέλεσμα([Kapeleris, et al, 2018](#)). Εάν εντοπιστεί σε πρώιμο στάδιο, η χειρουργική εκτομή του NSCLC προσφέρει ευνοϊκή πρόγνωση, με ποσοστά επιβίωσης 5 ετών 70-90% για μικρούς, εντοπισμένους όγκους (στάδιο I). Ωστόσο, οι περισσότεροι ασθενείς είχαν προχωρημένη νόσο κατά τη στιγμή της διάγνωσης (στάδιο III / IV) και παρόλο τις σημαντικές εξελίξεις στην ογκολογική διαχείριση των καρκίνων του πνεύμονα όψιμου σταδίου τα τελευταία χρόνια, η επιβίωση παραμένει κακή. Το 2014,

το Ηνωμένο Βασίλειο για τις National Statistics ανέφερε ότι οι ασθενείς που διαγνώστηκαν με μετέπειτα μεταστατική νόσο (στάδιο IV) είχαν ποσοστό επιβίωσης 1 έτους μόλις 15–19% σε σύγκριση με 81–85% για το στάδιο I. Ο SCLC είναι πιο επιθετικός από τον NSCLC, με ομοιόμορφη πρόγνωση χειρότερη - η συνολική 5ετής επιβίωση είναι περίπου 5%. Η πρώιμη διάδοση είναι χαρακτηριστική και κατά συνέπεια περισσότερο από το 90% των ασθενών παρουσιάζουν τοπικά προχωρημένα ή μεταστατική νόσο σε μετέπειτα χρονικό διάστημα (στάδιο III / IV)([Knight, et al, 2017](#)).

Αυτά τα δεδομένα δείχνουν την ανάγκη εύρεσης πιο συγκεκριμένων, λιγότερο επεμβατικών βιοδεικτών που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά ή συμπληρωματικά με τις ακτινολογικές προσεγγίσεις και να βελτιώσουν την ανίχνευση καρκίνου του πνεύμονα και τον προσδιορισμό του σταδίου του. Στην εποχή μας, ανιχνεύονται μεταλλάξεις που είναι χαρακτηριστικές του καρκίνου του πνεύμονα οι οποίες επιτρέπουν τη διάγνωση στο αρχικό στάδιο του. Οι μεταλλάξεις είναι εγγενές χαρακτηριστικό της ανάπτυξης του καρκίνου του πνεύμονα και η ανίχνευσή τους έχει σημασία τόσο στα διαγνωστικά όσο και στα θεραπευτικά στάδια της νόσου. Μεταλλάξεις στην καρκινογένεση που πλεονεκτούν στα καρκινικά κύτταρα θεωρούνται μεταλλάξεις “οδηγοί”. Ο αριθμός αυτών των μεταλλάξεων που επηρεάζει την καρκινογένεση είναι περιορισμένος. Οι περισσότεροι συμπαγείς όγκοι εμφανίζουν μεταξύ 40 και 150 “μη σιωπηλές” μεταλλάξεις και οι περισσότερες από αυτές θεωρούνται “παθητικές” μεταλλάξεις που δεν συμβάλλουν στον κακοήθη φαινότυπο. Ένα ευρύ φάσμα γονιδιωματικών αλλαγών που παρατηρούνται στον καρκίνο του πνεύμονα σχετίζεται με την ταξινόμηση μετάλλαξης, η οποία απαιτεί μια κλιμακωτή προσέγγιση και μπορεί να επιτρέψει τη διαφοροποίηση των μεταλλάξεων-“οδηγών” από τις “παθητικές” μεταλλάξεις. Επιπλέον, η βαθιά ανάλυση των αλλαγών του γονιδιώματος που οδηγεί στην ανάπτυξη του καρκίνου επιτρέπει την αναζήτηση ανωμαλιών σε συγκεκριμένα γονίδια, τα οποία μπορεί να είναι συγκεκριμένοι δείκτες όγκου που χρησιμοποιούνται ως διαγνωστικοί ([Wadowska, et al, 2020](#)).

Ωστόσο, η ταυτοποίηση των καρκινικών γονιδιωματικών στόχων για καθεμία από τις αλλαγές σωματικών αντιγράφων (SCNAs) είναι μια σημαντική πρόκληση. Η πλειονότητα των όγκων εξακολουθεί να στερείται αναγνωρισμένου μοριακού οδηγού που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως γενετικός βιοδείκτης. Οι εκτενείς έλεγχοι που αναζητούν μεγάλο αριθμό γονιδιωματικών αλλοιώσεων μπορεί να προσφέρουν κλινικά σημαντικές πληροφορίες που θα μας επιτρέψουν να επηρεάσουμε τις θεραπευτικές επιλογές και την πρόγνωση των ασθενών. Επειδή τα SCNA μπορεί να αλληλεπικαλύπτονται και να στοχεύουν διαφορετικά γονίδια σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου, όλα τα κατάλληλα SCNA πρέπει να ελεγχθούν σε κατάλληλο σύστημα μοντέλου. Η μοριακή διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα, παρόμοια με τους σκοπούς εφαρμογής της NGS διερευνάται σε δύο τομείς - για ερευνητικούς σκοπούς, για να βρεθούν νέες φαρμακευτικές μεταλλάξεις και στην κλινική πρακτική για τη διάγνωση και την επιλογή επιλέξιμων ασθενών για συγκεκριμένη θεραπεία με αναστολέα τυροσινικής κινάσης (TKI). Η διαθεσιμότητα του NGS έχει επιτρέψει τον πλήρη χαρακτηρισμό των μεταλλάξεων του καρκίνου του πνεύμονα στο International Cancer Genome Consortium και στο Cancer Genome Atlas. Ειδικότερα, αυτά τα έργα ασχολούνται με την ανάπτυξη της εξατομικευμένης ιατρικής και την διαθεσιμότητα στοχευμένων θεραπειών για ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα (AC) και καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων (SCC) στην πρώτη περίπτωση. Οι οδηγίες του National Comprehensive Cancer Network προτείνουν τον έλεγχο μιας ομάδας γονιδίων για το NSCLC, που αποτελείται από μεταλλάξεις του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), αναδιατάξεις της κινάσης αναπλαστικού λεμφώματος (ALK) και αναδιατάξεις ογκογονιδίου c-ros 1 (ROS1). Αυτοί οι βιοδείκτες θεωρούνται βιοδείκτες “must-

test” στη διάγνωση ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα και αναλύονται με προσδιορισμούς ενός γονιδίου όπως PCR, ανοσοϊστοχημεία (IHC) και FISH. Η αλληλουχία Sanger, η qPCR, η ddPCR, η IHC και η FISH θεωρούνται ως gold standard τεχνικές μοριακής ανάλυσης στην κλινική πρακτική, ενώ η αλληλούχιση ενός μόνο όγκου, η αλληλούχιση αντιστοίχισης όγκου και η αλληλούχιση του φυσιολογικού ιστού είναι τα gold standard ανίχνευσης σωματικής μετάλλαξης. Το 2020, στη μελέτη των Park et al. ([Park, et al, 2020](#)), οι ερευνητές συνέκριναν τον έλεγχο ενός γονιδίου, με RT-PCR, IHC και FISH σε στοχευμένο NGS. Θεωρώντας τα αποτελέσματα του NGS ως τα τελικά, η EGFR PCR αποκάλυψε ευαισθησία 80,3% και ειδικότητα 99,4%, η ALK FISH έδειξε 71,4% ευαισθησία και 100% ειδικότητα, και η ROS1 FISH έδειξε 100% ευαισθησία και 99,5% ειδικότητα. Αυτά τα αποτελέσματα σχετίζονται με τη χαμηλότερη ευαισθησία των προσδιορισμών ενός γονιδίου σε σύγκριση με το βάθος της στοχευμένης αλληλουχίας του NGS. Τα δεδομένα αποκάλυψαν επίσης την ανάγκη επανεπικύρωσης των αποτελεσμάτων των ελέγχων ενός γονιδίου, ειδικά για αρνητικές δοκιμασίες EGFR ([Wadowska, et al, 2020](#)).

Οι πρώτες αναγνωρισμένες μεταλλάξεις στο NSCLC αναγνωρίστηκαν στα KRAS και TP53. Στη συνέχεια, το 2004 μεταλλάξεις στον τομέα της κινάσης του EGFR περιέγραψαν ότι άλλαξε το πρότυπο θεραπείας του καρκίνου του πνεύμονα. Και οι δύο μεταλλάξεις KRAS και EGFR ταυτοποιήθηκαν σχεδόν αποκλειστικά στο αδενοκαρκίνωμα των πνευμόνων, παρόμοια με τις αναδιατάξεις που περιλαμβάνουν ALK και ROS1, που περιγράφηκαν το 2007. Το KRAS δεν ήταν μόνο η πρώτη περιγραφείσα μετάλλαξη αλλά και το πιο συχνά μεταλλαγμένο ογκογόνο στο NSCLC (20-35%). Επιπλέον, ενεργοποιητικές μεταλλάξεις EGFR υπάρχουν στο 15% περίπου του NSCLC, ενώ οι αλλοιώσεις ALK και ROS1 είναι αρκετά σπάνιες (<5% των καρκίνων του πνεύμονα) αλλά είναι συχνές μεταξύ ελαφρών και μη καπνιστών. Αυτές οι μεταλλάξεις - EGFR, ALK και ROS – μπορεί να προβλέψουν μια καλή απόκριση στη θεραπεία με τον ειδικό αναστολέα τυροσινικής κινάσης (TKI). Γενικά, ο αριθμός των κλινικά σχετικών γονιδιωματικών μεταβολών με ήδη διαθέσιμους ή πρόσφατα ανεπτυγμένους αναστολείς κινάσης αυξάνεται ραγδαία. Υπάρχουν πολλές άλλες σημαντικές αναγνωρισμένες ογκογονικές μεταβολές στο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα που μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθούν ως δυνητικά στοχευόμενες αλλοιώσεις, συμπεριλαμβανομένου του B-Raf πρωτο-ογκογόνου (BRAF), του υποδοχέα 2 τυροσινικής κινάσης Erb-B2 (ERBB2), του συντελεστή μεσεγγυματικής-επιθηλιακής μετάβασης (MET), και της αναδιάταξης μέσω επιμόλυνσης (RET). Τρέχουσες τεχνολογίες όπως η προσέγγιση του NGS αποκαλύπτουν πολλαπλές μεταβολές γονιδίων σε έναν μόνο όγκο, ωστόσο η συνύπαρξη περισσότερων σπάνια είναι ένας ογκογόνος οδηγός. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν στη μελέτη του Lung Cancer Mutation Consortium αποκάλυψαν ότι, μεταξύ 1007 αδενοκαρκινωμάτων πνευμόνων, η συνύπαρξη περισσότερων από ενός ογκογόνων-“οδηγών” βρέθηκε μόνο στο 3% των ασθενών. Αρχικά, η μοριακή διάγνωση του καρκινώματος των πλακωδών κυττάρων (SCC) βασίστηκε στην απουσία ορισμένων στοχευόμενων γενωμικών αλλοιώσεων που απαντώνται συνήθως στο αδενοκαρκίνωμα - δηλαδή, EGFR και ALK. Το 2018 σε μία περαιτέρω μελέτη, οι Devarakonda et al. ([Devarakonda, et al, 2018](#)) ανέλυσαν τα μοριακά προφίλ, αποτελούμενα από 1538 γονίδια, από 908 ασθενείς με NSCLC. Τα αποτελέσματά τους αποκάλυψαν διαφορές στη συχνότητα μετάλλαξης μεταξύ αδενοκαρκινώματος και SCC, και όπως ήταν αναμενόμενο, οι χαρακτηριστικές ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του αδενοκαρκινώματος όπως τα KRAS, HRAS, NRAS και EGFR αναγνωρίστηκαν μόνο στο 3% των SCC (Πίνακας 4) ([Wadowska, et al, 2020](#)).

Πίνακας 4: Η ταξινόμηση του καρκίνου του πνεύμονα και οι αντίστοιχες συνήθειες μεταλλάξεις(Kapeleris, et al, 2018).

		Location in the lung	Common features	Common mutations
NSCLC (80–86%)	Adenocarcinoma (40%)	Peripheral	<ul style="list-style-type: none"> • Most common type of cancer in non- smokers • More common in women • Should test for EGFR, ALK, ROS1 and BRAF mutation for targeted therapy 	<ul style="list-style-type: none"> • EGFR • KRAS • CDKN2A • ALK • BRAF • MET • TP53
	Squamous cell carcinoma (25-30%)	Central and Peripheral	<ul style="list-style-type: none"> • Strongly associated with cigarette smoking 	
	Large cell carcinoma (10-15%)	Peripheral	<ul style="list-style-type: none"> • Similar characteristics to adenocarcinoma 	
SCLC (15–20%)		Central	<ul style="list-style-type: none"> • Strongest association with smoking • Very rapid growth • Early distant metastasis in brain, liver and bone • Worst prognosis • Better response to chemotherapy 	<ul style="list-style-type: none"> • MYC • BCL2 • c-KIT • TP53 • RB

Όσον αφορά τις τεχνικές, ο καρκίνος του πνεύμονα διαγιγνώσκεται ολοένα και περισσότερο από βιοψία βελόνας διαθωρακικού πυρήνα και αναρρόφηση λεπτής βελόνας (FNA), αναρρόφηση δια βρογχικής βελόνας, αναρρόφηση διαβρογχικής βελόνας με ενδοβρογχικό υπερηχογράφημα και FNA που καθοδηγείται από υπερηχογράφημα. Είναι καλά αποδεδειγμένο ότι το κακώς διαφοροποιημένο αδενοκαρκίνωμα και το καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων του πνεύμονα μπορεί να εμφανιστούν αδιακρίτως με μικροσκοπία ρουτίνας, ιδιαίτερα σε μικρά δείγματα βιοψίας και κυτταρολογίας. Σε αυτά τα μικρά δείγματα, ιδιαίτερα σε κακώς διαφοροποιημένους όγκους, πρέπει να ενσωματωθεί η μορφολογία με την ανάλυση IHC για να γίνει μια ακριβής διάγνωση. Αυτό περιλαμβάνει την εξέταση της έκφρασης IHC του παράγοντα μεταγραφής του θυρεοειδούς (TTF1) και της νέας ασπартικής πρωτεΐνης της οικογένειας πεψίνης A (ναψίνη A) για αδενοκαρκίνωμα και p40 και της κυτοκερατίνης 5/6 για καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων. Επιπλέον, η ιστοχημική χρώση της βλεννίνης είναι χρήσιμη για τη διάγνωση της ιστολογίας του αδενοκαρκινώματος. Η σωστή ιστολογική διάγνωση αυτών των δειγμάτων είναι σημαντική, αλλά είναι επίσης επιτακτική ανάγκη να χρησιμοποιηθεί σωστά ο ιστός για τη μεγιστοποίηση της απόδοσης για μοριακούς ελέγχους(Villalobos, et al, 2017).

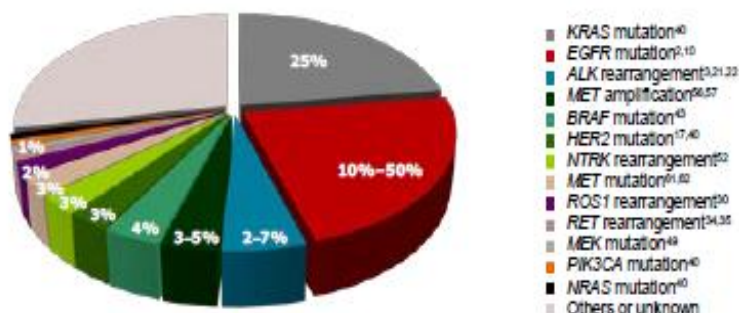
Η πρώτη γραμμής θεραπεία θα πρέπει πάντα να γίνεται όταν ο ασθενής έχει καλή φυσική κατάσταση, δηλαδή όταν ο ασθενής είναι σε θέση να ανεχτεί καλύτερα τις πιθανές παρενέργειες της συστηματικής θεραπείας. Η βιολογική θεραπεία η οποία χορηγείται είτε σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία (όπως για τη μπεβασιζουμάμπη), είτε ως μονοθεραπεία (όπως η γεφτινίμη και η ερλοτινίμη) συνήθως δεν διακόπτεται ποτέ (εάν είναι καλά ανεκτή), εκτός αν οι ακτινολογικές εξετάσεις αναδείξουν πρόοδο νόσου. Η δεύτερης και τρίτης γραμμής θεραπεία μπορούν να χορηγηθούν μετά την εξέλιξη της νόσου στη θεραπεία πρώτης γραμμής σε ασθενείς οι οποίοι εξακολουθούν να είναι κατάλληλοι για να λάβουν περαιτέρω θεραπεία. Η μονοθεραπεία με δοσεταξέλη ή πεμετρεξάτη (το τελευταίο για μη πλακώδη καρκίνο μόνο), ή η στοχεύουσα θεραπεία με γεφτινίμη (για EGFR μεταλλαγμένους όγκους μόνο), βελτιώνει τα συμπτώματα που σχετίζονται με τον όγκο και την επιβίωση. Το ίδιο ισχύει και για τη μονοθεραπεία με ερλοτινίμη όταν δίνεται ως

δεύτερης (σε ασθενείς που δεν μπορούν να ανεχθούν χημειοθεραπεία) ή τρίτης γραμμής θεραπεία ανεξάρτητα από την ύπαρξη μετάλλαξης του EGFR. Ασθενείς με όγκους που παρουσιάζουν αναδιάταξη στο γονίδιο ALK (περίπου 5% όλων των ασθενών) μπορούν να λάβουν ως θεραπεία δεύτερης γραμμής κριζοτινίμη, ένα φάρμακο το οποίο πρόσφατα έχει εγκριθεί σε μερικές χώρες ([Metro, et al, 2014](#)).

Έτσι, η άμεση ανάγκη για έγκαιρη ανίχνευση υποτροπής του καρκίνου του πνεύμονα και η παρακολούθηση της απόκρισης στη θεραπεία είναι απαραίτητες για τη διευκόλυνση της βελτιωμένης επιβίωσης των ασθενών. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ο έλεγχος της αξονικής τομογραφίας (CT) βοήθησε στη μείωση της θνησιμότητας, ωστόσο η CT έχει κινδύνους όπως η έκθεση σε ακτινοβολία, οδηγώντας σε αυξημένο κίνδυνο μακροχρόνιου καρκίνου. Αυτό σημαίνει την ανάγκη για λιγότερο επεμβατικές τεχνικές για τις αρχές ανίχνευσης μετάστασης και ενίσχυση της εξατομικευμένης θεραπείας του καρκίνου του πνεύμονα ([Kapelleris, et al, 2018](#)).

Η εξατομικευμένη θεραπεία στοχεύει στην αντιστοίχιση αυτών των γονιδιοτυπικών αδενοκαρκινωμάτων

των πνευμόνων με αποτελεσματικές στοχευμένες θεραπείες όπως συγκεκριμένα TKIs, και για αυτό χρησιμοποιείται. Ο μοριακός έλεγχος για EGFR και ALK θεωρείται πλέον πρότυπο φροντίδας, με άλλες μεταλλάξεις “οδηγών” στα ογκογόνα όπως ROS1, BRAF (σάρκωμα ποντικού v-Raf ογκολογικό ομόλογο



Σχήμα 5: Η συχνότητα μεταλλάξεων/γονιδιωματικών μεταβολών στο NSCLC (αδενοκαρκίνωμα) σε πληθυσμούς Καυκάσου Όπως φαίνεται στην εικόνα οι μεταλλάξεις EGFR, KRAS και οι αναδιατάξεις ALK είναι οι συνηθέστερες που εντοπίζονται στο αδενοκαρκίνωμα με ποσοστά 25%, 10-50% και 2-7% αντίστοιχα. Οι υπόλοιπες αντιπροσωπεύουν ένα μικρότερο ποσοστό στον αντίστοιχο πληθυσμό ([Salgia, 2016](#)).

ιού B), RET (αναδιάταξης μέσω επιμόλυνσης), MEK1 (μιτογόνα πρωτεϊνική κινάση 1), NTRK (υποδοχέας νευροτροφικής κινάσης τυροσίνης), MET και KRAS (ιογενές ομόλογο ογκογονικό γονίδιο του σαρκώματος των αρουραίων Kirsten) (Σχ. 5) επίσης όλο και περισσότερο να ενσωματώνονται στη διαγνωστική επεξεργασία των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα, έτσι ώστε να καθορίσουν την καταλληλότητά τους για εγγραφή σε διάφορες κλινικές μελέτες με κατάλληλα στοχευμένα μόρια αναστολείς ([Salgia, 2016](#)).

Ασθενείς των οποίων οι όγκοι έχουν διαγραφές εξονίου 19 ή μεταλλάξεις εξονίου 18 (G719X, G719A, G719S, G719C, G719D), εξονίου 20 (S768I) ή εξονίου 21 (L858R, L861Q, L861R) είναι ευαίσθητοι στη θεραπεία EGFR-TKI. Η ερλοτινίμη εγκρίθηκε από το FDA το 2013 για τη θεραπεία πρώτης γραμμής για ασθενείς με μεταστατικό NSCLC που περιέχει μεταλλάξεις υποκατάστασης EGFR εξονίου 19 ή μεταλλάξεις υποκατάστασης εξονίου 21 (L858R) σε ποσοστό απόκρισης 65% σε σύγκριση με το αντίστοιχο 16% με χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα, και διάμεσο διάστημα PFS 10,4 μηνών έναντι 5,2 μηνών ([Khozin, et al, 2014](#)). Η ερλοτινίμη είναι επίσης εγκεκριμένη για θεραπεία συντήρησης τοπικά προχωρημένου ή μεταστατικού NSCLC μετά από πλατίνα χημειοθεραπεία. Η αφατινίμη και η γεφτινίμη έχουν πλέον εγκριθεί πλήρως από το FDA (2013 και 2015, αντίστοιχα) για τη θεραπεία πρώτης γραμμής ασθενών με τους ίδιους τύπους μετάλλαξης EGFR σε NSCLC ([Salgia, 2016](#)).

Η απόδειξη της καταλληλότητας του ctDNA ως βιοδείκτη καρκίνου ήρθε με την ταυτοποίηση των KRAS γονιδιακών μεταλλάξεων στο ctDNA από το αίμα ασθενών με καρκίνο του παγκρέατος (De Rubis, et al, 2019). Παρόλο αυτά, και άλλα συστατικά του αίματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση ορισμένων θεραπευτικών στόχων για ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, συμπεριλαμβανομένου του ελεύθερου RNA πλάσματος ή του RNA σε ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο σε εξωσώματα ή αυτού που συσχετίζεται με αιμοπετάλια. Μεταξύ αυτών των RNA, το microRNA παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον (Hofman, 2017). Οι αλλαγές στα miRNAs από υγρές βιοψίες είναι προγνωστικές για απόκριση και μπορεί επίσης να βοηθήσουν στην παρακολούθηση της αντίστασης στη θεραπεία και στον εντοπισμό της πρώιμης εξέλιξης (Salgia, 2016). Επιπλέον, ενδιαφέρον έχουν και τα μικροσωματίδια σε πλάσμα, τα οποία είναι ετερογενή συστατικά που σχετίζονται με εξωσώματα, νουκλεοσώματα και σωματίδια μεγαλύτερου μεγέθους (Hofman, 2017). Ωστόσο, επί του παρόντος, κανένα από αυτά τα στοιχεία δεν χρησιμοποιείται στην εργαστηριακή πρακτική για την ανίχνευση των γονιδιωματικών αλλοιώσεων σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (Hofman, 2017). Τα ίδια τα CTC μπορεί επίσης να αναλυθούν μέσω υγρής βιοψίας για εξατομίκευση και παρακολούθηση θεραπειών και για αντίσταση (Salgia, 2016), ενώ παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση χρωμοσωμικών αναδιατάξεων ή CNVs επειδή μπορούν να υποβληθούν σε ανοσοκυτταροχημική και in situ φθορίζουν υβριδισμού ανάλυση, όπως αποδεικνύεται για τις αναδιατάξεις ALK και τις MET ενισχύσεις (Guibert, et al, 2020). Ωστόσο, πρόσφατα δεδομένα από μια μεγάλη πολυκεντρική κλινική μελέτη προτείνουν τα δείγματα ctDNA ως κατάλληλα για ανάλυση μετάλλαξης EGFR εκ των προτέρων όταν τα δείγματα ιστού δεν είναι διαθέσιμα (Salgia, 2016). Δηλαδή, το κυκλοφορούν καρκινικό DNA πλάσματος χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο για την ανάλυση μεταλλάξεων EGFR σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του πνεύμονα (Hofman, 2017) και οι ισχυρές και ευαίσθητες μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιούνται συνιστάται να ελαχιστοποιούν τα ψευδή αρνητικά αποτελέσματα που πιθανώς προκύπτουν (Salgia, 2016). Αντιθέτως, το RNA πλάσματος δεν χρησιμοποιείται στην καθημερινή πρακτική ή πολύ σπάνια χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της αναδιάταξης EML4-ALK. Εκτός από τις αναδιατάξεις της ALK, άλλα αντίγραφα σύντηξης των γονιδίων για τα ROS πρωτοογκογονίδια 1 (ROS1), τα RET πρωτοογκογονίδια (RET) ή τα NTRK γονίδια έχουν ταυτοποιηθεί στο 1-2% των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα προχωρημένου σταδίου. Αυτές οι γονιδιωματικές αλλοιώσεις ενδέχεται να σχετίζονται με στοχευμένες θεραπείες. Σε αυτό το πλαίσιο, αναπτύχθηκαν προσεγγίσεις NGS για τον εντοπισμό αυτών των γονιδιωματικών αλλοιώσεων σε δείγματα αίματος τα οποία είχαν καθαριστεί από ελεύθερα νουκλεϊκά οξέα. Με βάση την προσέγγιση “hybrid-capture”, αυτές οι τεχνικές δεν εντοπίζουν μόνο αναδιατάξεις αλλά και μεταλλάξεις σημείων, εισαγωγές, διαγραφές και παραλλαγές στον αριθμό αντιγράφων (Hofman, 2017).

Επί του παρόντος, η χρησιμότητα αλληλούχισης επόμενης γενιάς για ctDNA που προέρχεται από πλάσμα δεν περιορίζεται σε κοινές γενετικές αλλοιώσεις όπως EGFR, ALK ή ROS-1, αλλά μπορεί επίσης να ανιχνεύσει σχετικά ασυνήθιστες μεταλλάξεις όπως αναδιάταξη RET, ενίσχυση MET και εισαγωγή HER-2 (Mamdani, et al, 2017).

Έτσι, πολλές κλινικές δοκιμές βρίσκονται σε εξέλιξη ή σχεδιάζονται, για να διερευνήσουν την αλληλουχία και τους συνδυασμούς με βάση την προσαρμοσμένη θεραπεία και τους μηχανισμούς αντοχής, και τα αποτελέσματα ελπίζουμε να οδηγήσουν σε περαιτέρω βελτίωση της επιβίωσης για ασθενείς με προηγμένο NSCLC. Για τα αποτελέσματα αυτών των μελετών που θα μεταφραστούν σε όφελος ασθενών στον πραγματικό κόσμο, τόσο η κατάλληλη βιοψία όσο και οι διαγνωστικές πλατφόρμες και οι στρατηγικές θα πρέπει να εφαρμοστούν καθολικά. Ταυτόχρονα, η κλινική αποτελεσματικότητα των διαφορετικών

στοχευμένων θεραπειών ως ισχυρές εξατομικευμένες επιλογές θεραπείας για τους ασθενείς που θα παράγουν το μεγαλύτερο όφελος μπορεί να μεγιστοποιηθεί([Salgia, 2016](#)).

3.3.1. ctDNA

Το ctDNA μπορεί να είναι ένας πολλά υποσχόμενος δείκτης στην ανίχνευση του πρώιμου καρκίνου του πνεύμονα, στην απόκριση στη θεραπεία, στους αναδυόμενους μηχανισμούς αντοχής στα φάρμακα και στην υποτροπή. Τα τελευταία χρόνια, μία ερευνητική ομάδα ([Liang, et al, 2018](#)) προσπάθησε να εντοπίσει την παρουσία μικρών αλλοιώσεων σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα μέσω της ανίχνευσης μέσω τσιπ και της αλληλουχίας υψηλής απόδοσης. Χρησιμοποιώντας αυτή τη προσέγγιση, διεξήχθησαν δύο μελέτες. Στην πρώτη μελέτη, εξετάστηκαν οι πιο σημαντικές γενετικές μεταλλάξεις στον ασιατικό πληθυσμό με βάση ένα προφίλ αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) ενός μεγάλου δείγματος. Χρησιμοποιώντας αυτές τις πληροφορίες, σχεδιάστηκε ένα πάνελ με την πιο συχνή γονιδιακή μετάλλαξη που θα μπορούσε να καλύψει περισσότερο από το 80% των περιοχών μεταλλάξεων. Στη συνέχεια, εντάχθηκαν 38 ασθενείς με ύποπτα οζίδια πνευμόνων, τα οποία διαγνώστηκαν ως κακοήθη στους 34 σύμφωνα με τα ιστοπαθολογικά ευρήματα. Για όλους τους ασθενείς, πραγματοποιήθηκε εξαιρετικά βαθιά αλληλουχία (> 30.000 × κατά μέσο όρο) για τον έλεγχο των μεταλλάξεων που σχετίζονται με καρκίνο του πνεύμονα τόσο στα δείγματα ιστού(τα οποία ήταν σταθεροποιημένα με φορμαλίνη και/ή ενσωματωμένα σε παραφίνη (FFPE)) για τις ιστικές βιοψίες όσο και στα αντίστοιχα δείγματα πλάσματος αίματος για την ανίχνευση cfDNA. Τα αποτελέσματα από τις βιοψίες ιστών αποκάλυψαν ότι δεν υπήρχαν μεταλλάξεις σε 4 ασθενείς (με τα καλοήθη οζίδια) και 157 μεταλλάξεις στους 32 ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα αντιστοιχούσαν στον κατάλογο της βάσης δεδομένων των σωματικών μεταλλάξεων στον καρκίνο (COSMIC), όπου εκεί αναφέρθηκαν 76 μεταλλάξεις με μετρήσεις cfDNA στους 12 εξ' αυτών. Μόνο 6 πανομοιότυπες μεταλλάξεις υπήρχαν τόσο στο προφίλ μετάλλαξης του DNA που προέρχεται από ιστό όσο και του cfDNA που προέρχεται από πλάσμα. Έτσι, δημιουργήθηκε ένας αλγόριθμος, που έδειξε ότι η ευαισθησία είναι μόνο 33% με 100% ειδικότητα. Στην άλλη μελέτη, πραγματοποιήθηκε υψηλής απόδοσης αλληλούχιση DNA χρησιμοποιώντας Illumina 450k Bead Methylation συστοιχία τσιπ σε δείγματα ιστού καρκίνου του πνεύμονα για αναγνώριση θέσεων μεθυλίωσης ειδικές για καρκίνο και έπειτα αντιστοιχήθηκαν τα ctDNA αποτυπώματα μεθυλίωσης στο κατάλληλο δείγμα πλάσματος. Από ένα ανεξάρτητο σύνολο επικύρωσης 129 δειγμάτων πλάσματος σε 63 ασθενείς με κακοήθη πνευμονικά οζίδια και σε 66 ασθενείς με καλοήθη οζίδια, επιτεύχθηκε ευαισθησία 82,5% για τον εντοπισμό κακοήθων οζιδίων, με ειδικότητα 83,3%. Συγκεκριμένα, αποδείχτηκε η ανάλυση να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στην ανίχνευση του καρκίνου του πνεύμονα πρώιμου σταδίου, με ευαισθησία 81,5% σε συνολικά 27 ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα σταδίου Ια. Από όσο γνωρίζουμε, αυτός ο διαγνωστικός έλεγχος με βάση τη μεθυλίωση ctDNA είναι το πιο ευαίσθητο εργαλείο για τον προσδιορισμό του πρώιμου σταδίου καρκίνου του πνεύμονα μέχρι σήμερα και μια πολυκεντρική μελέτη μεγάλης κλίμακας δεσμεύτηκε να επικυρώσει την κλινική του αξία στην έγκαιρη ανίχνευση αυτού του καρκίνου([Liang, et al, 2018](#)).

Οι πλατφόρμες Illumina είναι τα πιο διαδεδομένα συστήματα NGS παγκοσμίως. Μεταξύ των διάφορων πλατφορμών, κυκλοφόρησε το MiSeq το 2011, το οποίο είναι μια πλατφόρμα χαμηλής απόδοσης, αρκετά ταχύ που εξυπηρετεί καλύτερα ερευνητικούς σκοπούς σε μικρότερα εργαστήρια. Στοχευμένες μεταλλάξεις (19 del, L858R, T790M) από τα δείγματα πλάσματος και ούρων ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα μπορούν να ανιχνευθούν επιτυχώς χρησιμοποιώντας το MiSeq([Reckamp, et al, 2016](#)). Το Ion-torrent, από το ThermoFisher

Scientific, αναπτύχθηκε χρησιμοποιώντας αισθητήρα chip και αισθητήρα ιόντων για να ανιχνεύσει το πρωτόνιο που απελευθερώνεται όταν ένα νουκλεοτίδιο ενσωματώνεται στην πολυμεράση σε μόρια DNA. Έχει εξαιρετικά σύντομους χρόνους εκτέλεσης και σύντομα μήκη ανάγνωσης και δεν έχει ογκώδεις ρυθμίσεις. Αυτά είναι πλεονεκτήματα στην ανίχνευση στοχευόμενων μεταλλάξεων από βραχυ-κατακερματισμένο ctDNA. Αυτή η πλατφόρμα παρέχει μοναδικά πάνελ κλινικά σχετικών σωματικών κύριων μεταλλάξεων στους καρκίνους και γενικά αυτές οι πλατφόρμες έχουν συνηθίσει να εξετάζουν αποτελεσματικά τον καρκίνο ανιχνεύοντας γενετικές παρεκκλίσεις στο ctDNA ασθενών με μεταστατικό καρκίνο του πνεύμονα ([Couraud, et al, 2014](#)). Αν και το ίδιο το σύστημα αναπτύχθηκε για να είναι εύκολο στη χρήση, το επίπεδο της αναλυτικής απόδοσης (ευαισθησία, ειδικότητα) είναι μέτριο. Ως εκ τούτου, πολλοί ερευνητές προσπάθησαν να αυξήσουν την ευαισθησία και την ειδικότητα των πτυχών της τεχνολογίας αλληλουχίας για να βελτιώσουν την πρώιμη ανίχνευση του καρκίνου. Επίσης, η βαθιά αλληλούχιση με αμπλικόνιο (Tam-Seq) έχει χρησιμοποιηθεί για τη διαλογή των 5995 γονιδιωματικών βάσεων για μεταλλάξεις χαμηλής συχνότητας, όπως αυτές στο ctDNA ([Forsheew, et al, 2012](#)). Αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί σύντομα αμπλικόνια, δύο βημάτων ενίσχυση, γραμμικούς κώδικες δείγματος και PCR υψηλής απόδοσης για επίτευξη αποτελεσματικής ενίσχυσης μικρών ποσοτήτων κατακερματισμένου ctDNA, αφαίρεση ψευδών θετικών αποτελεσμάτων που προέρχονται από σφάλματα PCR και γρήγορους χρόνους ανακύκλωσης (TAT), αντίστοιχα. Χρησιμοποιώντας αυτήν τη μέθοδο, οι μεταλλάξεις καρκίνου στο ctDNA ταυτοποιούνται σε επίπεδα ευαισθησίας και ειδικότητας > 97%. Επιπλέον, το προφίλ εξατομικευμένου καρκίνου με βαθιά αλληλούχιση (CAPP-Seq), σχεδιασμένο για την αντιμετώπιση πολλαπλών κατηγοριών σωματικών αλλοιώσεων, έχει χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό μεταλλάξεων σε >95% των όγκων ([Newman, et al, 2014](#)). Αυτή η προσέγγιση συνδυάζει βελτιστοποιημένες μεθόδους προετοιμασίας βιβλιοθήκης για εισαγωγή DNA με χαμηλό ρυθμό με πολλαπλή βιοπληροφορική προσέγγιση για το σχεδιασμό ενός “selector” που στοχεύει επαναλαμβανόμενες μεταλλαγμένες περιοχές στον καρκίνο ενδιαφέροντος. Ο “selector” έχει τη δυνατότητα να εντοπίσει ενός συγκεκριμένου ασθενούς τις καρκινικές γενετικές παρεκκλίσεις έναντι μη στοχευόμενων παρεκκλίσεων. Συγκεκριμένα, αυτή η τεχνολογία έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ctDNA σε πρώιμο στάδιο του NSCLC (σε 50% των ασθενών με στάδιο I) με 96% ειδικότητα για τα κλάσματα μεταλλαγμένων αλληλόμορφων έως ~ 0,02%. Το CAPP-Seq έχει βελτιωθεί συνδυάζοντάς το με προκαθορισμένους γραμμικούς κώδικες και “φόντο στίλβωσης” -το οποίο επιτυγχάνεται με μοντελοποίηση σφαλμάτων συγκεκριμένων θέσεων- το οποίο αναφέρεται ως ολοκληρωμένο ψηφιακό σφάλμα καταστολής (iDES). Το βελτιωμένο iDES CAPP-Seq έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να εντοπίσει με ακρίβεια ctDNA έως 0,0025%, που είναι περίπου το ένα δέκατο του ορίου ανίχνευσης του αυθεντικού συστήματος CAPP-seq (0,02%). Πιο συγκεκριμένα, σε μία μελέτη, το CAPP-Seq με ενισχυμένο iDES χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για να αναλυθεί το σημαντικά ανιχνεύσιμο ctDNA στο 93% των ασθενών, συμπεριλαμβανομένων τριών με όγκους στα αρχικά στάδια (στάδιο I) ([Newman A., et al, 2016](#)). Ακόμα, μια νέα προσέγγιση που ονομάζεται στοχευμένη αλληλουχία διόρθωσης σφαλμάτων (TEC-seq) αναπτύχθηκε πρόσφατα για υπερευαίσθητη άμεση αξιολόγηση των αλλαγών αλληλουχίας χρησιμοποιώντας μαζική παράλληλη αλληλουχία, που επιτρέπει την ανίχνευση ειδικών για καρκίνο γενετικών παρεκκλίσεων στο ctDNA σε ασθένεια πρώιμου σταδίου. Αυτή η προσέγγιση βασίζεται στη στοχευμένη ανίχνευση πολλαπλών περιοχών ενός γονιδιώματος βελτιστοποιώντας την διαδικασία δημιουργίας βιβλιοθήκης, σε συνδυασμό με προκαθορισμένους γραμμικούς κώδικες. Συγκεκριμένα, σε μία μελέτη, 200 ασθενείς με πρώιμα στάδια καρκίνου (στάδιο I και II) αξιολογήθηκαν με αυτή τη μέθοδο για την ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων στο ctDNA από πλάσμα αίματος. Από τους 200 ασθενείς,

το 59% των 61 ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα σταδίου I ή II είχαν σημαντικά ανιχνεύσιμες σωματικές αλλαγές στο ctDNA (Phallen, et al, 2017). Επιπροσθέτως, η αλληλούχηση πολλαπλών περιοχών exome (M-seq) που προέρχονται από φυλογενετικά δέντρα όγκου αναπτύχθηκε για την διεξαγωγή προφίλ ctDNA σε αρχικό στάδιο NSCLC. Χρησιμοποιώντας αυτήν την τεχνική, το 48% των 96 ασθενών με αρχικό στάδιο NSCLC ταυτοποιήθηκαν ως θετικοί στο ctDNA με τουλάχιστον δύο παραλλαγές ενός νουκλεοτιδίου (SNV) (Abbosh, et al, 2017). Στον Πίνακα 5 φαίνονται οι αντιπροσωπευτικές πλατφόρμες ανίχνευσης μεταλλάξεων στο ctDNA με τα αντίστοιχα επίπεδα ευαισθησίας, ειδικότητας και με τα αντίστοιχα όρια ανίχνευσης συγκεκριμένων στοχευμένων γενετικών αλλοιώσεων (Minji, et al, 2018).

Τέλος, μία από τις μεγαλύτερες μελέτες με προοπτικές δημοσιεύθηκε από τον Leighl και τους συνεργάτες του (Leighl, et al, 2019). Αυτοί αξιολόγησαν τη χρησιμότητα της ανάλυσης G360 στην ταυτοποίηση των γονιδιωματικών βιοδεικτών σε καινοτόμα θεραπεία σε ασθενείς με NSCLC. Συνολικά συμμετείχαν 282 ασθενείς και διεξήχθησαν αναλύσεις ιστών και πλάσματος σε 60 και 77 ασθενείς αντίστοιχα με στοχευόμενες αλλαγές. Αναλυτικά, 12 περιπτώσεις από 60 θετικά δείγματα ιστών ήταν αρνητικές στο πλάσμα, ενώ 48 περιπτώσεις ήταν θετικές τόσο στον ιστό όσο και στο ctDNA. Μάλιστα, για μεταλλάξεις EGFR, ALK, ROS1, BRAF, η αντιστοιχία μεταξύ ctDNA και ιστού ήταν μεγαλύτερη από 98,2% και επιπλέον η ανάλυση ctDNA αύξησε το ποσοστό ανίχνευσης στα δείγματα ιστού άγριου τύπου εντοπίζοντας ακόμα περισσότερες αλλαγές (Bruno, et al, 2020).

Πίνακας 5: Οι αντιπροσωπευτικές πλατφόρμες που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση καρκινικών μεταλλάξεων σε ctDNA που απομονώθηκε από ασθενείς με NSCLC (Minji, et al, 2018).

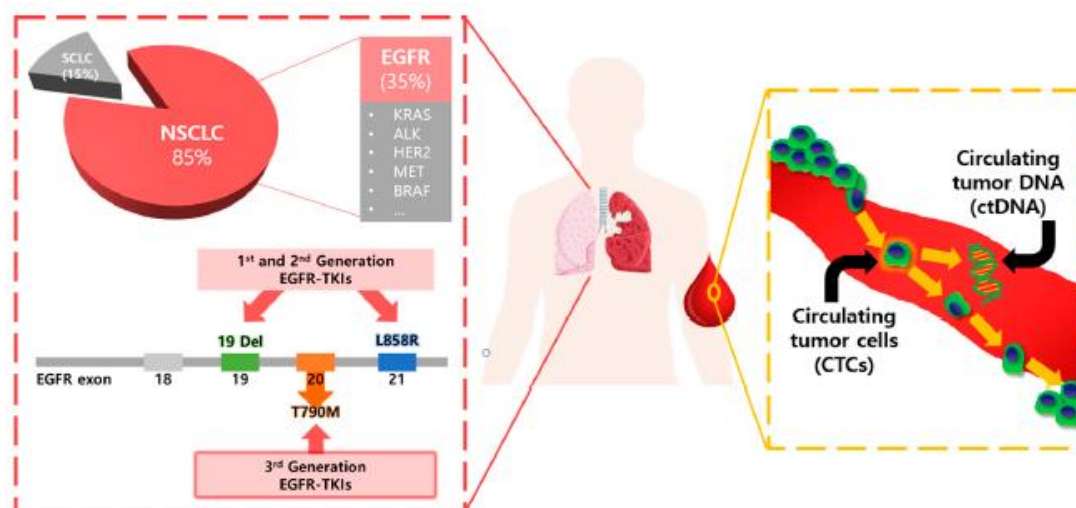
Detection Techniques		Sensitivity	Specificity	Detection Target	Detection Limit (Threshold)
NGS	MiSeq	93% (T970M), 100% (L858R), 87% (19del)	94% (T970M), 100% (L858R), 96% (19del)	T790M, L858R, 19del	0.028%
	Ion Torrent	58%	87%	Panel: 50 genes	0.2%
	TAM-seq	97%	97%	6 genes *	2%
	iDES-CAPP-seq	90%	96%	Panel: 292 genes	0.0025%
	TEC-seq	97.4%	>99.9999%	Panel: 55 genes	0.05%
PCR-based assay	BEAMing	81% (T970M), 87% (L858R), 82% (19del)	58% (T970M), 97% (L858R), 97% (19del)	T790M, L858R, 19del	0.02%
	Cobas EGFR Mutation Test	73% (T970M), 87% (L858R), 82% (19del)	67% (T970M), 97% (L858R), 97% (19del)	T790M, L858R, 19del	0.02%
	ddPCR	77% (T970M), 69% (L858R), 86% (19del)	63% (T970M), 100% (L858R), 100% (19del)	T790M, L858R, 19del, KRAS G12X	NA/0.04% **

* PIK3CA, EGFR, BRAF, PTEN, KRAS, TP53; NA—not available

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι η μείωση του επιπέδου του κυκλοφορικού καρκινικού DNA που προέρχεται από το πλάσμα (ctDNA) είναι ένας πρώιμος δείκτης θεραπευτικής αποτελεσματικότητας και προβλέπει παρατεταμένη επιβίωση σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα που υποβάλλονται σε θεραπεία με αναστολείς ανοσοποιητικού σημείου ελέγχου. Παραδείγματος χάριν, σε 14 ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με νιβολουμάμπη, τα επίπεδα ctDNA μετρήθηκαν και η βασική και η σειριακή ctDNA ανάλυση αποκάλυψε ότι η μείωση της αλληλικής συχνότητας (AF) του ctDNA έδειξε υψηλό επίπεδο απόκρισης, με καλά επίπεδα αντίστασης, μέσα σε 2 εβδομάδες (Iijima, et al, 2017). Συνολικά, το ctDNA αντιπροσωπεύει έναν εξαιρετικά υποσχόμενο βιοδείκτη στο NSCLC (Lee Y., et al, 2019).

3.3.1.1. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ EGFR

Ο υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) είναι μέλος του υποδοχέα της τυροσινικής κινάσης της οικογένειας ERBB(που περιλαμβάνει HER1(EGFR), HER2/neu, HER3 και HER4(Mamdani, et al, 2017)). Το γονίδιο EGFR βρίσκεται στον βραχίονα του χρωμοσώματος 7 στη θέση 12. Όταν το εξωκυτταρικό πρόσδεμα συνδέεται με EGFR, δημιουργεί ομο- ή ετερο-διμερισμό του υποδοχέα, ενεργοποίηση μεταλλάξεων οδηγώντας σε φωσφορυλίωση θέσεων στην κυτταροπλασματική κινάση της τυροσίνης και σε ενεργοποίηση διαφόρων ενδοκυτταρικών οδών, συμπεριλαμβανομένων των μονοπατιών της 3-κινάσης φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI3K)/AKT/μηχανιστικού στόχου της ραπαμυκίνης (mTOR), της RAS / RAF / ενεργοποιούμενη από μιτογόνα πρωτεϊνική κινάση (MAPK) και των κατασταλτικών αντιποπτικών μονοπατιών σηματοδότησης που οδηγούν σε πολλαπλασιασμό των κυττάρων, μετάσταση και πρόληψη της απόπτωσης. Το EGFR υπερεκφράζεται στο 62% των NSCLC και η έκφρασή του έχει συσχετιστεί με κακή πρόγνωση. Περίπου το 10% των ασθενών με αδеноκαρκίνωμα του πνεύμονα στις Ηνωμένες Πολιτείες και το 30% έως 50% στην Ανατολική Ασία έχουν καρκίνο του πνεύμονα που σχετίζεται με μεταλλάξεις EGFR. Αυτές οι μεταλλάξεις συμβαίνουν στα εξόνια 18-21, τα οποία κωδικοποιούν ένα τμήμα της περιοχής της κινάσης του EGFR. Περίπου το 90% των μεταλλάξεων EGFR συμβαίνουν ως διαγραφές εντός πλαισίου στο εξόνιο 19 ή ως μεταλλάξεις παραλείψεων στο εξόνιο 21 (44% και 41% όλων των μεταλλάξεων, αντίστοιχα). Οι μεταλλάξεις του EGFR ενώ μπορεί να εμφανιστούν σε οποιονδήποτε ασθενή, δείχνουν μία σαφή σχέση με την ασιατική εθνικότητα, το φύλο των γυναικών, και την κατάσταση του καπνιστή(Villalobos, et al, 2017). Μάλιστα, απαντώνται συχνότερα στα αδеноκαρκινώματα με λεπιδικά χαρακτηριστικά σε μη καπνίστριες γυναίκες(Villalobos, et al, 2017). Για ασθενείς με προχωρημένα NSCLCs(Minji, et al, 2018) με θετική μετάλλαξη EGFR NSCLC, η θεραπεία πρώτης γραμμής με αναστολείς τυροσινικής κινάσης EGFR (TKIs, συγκεκριμένα γεφτινίμη [IRESSATM], ερλοτινίμη [TARCEVA®] και αφατινίμη[GIOTRIF®]) έχει συσχετιστεί με ανώτερα αντικειμενικά ποσοστά απόκρισης(55% -78%(Villalobos, et al, 2017)) και με επιβίωση χωρίς πρόοδο με χημειοθεραπεία(Heydt, et al, 2018). Όπως φαίνεται στην εικ.33, ορισμένες ομάδες με συγκεκριμένες μεταλλάξεις ενεργοποίησης, διαγραφές στο εξόνιο 19 (19 Del) και υποκαταστάσεις στο εξόνιο 21 (L858R)(αλλαγή λευκίνης προς αργινίνη στη θέση 858(Gu, et al, 2019)) στην περιοχή της τυροσινικής κινάσης του EGFR παρουσιάζουν δραματική απόκριση σε EGFR TKIs(Minji, et al, 2018). Μπορούν επίσης να παρατηρηθούν και άλλες λιγότερο συχνές μεταλλάξεις (όπως το G719X στο εξόνιο 18, το L861Q στο εξόνιο 21) και αμφότερα παρέχουν ευαισθησία σε μικρού μορίου EGFR TKIs (Mamdani, et al, 2017).



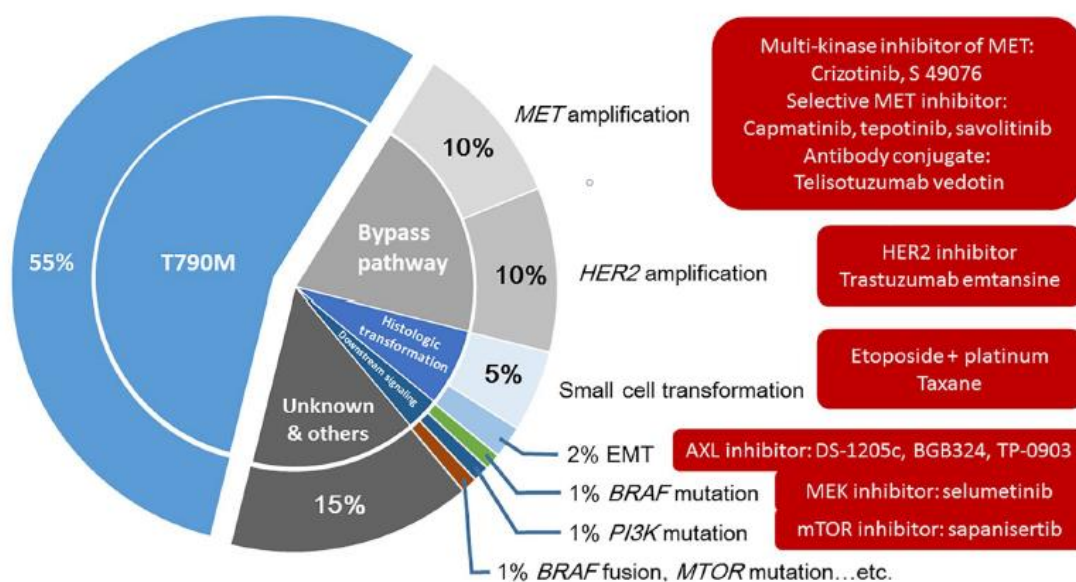
Εικόνα 33: Σχηματική απεικόνιση της κλινικής χρησιμότητας της υγρής βιοψίας στον καρκίνο του πνεύμονα Οι κυκλοφορούντες βιοδείκτες (CTCs και ctDNA) χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό ενεργοποιητικών μεταλλάξεων, όπως ευαίσθητες (19 del και L858R) και ανθεκτικές (T790M) EGFR μεταλλάξεις, οι οποίες αποκρίνονται σε 1^{ης}, 2^{ης} και 3^{ης} γραμμής θεραπεία αντίστοιχα (Minji, et al, 2018).

Ωστόσο, οι αναστολείς EGFR συχνά λειτουργούν μόνο για κάποιους μήνες. Τελικά τα φάρμακα σταματούν να λειτουργούν λόγω της ανάπτυξης αντοχής των ασθενών. Ένας από τους σημαντικότερους μηχανισμούς αντίστασης είναι μια δευτερεύουσα μετάλλαξη στο EGFR (T790M), η οποία βρίσκεται στο 48% έως 62% του EGFR TKI σε ασθενείς που προβάλλουν αντίσταση (Minji, et al, 2018). Επιπλέον, οι περισσότεροι από αυτούς τους ασθενείς αναπτύσσουν αντίσταση και υποτροπή σε σύντομο χρονικό διάστημα (συνήθως εντός 6-24 μηνών από την έναρξη της θεραπείας (Heydt, et al, 2018)) πέραν της εμφάνισης της μετάλλαξης (T790M) στο εξόνιο 20 της περιοχής κινάσης του EGFR (50%), λόγω της ενίσχυσης του ογκογονιδίου MET (21%) ή των μεταλλάξεων του PI3KCA (Villalobos, et al, 2017). Καθώς οι μεταλλάξεις T790M είναι ο πιο κοινός μηχανισμός επίκτητης αντίστασης, σχετίζονται με μειωμένη δέσμευση του EGFR TKI στην περιοχή κινάσης τυροσίνης του EGFR. Η μετάλλαξη αυτή αυξάνει τη συγγένεια του δεσμού σύνδεσης με ATP, παρεμβαίνοντας έτσι στη δέσμευση των EGFR TKIs και επηρεάζοντας την ειδικότητα. Η αντικατάσταση είναι σε μία κύρια τοποθεσία στην καταλυτική σχισμή της περιοχής EGFR TKI, που βρίσκεται στο πίσω μέρος της σχισμής σύνδεσης του ATP. Η υποκατάσταση του αμινοξέος (θρεονίνη σε μεθειονίνη) οδηγεί σε ογκώδη πλευρική αλυσίδα, με αποτέλεσμα στερικό εμπόδιο που αποτρέπει την σύνδεση αναστρέψιμων μορίων TKI πρώτης γενιάς. Ωστόσο, η ίδια η μετάλλαξη T790M δεν παρεμβαίνει με την ATP-δέσμευση και την ενεργοποίηση του EGFR, επομένως ο όγκος εξακολουθεί να εξαρτάται από το EGFR. Αυτό το γεγονός είναι σημαντικό για περαιτέρω θεραπεία EGFR TKI, καθώς η μετάλλαξη T790M παραμένει ευαίσθητη σε μη αναστρέψιμους αναστολείς. Σε αντίθεση με τους αναστρέψιμους αναστολείς, οι μη αναστρέψιμοι ξεπερνούν τον μηχανισμό αντοχής με ομοιοπολική σύνδεση με Cys-797 στη σχισμή σύνδεσης ATP. Ως συλλογική κατηγορία φαρμάκων, οι μη αναστρέψιμοι αναστολείς ονομάζονται “τρίτης γενιάς” EGFR TKI και έχουν δείξει ισχυρή και ιδιαίτερα ειδική δραστηριότητα έναντι της T790 EGFR TKI αντίστασης, με δεδομένα από έρευνες φάσης I / II / III (Heydt, et al, 2018). Δυστυχώς, το αναπόφευκτο της επίκτητης αντίστασης που συμβαδίζει με μία νέα ανάπτυξη φαρμάκων και η αντίσταση στη δεύτερη γραμμή “τρίτης γενιάς” του EGFR TKI (π.χ. οσιμερτινίμη [TAGRISSOM] και ροσιλετινίμη) έχει επίσης αναφερθεί (Heydt, et al, 2018). Συγκεκριμένα, η οσιμερτινίμη, εγκρίθηκε από το FDA για T790M θετικούς ασθενείς και έχει δείξει σημαντικά καλύτερη αποτελεσματικότητα από τη θεραπεία με βάση την πλατίνα. Ως εκ τούτου, η έγκαιρη ανίχνευση της μετάλλαξης T790M κατά τη διάρκεια της θεραπείας πρώτης γραμμής και η αλλαγή του φαρμάκου σε 3^{ης} γενιάς EGFR TKI που περιλαμβάνει την οσιμερτινίμη είναι εξαιρετικά σημαντική για τη διαχείριση ασθενών με NSCLC με μεταλλάξεις EGFR (Minji, et al, 2018).

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα EGFR TKI “τρίτης γενιάς” στοχεύουν τη μετάλλαξη T790M. Ωστόσο, πρόσφατα κλινικά ευρήματα έχουν δείξει την εμφάνιση μιας τριτοβάθμιας αποκτηθείσας μετάλλαξης EGFR C797S μετά τη θεραπεία με TKI “τρίτης γενιάς”. Τα TKI τρίτης γενιάς βασίζονται εν μέρει στον σχηματισμό ενός ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ του TKI και του υπολειμματος 797-κυστεΐνης για ισχυρή δέσμευσή τους στο EGFR, αλλά η μετάλλαξη του κατάλοιπου 797-κυστεΐνης σε μια σερίνη (C797S) αποτρέπει έναν τέτοιο σχηματισμό δεσμού, διακυβεύοντας την αποτελεσματικότητα του TKI και οδηγώντας σε επακόλουθη αντίσταση. Συνδυαστικές στρατηγικές από πρώτη και τρίτη γενιά EGFR TKI έχουν χρησιμοποιηθεί για στόχευση της αντίστασης C797S σε EGFR TKI τρίτης γενιάς. Τα στοιχεία που υποστηρίζουν

αυτήν την προσέγγιση προέρχονται από *in vitro* μελέτες, οι οποίες έχουν δείξει ότι η παρουσία T790M και C797S σε *trans* (σε διαφορετικούς κλώνους DNA), οδηγεί σε ανθεκτικότητα σε τρίτης γενιάς EGFR TKI αλλά και ευαισθησία σε μια συνδυαστική θεραπεία πρώτης και τρίτης γενιάς EGFR TKI. Πρόσφατα, παρουσιάστηκαν δύο αναφορές περιπτώσεων ([Wang, et al, 2017](#)/[Arulananda, et al, 2017](#)) όπου αυτός ο συνδυασμός προσέγγισης EGFR TKI είναι αποτελεσματικός σε ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη T790M και C797S στο *trans*. Ωστόσο, αυτές οι μεταλλάξεις μπορούν επίσης να συμβούν στο *cis* (στον ίδιο κλώνο DNA), μεσολαβώντας στην αντίσταση στη θεραπεία πριν σε, ή κατά τη διάρκεια, συνδυαστικής θεραπείας. Έτσι, προσδιορίζοντας εάν οι μεταλλάξεις είναι *cis*- ή *trans*-αλληλόμορφες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη του αποτελέσματος αυτής της συνδυαστικής θεραπείας([Heydt, et al, 2018](#)).

Το FDA πρόσφατα χορήγησε ταχεία έγκριση στην EGFR TKI οσιμερτινίμη (AZD9291) για ασθενείς με προηγμένο NSCLC θετικούς στη μετάλλαξη T790M βάσει ποσοστών απόκρισης 57– 61% σε δύο παρόμοιες μελέτες([Yang, et al, 2015](#)/[Mitsudomi, et al, 2015](#)). Άλλοι παράγοντες στην κλινική ανάπτυξη περιλαμβάνουν ροσιλετινίμη (CO-1686), που είναι ενεργή τόσο κατά της μετάλλαξης T790M όσο και των βασικών μεταλλάξεων ενεργοποίησης EGFR, και σε μια πρώτη μελέτη([Tan, et al, 2015](#)) σε ανθρώπους για τον EGFR μεταλλαγμένο ειδικό TKI EGF816, αναφέρθηκε συνολικό ποσοστό απόκρισης (ORR) 55% και DCR 86%. Άλλοι δυνητικά στοχευόμενοι για αντίσταση EGFR TKI μηχανισμοί που σχετίζονται με το MAPK σηματοδοτούν ότι μελλοντικές διαγνωστικές εκ νέου βιοψίες θα χρειαστεί να πραγματοποιηθούν για να πληροφορήσουν σχετικά με τις στρατηγικές θεραπευτικές μεθόδους, οι οποίες περιλαμβάνουν ενίσχυση του HER2 ή MEK1 και ενεργοποίηση μεταλλάξεων σε RAS ή BRAF. Η παράκαμψη ενεργοποίησης άλλου μονοπατιού παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην αντίσταση και περιλαμβάνει ενίσχυση του MET, και επίκτητη



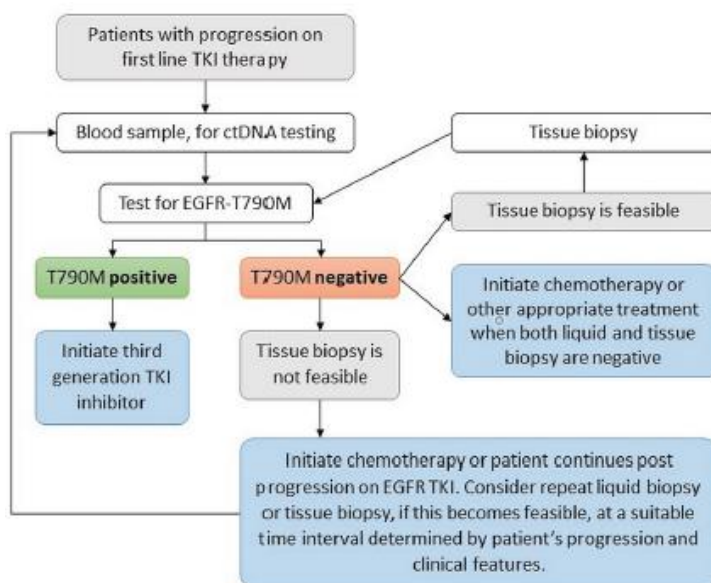
Εικόνα 34: Εκτιμώμενη κατανομή μηχανισμών αντίστασης σε EGFR-TKI πρώτης και δεύτερης γενιάς και σχετικές διερευνητικές θεραπείες Όπως φαίνεται στο διάγραμμα, η MET-amp υπάρχει στο 5-20% της EGFR θετικής μετάλλαξης σε ασθενείς με NSCLC που αναπτύσσουν αντίσταση σε EGFR-TKIs και οι στοχευμένες θεραπείες γίνονται με καμπατινίμη, τεποτινίμη και σαβολιτινίμη. Αντίστοιχα, η HER2-amp(10% ασθενών) αντιμετωπίζεται με τραστοζουμάμη και το SCLC(5%) με ετοποσίδη και πλατίνα. Οι υπόλοιποι μηχανισμοί αντίστασης(EMT, BRAF, PI3K, MTOR) βρίσκονται σε μικρότερα ποσοστά(1-2%)([Liao, et al, 2019](#)).

μετάλλαξη του PIK3CA. Το γονίδιο MET ενισχύεται σε πάνω από το 21% των περιπτώσεων NSCLC με αντίσταση σε αναστολέα EGFR. Ακόμα, η επίκτητη αντίσταση σε EGFR TKI επόμενης γενιάς μπορεί να προκύψει μέσω αυξημένης ενεργοποίησης ERK(μέσω ενίσχυσης ή μετάλλαξης MEK1), και οι κατασταλτικοί αναστολείς αυτού του μονοπατιού όπως αυτοί που έχουν ήδη περιγραφεί μπορεί να είναι αποτελεσματικοί σε αυτήν τη ρύθμιση όταν αυτές οι παρεκκλίσεις εντοπίζονται κατά την σταδιοποίηση. Τέλος, η αναδιάταξη RET έχει εμπλακεί στην μετάλλαξη EGFR σε NSCLC σε προχωρημένη θεραπεία EGFR TKI, και αυτή η γενετική παρέκκλιση πρέπει να προστεθεί στον αυξανόμενο κατάλογο πιθανών δεικτών στους ελέγχους γενετικής αντίστασης. Τέλος, υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι με την αντίσταση στο TKI, μπορεί να υπάρχει αλλαγή ιστολογίας σε καρκίνο πνευμόνων μικρών κυττάρων ή σε καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων(Salgia, 2016)(Εικ.34).

Έτσι, οι μοριακοί μηχανισμοί που αποτελούν την αντίσταση στην πρώτη και στην δεύτερη γραμμή θεραπείας του EGFR TKI γίνονται όλο και περισσότερο σαφείς. Σε NSCLC, οι θεραπευτικές αποφάσεις λαμβάνονται επί του παρόντος βάσει κλινικών δεικτών που χρησιμοποιούνται στην ακτινολογία στην εξέλιξη της νόσου, που υποδηλώνουν επιδείνωση του όγκου με την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων.

Η απαιτούμενη ανθεκτική αντίσταση που οδηγεί σε πρόοδο των ασθενειών συχνά οδηγείται από την ανάπτυξη δευτερογενών μεταλλάξεων που μπορούν να επαληθευτούν μετά την ανίχνευση γενετικών βιοδεικτών, που μπορεί να αποτελέσουν τη βάση της διάγνωσης και της εξατομικευμένης

θεραπείας για τους ασθενείς με NSCLC. Συγκεκριμένα, οι μεταλλάξεις EGFR είναι σημαντικοί προγνωστικοί βιοδείκτες κατά τη διάγνωση για την αποτελεσματικότητα της θεραπείας πρώτης γραμμής EGFR TKI. Ο προσδιορισμός της μετάλλαξης EGFR κατά συνέπεια, είναι υποχρεωτικός στη διάγνωση του NSCLC, και θα πρέπει επίσης να πραγματοποιείται σε καρκίνωμα πνευμόνων πλακωδών κυττάρων σε μη καπνιστές. Για ασθενείς με NSCLC θετικούς στη μετάλλαξη EGFR, η θεραπεία EGFR TKI υποστηρίζεται, ενώ η χημειοθεραπεία ή η ανοσοθεραπεία μπορεί να είναι ευεργετική για ασθενείς με αρνητική μετάλλαξη EGFR, όπως φαίνεται στην Εικ.35. Η φύση της θεραπείας μετά την εξέλιξη θα πρέπει να είναι προσαρμοσμένη σύμφωνα με



Εικόνα 35: Η αξιολόγηση της κατάστασης EGFR T790M Σε ασθενείς που υποτροπιάζουν πέραν της πρώτης γραμμής TKI θεραπείας, γίνεται ανάλυση ctDNA για ανίχνευση της μετάλλαξης T790M: όσοι ασθενείς είναι θετικοί θεραπεύονται με τρίτης γενιάς αναστολέα, ενώ όσοι είναι αρνητικοί εάν η ιστική βιοψία δεν είναι δυνατή, πραγματοποιείται είτε χημειοθεραπεία, είτε συνέχιση της θεραπείας EGFR-TKI, μέχρι να είναι δυνατή η υγρή ή η ιστική βιοψία. Εάν η ιστική βιοψία είναι δυνατή πραγματοποιείται για να επιβεβαιώσει την μετάλλαξη EGFR-T790M. Τέλος, στους συγκεκριμένους ασθενείς εάν και οι δύο βιοψίες (υγρή και ιστική) είναι αρνητικές τότε προτιμάται σαν μέθοδος θεραπείας η χημειοθεραπεία ή κάποια άλλη κατάλληλη μέθοδος(Stockley, et al, 2018).

προσδιορισμένους μηχανισμούς αντίστασης, καθώς και με τις περιοχές και τον ρυθμό εξέλιξης της νόσου. Συνεχιζόμενη θεραπεία πέρα από την εξέλιξη με ταυτόχρονη τοπική θεραπεία σε ολιγοπροσδευτική νόσο όταν η τοπική θεραπεία είναι εφικτή έχει υιοθετηθεί ευρέως για το NSCLC. Οι πιο πρόσφατες οδηγίες του National Comprehensive Cancer Network (NCCN) υποστήριζαν τη συνεχιζόμενη χρήση της ερλοτινίμης, της γεφτινίμης ή της αφατινίμης σε ασθενείς με ασυμπτωματική εξέλιξη, δεδομένου ότι υπήρξε διακοπή αυτών των EGFR TKI που σχετίζεται με την επιταχυνόμενη εξέλιξη των συμπτωμάτων της νόσου και του μεγέθους του όγκου. Η σύσταση θεραπείας πέρα από την εξέλιξη μπορεί να βασίζεται σε προοπτικές και αναδρομικές αναλύσεις. Η μελέτη ASPIRATION, μέχρι σήμερα, η μόνη μελέτη με προοπτικές για να διερευνήσει τη συνέχεια της εξέλιξης της ερλοτινίμης, δείχνει όφελος που σχετίζεται με τη συνεχιζόμενη θεραπεία σε επιλεγμένους ασθενείς με διάμεση PFS 3,1 μήνες ([Park, et al, 2016](#)). Έτσι, ενώ μπορεί να προκύψει αντίσταση σε EGFR TKI από πολλαπλούς, πολύπλοκους μηχανισμούς, αρκετές θεραπείες έχουν αναπτύξει στρατηγικές που στοχεύουν συγκεκριμένα τις πιο συχνές διαδρομές, δηλαδή τις μεταλλάξεις EGFR T790M, τις MET ενισχύσεις και τις ενισχύσεις του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα του υποδοχέα 2(HER2) ([Heydt, et al, 2018](#)).

Οι μεταλλάξεις EGFR ταυτοποιούνται κυρίως με τη χρήση μεθοδολογιών προσδιορισμού αλληλουχίας γονιδίων και προσδιορισμών βασισμένων σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (PCR). Και οι δύο μέθοδοι έχουν αναφερθεί ότι έχουν υψηλή απόδοση και ευαισθησία στην ανίχνευση αυτών των μεταλλάξεων σε ιστούς σταθεροποιημένους με φορμαλίνη και ενσωματωμένους σε παραφίνη. Η ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR που βασίζεται στην IHC με συγκεκριμένα αντισώματα κατά των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών έχει δοκιμαστεί αλλά έδειξε μεταβλητή ευαισθησία και σημαντική μεταβλητότητα μεταξύ των μελετών ([Villalobos, et al, 2017](#)).

Το cobas® EGFR Mutation Test v2, που είναι ένας έλεγχος υγρής βιοψίας με βάση την PCR για το NSCLC και έχει αναπτυχθεί για την ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR, συμπεριλαμβανομένης της μετάλλαξης T790M, έχει πρόσφατα εγκριθεί από το FDA. Ωστόσο, το εξαιρετικά χαμηλό κλάσμα των γενετικών αλλοιώσεων που σχετίζεται με τον όγκο σε μια “δεξαμενή” φυσιολογικού γονιδιωματικού ctDNA απαιτεί περαιτέρω ανάπτυξη πολύ ευαίσθητων, προηγμένων τεχνολογιών μοριακής ανίχνευσης, καθώς και ειδικές για ctDNA μεθόδους απομόνωσης. Πρόσφατες εξελίξεις στην εξατομικευμένη διαχείριση του καρκίνου έχουν επιταχυνθεί και έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στις υπερευαίσθητες, βελτιωμένες μοριακές μεθόδους, όπως NGS και τεχνολογίες PCR τρίτης γενιάς (π.χ. ddPCR). Η ανίχνευση της μετάλλαξης EGFR μέσω ανάλυσης ctDNA είναι μια συναρπαστική εφαρμογή υγρής βιοψίας. Σε μια κλινική μελέτη ([Thress, et al, 2015](#)) για τον έλεγχο καρκίνου σε ασθενείς με NSCLC που είχαν ληφθείσα θεραπεία τρίτης γενιάς EGFR TKI (AZD9291, οσιμερτινίμη), η BEAMing χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR από ctDNA με χαμηλό όριο ανίχνευσης (0,02% του κλάσματος αλληλόμορφων). Αυτή η μελέτη κατέδειξε επίσης την ανάλυση του cobas® EGFR Mutation Test v2 για θεραπεία με την οσιμερτινίμη, η οποία εγκρίθηκε από το FDA το 2016. Επιπλέον, μία από τις πιο ισχυρές τεχνικές ανίχνευσης για τον έλεγχο καρκίνου βάσει της ταυτοποίησης γενετικών αλλοιώσεων στο ctDNA είναι η ddPCR. Η πρώτη μελέτη με προοπτικές για να αποδείξει τη χρησιμότητα του γονότυπου πλάσματος με βάση την ddPCR σε ασθενείς με προχωρημένο NSCLC ήταν το 2017. Σε αυτή τη μελέτη ([Sacher, et al, 2016](#)) τόσο οι μεταλλάξεις EGFR, η διαγραφή του εξονίου 19 όσο και η L858R, ανιχνεύθηκαν με 100% ειδικότητα, ενώ η T790M ανιχνεύθηκε με χαμηλότερη ειδικότητα 79%, από δείγματα ctDNA από ασθενείς με προχωρημένο μη πλακώδες NSCLC. Οι αναλύσεις που βασίζονται σε PCR που συνοψίζονται παραπάνω αναμένεται να χρησιμοποιηθούν

ενεργά σε κλινικές εφαρμογές, αλλά παραμένει απαραίτητο να ανακαλυθούν περισσότεροι νέοι βιοδείκτες χρησιμοποιώντας NGS για πιο αποτελεσματικό έλεγχο καρκίνου. Γενικά, το ctDNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη διαχείριση θεραπείας NSCLC μέσω της επιλογής συγκεκριμένων θεραπευτικών μεθόδων, στην παρακολούθηση της απόκρισης στη θεραπεία και στην ανάπτυξη αντοχής μέσω ανίχνευσης των σωματικών μεταλλάξεων στο γονίδιο EGFR. Σε μια μελέτη περίπτωσης (Zheng, et al, 2016), μεταλλάξεις T790M στο ctDNA ανιχνεύθηκαν στο πλάσμα 47% των 117 ασθενών με NSCLC χρησιμοποιώντας ανάλυση ddPCR. Μεταξύ των ασθενών που έλαβαν δεύτερης γραμμής ή μετέπειτας γραμμής θεραπεία TKI, εκείνοι που ήταν θετικοί σε T790M ctDNA NSCLC είχαν σημαντικά μικρότερη συνολική επιβίωση από την αρνητική ομάδα (διάμεση συνολική επιβίωση: 26,9 μήνες έναντι NA). Σε μια άλλη μελέτη (Punnoose, et al, 2012) με τη συμμετοχή 41 ασθενών με προχωρημένο NSCLC που συμμετείχαν σε κλινική δοκιμή φάσης II της ερλοτινίμπης και της περτουζουμάμπης, η κατάσταση μετάλλαξης EGFR στο ctDNA συσχετίστηκε με μεγαλύτερο PFS (~ 7 μήνες έναντι NA, $p = 0,039$). Επιπρόσθετα, το CAPP-Seq χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη μηχανισμών αντοχής μέσω ανάλυσης ctDNA 43 NSCLC ασθενών που έλαβαν θεραπεία με ροσιτετινίμπη, που είναι ένας άλλος τύπος φαρμάκου TKI τρίτης γενιάς. Αυτή η μελέτη ανίχνευσε πολλαπλούς μηχανισμούς αντοχής στο 46% των ασθενών μετά από θεραπεία με αναστολείς πρώτης γραμμής, που δείχνει συχνή ετερογένεια εντός του ασθενούς (Newman, et al, 2014). Σε μια άλλη μελέτη περίπτωσης, η T790M ανιχνεύθηκε στο 31% των δειγμάτων πλάσματος από 58 ασθενείς με T790M αρνητικούς ιστούς όγκου (Oxnard, et al, 2016). Το άλλο σημαντικό πλεονέκτημα της χρήσης προσδιορισμών ctDNA είναι η σχετικά εύκολη σειριακή δειγματοληψία. Σε μια μελέτη (Sacher, et al, 2016), το TAT για υγρή βιοψία ήταν δύο ημέρες για το NSCLC που διαγνώστηκε πρόσφατα και τρεις ημέρες για την απόκτηση αντίστασης, ενώ το TAT για γονότυπο ιστού σε ασθενείς με πρόσφατα διαγνωσμένο NSCLC ήταν σημαντικά μεγαλύτερο σε 12 ημέρες ($p < 0,001$) και 27 ημέρες για επίκτητη αντίσταση στη θεραπεία EGFR TKI σε πραγματικό κλινικό περιβάλλον ($p < 0,001$). Η δυνατότητα συχνής παρακολούθησης της πρόοδου της νόσου, μέσω της χρήσης του ctDNA θα ήταν τεράστιο όφελος, ιδιαίτερα για ασθενείς που έχουν αναπτύξει αντίσταση στη θεραπεία πρώτης γραμμής με επώδυνες οστικές μεταστάσεις, αλλά δεν είναι όλοι σε θέση να λάβουν περαιτέρω συστηματική θεραπεία (λόγω των περιορισμένων δεδομένων γονότυπου που μπορούν να ληφθούν, δεδομένων των κινδύνων της ιστικής βιοψίας, ανάλογα με την ηλικία του ασθενούς και τις συννοσηρότητες (Minji, et al, 2018).

Ένα ακόμα kit ανίχνευσης μετάλλαξης με βάση το S-ARMS EGFR κατάφερε να ανιχνεύσει τη μετάλλαξη με ευαισθησία 66% και ειδικότητα που πλησιάζει σχεδόν το 100% σε ένα δείγμα 652 ασθενών. Η αντιστοιχία ιστών ήταν 94% (Douillard, et al, 2014). Η μέθοδος COBAS βρήκε παρόμοια αποτελέσματα σε 238 ασθενείς που ανέφεραν 75% ευαισθησία, 96% ειδικότητα και 88% αντιστοιχία ιστού (Mok, et al, 2015). Και οι δύο μελέτες ανέφεραν έναν μικρό πληθυσμό ασθενών που είχαν θετικά αποτελέσματα από ctDNA αλλά όχι από ιστό σε μεγάλο βαθμό επειδή οι ιστικοί έλεγχοι ενδέχεται να χάσουν κάποιο μέρος του γονιδιωματικού τοπίου του όγκου λόγω της ετερογένειάς τους. Ωστόσο, το ctDNA έχει περιορισμένη ευαισθησία και δεν είναι ακόμη υποκατάστατο των βιοψιών ιστού. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι το ctDNA μπορεί να αποδώσει ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα σε περίπου 15-30% των ασθενών, ειδικά σε ασθενείς με χαμηλό ιικό φορτίο, με ένα αδρανές λεπιδικό πρότυπο ανάπτυξης, με έναν βλεννώδη υποτύπο ή περιστασιακά με λεπτομυμενική νόσο (Mamdani, et al, 2017). Τέλος, οι Oxnard et al. (Oxnard, et al, 2016) προσδιόρισαν την αλληλουχία ctDNA ασθενών με αντίσταση EGFR-TKI με τεχνικές COBAS και BEAMing και βρήκαν μετάλλαξη T790M με ευαισθησία 70%. Τριάντα ένα τοις εκατό των ασθενών με

αρνητική βιοψία ιστού δοκιμάστηκε θετικά από ctDNA πλάσματος. Το πιο σημαντικό, η επιβίωση χωρίς εξέλιξη ήταν παρόμοια ανεξάρτητα από τα μέσα ελέγχων. Συνεπώς, η διεξαγωγή δοκιμών ctDNA τη στιγμή της αντίστασης EGFR TKI είναι ένας λογικός τρόπος για την ταυτοποίηση της μετάλλαξης T790M. Ωστόσο, δεδομένου του ψευδούς αρνητικού ρυθμού (30%) που παρατηρήθηκε με το ctDNA, η βιοψία όγκου θα πρέπει να συνεχίσει μετά από μια αρνητική δοκιμασία στο πλάσμα. Δεδομένης της ανάγκης βελτίωσης της ανάλυσης μετάλλαξης με βάση το ctDNA, μία ομάδα (Arcila, et al, 2011) χρησιμοποίησε dPCR για να ανιχνεύσουν τη μετάλλαξη T790M με αυξημένη ευαισθησία. Η παρουσία του T790M που ανιχνεύθηκε από αυτήν την εξαιρετικά ευαίσθητη δοκιμασία πριν από τη θεραπεία με TKI, παρουσίασε ένα χειρότερο αποτέλεσμα. Το εξαιρετικά ευαίσθητο dd-PCR μπόρεσε να ανιχνεύσει εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα μετάλλαξης T790M στο 80% των ασθενών με NSCLC που δεν έλαβαν θεραπεία. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι η συνεχής παρακολούθηση του ctDNA μπορεί να ανιχνεύσει μετάλλαξη T790M, σχεδόν ένα χρόνο πριν από την κλινική εξέλιξη. Ακόμα, η οσιμερτινίμη ως τρίτης γενιάς EGFR TKI είναι ενεργή σε ασθενείς με μετάλλαξη αντίστασης T790M. Μάλιστα, είκοσι δύο τοις εκατό των ασθενών που προχωρούν στην οσιμερτινίμη έχουν μετάλλαξη αντίστασης C797S (Mok, et al, 2017/ Jänne, et al, 2015). Άλλα μέσα για την παροχή αντίστασης EGFR TKI περιλαμβάνουν την υπερέκφραση του c-MET η οποία παρακάμπτει συνολικά την EGFR τυροσινική κινάση και αυξάνει τη μετάδοση σηματοδότησης, την ενίσχυση Her-2 και τις μεταλλάξεις PI3KCA μεταξύ άλλων. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι περίπου το 15% των όγκων που εξελίσσονται μετά την 1^η γραμμής θεραπεία TKI, μετατρέπονται σε SCLC που μπορεί δυνητικά να ανιχνευθεί αναγνωρίζοντας SCLC CTCs στο αίμα. Επί του παρόντος, η χρησιμότητα τεχνικών με βάση το πλάσμα για την ανίχνευση αυτών των άλλων μεταλλάξεων αντίστασης περιορίζεται σε ασθενείς με θέση όγκου που είναι δύσκολο να βιοψηθεί (Mamdani, et al, 2017).

Οι βελτιωμένες τεχνολογίες αλληλουχίας όπως το BEAMing μπορούν να αυξήσουν την ευαισθησία στο 99%, αν και χρειάζονται μεγαλύτερες μελέτες για την επικύρωση της χρήσης τους. Η ευρωπαϊκή ιατρική υπηρεσία προτείνει τη χρήση δοκιμών EGFR με βάση το πλάσμα για ασθενείς που δεν μπορούν να λάβουν βιοψία ιστού. Καθώς η τεχνολογία εξελίσσεται και η ευαισθησία αυτών των δοκιμών αυξάνεται, οι υγρές βιοψίες μπορεί τελικά να γίνουν λογικές εναλλακτικές λύσεις έναντι της βιοψίας ιστών (Mamdani, et al, 2017).

Εν ολίγοις, η χρήση της ανάλυσης ctDNA στην παρακολούθηση της θεραπείας με καρκίνο για ασθενείς με NSCLC μπορεί να αποφέρει πολύτιμα αποτελέσματα με υψηλή κλινική σημασία, συμπεριλαμβανομένης της διερεύνησης της κατάστασης μετάλλαξης και του σειριακού γονότυπου όγκων (Minji, et al, 2018).

ΑΛΛΟΙ ΣΠΑΝΙΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΟΧΗΣ-ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ

Οι γενετικές παρεκκλίσεις που περιγράφηκαν παραπάνω (EGFR TKI αντίσταση, ενίσχυση MET και HER2) μπορεί να συμβάλλουν στην εξέλιξη της ασθένειας, συμπεριλαμβανομένης των μεταλλάξεων της σωματικής φωσφατιδυλινοσιτόλης-4,5- διφωσφορική 3-κινάση καταλυτική υπομονάδα άλφα (PIK3CA), που παρατηρούνται στο 1-5% των ασθενών και της απώλειας ομόλογου φωσφατάσης και τανσίνης (PTEN), το οποίο ελέγχει το σηματοδοτικό μονοπάτι της 3-κινάσης της φωσφατιδυλινοσιτόλης / πρωτεϊνικής κινάσης B (PI3K / Akt). Σε αρκετές περιπτώσεις ασθενών έχει αναφερθεί ως πρόσθετος μηχανισμός απόκτησης αντίστασης στον θετικό στη μετάλλαξη EGFR NSCLC ο μετασχηματισμός σε φαινότυπο του καρκίνου του πνεύμονα μικρών κυττάρων (SCLC). Αν και είναι σχετικά ασυνήθιστο, η μετάβαση ανιχνεύεται με τυπική παθολογική εξέταση ιστικής βιοψίας και οι ασθενείς μπορεί να αποκρίνονται καλά σε ειδική SCLC χημειοθεραπεία. Είναι επίσης σημαντικό να θεωρήσουμε

ότι άλλοι παράγοντες - όπως το μικροπεριβάλλον του όγκου - μπορεί να σχετίζονται με αντίσταση, περιπλέκοντας περαιτέρω την πλήρη διευκρίνιση των οδών αντίστασης. Πράγματι, ο μηχανισμός αντίστασης μπορεί να είναι άγνωστος σε περισσότερο από το 18-30% των ασθενών ([Heydt, et al, 2018](#)). Πρέπει να σημειωθεί ότι τα πρότυπα αντίστασης στην “τρίτη γενιά” TKI ενδέχεται να διαφέρουν μεταξύ των ρυθμίσεων, π.χ. με ή χωρίς την παρουσία μετάλλαξης T790M, και αυτή η εμφάνιση αντίστασης σε TKI “τρίτης γενιάς” δεν περιορίζεται στη μετάλλαξη EGFR C797S. Μπορεί να συμβεί μέσω πολλαπλών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένων, αλλά όχι περιορισμένων, της ενίσχυσης MAPK1, της μειορύθμισης αρνητικών ρυθμιστών ERK, της μετάλλαξης/ενίσχυσης NRAS και της ενίσχυσης KRAS. Η αντοχή στην ροσιτενίμη και στην οσιμερτινίμη, αν και δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητό, θεωρείται να επαναλαμβάνεται περιοδικά στα μονοπάτια MET, EGFR, PIK3CA, ERBB2, KRAS και RB1, καθώς και στη δυνατότητα νευροενδοκρινικού μετασχηματισμού σε SCLC ([Heydt, et al, 2018](#)).

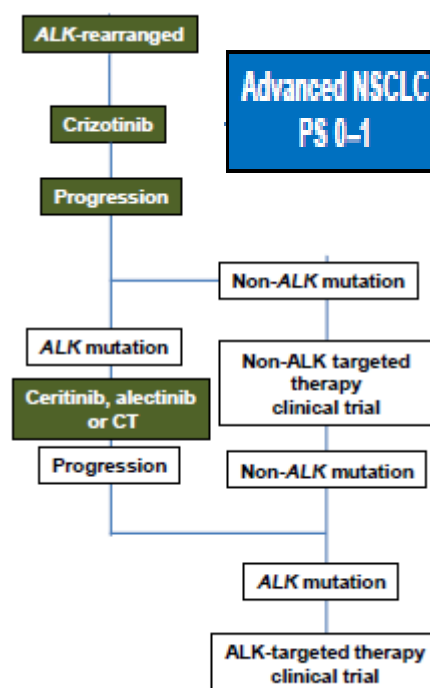
3.3.1.2. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ALK

Το αναπλαστικό λέμφωμα κινάσης (ALK) είναι μέλος του υποδοχέα της τυροσινικής κινάσης της υπεροικογένειας του υποδοχέα ινσουλίνης. Το γονίδιο ALK βρίσκεται στον βραχίονα του χρωμοσώματος 2 στη θέση 23. Η αναδιάταξη του γονιδίου ALK ταυτοποιήθηκε αρχικά σε αναπλαστικό λέμφωμα μεγάλων κυττάρων και στη συνέχεια περιγράφηκε σε ένα υποσύνολο όγκων NSCLC που περιείχε σύντηξη γονιδίων ALK και echinoderm σχετιζόμενων με μικροσωληνίσκους 4 (EML4). Αυτή η αναδιάταξη κωδικοποιεί μια χιμαιρική πρωτεΐνη με συστατική δραστηριότητα κινάσης, η οποία προάγει κακοήγη ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό. Η σύντηξη EML4-ALK έχει ανιχνευθεί στο 3,7% έως 7% των NSCLC, συνήθως σε αδενοκαρκινώματα με κύτταρα δακτυλίου-σηματοδότησης ή χαρακτηριστικά ιστολογίας cribriform και είναι πιο συχνή σε νεαρούς ασθενείς που δεν έχουν καπνίσει ποτέ (περισσότερο από το 17% των ασθενών ([Hofman, 2017](#))). Υπάρχουν αρκετές παραλλαγές αναδιάταξης EML4-ALK και επίσης συγχώνευση ALK με άλλα λιγότερο συχνά μόρια, όπως το μέλος 5B της οικογένειας κινασών (KIF5B), το γονίδιο σύντηξης TRK (TFG), η κινάση ελαφριάς αλυσίδας 1 (KLC1) και το γονίδιο της πρωτεΐνης “huntingtin-interacting” 1 (HIP1), με αποτέλεσμα ογκογονικό μετασχηματισμό. Έχει αποδειχθεί ότι το EGFR, το ιογενές ομόλογο ογκογονικό γονίδιο του σαρκώματος των αρουραίων Kirsten (KRAS) και οι μοριακές αλλοιώσεις ALK είναι αμοιβαία αποκλειστικά γεγονότα. Ωστόσο, έχουν περιγραφεί σε έως και 2,7% των περιπτώσεων αδενοκαρκινώματος των πνευμόνων με ταυτόχρονες μοριακές μεταβολές ([Villalobos, et al, 2017](#)).

Επί του παρόντος, η ανάλυση για την κατάσταση EML4-ALK πραγματοποιείται κυρίως από ανοσοϊστοχημεία (IHC) και επιβεβαιώνεται από ανάλυση FISH σε βιοψίες ιστών. Αυτή η κατάσταση (EML4-ALK) μπορεί επίσης να εντοπιστεί σε κυτταρολογικά δείγματα με ανοσοχημεία (ICC). Ωστόσο, οι μέθοδοι μοριακής βιολογίας χρησιμοποιούνται επίσης για αυτήν την ανίχνευση γονιδιωματικών αλλοιώσεων σε ιστούς ή κύτταρα, ιδίως η αλληλούχηση επόμενη γενιά (NGS). Η παρουσία αναδιάταξης EML4-ALK οδηγεί σε στοχευμένη θεραπεία. Παρά τη συχνή έγκαιρη και αποτελεσματική θεραπευτική απόκριση κατά τους πρώτους μήνες της χορήγησης στοχευμένης θεραπείας, παρατηρείται συστηματικά υποτροπή και εξέλιξη, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε μια αλλαγή στη στοχευμένη θεραπεία. Στις περισσότερες περιπτώσεις, αυτή η εξέλιξη του όγκου συνδέεται με την εμφάνιση των συγκεκριμένων μεταλλάξεων (EML4-ALK). Ωστόσο, πολλές διαφορετικές μεταλλάξεις ALK εμφανίζονται και μπορούν να εντοπιστούν από ανάλυση NGS με κυκλοφορούν καρκινικό DNA (ctDNA). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ανάλογα με τη θεραπεία που

χρησιμοποιείται για να στοχοποιηθεί μια αναδιάταξη ALK, οι μεταλλάξεις αντίστασης που εμφανίζονται σε αυτό το γονίδιο είναι συνήθως διαφορετικές (Hofman, 2017). Οι τρέχουσες διαγνωστικές προσεγγίσεις για την ανίχνευση γονιδίων σύντηξης ALK και τα αποτελέσματά τους εκτός από in situ φθορίζων υβριδισμό (FISH) και IHC περιλαμβάνουν και αλυσιδωτή αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής πολυμεράσης (RT-PCR). Ειδικότερα, το “Break-apart” FISH έχει καθιερωθεί σε κλινικές δοκιμές ως η τυπική μέθοδος επιβεβαίωσης της κατάστασης ALK. Οι FISH και IHC έχουν δείξει υψηλή συμφωνία σε πολλές αναφορές, ειδικά με την ανάπτυξη αντισωμάτων IHC (κλώνοι 5A4 και D5F3) με καλύτερες ευαισθησίες και ειδικότητες (83% -100%) για την ανίχνευση της αναδιάταξης ALK (Villalobos, et al, 2017). Ωστόσο, υπάρχει διακύμανση μεταξύ των χειριστών στην αξιολόγηση του FISH, λόγω της αναξιόπιστης ερμηνείας του διαχωρισμένου σήματος της αναδιάταξης ALK (Mamdani, et al, 2017). Ως αποτέλεσμα, η ανίχνευση IHC της πρωτεΐνης ALK θεωρείται ως ένα κατάλληλο εργαλείο διαλογής για τη δοκιμή δειγμάτων NSCLC για αναδιατάξεις ALK ή ως εργαλείο για την αξιολόγηση περιπτώσεων που δεν μπορούν να ερμηνευθούν από το FISH. Ωστόσο, άλλες μελέτες αποκαλύπτουν σημαντικές ασυμφωνίες, υποδηλώνοντας την ανάγκη συνδυασμού και των δύο δοκιμών για τη βελτιστοποίηση της ανίχνευσης. Επιπλέον, η RT-PCR και η NGS που χρησιμοποιούνται δεν έχουν εξεταστεί συστηματικά σε σύγκριση με τον FISH ως προγνωστικοί παράγοντες απόκρισης στους αναστολείς της ALK (Villalobos, et al, 2017). Συγκεκριμένα, η RT-PCR παρόλο που μπορεί να ανιχνεύσει μια αναδιάταξη ALK στο αίμα των ασθενών που φαίνεται να είναι θετικοί στην ALK μετά την ανάλυση μιας βιοψίας ιστού, εξακολουθεί να έχει ορισμένα όρια. Το πρώτο εμπόδιο αφορά την προ-αναλυτική καθυστέρηση μεταξύ της δειγματοληψίας αίματος και της εξαγωγής του RNA πλάσματος, γνωρίζοντας ότι το RNA του αίματος αποσυντίθεται γρήγορα μετά τη δειγματοληψία. Η προσθήκη ενός διαλύματος όπως το Trizol ή η άμεση κατάψυξη πλάσματος σε χαμηλή θερμοκρασία (τουλάχιστον -80° C) επιτρέπει καλύτερη διατήρηση της ακεραιότητας του RNA πλάσματος. Στην πράξη, αυτό δεν είναι πάντα δυνατό να γίνει στην κλινική πρακτική. Το δεύτερο εμπόδιο είναι το χαμηλό όριο ανίχνευσης της αναδιάταξης EML4-ALK από RT-PCR (περίπου 20-25%), το οποίο επίσης περιορίζει τη χρήση του στην καθημερινή πρακτική (Hofman, 2017).

Η σύντηξη ALK ορίζει έναν ξεχωριστό υποπληθυσμό ασθενών με αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα, οι οποίοι αποκρίνονται πολύ (57% -74%) στους αναστολείς της ALK όπως η κριζοτινίμη (Εικ.36). Ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με κριζοτινίμη παρουσίασαν σημαντικά καλύτερη μέση τιμή PFS και ποσοστό απόκρισης σε σύγκριση με ασθενείς που έλαβαν χημειοθεραπεία. Ως αποτέλεσμα, συνίσταται έλεγχος για αναδιατάξεις ALK σε



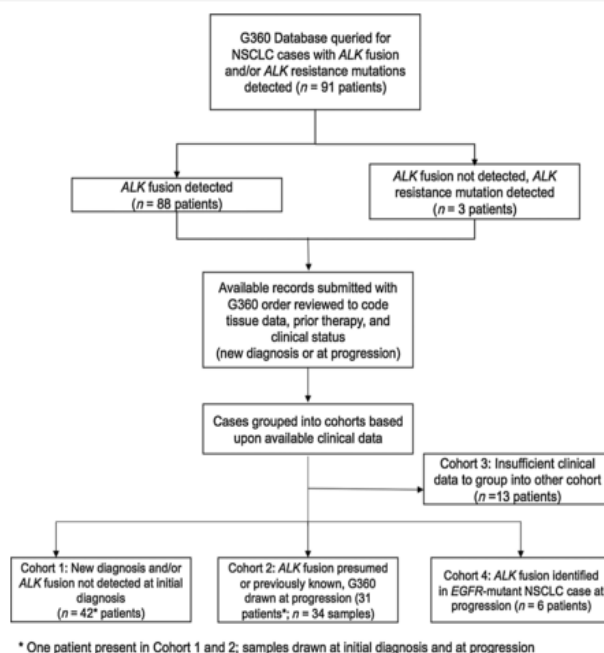
Εικόνα 36: Το θεραπευτικό σχήμα της αναδιάταξης ALK σε NSCLC ασθενείς. Ο κύριος αναστολέας της αναδιάταξης ALK είναι η κριζοτινίμη. Ωστόσο παρουσιάζεται εξέλιξη της νόσου και εάν ανιχνευθεί μετάλλαξη ALK, τότε δίνεται σεριτινίμη, αλεκτινίμη ή CT. Αν δεν ανιχνευθεί δεν γίνεται στοχευμένη θεραπεία και σε περαιτέρω εξέλιξη της νόσου (και στις δύο περιπτώσεις) η στοχευμένη θεραπεία κατά της μετάλλαξης ALK γίνεται σε κλινική δοκιμή (Salgia, 2016).

ασθενείς με προχωρημένο αδενοκαρκίνωμα πνευμόνων στις τρέχουσες οδηγίες κλινικής πρακτικής. Ωστόσο, παρά τις αρχικές αποκρίσεις, ένα κλάσμα των ασθενών αναπτύσσει επίκτητη αντίσταση στην κριζοτινίμη, λόγω δευτερογενών μεταλλάξεων εντός της περιοχής κινάσης του EML4-ALK. Αυτές περιλαμβάνουν τις L1196M, C1156Y και F1174L, μεταξύ άλλων. Αρκετοί αναστολείς ALK δεύτερης γενιάς που στοχεύουν στο θετικό ALK NSCLC, όπως η αλεκτινίμη, η σεριτινίμη και η AP26133, έχουν αναπτυχθεί και βρίσκονται υπό αξιολόγηση σε κλινικές δοκιμές ([Villalobos, et al, 2017](#)). Γενικά, πέντε είναι οι κύριοι αναστολείς της ALK: η κριζοτινίμη πρώτης γενιάς, η αλεκτινίμη δεύτερης γενιάς, η σεριτινίμη, η μπριγκατινίμη και η λορλατινίμη τρίτης γενιάς. Διάφορες κλινικές δοκιμές έδειξαν καλύτερη αποτελεσματικότητα για τα φάρμακα δεύτερης γενιάς αλεκτινίμη και μπριγκατινίμη, σε σύγκριση με την κριζοτινίμη στην πρώτη γραμμή θεραπείας της ALK-αναδιάταξης σε ασθενείς με NSCLC. Η τρίτης γενιάς λορλατινίμη, η οποία είναι η μόνη TKI ικανή να στοχεύσει τη μετάλλαξη αντίστασης ALK G1202R, έχει εγκριθεί τόσο ως δεύτερη όσο και ως τρίτης γραμμής θεραπεία μετά από άλλα TKI πρώτης ή δεύτερης γενιάς ALK ([Malapelle, et al, 2016](#)). Επιπλέον, η μετάλλαξη L1196M εμφανίζεται συχνά μετά από θεραπεία με κριζοτινίμη, η G1202R μετά από σεριτινίμη ή αλεκτινίμη, η F1174C μετά την σεριτινίμη και η I1171T / N / S μετά τη θεραπεία με αλεκτινίμη. Γενικά, η προσέγγιση υγρής βιοψίας μπορεί να ανιχνεύσει επίμονη αναδιάταξη ή να ανιχνεύσει έναρξη μετάλλαξης αντίστασης στο ALK γονίδιο και έτσι η θεραπεία μπορεί να προσαρμοστεί σε σχέση με την παρατηρούμενη μετάλλαξη. Μετά από μια αλλαγή κατά τη θεραπεία, η εκ νέου υγρή βιοψία μπορεί να εκτελεστεί ξανά σε διαφορετικούς χρόνους για να εντοπίσει την εμφάνιση νέων μεταλλάξεων του γονιδίου ALK. Η παρακολούθηση των ασθενών που μπορούν να υποβληθούν σε θεραπεία με κριζοτινίμη ή αλεκτινίμη μπορεί επίσης να γίνει με υγρή βιοψία. Η επίμονη επανεμφάνιση μιας αναδιάταξης ALK μπορεί να υποδηλώνει απουσία απόκρισης στη θεραπεία ή μπορεί να προβλέπει ακτινολογική πρόοδο πριν από την εμφάνιση των κλινικών συμπτωμάτων. Παρ' όλα αυτά, η ανίχνευση στο αίμα της κατάστασης ALK και των μεταλλάξεων ALK διατηρεί ορισμένα όρια ([Hofman, 2017](#)).

Ο McCoach και οι συνεργάτες του ([McCoach, et al, 2018](#)) πραγματοποίησαν μια έρευνα σε μια εργαστηριακή ομάδα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα με θετικό ALK και το ctDNA ελέγχθηκε με ανάλυση G360 για τον προσδιορισμό της κλινικής χρησιμότητας σε περιεκτικό προφίλ της γονιδιωματικής με βάση το πλάσμα. Προσδιόρισαν αναδρομικά σε 88 ασθενείς 90 συντήξεις ALK καταγεγραμμένες στο ctDNA: ορισμένες περιπτώσεις ήταν μη θεραπευτικές, άλλες είχαν ανεπαρκείς ιστούς για να εκτελέσουν δοκιμές FISH, άλλοι ασθενείς ήταν σε εξέλιξη ALK TKI και σε ορισμένες περιπτώσεις η αναδιάταξη της ALK βρέθηκε σε ασθενείς με αντοχή στο EGFR TKI. Αποδείχθηκε ότι η χρήση του ctDNA για να συμπληρωθούν οι δοκιμές ιστού παρείχε αποτελεσματικές επιλογές θεραπείας σε αυτούς τους ασθενείς. Επιπλέον, μία περίπτωση σε αρνητικό έλεγχο FISH και θετικό έλεγχο ctDNA για σύντηξη ALK αποκρίθηκε σε θεραπεία με ALK TKI (Εικ. 37). Επιπλέον, οι Supplee και οι

συνεργάτες του (Supplee, et al, 2019) συνέκριναν το πάνελ G360 με το πάνελ ctDx-Lung (Resolution Bioscience, Redmond, Washington, USA), που εκτείνεται σε εξόνια και μερικά ιντρόνια των 20 γονιδίων που σχετίζονται με το NSCLC, σε 16 ασθενείς που ήταν γνωστό ότι φέρανε σύντηξη ALK, ROS1 ή RET. Επίσης, οι Wang et al. (Wang, et al, 2016) αξιολόγησαν έναν άλλο πάνελ στοχευμένης αλληλουχίας με βάση την καταγραφή για τον εντοπισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των εκδηλώσεων αναδιάταξης. Χρησιμοποίησαν ένα εμπορικά διαθέσιμο πάνελ (Burning Rock Biotech Ltd., Guangzhou, Κίνα) στοχεύοντας 168 γονίδια χρησιμοποιώντας 50 ng ctDNA. Τα δείγματα αίματος από 24 ALK αναδιαταγμένες περιπτώσεις, σύμφωνα με τον έλεγχο βιοψίας ιστού, αναλύθηκαν και βρέθηκαν ότι οι αναδιατάξεις ALK επιτυχώς ανιχνεύθηκαν σε 19 από τους 24 ασθενείς με βασική 100% ειδικότητα. Ακόμα, οι Plagnol et al (Plagnol, et al, 2018) επικύρωσαν έναν πάνελ βασισμένο σε μια ενισχυμένη αλληλουχία στοχευμένων αμπλικονίων που καλύπτει 36 γονίδια για παραλλαγές ενός νουκλεοτιδίου, μεταλλάξεις εισαγωγής-διαγραφής, παραλλαγές αριθμού αντιγράφων και συμβάντα σύντηξης γονιδίων συμπεριλαμβανομένων των βασικών μεταλλάξεων στις συντήξεις EGFR, ALK και ROS1 (πίνακας InVisionFirst, Cambridge, UK). Αυτό το πάνελ αποδείχθηκε ικανό να ανιχνεύσει συντήξεις γονιδίων σε υψηλή ευαισθησία, δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των δοκιμαστικών σωλήνων συλλογής αίματος Streck και EDTA και αναφέρθηκε υψηλή συμφωνία με την ddPCR, που είναι μία από τις μεθόδους εκλογής για έλεγχο ctDNA. Διαπίστωσαν ότι η χρήση του βραχύ-αμπλικονίου μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερο κλάσμα του αναλυμένου DNA σε σύγκριση με τις μεθόδους NGS συμπεριλαμβανομένων της απολίωσης και του καθαρισμού (Bruno, et al, 2020).

Η Kunimasa δοκίμασε μια αλληλουχία στόχου βασισμένη σε mPCR σε μια πλατφόρμα Ion PGM. Χρησιμοποίησε ένα σύνθετο πάνελ που καλύπτει ολόκληρο το ιντρόνιο ALK 19 που συχνά εμπλέκεται σε αναδιατάξεις. Ανέλυσε το ctDNA από 20 ALK θετικές και 10 ALK αρνητικές περιπτώσεις που ανέφεραν χαμηλή ευαισθησία 50% και υψηλή ειδικότητα 100%, χρησιμοποιώντας 10 ng ctDNA (Kunimasa, et al, 2019). Τέλος, ορισμένοι πίνακες NGS που



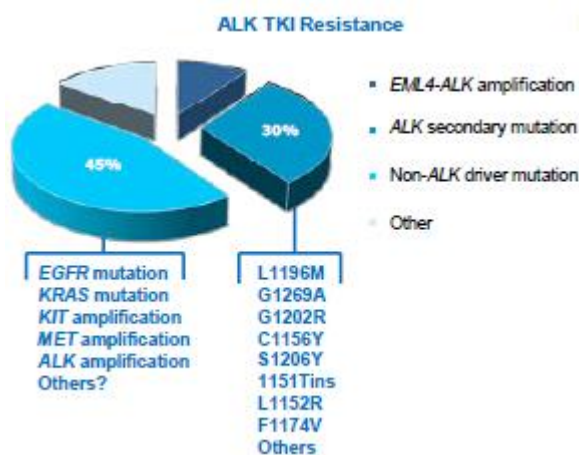
Εικόνα 37: Διάγραμμα ροής ασθενών με ALK συντήξεις
 Όπως φαίνεται στο σχεδιάγραμμα, 91 NSCLC ασθενείς με ALK συντήξεις ή/και αντίσταση σε ALK μεταλλάξεις εξετάστηκαν με το G360 και στους 88 εξ' αυτών βρέθηκαν συντήξεις ALK, ενώ οι 3 παρουσίασαν αντίσταση. Στη συνέχεια, είτε με νέα διάγνωση είτε κατά την διάρκεια της εξέλιξης, οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 4 ομάδες. Στην 1^η ομάδα ανήκαν οι ασθενείς που οι ALK συντήξεις δεν εντοπίστηκαν με την αρχική διάγνωση (μη θεραπευτικές), στην 2^η ομάδα ανήκαν αυτοί με γνωστή σύντηξη ALK (σε εξέλιξη ALK TKI), στην 3^η ομάδα ανήκαν οι ασθενείς με ανεπαρκείς δεδομένα (ανεπαρκείς ιστοί για την FISH) και στην 4^η ομάδα ανήκαν οι ασθενείς όπου οι συντήξεις ALK ταυτοποιήθηκαν αμοιβαία με τις μεταλλάξεις EGFR (αντοχή σε EGFR-TKI) (McCoach, et al, 2018).

βασίζονται σε αμπλικόνιο αναλύουν τις συντήξεις γονιδίων σε επίπεδα ctRNA μαζί με γονιδιακές μεταβολές στο ctDNA, όπως είναι το εμπορικά διαθέσιμο κιτ του Lung Cell Free Total Nucleic Acid(ThermoFisher). Η Παπαδοπούλου κ.ά. ([Papadopoulou, et al, 2019](#)) απέδειξαν ότι αυτή η προσέγγιση είναι πολύτιμη στο μοριακό χαρακτηρισμό ασθενών με NSCLC. Πιο συγκεκριμένα, ανέλυσαν 121 δείγματα πλάσματος NSCLC που δεν είχαν λάβει θεραπεία και 50 περιπτώσεις σε εξέλιξη της EGFR TKI, αναφέροντας το 49% των θετικών στη μετάλλαξη περιπτώσεων και μια συμφωνία με τον ιστό ίση με 86,11%. Αυτός ο προσδιορισμός επέτρεψε να χαρακτηρίσει τις συντήξεις ALK, ROS1 και RET μαζί με τις πιο κοινές γενετικές αλλοιώσεις με την προετοιμασία βιβλιοθήκης ctDNA και ctRNA. Επιπλέον, ένας τέτοιος προσδιορισμός χρησιμοποιεί τυχαίους μοριακούς στόχους ως ένα μοναδικό μοριακό μέσο αναγνώρισης για τη μοναδική επισήμανση κάθε μορίου πριν από την ενίσχυση της βιβλιοθήκης, αυξάνοντας έτσι την απόδοση του ελέγχου([Bruno, et al, 2020](#)).

Πρόσφατα, μια μεγάλη μελέτη ασθενών -χρησιμοποιώντας το Guardant360- έδειξε 94% αντιστοιχία υγρών βιοψιών, βρίσκοντας ενεργές μεταλλάξεις στο NSCLC, όπως οι αναδιατάξεις ALK & ROS1([Pailler, et al, 2013](#)/[Ilie, et al, 2012](#)) Άλλες εξελισσόμενες τεχνικές, που αναφέρεται ότι έχουν ευαισθησία 88% και ειδικότητα 100%, περιλαμβάνουν προσδιορισμό αλληλουχίας εξωσωματικού RNA πλάσματος. Συγκεκριμένα, η RT-PCR του TEP RNA μπόρεσε να ανιχνεύσει την αναδιάταξη του ALK με 65% ευαισθησία και 100% ειδικότητα([Nilsson, et al, 2011](#)/[Nilsson, et al, 2016](#)). Η θεραπεία με κριζοτινίμη οδηγεί σε εξαφάνιση της σύντηξης EML-ALK που βρίσκεται σε TEPs και σε μία περίπτωση ένας ασθενής είχε επανεμφάνιση της αναδιάταξης αυτής 2 μήνες πριν από την ακτινολογική εξέλιξη, υποδηλώνοντας και πάλι ότι μπορεί να είναι χρήσιμη για την παρακολούθηση της απόκρισης στη θεραπεία([Mamdani, et al, 2017](#)). Μελέτες φάσης I([Shaw, et al, 2011](#)) και II([Shaw, et al, 2013](#)) της κριζοτινίμης σε ALK-αναδιάταξη σε NSCLC επέδειξαν εντυπωσιακή δραστηριότητα και κλινικό όφελος, οδηγώντας σε έγκρισή της από τον FDA το 2011. Επιπλέον, μια επακόλουθη δοκιμή Φάσης III([Solomon, et al, 2014](#)) έδειξε ότι αυτή ήταν καλύτερη από την τυπική χημειοθεραπεία πεμετρεξίδης-συν-πλατίνας πρώτης γραμμής σε ασθενείς με προηγμένο μη επεξεργασμένο ALK+ NSCLC. Ωστόσο, παρά τα υψηλά ποσοστά απόκρισης (65-74%), οι περισσότεροι ασθενείς ανέπτυξαν αντίσταση στην κριζοτινίμη εντός 2 ετών, και οι αναστολείς δεύτερης γενιάς έχουν πλέον εγκριθεί από τον FDA (σεριτινίμη, αλεκτινίμη) ή σε προχωρημένο στάδιο της νόσου ως FDA Breakthrough Designated Therapy (μπριγκατινίμη). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι καθώς οι ασθενείς με ALK+ επιβιώνουν περισσότερο, υποτροπές εντός του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) διαγιγνώσκονται όλο και περισσότερο. Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι υπάρχουν μοναδικά πρότυπα μεταστάσεων σε όγκους ALK+, ειδικά σε γυναίκες με μεταστάσεις στο adnexa([Salgia, 2016](#)).

Τέλος, όπως φαίνεται στην εικ. 38 έχουν εμπλακεί πολλοί μηχανισμοί παράκαμψης, συμπεριλαμβανομένου της ALK ενίσχυσης, της ενεργοποίησης MET, της ενίσχυσης KIT και των μεταλλάξεων στο σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK. Ωστόσο, ο κύριος μηχανισμός της αντίστασης είναι μέσω οποιουδήποτε πλήθους γνωστών δευτερογενών μεταλλάξεων ALK που είτε προκαλούν αλλαγές στην σχισμή δέσμευσης του ATP, και προκαλούν στερική παρεμπόδιση για δέσμευση της κριζοτινίμης, είτε προκαλούν αποσταθεροποίηση της αυτοανασταλτικής διαμόρφωσης του ALK άγριου τύπου με το οποίο συνδέεται η κριζοτινίμη. Οι συχνότερες εμφανιζόμενες μεταλλάξεις που σχετίζονται με την αντίσταση της κριζοτινίμης είναι η L1196M (η μετάλλαξη “gatekeeper”) και η G1269A. Οι αναστολές ALK νέας γενιάς όπως η σεριτινίμη μπορούν να ξεπεράσουν την αντίσταση μετάλλαξης ALK στην κριζοτινίμη. Σε μια μελέτη φάσης I (Shaw, et al, 2014) σε ALK+ NSCLC, σημειώθηκε έντονη αντικαρκινική δραστηριότητα και στους υποτροπιάζοντες στην κριζοτινίμη ασθενείς αλλά και σε αυτούς που δεν είχαν λάβει κριζοτινίμη (δηλαδή ανεξάρτητα από την παρουσία μεταλλάξεων αντίστασης σε ALK), και βάσει αυτών των δεδομένων, η σεριτινίμη έλαβε έγκριση από το FDA το 2014. Τα επιβεβαιωτικά δεδομένα της Φάσης II (Mok, et al, 2015/ Felip, et al, 2015) έχουν τώρα αναφερθεί, συμπεριλαμβανομένου ενός ORR 36% και PFS 7,2 μηνών σε ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία με κριζοτινίμη. Σε αναδρομική μελέτη (Gainor, et al, 2015), μια ομάδα

θετικών ασθενών με ALK που έλαβαν θεραπεία με κριζοτινίμη και σεριτινίμη, έδειξε ότι η σεριτινίμη είχε σημαντική αντικαρκινική δράση στο θετικό ALK NSCLC, ακόμα και όταν η κριζοτινίμη προηγήθηκε αμέσως της θεραπείας με σεριτινίμη. Το διάμεσο συνδυασμένο διάστημα PFS για διαδοχική θεραπεία με αυτά τα φάρμακα ήταν 17,4 μήνες. Άλλοι ALK αναστολές βρίσκονται σε προχωρημένη κλινική ανάπτυξη με δραστηριότητα στους ανθεκτικούς στην κριζοτινίμη ασθενείς με NSCLC. Η αλεκτινίμη και η μπριγκατινίμη παρέχουν ORRs 45-71% σε ασθενείς που έχουν προχωρήσει στη θεραπεία με κριζοτινίμη. Ωστόσο, οι νέες γενιάς ALK αναστολές μπορούν, με τη σειρά τους, να προκαλέσουν μεταλλάξεις δευτερογενούς αντίστασης, για τις οποίες νέα φάρμακα θα πρέπει να σχεδιαστούν. Παρά τις αρχικές ανθεκτικές αποκρίσεις στην σεριτινίμη, στους ανθεκτικούς στην κριζοτινίμη ασθενείς, οι όγκοι τελικά αναπτύσσουν ανοχή στην σεριτινίμη. Οι ιστικές βιοψίες ασθενών ανθεκτικών στην κριζοτινίμη που εξελίχθηκαν στην σεριτινίμη έδειξαν εξάλειψη των ευαίσθητων σε σερατινίμη μεταλλάξεων (S1206Y, G1269A), και την εμφάνιση της ανθεκτικής σταυροειδής μετάλλαξης G1202R, η οποία σχετίζεται επίσης με κλινική ανθεκτικότητα στην αλεκτινίμη και στην κριζοτινίμη. Επιπλέον, σε μια μελέτη (Friboulet, et al, 2014) 11 ασθενών με επίκτητη αντίσταση, 5 βιοψίες ασθενών είχαν είτε μεταλλάξεις G1202 είτε F1174 και οι υπόλοιπες 6 βιοψίες είχαν άγριου τύπου EML4- ALK χωρίς μετάλλαξη (Salgia, 2016).



Εικόνα 38: Οι μηχανισμοί αντίστασης στην ALK TKI
Οι κυριότεροι μηχανισμοί αντίστασης είναι η μετάλλαξη EGFR, η KRAS και η ενίσχυση ALK, MET, KIT με ποσοστό 45%. Το 30% αντιπροσωπεύουν οι δευτερεύουσες μεταλλάξεις που εμφανίζονται όπως είναι η L1196M, η G1269A, η G1202R κλπ (Salgia, 2016).

Τα προφίλ των ALK μεταλλάξεων αντίστασης αλλάζουν ανάλογα με τον αναστολέα ALK και η ακριβής διαλογή για να ταιριάξει το μεταλλακτικό προφίλ των όγκων με τον κατάλληλο ALK αναστολέα είναι πιθανό να είναι σημαντική για να μεγιστοποιηθεί το όφελος για ασθενείς που υποτροπιάζουν με την θεραπεία του ALK αναστολέα κατευθύνοντας επακόλουθη διαδοχική ή συνδυαστική θεραπεία. Σπάνια και πολύπλοκα μεταλλακτικά προφίλ έχουν επίσης διασταυρωθεί σε ανθεκτικό στα φάρμακα ALK αναστολέα (ALK + NSCLC), συμπεριλαμβανομένης της μετάλλαξης KRAS Q22K και των STK11 “frameshift” μεταλλάξεων. Αυτό υπογραμμίζει τη σημασία της ολοκληρωμένης μοριακής δοκιμής στους εξελισσόμενους ασθενείς. Η ετερογένεια των μηχανισμών της αντίστασης του αναστολέα ALK σημαίνει ότι η αποτελεσματική παρακολούθηση των γενετικών αλλαγών κατά τη διάρκεια της θεραπείας είναι σημαντική για τη θεραπεία ή την πρόληψη της εμφάνισης αντίστασης ([Salgia, 2016](#)).

Εκτός των άλλων, το RNA προστατευμένο στα κυστίδια ως το εξωσωμικό RNA φαίνεται να είναι μια πολλά υποσχόμενη πηγή για την ανάλυση του αντιγράφου σύντηξης EML4-ALK ([Mamdani, et al, 2017](#)). Επιπλέον, η ειδικότητα αυτής της ανίχνευσης είναι πολύ καλή με CTCs, με πλάσμα και με αιμοπετάλια ([Hofman, 2017](#)). Όπως περιγράφηκε παραπάνω, υπάρχουν διαφορετικές προσεγγίσεις και ο συνδυασμός αυτών των προσεγγίσεων μπορεί να αυξήσει την πιθανότητα ανίχνευσης αναδιατάξεων ALK και ALK μεταλλάξεων. Ωστόσο, θα πρέπει να γίνουν μελλοντικές προσπάθειες για τη σύγκριση αυτών των μεθόδων στις ίδιες ομάδες ασθενών για να δειχθεί η δυνατότητα να χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα έτσι ώστε να αυξηθεί ο αριθμός των θετικών ALK δειγμάτων αίματος. Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος σε δείγματα αίματος, ο συσχετισμός με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν με ιστούς είναι εξαιρετικός. Αντίθετα, η ευαισθησία είναι μεταβλητή ανάλογα με την προσέγγιση που χρησιμοποιείται, ιδίως για τεχνικές που αναπτύχθηκαν με RNA χωρίς πλάσμα. Το όφελος της υγρής βιοψίας είναι το ίδιο με την ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR στο αίμα: (i) για ανίχνευση αναδιάταξης ALK όταν είναι αδύνατο να εκτελεστεί βιοψία ιστού ή εάν το δείγμα ιστού είναι υποβαθμισμένο ή μη αξιοποιήσιμο (ii) για έγκαιρη ανίχνευση μεταλλάξεων ALK που σχετίζονται με την αντίσταση στη θεραπεία που οδηγεί σε ταχεία αλλαγή στην θεραπευτική στρατηγική και (iii) για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας των θεραπειών που στοχεύουν μια αναδιάταξη ALK όταν αυτή η γονιδιωματική αλλοίωση χάνεται ή εμφανίζεται αντίστροφα στο αίμα. Η πρόκληση τώρα είναι σίγουρα η αύξηση της ευαισθησίας των εξετάσεων αίματος για αυτήν την ανίχνευση. Αυτό απαιτεί έλεγχο της προ-αναλυτικής φάσης μόλις ληφθεί δείγμα αίματος και ανάπτυξη πιο ευαίσθητων τεχνολογιών με ελάχιστη ποσότητα κυκλοφορούντος DNA / RNA. Επί του παρόντος, μελετώνται άλλες προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό της κατάστασης ALK στα ούρα ή στο microRNAs πλάσματος. Επιπλέον, ένα από τα σημαντικότερα ζητήματα είναι η πρόταση ισχυρών και αναπαραγωγίμων αναλυτικών ελέγχων για τον καθορισμό της κατάστασης ALK στο αίμα, με το πρόσχημα του ποιοτικού ελέγχου με διαπιστευμένους ελέγχους εγκεκριμένους σύμφωνα με τους διεθνείς κανόνες ([Hofman, 2017](#)).

Τέλος, ορισμένες φορές η ανάλυση ενός μόνο κυττάρου των CTC για καλύτερη αποκρυπτογράφηση αντίστασης αναφέρεται ως πλεονέκτημα των CTC έναντι του ctDNA. Συγκεκριμένα, αυτή η προσέγγιση απέδειξε ότι και οι δύο μηχανισμοί αντοχής επί στόχου και εκτός στόχου μπορούν να αναγνωριστούν στον ίδιο CTC μετά την επίτευξη αντίστασης στο ALK – TKI. Ωστόσο, έχει περιορισμένο κλινικό αντίκτυπο και είναι τεχνικά εξαιρετικά απαιτητική ([Guibert, et al, 2020](#)).

3.3.1.3. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ MET

Το γονίδιο MET βρίσκεται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 7 στη θέση 31. Αυτό το ογκογόνο κωδικοποιεί έναν υποδοχέα τυροσινικής κινάσης (υποδοχέας αυξητικού παράγοντα ηπατοκυττάρων-HGF), ο οποίος ενεργοποιεί πολλαπλές οδούς σηματοδότησης ([Villalobos, et al, 2017](#)), συμπεριλαμβανομένου των μονοπατιών της ενεργοποιημένου με μιτογόνο RAS-RAF πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK) και της PI3K-AKT-mTOR (μηχανιστικός ραπαμυκίνης) ([Salgia, 2016](#)), που παίζουν θεμελιώδεις ρόλους στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, στην επιβίωση, στην κινητικότητα και στην εισβολή. Η παθολογική ενεργοποίηση του MET περιλαμβάνει μετάλλαξη, ενίσχυση γονιδίων και υπερέκφραση πρωτεΐνης ([Villalobos, et al, 2017](#)). Συγκεκριμένα, το MET μπορεί να ενεργοποιηθεί από μεταλλάξεις, ανάπτυξη autocrine/paracrine, υπερέκφραση με ενίσχυση γονιδίου ή μειωμένη αποικοδόμηση και έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις σωματικών MET γονιδίων σε κληρονομικούς και σποραδικούς θηλαστικούς νεφρικούς καρκίνους. Σε άλλους καρκίνους, μεταλλάξεις και ενισχύσεις γονιδίων MET έχουν αναφερθεί ότι είναι προγνωστικοί παράγοντες της απόκρισης σε θεραπεία ([Cagle, et al, 2012](#)). Μάλιστα, μεταβολές MET αναφέρθηκαν για πρώτη φορά σε ασθενείς με νεφρικό καρκίνωμα των θηλών και μεταλλάξεις στον τομέα της MET κινάσης οδήγησαν σε συστατική ενεργοποίηση του υποδοχέα. Στον καρκίνο του πνεύμονα, οι μεταλλάξεις MET βρίσκονται στους εξωκυτταρικούς τομείς της σηματοδότησης και της εξωκυτταρικής μεμβράνης, που εμφανίζονται στο 3% των καρκίνων των πνευμόνων των πλακωδών κυττάρων και στο 8% των αδενοκαρκινωμάτων των πνευμόνων. Οι ενισχύσεις MET βρίσκονται στο 4% των αδενοκαρκινωμάτων των πνευμόνων και στο 1% των καρκίνων των πνευμόνων των πλακωδών κυττάρων και σχετίζονται με ευαισθησία στους αναστολείς της MET. Στο NSCLC, η έκφραση πρωτεΐνης MET και του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων, μαζί με υψηλό αριθμό αντιγράφων γονιδίου MET, έχουν περιγραφεί ως κακοί παράγοντες πρόγνωσης. Η ενεργοποίηση σημειακών μεταλλάξεων που επηρεάζουν τις θέσεις ματίσματος του εξονίου 14 του γονιδίου MET (METex14), οι οποίες εμφανίζονται στο 4% των αδενοκαρκινωμάτων των πνευμόνων, αντιπροσωπεύουν έναν πιθανό ογκογόνο οδηγό και προσδιορίζουν ένα υποσύνολο ασθενών που μπορεί να επωφεληθούν από αναστολείς MET, όπως η καματιμπίπη, η κριζοτινίμη και η καμποζατινίμη. Αυτή η νέα αλλαγή συνήθως προσδιορίζεται με τη μεθοδολογία NGS ([Villalobos, et al, 2017](#)).

Αν και υψηλού επιπέδου ενισχύσεις του πρωτογονιδίου MET είναι ασυνήθιστες σε προηγούμενους χωρίς θεραπεία NSCLC (~ 3%), οι ενισχύσεις MET ανιχνεύθηκαν στο 5-20% των δειγμάτων όγκου από ασθενείς που απέκτησαν αντίσταση μετά από θεραπεία πρώτης γραμμής EGFR TKI, και έχουν εμπλακεί στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και στην επιβίωση. Ακόμα, συνύπαρξη τόσο του MET όσο και των μηχανισμών αντίστασης T790M ενδέχεται να βρεθούν στο 7-39% των ασθενών. Ωστόσο, η ενίσχυση MET μπορεί επίσης να συμβεί ανεξάρτητα από τη μετάλλαξη T790M, αντιπροσωπεύοντας έτσι έναν κλινικά διακριτό θεραπευτικό στόχο. Σε ένα προ-κλινικό περιβάλλον, ένας συνδυασμός της αναστολής MET και της αναστολής EGFR έχει αποδειχθεί ότι αποκατέστησε την ευαισθησία στα EGFR TKIs και οι προκαταρκτικές κλινικές μελέτες βρίσκονται σε εξέλιξη ([Heydt, et al, 2018](#)). Επίσης, προκλινικά μοντέλα υποδηλώνουν ότι η αντίσταση στους αναστολείς MET μπορεί να μεσολαβείται από ενίσχυση KRAS και υπερέκφραση που είναι δυναμικά στοχευμένη με τους MAPK αναστολείς του μονοπατιού. Οι δευτερεύουσες μεταλλάξεις MET μπορούν ακόμα να στοχευτούν στην περίπτωση αποτελεσματικών κατάλληλων διαγνωστικών σημμάτων ([Salgia, 2016](#)).

Η έκφραση του MET και του φωσφο-MET μελετήθηκε σε καρκίνο του πνεύμονα. Πρόσφατα, το 40% των ιστών καρκίνου του πνεύμονα έδειξε ότι υπερεκφράζουν το MET. Μελέτες έχουν δείξει ότι η επιβίωση για ασθενείς με NSCLC που είχαν 5 ή περισσότερα αντίγραφα/κύτταρα είναι χειρότερη από ό, τι για όσους είχαν λιγότερα από 5 αντίγραφα/ κύτταρα. Επιπλέον, αντισώματα κατά του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων, αντισώματα MET και αναστολείς MET TKI μικρού μορίου βρίσκονται όλα σε διάφορα στάδια ανάπτυξης, και η διευκρίνιση των προγνωστικών βιοδεικτών για αναστολείς MET θα είναι σημαντική για μελλοντικές δοκιμές και αποφάσεις θεραπείας ([Cagle, et al, 2012](#)).

Έχουν πραγματοποιηθεί έως τώρα αρκετές κλινικές δοκιμές, αλλά οι περισσότερες από αυτές δεν είχαν θετικά αποτελέσματα. Τα προκαταρκτικά στοιχεία για την καμπατινίμη αποκάλυψαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα είτε σε ασθενείς NSCLC με μεταλλάξεις METex14 που είχαν ήδη λάβει θεραπεία είτε σε ασθενείς NSCLC με αντίστοιχες μεταλλάξεις που δεν είχαν λάβει θεραπεία. Το 2002, το πρόγραμμα GEOMETRY([Wolf, et al, 2019](#)) έδειξε μια κλινικά σημαντική ORR 39,1% και 71,4% σε ασθενείς που είχαν προηγουμένως υποβληθεί σε θεραπεία και σε ασθενείς που δεν είχαν υποβληθεί σε θεραπεία, αντίστοιχα, με διαχειρίσιμο προφίλ τοξικότητας. Η τεποτινίμη, ένα MET επιλεκτικό TKI, δημιούργησε πολλά υποσχόμενη δραστηριότητα σε ασθενείς με METex14, με ANORR 59%. Όσον αφορά την ασφάλεια, σε περισσότερο από το 50% των ασθενών εμφανίστηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με τη θεραπεία με την τεποτινίμη (TRTEAEs), συμπεριλαμβανομένων σοβαρών TRTEAE σε τρεις περιπτώσεις (8,8%). Η κριζοτινίμη πήρε έγκριση από τον FDA για METex14 σε ασθενείς με NSCLC, με βάση τα αποτελέσματα μιας εκτεταμένης δοκιμής από τη μελέτη Φάσης I PROFILE 1001([Drilon, et al, 2018](#)), η οποία περιελάμβανε 69 ασθενείς με METex14. Μεταξύ 65 αξιολογών ασθενών, υπήρχαν 3 πλήρεις αποκρίσεις(4,6%), 18 μερικές αποκρίσεις (27,7%) και 29 περιπτώσεις σταθερών ασθενειών. Ο μέσος χρόνος απόκρισης ήταν 7,6 εβδομάδες, με διάμεση διάρκεια απόκρισης (DOR) 9,1 μήνες και PFS 7,3 μήνες. Τέλος, το πρόγραμμα AcSé ([Moro-Sibilot, et al, 2019](#)) κατέγραψε 25 ασθενείς με ενίσχυση MET και 29 με μετάλλαξη MET (25 METex14). Η κριζοτινίμη έδειξε δραστηριότητα και στην MET ενίσχυση και στην MET-μετάλλαξη σε NSCLC (ORR: 32 και 40%, αντίστοιχα) ασθενείς, ενώ η απόκριση συσχετίστηκε με τον αριθμό MET αντιγράφων στην ενισχυμένη ομάδα. Το διάμεσο PFS ήταν περίπου 3,5 μήνες και στις δύο ομάδες, ενώ η συνολική επιβίωση ήταν μεγαλύτερη στο πληθυσμό με METex14 (9,5 έναντι 7,7 μήνες) ([Pinsolle, et al, 2019](#)).

3.3.1.4. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ HER2(ERBB)

Το ανθρώπινο γονίδιο υποδοχέα 2 του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα HER2 (ERBB2) είναι ένα πρωτο-ογκογόνο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 στη θέση 12. Κωδικοποιεί ένα μέλος υποδοχέα τυροσίνης κινάσης της οικογένειας υποδοχέων ERBB. Το HER2 δεν διαθέτει συγκεκριμένο συνδέτη ([Villalobos, et al, 2017](#)). Δηλαδή, σε αντίθεση με τα άλλα μέλη του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα της οικογένειας υποδοχέων (HER), το HER2 / neu δεν είναι αυστηρά υποδοχέας τυροσίνης κινάσης επειδή κανένας σύνδεσμος ενδογενής υψηλής συγγένειας δεν έχει αναγνωριστεί. Το HER2 / neu λειτουργεί ως σηματοδότης συντονιστής δικτύου και ενισχυτής όταν σχηματίζει ετεροδιμερή με άλλα μέλη της οικογένειάς του([Cagle, et al, 2012](#)). Έτσι, μπορεί να συνδυαστεί με άλλους υποδοχείς ERBB για να σχηματίσει ένα ετεροδιμερές. Αυτό επιτρέπει την ενεργοποίηση σημαντικών οδών μεταγωγής σήματος, συμπεριλαμβανομένων των οδών MAPK και PI3K, που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, στη διαφοροποίηση και στη μετανάστευση. Η έκφραση και/ή η ενίσχυση HER2 βρίσκεται σε πολλούς καρκίνους, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού και του στομάχου. Η υπερέκφραση του HER2 έχει αναφερθεί στο

7% έως 34,9% του NSCLC και έχει συσχετιστεί με κακή πρόγνωση σε ασθενείς με αυτούς τους όγκους. Ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του HER2 έχουν βρεθεί στο 1,6% έως 4% των καρκίνων του πνεύμονα. Αυτές οι μεταλλάξεις εμφανίζονται στα 4 εξόνια του τομέα της τυροσινικής κινάσης(εξόνια 18-21) και απαντώνται συχνότερα σε αδenoκαρκίνωμα σε ασιατικής καταγωγής γυναίκες, καπνιστές ή μη. Οι μεταλλάξεις HER2 είναι σχεδόν πάντα αμοιβαία αποκλειστικές με άλλες μεταβολές ογκογονιδίων “οδηγών” στον καρκίνο του πνεύμονα (Villalobos, et al, 2017), όπως μεταλλάξεις EGFR και KRAS (Salgia, 2016). Διαφορετικές μελέτες ενισχύουν τη σημασία της διαλογής των αδenoκαρκινωμάτων των πνευμόνων για τη μετάλλαξη HER2 ως μέθοδος για την επιλογή ασθενών που θα μπορούσαν να επωφεληθούν από τις στοχευμένες με HER2 θεραπείες (αφατινίμη και τραστουζουμάμπη), οι οποίες έχουν δείξει ποσοστά απόκρισης περίπου 50%(Villalobos, et al, 2017).

Οι κλινικές δοκιμές δεν έχουν δείξει ακόμα σαφές όφελος, αλλά οι HER2- στοχευμένες θεραπείες όπως η αφατινίμη έχουν δείξει σημάδια κλινικής δραστηριότητας σε ασθενείς με -μεταλλαγμένο με HER2- αδenoκαρκίνωμα, που είχαν υποστεί βαριά θεραπεία - περιλαμβάνοντας δραστηριότητα σε ασθενείς με -μεταλλαγμένους με HER2- καρκίνους του πνεύμονα, με τις παρεμβολές του εξονίου 20 YVMA να είναι οι πιο κοινές επιλογές(Salgia, 2016). Επίσης, αρκετές κλινικές δοκιμές στοχευμένων παραγόντων, όπως η τραστουζουμάμπη, η νερατινίμη και η πυροτινίμη, μεταξύ άλλων, διεξάγονται σε ασθενείς με μετάλλαξη HER2. Οι μεταλλάξεις HER2 συνήθως αξιολογούνται μέσω προσεγγίσεων αλληλούχησης (Villalobos, et al, 2017).

Επιπλέον, ενίσχυση του HER2 έχει εντοπιστεί με συχνότητα 12-13% σε ασθενείς με ασθένεια σε προχωρημένο επίπεδο μετά από θεραπεία πρώτης γραμμής EGFR TKI. Επιπλέον, υποστηρίχθηκε ότι η HER2 ενίσχυση ενισχύεται στην ανάπτυξη της αντίστασης σε "τρίτης γενιάς" EGFR TKI, όπως η οσιμερτινίμη. Σε μια αναφορά περίπτωσης(Planchard, et al,2015) ένας ασθενής που είχε αποκτήσει T790M μετάλλαξη μετά την εξέλιξη με την γεφτινίμη δεύτερης γραμμής, στη συνέχεια συνέχισε να αναπτύσσει αντίσταση στην οσιμερτινίμη, το οποίο συσχετίστηκε με ενίσχυση HER2 εν απουσία μετάλλαξης C797S στο EGFR. Η στοχευμένη θεραπεία της ενίσχυσης HER2 ήταν μέχρι στιγμής απογοητευτική σε NSCLC, αν και τα αντισώματα κατευθυνόμενα με HER2 και με TKI βρίσκονται υπό αξιολόγηση(Heydt, et al, 2018).

Αν και οι HER2 /neu μεταλλάξεις εμφανίζονται μόνο στο 2% των ασθενών, το HER2 / neu συχνά υπερεκφράζεται σε κάποιο βαθμό σε NSCLC και φαίνεται να σχετίζεται με την αντοχή στα φάρμακα, με αυξημένο μεταστατικό δυναμικό, με αυξημένη παραγωγή VEGF και με κακή πρόγνωση. Η HER2 / neu μεσολαβούμενη από αντίσταση στους DNA καταστροφικούς παράγοντες απαιτεί την ενεργοποίηση του Akt, το οποίο φωσφορυλιώνει μυϊκά διπλό λεπτό 2 (MDM2) και ως εκ τούτου, βελτιώνει τη διαμεσολαβούμενη από MDM2 πανταχού παρούσα και υποβάθμιση του p53. Αποκλεισμός της διαδρομής Akt με μεσολάβηση από το HER2 / neu αυξάνει το κυτταροτοξικό αποτέλεσμα των DNA καταστροφικών φαρμάκων σε καρκινικά κύτταρα άγριου τύπου TP53. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο G/G γονότυπος του πολυμορφισμού MDM2 σχετίζεται με χειρότερη συνολική επιβίωση μεταξύ ασθενών με πρώιμο στάδιο NSCLC, ιδιαίτερα εκείνων των οποίων οι όγκοι έχουν πλακώδη ιστολογία κυττάρων. Η τραστουζουμάμπη είναι ένα χημειοθεραπευτικό αντίσωμα εναντίον του HER2 / neu. Συνδυασμοί τραστουζουμάμπης και χημειοθεραπείας είναι καλά ανεκτοί, με ποσοστά απόκρισης 21% έως 40%. Φαίνεται ότι οι πολύ υπερεκφραζόμενες περιπτώσεις HER2 / neu του NSCLC, αν και σχετικά σπάνιες (3% - 9%), μπορεί να δείξουν όφελος με τη θεραπεία με τραστουζουμάμπη(Cagle, et al, 2012).

3.3.1.5. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ KRAS

Το KRAS είναι ένα ογκογόνο που βρίσκεται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 12 στη θέση 12.1. Είναι μέλος της οικογένειας RAS των πρωτεϊνών G που σχετίζονται με μεμβράνη και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με ενδογενή δραστικότητα GTPase, η οποία εμπλέκεται σε μια ποικιλία κυτταρικών αποκρίσεων όπως ο πολλαπλασιασμός, η κυτταροσκελετική αναδιοργάνωση και η επιβίωση. Το KRAS δρα κατασταλτικά σε αριθμό υποδοχών τυροσίνης κινάσης, συμπεριλαμβανομένου του EGFR, και σχετίζεται με ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών της κινάσης RAS / RAF / MAP, της κινάσης (MEK) / της ρυθμιζόμενης από εξωκυτταρικό σήμα κινάσης (ERK) και της RAS / MAPK. Οι μεταλλάξεις KRAS εμφανίζονται στο 25% έως 35% των ασθενών με NSCLC, κυρίως σε αδενοκαρκινώματα με συμπαγές μοτίβο([Villalobos, et al, 2017](#)) και στο 4% των καρκινωμάτων των πλακωδών κυττάρων των πνευμόνων([Salgia, 2016](#)) και βρίσκονται συχνότερα σε λευκούς ασθενείς σε σύγκριση με τους Ασιάτες, σε πρώην ή τρέχοντες καπνιστές, αλλά χωρίς σεξουαλική προδιάθεση. Μεταλλάξεις με τη μορφή παραλλαγών απλού νουκλεοτιδίου βρίσκονται στα κωδικόνια 12 και 13 περίπου στο 95% των περιπτώσεων. Σε μη καπνιστές, οι πιο συχνές μεταλλάξεις KRAS είναι οι G12D και G12V, ενώ η G12C είναι η πιο κοινή μετάλλαξη που σχετίζεται με το κάπνισμα. Η παρουσία της μετάλλαξης KRAS μπορεί να σχετίζεται με δυσμενή έκβαση και μπορεί να είναι αρνητικός προγνωστικός παράγοντας για την απόκριση στη χημειοθεραπεία. Επιπλέον, συνδέεται με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης δεύτερου πρωτογενούς όγκου και αποτελεί πρόβλεψη αντοχής σε στοχευμένη θεραπεία με EGFR-TKIs, όπως η γεφιτινίμη ή ερλοτινίμη, σε ασθενείς με NSCLC. Επειδή οι μοριακές αλλοιώσεις KRAS, EGFR και ALK είναι αμοιβαία αποκλειστικές, έχει προταθεί ότι ο έλεγχος KRAS θα μπορούσε να είναι μια υποκατάστατη δοκιμασία για τον αποκλεισμό θετικών περιπτώσεων EGFR και ALK. Ωστόσο, αυτή η προσέγγιση δεν συνίσταται προς το παρόν. Αν και δεν έχουν εγκριθεί στοχοθετημένες θεραπείες για ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και μετάλλαξη KRAS, πολλές κλινικές δοκιμές που στοχεύουν σε στόχους καθοδικής σηματοδότησης βρίσκονται σε εξέλιξη. Διαφορετικές δοκιμές φάσης II ανέφεραν βελτιώσεις τόσο στο PFS όσο και στο ποσοστό απόκρισης με το συνδυασμό της σελομετινίμης (αναστολέας MEK1 / MEK2) και της δοξεταξέλης σε σύγκριση μόνο με την δοξεταξέλη([Jänne, et al, 2013](#)) και πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα με την σοραφενίμη (αναστολέας της οδού RAS / RAF), με έλεγχο της νόσου σε ποσοστό περίπου 50% ([Dingemans, et al, 2013](#)). Αντίθετα, η τραμετινίμη (αναστολέας MEK1 / MEK2) δεν παρουσίασε πλεονεκτήματα έναντι της δοξεταξέλης σε ασθενείς με NSCLC([Blumenschein, et al, 2015](#)).

Ορισμένα πιθανά δεδομένα έχουν δείξει ότι σε εκτομή NSCLC πρώιμου σταδίου, οι KRAS μεταλλάξεις βρέθηκαν μόνο σε καπνιστές και συσχετίστηκαν με χειρότερη επιβίωση αποκλειστικά στη νόσο του σταδίου I αλλά όχι σε ολόκληρο τον πληθυσμό. Αντίθετα, στη νόσο του σταδίου IV, η παρουσία μεταλλάξεων KRAS συσχετίστηκε με μικρότερη επιβίωση. Όσον αφορά τη μετάλλαξη, μια μελέτη([Yu, et al, 2015](#)) δεν έδειξε καμία διαφορά στη συνολική επιβίωση (OS) όταν συγκρίθηκαν οι ειδικές υποκαταστάσεις αμινοξέων στο κωδικόνιο 12. Ένα ενδιαφέρον εύρημα ήταν ότι οι μεταλλάξεις του κωδικονίου 13 του KRAS φαινόταν να σχετίζονται με χειρότερη επιβίωση σε σύγκριση με τις μεταλλάξεις του κωδικονίου 12. Δυστυχώς, αυτά τα αποτελέσματα δεν επιβεβαιώθηκαν από ανεξάρτητη επικύρωση ([Garzón, et al, 2016](#)).

Οι προγνωστικοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της απόκρισης ή της αντίστασης σε μια συγκεκριμένη στοχευμένη θεραπεία. Μερικά στοιχεία δείχνουν ότι η ανοσοενισχυτική χημειοθεραπεία είναι απίθανο να ωφελεί ασθενείς με NSCLC που φέρουν

μεταλλάξεις KRAS. Παρ' όλα αυτά, σε μια πρόσφατη μελέτη, οι μεταλλάξεις του κωδικονίου 13 του KRAS φάνηκαν βλαβερές και οι ασθενείς είχαν σημαντικά χειρότερη συνολική επιβίωση με ανοσοενισχυτική χημειοθεραπεία. Σε σχέση με το NSCLC, παρουσιάστηκαν μεταλλάξεις KRAS να σχετίζονται σημαντικά με κατώτερα αποτελέσματα χημειοθεραπείας και EGFR-TKI. Ωστόσο, όταν οι ασθενείς με μεταλλάξεις EGFR αποκλείστηκαν, δεν υπήρχαν στατιστικές διαφορές μεταξύ επιβίωσης χωρίς εξέλιξη (PFS) στη χημειοθεραπεία και σε ποσοστά απόκρισης σε EGFR-TKIs ή σε χημειοθεραπεία. Μια εξήγηση μπορεί να είναι ότι οι KRAS και οι μεταλλάξεις EGFR είναι γενικά αμοιβαία αποκλειστικές στο NSCLC και, κατά συνέπεια, η συντριπτική πλειονότητα των μεταλλάξεων του EGFR υπάρχουν σε ασθενείς με άγριο τύπο KRAS. Επομένως, η απουσία τροποποιήσεων του EGFR, αντί της παρουσίας μετάλλαξης KRAS, μπορεί να είναι αρνητικός προγνωστικός παράγοντας της απόκρισης σε EGFR-TKIs. Από αυτή την άποψη, σε προχωρημένο NSCLC ορισμένες μελέτες έχουν επίσης διερευνήσει την επίδραση μεταλλάξεων KRAS σχετικά με την ευαισθησία στη χημειοθεραπεία με όχι σημαντικές διαφορές στο PFS και στην συνολική επιβίωση μεταξύ KRAS ασθενών με μετάλλαξη άγριου τύπου και ασθενών με KRAS μετάλλαξη. Σε αντίθεση, άλλες αναφορές δείχνουν ότι σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με πρώτη γραμμή χημειοθεραπεία με βάση πλατίνα, οι μεταλλάξεις KRAS έχουν αρνητικό προγνωστικό ρόλο. Επομένως, όλα αυτά τα ευρήματα πρέπει να επιβεβαιωθούν σε μεγαλύτερο πληθυσμό που έχει σημασία για λήψη κλινικών αποφάσεων, επισημαίνοντας την πιθανότητα ανάλυσης μετάλλαξης KRAS για συγκεκριμένους τύπους, η οποία θα μπορούσε να αναγνωρίσει μια υποομάδα ασθενών που θα μπορούσαν να επωφεληθούν με περισσότερο χημειοθεραπεία (Garzón, et al, 2016)(Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Δεδομένα επιβίωσης σύμφωνα με την κατάσταση KRAS στο αίμα(Garzón, et al, 2016).

Author, year	Study population (n)	NSCLC Stage	Therapeutic regimen	Specimen type	PFS (months)	P value (PFS)	OS (months)	P value (OS)
Camps C. et al., 2005	67	IIIB or IV	Chemotherapy	Serum	KRAS +: 7.3 WT: 5.5	0.2300	KRAS +: 11.4 WT: 12.5	0.2800
Gautschi O. et al., 2007	175	I, II, III (A/B) or IV	Surgery + chemotherapy	Plasma	-	-	Worse OS of patients with mutant plasma KRAS	0.0370
Wang S. et al., 2010	120	IIIB or IV	EGFR-TKI	Plasma	KRAS+: 2.5 WT: 8.8	<0.0010	KRAS +: 16.9 WT: 20.3	0.8270
Nygaard AD. et al., 2013	246	III or IV	Chemotherapy	Plasma	KRAS +: 3.0 WT: 5.6	0.0043	KRAS +: 4.8 WT: 9.5	0.0002
Kim ST. et al., 2013	57	IIIB and IV	EGFR-TKI	Serum	-	-	KRAS +: 3.9 WT: 10.4	0.4520
Nygaard AD. et al., 2014	69	III or IV	Chemotherapy	Plasma	KRAS +: 2.1 WT: 5.5	0.0100	KRAS +: 3.6 WT: 8.4	0.0300
Al B. et al., 2016	meta-analysis (30,31,33,35)	III or IV	Chemotherapy	cfDNA	No significant differences	0.4500	No significant differences	0.8900

NSCLC, non-small cell lung cancer; PFS, progression-free survival; OS, overall survival; EGFR, epidermal growth factor receptor; cfDNA, circulating free DNA.

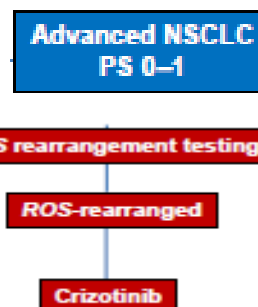
Οι μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 12 φαίνεται να παρέχουν διαφορετικές αποκρίσεις ανάλογα με τη θεραπεία. Ενώ η έκφραση του G12C σχετίζεται με μειωμένη απόκριση σε σισπλατίνη και αυξημένη ευαισθησία στην ταξόλη και στην πεμετρεξίδη, το G12D σχετίζεται μόνο με αντοχή στη θεραπεία με ταξόλη και ευαισθησία στην σοραφενίμη. Επιπλέον, μεταλλάγματα G12V δείχνουν έντονη ευαισθησία στη σισπλατίνη σε σύγκριση με κλώνους άγριου τύπου και είναι ελαφρώς πιο ανθεκτικά σε πεμετρεξίδη. Ωστόσο, η έκφραση διαφορετικών KRAS μεταλλάξεων δεν τροποποίησαν την κυτταρική απόκριση στον EGFR αναστολέα ερλοτινίμη ή γεμισταβίνη. Συνολικά, αυτά τα ευρήματα αλλάζουν την κλινική από άποψη διαφορετικών

μεταλλάξεων KRAS και μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια μεταγωγής σε NSCLC και σε διαφορετική καρκινογένεση και ευαισθησία στα φάρμακα. Επομένως, αυτό είναι απαραίτητο για τον ορισμό της συγκεκριμένης μετάλλαξης KRAS με τη σειρά για τον εντοπισμό αυτών των ασθενών με διαφορετικές πιθανότητες απόκρισης στη θεραπεία. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα να κατανοηθούν οι μεταλλάξεις KRAS και να αναπτυχθούν φάρμακα που στοχεύουν εναντίον τους. Μερικές πρόσφατες έρευνες έχουν δημιουργήσει ένα ανανεωμένο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη άμεσων αναστολέων KRAS. Για παράδειγμα, οι Lito και συνάδελφοι ([Lito, et al, 2016](#)) κατόρθωσαν να αποκλείσουν την ανταλλαγή των νουκλεοτιδικών παραγόντων από την ενεργοποίηση του KRAS. Δούλεψαν με μία ένωση, ARS-853, που είναι ένας εκλεκτικός, ομοιοπολικός αναστολέας του KRAS G12C, που αναστέλλει την μετάλλαξη σηματοδοτημένη από KRAS δεσμεύοντας την συνδεδεμένη με το ΑΕΠ ογκοπρωτεΐνη και αποτρέποντας την δραστηριοποίηση. Αυτό το έργο θα μπορούσε να παρουσιάσει ένα σημαντικό βήμα προς έναν άμεσο αναστολέα KRAS για τους ασθενείς με KRAS G12C μετάλλαξη, αλλά παρόλα αυτά, περαιτέρω βελτιστοποίηση απαιτείται για τη δημιουργία ένωσης κατάλληλης για in vivo μελέτες([Garzón, et al, 2016](#)).

Έτσι, ο έλεγχος μετάλλαξης KRAS μπορεί να εντοπίσει ασθενείς που μπορεί να μην επωφεληθούν από περαιτέρω μοριακές διαγνωστικές δοκιμές. Δεν υπάρχει άμεση στοχευμένη θεραπεία που να είναι διαθέσιμη για το μεταλλαγμένο KRAS NSCLC, και ως εκ τούτου έχουν διεξαχθεί έρευνες που επικεντρώθηκαν στη στόχευση μεταγενέστερων πρωτεϊνών σηματοδότησης των RAS / RAF / MEK / ERK, όπως των BRAF και MEK. Η επίπτωση και η συνθετική θνησιμότητα που σχετίζεται με τη μετάλλαξη KRAS σημαίνει ότι αυτά τα μονοπάτια πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω([Salgia, 2016](#)).

3.3.1.6. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ROS

Το ROS πρωτο-ογκογονίδιο 1 (ROS1) είναι μέλος υποδοχέα τυροσίνης κινάσης της οικογένειας του υποδοχέα ινσουλίνης και βρίσκεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 6 στη θέση 22. Το ROS1 παίζει ρόλο στη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων κατά την ανάπτυξη ποικιλίας οργάνων, αλλά δεν έχει αναγνωριστεί πρόσδεμα για αυτόν τον υποδοχέα. Οι αναδιατάξεις του ROS1 περιγράφηκαν αρχικά στο γλοιοβλάστωμα και έχουν επίσης αναφερθεί σε χολαγγειοκαρκίνωμα και καρκίνο των ωοθηκών. Περίπου 1% έως 2% των NSCLCs περιέχουν αναδιατάξεις ROS1 και αρκετά γονίδια σύντηξης, συμπεριλαμβανομένων των CD74, της οικογένειας μεταφορέων διαλυμένης ουσίας 34, του μέλους 2(SLC34A2), των επαναλήψεων πλούσιων σε λευκίνη, της ομοιογενούς περιοχής ανοσοσφαιρίνης 3(LRIG3), της εζρίνης(EZR), της συνδεκάνης 4 (SDC4), της τροπομοσίνης 3 (TPM3) και της FIG, έχουν αναφερθεί σε αυτούς τους όγκους. Όλες αυτές οι συντήξεις έχουν ως αποτέλεσμα μια χιμαιρική πρωτεΐνη που έχει αναφερθεί ότι είναι ογκογόνος. Η αναδιάταξη του ROS1 σε NSCLC εμφανίζεται συνήθως σε νέους, γυναίκες, μη καπνιστές με ιστολογική διάγνωση αδενοκαρκινώματος και συνήθως είναι αμοιβαία αποκλειστική με άλλους ογκογονικούς οδηγούς (EGFR, KRAS, ALK)([Villalobos, et al, 2017](#)). Η κριζοτινίμη είναι σήμερα το μόνο εγκεκριμένο TKI για θεραπεία πρώτης γραμμής(Εικ.39). Ωστόσο, σε πρόσφατη κλινική δοκιμή έχει αποδειχθεί ότι η δραστηριότητα του κεντρικού νευρικού συστήματος άλλων TKI που στοχεύουν



Εικόνα 39: Η θεραπεία του ROS
Σε ασθενείς με NSCLC, η κριζοτινίμη είναι το κύριο φάρμακο το οποίο στοχεύει την αναδιάταξη του ROS([Salgia, 2016](#)).

επίσης το ROS1 (σεριτινίμπη και εντρεκτινίμπη) είναι ανώτερη από την κριζοτινίμπη (Malapelle, et al, 2016). Άλλοι αναστολείς ALK / ROS1 μπορεί να αποδειχθούν αποτελεσματικοί ως επιλογείς δεύτερης γραμμής θεραπείας, παρόλο που οι μελέτες προφίλ αντοχής με βάση τα κύτταρα δείχνουν ότι οι ROS επιλεκτικοί αναστολείς διατηρούν την αποτελεσματικότητα έναντι του μεταλλάγματος ενώ οι διπλοί ROS1 / ALK αναστολείς είναι αναποτελεσματικοί. Για παράδειγμα, η λορλατινίμπη (PF-06463922) είναι ένας νέος διπλός ROS1 / ALK αναστολέας που αποκλείει τέτοιες μεταλλάξεις ανθεκτικές στην κριζοτινίμπη σε προκλινικές μελέτες (Salgia, 2016).

Κλινικές δοκιμές έχουν αναφέρει ότι ασθενείς με προχωρημένο NSCLC με αναδιάταξη του ROS1 έχουν επωφεληθεί από τη θεραπεία με κριζοτινίμπη, δείχνοντας ποσοστά απόκρισης έως και 80%. Οι τρέχουσες μελέτες φάσης I και II διερευνούν τη δραστηριότητα της κριζοτινίμης και της σεριτινίμης (αναστολέας ALK) στο NSCLC με αναδιάταξη του ROS1. Έτσι, ο έλεγχος ROS1 είναι απαραίτητος για τον εντοπισμό ασθενών που θα μπορούσαν να επωφεληθούν από τη θεραπεία με κριζοτινίμπη. Οι οδηγίες του National Comprehensive Network 2014 προτείνουν σε όλους τους ασθενείς με προχωρημένο τριπλό αρνητικό (EGFR, ALK και KRAS) πνευμονικό αδενοκαρκίνωμα να ελέγχονται για άλλους μοριακούς δείκτες, συμπεριλαμβανομένου του ROS1. Δεν υπάρχει μια τυποποιημένη gold standard μέθοδος, αλλά επί του παρόντος οι διαθέσιμες διαγνωστικές μέθοδοι περιλαμβάνουν FISH, RT-PCR και IHC. Η FISH είναι η μόνη μέθοδος που έχει εγκριθεί από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) και έχει χρησιμοποιηθεί σε κλινικές δοκιμές ως η τυπική μέθοδος επιβεβαίωσης της αναδιάταξης του ROS1 ωστόσο, είναι μια ακριβή και επίπονη τεχνική. Επειδή ο καρκίνος του πνεύμονα με αναδιάταξη του ROS1 είναι σπάνιος, η εκτίμηση της έκφρασης πρωτεΐνης ROS1 από την IHC μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο διαλογής για την ταυτοποίηση υποψηφίων κατάλληλων για θεραπεία στοχευμένη με ROS1. Στην πραγματικότητα, μελέτες έχουν διαπιστώσει ότι η ROS1 IHC (κλώνος D4D6) έχει υψηλή ευαισθησία (100%) και ειδικότητα (92% -97%) για τις αναδιατάξεις ROS1 σε σύγκριση με την FISH (Villalobos, et al, 2017).

Όπως και με το EGFR, οι δυνατότητες υγρών βιοψιών εδώ είναι τεράστιες. Ωστόσο, η καθημερινή κλινική χρήση υγρών βιοψιών για την ανίχνευση μεταλλάξεων ALK και ROS1 είναι προς το παρόν περιορισμένη (Mamdani, et al, 2017).

3.3.1.7. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ RET

Το RET πρωτο-ογκογόνο βρίσκεται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 10 στη θέση 11.2. Κωδικοποιεί έναν υποδοχέα τυροσίνης κινάσης για την οικογένεια των προσδεμάτων νευροτροφικού παράγοντα που προέρχεται από τη γλοιακή κυτταρική γραμμή και εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων, καθώς και στη νευρωνική πλοήγηση. Οι RET χρωμοσωμικές αναδιατάξεις περιγράφηκαν αρχικά στο θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς. Περίπου 1% έως 2% των NSCLC φιλοξενούν συντήξεις RET και πολλά μόρια σύντηξης, συμπεριλαμβανομένου του μέλους 5B της οικογένειας κινασών (KIF5B) (90%), της περιοχής “πηνίου” που περιέχει 6 (CCDC6), του ενεργοποιητή πυρηνικού υποδοχέα 4 (NCOA4) και του τριμερές μοτίβου 33 (TRIM33), έχουν περιγραφεί. Η αναδιάταξη του RET NSCLC εμφανίζεται συνήθως σε αδενοκαρκίνωμα με πιο φτωχά διαφοροποιημένα στερεά χαρακτηριστικά σε νέους που δεν καπνίζουν ποτέ, και είναι αμοιβαία αποκλειστική με γνωστά ογκογόνα “οδηγούς” (Villalobos, et al, 2017). Με τα χρόνια, έχουν αναπτυχθεί διάφοροι αναστολείς RET και αξιολογήθηκαν για τη θεραπεία των όγκων με αναδιάταξη της RET, συμπεριλαμβανομένων και των δύο αναστολέων πολυκινάσης, όπως

η καποζαντινίμνη και η βαντετανίμνη, και των εκλεκτικών αναστολέων, όπως η πραλσετινίμνη και η σελπερκατινίμνη. Οι αναστολείς πολυκινάσης έχουν δείξει μια μη ικανοποιητική κλινική αποτελεσματικότητα με διαφορετικά συμβάντα ανεπιθύμητων ενεργειών και έχουν χαμηλό συνολικό ποσοστό απόκρισης. Από την άλλη πλευρά, οι επιλεκτικοί αναστολείς έχουν αποδειχθεί περισσότερο αποτελεσματικοί με ένα καλύτερο προφίλ τοξικότητας. Πρόσφατα, η σελπερκατινίμνη έχει εγκριθεί από το Food and Drug Administration (FDA) για τη θεραπεία της RET-αναδιάταξης σε NSCLC ([Malapelle, et al, 2016](#)).

Μελέτες in vitro έδειξαν ότι οι συντήξεις RET οδηγούν σε ογκογονικό μετασχηματισμό, ο οποίος μπορεί να ανασταλεί από πολυαναστολείς κινάσης όπως η βαντετανίμνη, η σεραφενίμνη και η σουνιτινίμνη. Επιπλέον, οι προκαταρκτικές μελέτες με την καμποζαντινίμνη (αναστολέας MET και αναστολέας του υποδοχέα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα) σε αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα με αναδιάταξη RET είναι πολλά υποσχόμενες ([Villalobos, et al, 2017](#)). Μία δοκιμή φάσης II ([Drlon, et al, 2013](#)) του αναστολέα RET καμποζαντινίμνης σε ασθενείς με θετικό σε RET NSCLC έχει δείξει προκαταρκτική αποτελεσματικότητα. Πολλαπλές κλινικές δοκιμές σε NSCLC με KIF5B-RET αναδιατάξεις χρησιμοποιώντας υπάρχοντες αναστολείς RET (συμπεριλαμβανομένων των καμποζαντινίμνη, λενβατινίμνη, βαντετανίμνη, σουνιτινίμνη, πονατινίμνη και AU922) βρίσκονται σε εξέλιξη ([Salgia, 2016](#)).

Η FISH είναι επί του παρόντος η τυπική διαγνωστική δοκιμασία για την ανίχνευση των χρωμοσωμικών αναδιατάξεων RET. Η RT-PCR είναι συνήθως ανεπαρκής για την ανίχνευση νέων μορίων ή ισομορφών και η RET IHC έχει δείξει χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα για τις αναδιατάξεις RET. Τέλος, οι προσεγγίσεις αλληλουχίας, συμπεριλαμβανομένων των μεθοδολογιών NGS, χρησιμοποιούνται συχνά για την ανίχνευση μετατοπίσεων RET ([Villalobos, et al, 2017](#)).

3.3.1.8. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ BRAF

Το B-RAF πρωτο-ογκογόνο (BRAF) βρίσκεται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 7 στη θέση 34. Κωδικοποιεί μια κινάση σερίνης / θρεονίνης (κατασταλτική του KRAS ([Salgia, 2016](#))) η οποία εμπλέκεται στο RAS / RAF / MEK / ERK μονοπάτι σηματοδότησης. Όταν ενεργοποιείται από ογκογονικές μεταλλάξεις, το BRAF φωσφορυλιώνει MEK και προάγει την ανάπτυξη των κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση. Η υψηλότερη επίπτωση της μετάλλαξης BRAF είναι στο κακοήγη μελάνωμα (27% -70%), ακολουθούμενη από καρκίνο του θηλώδους θυρεοειδούς, καρκίνο του παχέος εντέρου και καρκίνο του ορού των ωοθηκών. Οι μεταλλάξεις BRAF έχουν επίσης αναφερθεί στο 1% έως 3% του NSCLC. Σε αντίθεση με το μελάνωμα, μόνο οι μισές μεταλλάξεις BRAF στο NSCLC είναι μεταλλάξεις V600E. Άλλες μεταλλάξεις εκτός των V600E που αναφέρονται στο NSCLC περιλαμβάνουν το G469A (~ 35%) και το D594G (~ 10%) ([Villalobos, et al, 2017](#)). Επιπλέον μεταλλάξεις συμβαίνουν στα εξόνια 11 και 15 ([Salgia, 2016](#)). Όλες οι μεταλλάξεις BRAF είναι αμοιβαία αποκλειστικές με άλλες μεταλλάξεις- “οδηγούς” όπως αυτές των EGFR, KRAS και ALK. Το μεταλλαγμένο με BRAF NSCLC έχει αναφερθεί ως επί το πλείστον σε αδενοκαρκίνωμα και σε αντίθεση με τους ασθενείς με μεταλλάξεις EGFR ή με αναδιατάξεις ALK που συνήθως δεν είναι ποτέ καπνιστές, οι ασθενείς με μεταλλάξεις BRAF είναι ως επί το πλείστον τρέχοντες ή πρώην καπνιστές. Ωστόσο, οι ασθενείς NSCLC με μεταλλάξεις BRAF V600E έχουν χειρότερη πρόγνωση και χαμηλότερη απόκριση στη χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα από τους ασθενείς με BRAF άγριου τύπου. Αυτοί οι ασθενείς επωφελήθηκαν από τη θεραπεία με αναστολείς BRAF και MEK. Οι αναστολείς του BRAF, όπως η βεμουραφενίμνη και η

νταμπραφενίμπη, έχουν υψηλή και επιλεκτική δραστικότητα έναντι της μεταλλαγμένης V600E BRAF κινάσης, με συνολικούς ρυθμούς απόκρισης από 33% έως 42%. Οι αναστολείς BRAF και MEK που στοχεύουν στη μετάλλαξη BRAF+ NSCLC, όπως η τραμετινίμπη, η σελουμετινίμπη και η ντασατινίμπη, μεταξύ άλλων, βρίσκονται επί του παρόντος υπό αξιολόγηση σε κλινικές δοκιμές ([Villalobos, et al, 2017](#)).

Η επίκτητη αντίσταση στους αναστολείς BRAF μπορεί να συμβεί μέσω του μονοπατιού επανενεργοποίησης MAPK λόγω σειράς γενετικών εκτροπών, συμπεριλαμβανομένου της BRAF V600E ενίσχυσης, του εναλλακτικού ματίσματος BRAF, της μετάλλαξης NRAS, της μετάλλαξης KRAS και της μετάλλαξης MEK1. Η συν-αναστολή των BRAF και MEK μπορεί να υπερνικήσει την αντίσταση, και ο συνδυασμός νταμπραφενίμπης και τραμετινίμπης παρέχει ποσοστό απόκρισης 68% σε BRAF-μεταλλαγμένο NSCLC, παρέχοντας τη βάση για FDA Breakthrough Therapy Designation (2015) για αυτό το συνδυαστικό σχήμα σε αυτήν την ένδειξη. Μεταλλάξεις PIK3CA έχουν επίσης εμπλακεί στην αντοχή στους αναστολείς BRAF και η διαγνωστική ανίχνευση αυτής της μετάλλαξης κατά τη διάρκεια της θεραπείας μπορεί να κατευθύνει αποφάσεις σχετικά με την επόμενη συνδυαστική θεραπεία PI3K αναστολέα ([Salgia, 2016](#)).

3.3.1.9. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ PI3Ks

Τα PI3Ks είναι ετεροδιμερείς λιπιδικές κινάσες αποτελούμενες από καταλυτικές και ρυθμιστικές υπομονάδες και αποτελούν μέρος αρκετών καθοδικών οδών που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των κυττάρων, στον μετασχηματισμό, στην προσκόλληση, στην απόπτωση, στην επιβίωση και στην κινητικότητα. Το γονίδιο PIK3CA βρίσκεται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 3 στη θέση 26.3. Κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα p110 άλφα των PI3Ks. Έχουν αναφερθεί ενισχύσεις, εξαλείψεις και μεταλλάξεις σωματικής απώλειας PIK3CA σε πολλούς όγκους, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του πνεύμονα. Στην πραγματικότητα, το PIK3CA είναι ένα από τα πιο συχνά μεταλλαγμένα ογκογόνα, μαζί με το KRAS, σε καρκίνους στον άνθρωπο. Οι μεταλλάξεις βρίσκονται στο 1% έως 4% των ασθενών με NSCLC, επηρεάζοντας συνήθως τα εξόνια 9 και 20 (80%). Αυτές οι μεταλλάξεις δεν αποκλείονται αμοιβαία με άλλες αλλοιώσεις “οδηγούς” και έχουν αναφερθεί συχνότερα στο καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων των πνευμόνων σε σύγκριση με το αδενοκαρκίνωμα (6,5% έναντι 1,5%). Ωστόσο, οι μεταλλάξεις PIK3CA δεν έχουν δείξει συσχέτιση με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά. Τα καρκινώματα των πλακωδών κυττάρων με προσθήκες PIK3CA δεν συνοδεύονται από άλλες γενετικές αλλοιώσεις, υποδηλώνοντας ότι αυτό το γονίδιο μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των καρκίνων των πλακωδών κυττάρων. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι μεταλλάξεις PIK3CA σε μεταλλαγμένο με EGFR καρκίνο του πνεύμονα προσδίδουν αντοχή σε EGFR TKIs και αποτελούν αρνητικό προγνωστικό παράγοντα σε ασθενείς με NSCLC που έλαβαν EGFR-TKIs. Οι μεταβολές του PI3KCA και οι κατασταλτικοί τελεστές τους, όπως η φωσφατάση και το ομόλογο τανσίνης (PTEN), mTOR και AKT, είναι πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι για τη θεραπεία με NSCLC και αξιολογούνται σε κλινικές δοκιμές για καρκίνο του πνεύμονα. Οι μεταβολές στο PI3KCA ανιχνεύονται χρησιμοποιώντας προσεγγίσεις προσδιορισμού αλληλουχίας, κυρίως προσδιορισμούς NGS ([Villalobos, et al, 2017](#)).

3.3.1.10. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ NTRK

Το νευροτροφικού υποδοχέα τυροσίνης κινάσης 1 (NTRK1) πρωτο-ογκογόνο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1q21-22 και κωδικοποιεί έναν υποδοχέα τυροσίνης κινάσης, επίσης γνωστή ως κινάση σχετιζόμενη με την τροπομοσίνη (TRK) A, που ανήκει στην TRK υπερικογένεια του

υποδοχέα της τυροσινικής κινάσης. Το NTRK1 εμπλέκεται στη ρύθμιση της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης των κυττάρων μέσω ενεργοποίησης διαφόρων οδών μεταγωγής σήματος συμπεριλαμβανομένων των MAPK, PI3K και φωσφολιπάσης C-γάμμα. Οι αναδιατάξεις NTRK1 έχουν βρεθεί στον καρκίνο του παχέος εντέρου, στον καρκίνο του θυρεοειδούς και στο πολύμορφο γλοιοβλάστωμα. Στον καρκίνο του πνεύμονα, έχουν αναφερθεί περίπου στο 3% των αδenoκαρκινωμάτων με συντήξεις NTRK1 και ορισμένα μόρια σύντηξης, συμπεριλαμβανομένων της πρωτεΐνης αλληλεπίδρασης μυσίνης φωσφατάσης RHO (MPPRIP) -NTRK1 και της CD74-NTRK1, έχουν επίσης αναφερθεί. Όλες αυτές οι συντήξεις έχουν ως αποτέλεσμα συστατική δραστηριότητα TRKA κινάσης, η οποία έχει αναφερθεί ότι είναι ογκογόνος. Σε πρώιμες μελέτες φάσης I, οι αναστολείς NTRK, όπως η εντρεκτινίμη και το LOXO-101, έχουν δείξει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους που φέρουν συντήξεις NTRK([Villalobos, et al, 2017](#)).

Ενισχύσεις του NTRK1 και NTRK2 (μεταξύ άλλων γονιδίων) κωδικοποιούν Src κινάσες που μπορούν να συμπληρώσουν την απώλεια δραστηριότητας EGFR σε πολλαπλά μοντέλα που εξαρτώνται από το EGFR, μέσω EGFR ανεξάρτητης ενεργοποίησης των μονοπατιών MEK-ERK και της φωσφοϊνοσιτίδης 3-κινάσης (PI3K) -AKT, υποδηλώνοντας μια σειρά κινασών ικανών να ξεπεράσουν την εξάρτηση από το EGFR. Έχει αναφερθεί σημαντική αντικαρκινική δράση για τον αναστολέα της κινάσης εντρεκτινίμης (RXDX-101) σε έναν ασθενή με NSCLC που φιλοξενεί ένα SQSTM1 (sequestosome 1). Πιο συγκεκριμένα, η αναδιάταξη γονιδίου NTRK1, που επικυρώνει τις γονιδιακές αναδιατάξεις NTRK, έχει αναφερθεί ως πιθανός κλινικός στόχος στο NSCLC([Salgia, 2016](#)). Οι όγκοι που φέρουν συντήξεις NTRK μπορούν να επωφεληθούν από θεραπεία TKI με την λαοτρεκτινίμη και την εντρεκτινίμη ([Malapelle, et al, 2016](#)).

3.3.1.11. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ FGFR

Το γονίδιο υποδοχέα αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (FGFR) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 8 στη θέση 12 και κωδικοποιεί έναν υποδοχέα τυροσινικής κινάσης που ανήκει στην οικογένεια FGFR. Η οικογένεια FGFR περιλαμβάνει 4 υποδοχείς τυροσίνης κινάσης (FGFRs 1-4). Όταν συμβαίνει σύνδεση συνδέτη-υποδοχέα, ο FGFR διμερίζεται και φωσφορυλιώνει το υπόστρωμα FGFR 2-άλφα (FRS2α), οδηγώντας σε ενεργοποίηση διαφορετικών οδών, συμπεριλαμβανομένων των οδών RAS / MAPK και PI3K / AKT / mTOR, προάγοντας την επιβίωση των κυττάρων, την κινητικότητα, την εισβολή και τον πολλαπλασιασμό. Στον καρκίνο, οι ενισχύσεις γονιδίων FGFR, οι μεταλλάξεις σωματικής απώλειας και οι χρωμοσωμικές μετατοπίσεις είναι οι συχνότεροι μηχανισμοί ενεργοποίησης. Ο FGFR έχει αναγνωριστεί ως ογκογόνος “οδηγός” σε όγκους μαστού, γαστρικού, ενδομητρίου, ουροθηλιακού και εγκεφάλου, μεταξύ άλλων. Στον καρκίνο του πνεύμονα, η συχνότητα ενίσχυσης του FGFR1 είναι σημαντικά υψηλότερη στο καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων (20%) σε σύγκριση με το αδenoκαρκίνωμα (3%) και είναι πιο συχνή στους τρέχοντες καπνιστές σε σύγκριση με τους πρώην και μη καπνιστές. Άλλα ειδικά κλινικά-δημογραφικά χαρακτηριστικά συσχετίζονται επίσης με την ενίσχυση FGFR1. Ορισμένες μελέτες έχουν αναγνωρίσει την ενίσχυση του FGFR ως ανεξάρτητο αρνητικό προγνωστικό παράγοντα σε ασθενείς με NSCLC, ενώ άλλες μελέτες έχουν δείξει το αντίθετο. Επιπλέον, οι ενισχύσεις FGFR μπορούν να βρεθούν σε συνδυασμό με άλλες γενετικές μεταβολές όγκων, συμπεριλαμβανομένων των μεταλλάξεων TP53 και PIK3CA και την ενίσχυση υποδοχέα A (PDGFRA) που προέρχεται από αιμοπετάλια. Οι σωματικές μεταλλάξεις FGFR στους όγκους των πνευμόνων εμφανίζονται συνήθως στους FGFR2 και FGFR3 και έχουν ανιχνευθεί στο 6% των καρκινωμάτων των πλακωδών κυττάρων των πνευμόνων. Πολλοί αναστολείς FGFR, όπως

η πονατινίμπη, ένας αναστολέας πολλαπλής στόχευσης κινάσης που εμφανίζει ισχυρή δραστηριότητα pan-anti-FGFR, βρίσκονται σε εξέλιξη, με πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα σε κυτταρικές σειρές και μοντέλα ξενομοσχεύματος. Επίσης, οι κλινικές δοκιμές φάσης I και II των αναστολέων FGFR (ντοβιτινίμπη, νιντετανίμπη, πονατινίμπη και AZD4547, μεταξύ άλλων) βρίσκονται σε εξέλιξη σε ασθενείς με NSCLC. Ο αριθμός αντιγράφου γονιδίου FGFR προσδιορίζεται συνήθως από την FISH. Ωστόσο, τα μέλη αυτής της οικογένειας αποτελούν συχνά μέρος των δοκιμαστικών πάνελ της NGS([Villalobos, et al, 2017](#)).

3.3.1.12. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ DDR2

Το γονίδιο τυροσινικής κινάσης υποδοχέα 2 περιοχής δισκοειδίνης (DDR2) βρίσκεται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 1 στη θέση 23.3 και κωδικοποιεί έναν υποδοχέα τυροσινικής κινάσης που εκφράζεται σε μεσεγχοματικούς ιστούς και ο οποίος συνδέει το ινώδες κολλαγόνο ως πρόσδεμα. Το DDR2 ενεργοποιεί σημαντικές οδούς σηματοδότησης που περιλαμβάνουν SRC, SRC ομολογία που περιέχει τομέα (SHC), Janus κινάση (JAK), ERK1 / 2 και PI3K και προωθεί τη μετανάστευση των κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση. Στον καρκίνο, μεταλλάξεις DDR2 έχουν αναφερθεί στο μελάνωμα, καθώς και στους καρκίνους της μήτρας, του στομάχου, της ουροδόχου κύστης και του παχέος εντέρου. Στον καρκίνο του πνεύμονα, οι μεταλλάξεις DDR2 εμφανίζονται στο 3% έως 4% των καρκινωμάτων των πλακωδών κυττάρων των πνευμόνων σε σύγκριση με το 0,5% των αδενοκαρκινωμάτων και εμφανίζονται μόνο σε καπνιστές. Δεν βρέθηκε άλλη σημαντική σχέση με την κλινικοπαθολογική κατάσταση. Έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον 11 διαφορετικές μεταλλάξεις DDR2 κατανεμημένες σε όλο το γονίδιο και περιλαμβάνουν τον τομέα εξωκυτταρικής δέσμωσης και τον τομέα κυτταροπλασματικής κινάσης. Οι μεταλλάξεις DDR2 έχουν συσχετιστεί με την απόκριση στην ντασατινίμπη (έναν αναστολέα πολλαπλών στόχων κινάσης) σε προκλινικά μοντέλα και σε κλινικές δοκιμές πρώιμης φάσης. Οι φάσεις II της κλινικής δοκιμής της ντασατινίμης σε ασθενείς με καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων των πνευμόνων βρίσκονται σε εξέλιξη([Villalobos, et al, 2017](#)).

3.3.1.13. ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ MEK1

Το MEK1 κωδικοποιεί μια κινάση σερίνης-θρεονίνης και μεταλλάσσεται σε περίπου 1% του NSCLC, σε μεγάλο βαθμό αδενοκαρκινώματος. Αρκετοί αναστολείς MEK βρίσκονται σε κλινική ανάπτυξη για NSCLC, συμπεριλαμβανομένων των σελομετινίμης (AZD6244) και της τραμετινίμης (GSK1120212), με επικέντρωση σε συνδυασμούς που μπορούν να αποτρέψουν ή να καταπολεμήσουν την αντίσταση λόγω δευτερεύουσας μετάλλαξης MEK και / ή ενίσχυσης KRAS / BRAF σε BRAF- ή KRAS μετάλλαξη σε NSCLC([Salgia, 2016](#)). Διπλοί MEK ERK αναστολείς εμφανίζουν πρόσθετα / συνεργιστικά αποτελέσματα και μπορούν να καθυστερήσουν την εμφάνιση, και ενδεχομένως να ξεπεραστεί η επίκτητη αντοχή στον αναστολέα MEK([Salgia, 2016](#)).

Η ενεργοποίηση της ενεργοποιημένης με μιτογόνο πρωτεϊνικής κινάσης (MEK) / εξωκυτταρικής οδού ρυθμιζόμενης σήματος κινάση (ERK) έχει παρατηρηθεί σε κυτταρικές σειρές που έχουν υποστεί αγωγή με EGFR TKIs, με αποτέλεσμα την αντίσταση στη μονοθεραπεία EGFR TKI. Σε ασθενείς που υποβάλλονται σε θεραπεία με EGFR TKI “τρίτης γενιάς”, η ενεργοποίηση MEK / ERK έχει επίσης περιγραφεί από διαφορετικούς μηχανισμούς. Οι συνδυασμοί EGFR “τρίτης γενιάς” TKI με MEK TKI διερευνώνται σε δοκιμές Φάσης I - για παράδειγμα με οσιμερτινίμπη και σελομετινίμπη (όπως δείχνουν τα δεδομένα in vitro σε ανασύσταση της εξάρτησης EGFR από την αναστολή MEK)([Heydt, et al, 2018](#)).

3.3.2. CTC

Καθώς η τεχνολογία των CTCs έχει εξελιχθεί ραγδαία κατά τη διάρκεια των τελευταίων χρόνων, έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες για αυτή την τεχνολογία έτσι ώστε να έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί στην παρακολούθηση της γονιδιωματικής εξέλιξης των όγκων με την πάροδο του χρόνου, καθώς και να μπορεί να έχει θεραπευτικές επιπτώσεις από την άποψη της ικανότητάς της να ανιχνεύει λειτουργικά γεγονότα ή ανθεκτικούς υποκλώνους ενώ αποφεύγεται η ανάγκη διεξαγωγής επαναλαμβανόμενων βιοψιών([Pérez-Callejo, et al, 2016](#)). Ωστόσο, αυτό δεν έχει ακόμη επιτευχθεί, αν και υπήρξαν αρκετές μελέτες που προσπάθησαν να καθορίσουν τις μετρήσεις CTC ως διαγνωστικό, προγνωστικό και προβλεπτικό εργαλείο σε ασθενείς με NSCLC([Pérez-Callejo, et al, 2016](#)).

Σε καρκίνο πρώιμου σταδίου NSCLC, το ποσοστό ανίχνευσης CTC είναι συνήθως χαμηλό, <30%. Οι [Ilie et al. \(Ilie, et al, 2014\)](#) χρησιμοποίησαν την ISET ως εργαλείο διαλογής σε πληθυσμούς υψηλού κινδύνου, καθώς έχει καλύτερη εξειδίκευση από την Cellsearch, η οποία χαρακτηρίζεται κυρίως από χαμηλή ευαισθησία και κακή ειδικότητα. Συγκεκριμένα, σε μια ομάδα 168 ασθενών με ΧΑΠ, εντοπίστηκαν CTC χρησιμοποιώντας ISET (RareCells, Paris, Γαλλία) σε πέντε εξ' αυτών που στη συνέχεια παρακολούθηθηκαν με ετήσια αξονική τομογραφία. Όλοι αυτοί οι ασθενείς ανέπτυξαν ένα οζίδιο πνεύμονα 1-4 χρόνια μετά, που αντιστοιχεί στο στάδιο Ia του NSCLC που θα μπορούσε να αντιμετωπιστεί χειρουργικά, ενώ κανένας από τους άλλους ασθενείς με ΧΑΠ ή ασθενείς ελέγχου δεν ανέπτυξε καρκίνο του πνεύμονα. Με βάση αυτά τα θετικά αποτελέσματα, ξεκίνησε η μεγάλη δοκιμή AIR. Σε αυτή την υποψήφια, πολυκεντρική μελέτη (21 κέντρα) συμμετείχαν 600 ασθενείς με ΧΑΠ. Πραγματοποιήθηκε ετήσιος έλεγχος με σαρώσεις CT χαμηλής δόσης και αιματολογική θεραπεία με ISET([Leroy, et al, 2017](#)). Τα αποτελέσματα δεν έχουν ακόμη δημοσιευτεί. Η ανίχνευση CTC μετά από ριζική θεραπεία (MRD) για την καθοδήγηση της ανοσοενισχυτικής θεραπείας ή την έγκαιρη ανίχνευση της υποτροπής είναι μια άλλη πιθανή εφαρμογή ([Guibert, et al, 2020](#)). Επίσης, σε μεταστατικούς ασθενείς με NSCLC, διάφορες μελέτες έχουν επανεξετάσει την προγνωστική σημασία των βασικών μετρήσεων των CTC, καταλήγοντας ότι είναι ένας ανεξάρτητος αρνητικός προγνωστικός παράγοντας που σχετίζεται με προχωρημένο στάδιο συντομότερης επιβίωσης χωρίς εξέλιξη(PFS) και συνολικής επιβίωσης(OS)([Pérez-Callejo, et al, 2016](#)). Σε μία μελέτη, στον ανιχνεύσιμο NSCLC, τα CTC ανιχνεύθηκαν στο 19% έως 39% των ασθενών με ανάλυση CellSearch και στο 36% έως 50% αντίστοιχα με τη μέθοδο ISET([Tanaka, et al, 2009/ Wong, 2012](#)). Σε προχωρημένο NSCLC, οι μετρήσεις CTC είναι γενικά υψηλότερες και οι μελέτες έχουν δείξει θετικότητα 32% έως 78% από την CellSearch και έως και 80% από την ISET([Krebs, et al, 2011/ Hofman, et al, 2011](#)). Ωστόσο, δεδομένα από διαφορετικά εργαστήρια έχουν δείξει επανειλημμένα περιορισμένη συνέπεια των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από τις προσεγγίσεις CellSearch και ISET. Τουλάχιστον 2 μελέτες που συγκρίνουν άμεσα αυτές τις προσεγγίσεις στην ίδια ομάδα ασθενών έχουν δείξει χαμηλά ποσοστά αντιστοιχίας([Wong, 2012](#)). Αυτές οι ασυνέπειες εξηγούνται πιθανώς από τις διαφορές στους υποπληθυσμούς των CTC που μετρώνται με κάθε τεχνική, τη χρήση διαφορετικών τύπων αντισωμάτων για τον εμπλουτισμό των CTC και τις εγγενείς διαφορές στις ευαισθησίες των δοκιμών. Παρά αυτές τις ασυνέπειες, αρκετές μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των CTC και της πρόγνωσης των ασθενών με προχωρημένο NSCLC([Mamdani, et al, 2017](#)). Επιπλέον, σε μία ακόμα μελέτη, μεταξύ 37 αξιόλογων δειγμάτων ασθενών με προηγμένο NSCLC, το 75,7% των ασθενών είχε θετικές βασικές μετρήσεις CTC (>1 CTCs / 7,5 mL) και μία ισχυρή συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των βασικών μετρήσεων CTC και των αποκρίσεων στη θεραπεία, όπως μετρήθηκε

από τα Response Evaluation Criteria in Solid Tumors(RECIST). Το πιο σημαντικό ήταν οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στις CTC μετρήσεις 56 ημέρες μετά τη θεραπεία, οι οποίες συσχετίστηκαν πολύ πιο έντονα με την επιβίωση από τις αλλαγές στις CTC μετρήσεις 14 ή 28 ημέρες μετά τη θεραπεία (τιμή p στις 56 ημέρες: 0,006 έναντι στις 14/28 ημέρες: 0,104)([Punnoose, et al, 2012](#)). Αυτά τα δεδομένα προτείνουν συσχέτιση μεταξύ των μειώσεων των μετρήσεων CTC μετά τη θεραπεία και του μεγαλύτερου PFS, κάτι που μπορεί να υποδεικνύει μια πρόωπη απόκριση στη θεραπεία. Παρόλο αυτά, μια άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 59 ασθενείς με προχωρημένο NSCLC έδειξε ότι οι μετρήσεις CTC συσχετίστηκαν ελάχιστα με την απόκριση στη θεραπεία, αν και ήταν ένας καλός δείκτης φτωχής πρόγνωσης και παρουσίας μακρινών μεταστάσεων([Zhou, et al, 2017](#)). Ειδικότερα, οι ασθενείς με CTC μετρήσεις πάνω από την τιμή αποκοπής των 2 CTCs / 7,5 mL είχαν σημαντικά κακή PFS και OS (μέση τιμή PFS: 6,2 μήνες έναντι 4,3 μήνες, μέση τιμή OS: 11,2 μήνες έναντι 8,3 μήνες). Ακόμα, οι μετρήσεις CTC 2 μήνες μετά τη θεραπεία ήταν καλά συσχετισμένες με την συνολική επιβίωση(τιμή p του OS κατά την έναρξη: 0,006 και 2 μήνες μετά: 0,008)([Zhou, et al, 2017](#)).

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 7, γενικά αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι οι μετρήσεις CTC μπορεί να είναι χρήσιμες ως προγνωστικοί δείκτες για ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του πνεύμονα, ακόμη και όταν το ποσοστό ανίχνευσης είναι σχετικά χαμηλό([Minji, et al, 2018](#)).

Πίνακας 7: Παραδείγματα μελετών πρόγνωσης των CTCs για ασθενείς με NSCLC([Minji, et al, 2018](#)).

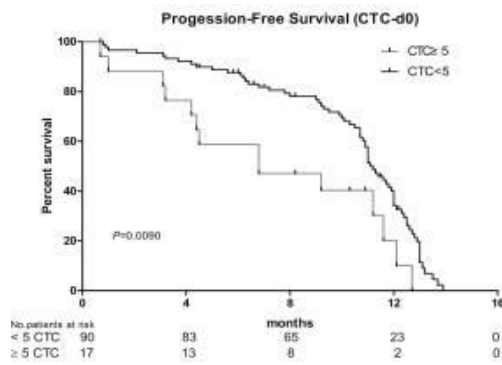
Methods	Therapeutics	Stage	# of Patients	Cut off (CTCs/7.5 mL)	Significance	Detection Rate
CellSearch	Platinum	III A-IV	101	5	PFS/OS ($p < 0.001$)	14.9%
	EGFR TKI	III B-IV	37 (41)	1	PFS ($p = 0.006$)	75.7%
	EGFR TKI	III A-IV	59	2	PFS/OS ($p = 0.01/p = 0.006$)	40.7%
	QT treatment	III B-IV	43	5	PFS/OS ($p = 0.034/p = 0.008$)	23.2%
	Platinum, EGFR TKI, ALK inhibitor	III B-IV	125	5	OS ($p = 0.022$)	19.2%
	Adjuvant chemotherapy	I-III A	27 (30)	1	DFS/OS ($p = 0.011/p = 0.037$)	22.2%
ISET	Neoadjuvant therapy	I-IV	208	50	DFS/OS ($p = 0.001/p = 0.002$)	30.8%
	Neoadjuvant therapy/Surgery	I-IV	210	1	DFS ($p < 0.0001$)	49.5%

Η ανίχνευση CTC σε ασθενείς με μεταστατική νόσο είναι πιο αποτελεσματική όταν χρησιμοποιούνται μέθοδοι που βασίζονται σε PCR (71%). Οι περισσότερες μελέτες έχουν αναφέρει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της ανίχνευσης των CTC περιφερικού αίματος και της συνολικής επιβίωσης. Μάλιστα, το 2005, εντοπίστηκαν για πρώτη φορά CTCs με την RT-PCR στην πνευμονική φλέβα ασθενών με NSCLC([Bernaudin, et al, 2005](#)). Έκτοτε, πολλές ακόμα μελέτες έχουν συγκρίνει το ποσοστό ανίχνευσης CTC στο περιφερικό αίμα με τα αγγεία κοντά στον όγκο([Buscail, et al, 2019](#)). Αξίζει να αναφερθούν πρόσφατα αναπτυχθείσες συσκευές που έχουν χρησιμοποιηθεί για μοριακή ανάλυση των CTC που απομονώνονται από ασθενείς με NSCLC, για να βελτιώσουν την απόδοση και την καθαρότητα της σύλληψης. Αυτές είναι: η ^{Hb}CTC-Chip, η οποία ανιχνεύει την μετάλλαξη T790M και παρακολουθεί την ανάπτυξη της αντίστασης στην θεραπεία EGFR TKI μέσω αλληλούχισης DNA, η “Nano Velcro” και η τεχνική ανάκτησης μεμονωμένων κυττάρων, οι οποίες μέσω αλληλούχισης Sanger, ανιχνεύουν τις μεταλλάξεις L858R και T790M, η MagSifter, η οποία εντοπίζει μέσω RT-PCR τις μεταλλάξεις

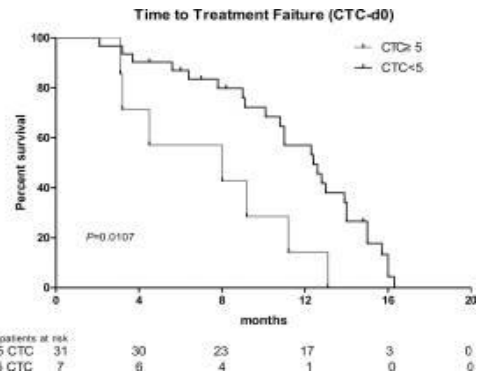
EGFR 19 del, L858R και T790M και τέλος η OncoBean Chip, η οποία χρησιμοποιώντας RT-PCR ανιχνεύει μεταλλάξεις EGFR και KRAS([Minji, et al, 2018](#)).

Στις μέρες μας, η κλινική σημασία των μετρήσεων CTC παραμένει αμφιλεγόμενη, αν και αρκετές έρευνες έχουν αποδείξει ([Minji, et al, 2018](#)) ότι ένας υψηλός αριθμός CTC πριν, κατά τη διάρκεια ή μετά τη χειρουργική επέμβαση συσχετίζεται με μια χειρότερη πρόγνωση και θα μπορούσε να επηρεάσει την απόφαση της επικουρικής θεραπείας ([Guibert, et al, 2020](#)). Σε μία μεγάλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε 326 ασθενείς με μεταστάσεις που συμμετείχαν σε μελέτες φάσης I αξιολογήθηκε το δυναμικό των πρώιμων αλλαγών CTC (Cellsearch) για να προβλεφθεί η απόκριση στη θεραπεία. Ωστόσο, η κινητική των CTC δεν συσχετίστηκε με την απόκριση σύμφωνα με τα RECIST. Η ευαισθησία και η ειδικότητα των ποικίλων μετρήσεων CTC για την πρόβλεψη απόκρισης ήταν μόνο 41% και 80%, αντίστοιχα([Massard, et al, 2017](#)). Η ακριβής ποσοτική παρακολούθηση μπορεί να είναι δύσκολη λόγω του πολύ χαμηλού αριθμού CTC που συνήθως εντοπίζονται και δεδομένου του μεγάλου δυναμικού του cfDNA για την παρακολούθηση του όγκου, τα CTC δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται για παρακολούθηση απόκρισης ([Guibert, et al, 2020](#)).

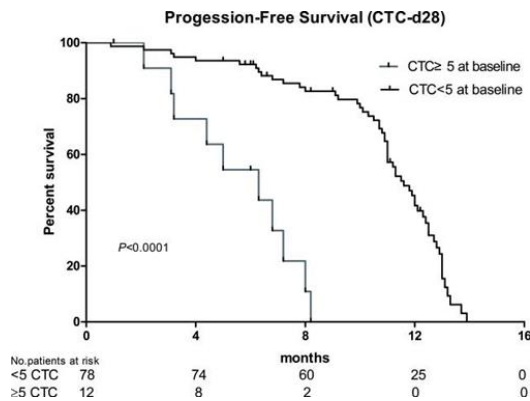
Προκειμένου να αναπτυχθεί μία μέθοδος ικανή να ανιχνεύσει μεγαλύτερο αριθμό CTC σε ασθενείς με NSCLC, οι Sharpenseel et al.([Sharpenseel, et al, 20019](#))αξιολόγησαν την έκφραση διαφορετικών επιφανειακών δεικτών (δηλ. EGFR και HER3). Αρκετές μελέτες απέδειξαν ότι αυτές οι πρωτεΐνες αυξορυθμίστηκαν σε μεταστατικό ιστό και σε CTC σε σύγκριση με το πρωτοπαθή όγκο([Sun, et al, 2009](#)). Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο συνδυασμός εμπλουτισμού EGFR / HER3 με την τεχνική CellSearch που βασίζεται σε EpCAM μπορεί να ανιχνεύσει σημαντικά υψηλότερο αριθμό CTC στο NSCLC σε ασθενείς με υψηλή βιοψία ([Sharpenseel, et al, 20019](#)). Όσον αφορά τον προγνωστικό ρόλο των CTC, οι Yang et al.([Yang, et al, 2017](#))απέδειξαν αυτή την συσχέτιση σε 107 ασθενείς με προχωρημένο NSCLC με κοινές μεταλλάξεις ενεργοποίησης EGFR. Πιο συγκεκριμένα, οι εγγεγραμμένοι ασθενείς έλαβαν πρώτης γραμμής θεραπεία είτε με ερλοτινίμπη(150 mg) είτε με γεφτινίμπη(250 mg). Κατά την έναρξη και την 28^η ημέρα θεραπείας, σειριακά δείγματα αίματος συλλέχθηκαν για ανίχνευση CTCs χρησιμοποιώντας CellSearch. Οι CTC μετρήσεις κατηγοριοποίησαν τους ασθενείς σε ευνοϊκές (<5 CTCs) και δυσμενείς (≥5 CTCs) ομάδες. Ασθενείς με το χαμηλότερο πλήθος CTC κατά την έναρξη και την 28^η ημέρα έδειξαν διάμεσο διάστημα PFS μεγαλύτερο από ασθενείς στην αρνητική ομάδα (11,1 έναντι 6,8 μηνών, $p = 0,009$ και 11,6 έναντι 6,3 μηνών, $p < 0,0001$, αντίστοιχα). Κατά την έναρξη, ο μέσος χρόνος έως τον χρόνο αποτυχίας της θεραπείας (TTF) ήταν επίσης σημαντικά μεγαλύτερος σε ασθενείς στην ευνοϊκή ομάδα σε σύγκριση με εκείνους στην δυσμενή ομάδα (12,4 έναντι 8,0 μηνών, $p = 0,0107$). Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά όσον αφορά το TTF μεταξύ των δύο ομάδων στην 28^η ημέρα (7,1 έναντι 10,6 μηνών, $p = 0,061$), όπως φαίνεται στις Εικόνες 40, 41, 42([Rijavec, et al, 2019](#)).



Εικόνα 40: Συσχέτιση μεταξύ CTC και PFS Κατά την έναρξη της θεραπείας (d-0), οι ασθενείς με το χαμηλότερο πλήθος CTC (CTC<5) έχουν μεγαλύτερο PFS από τους ασθενείς με CTC>5 (Yang, et al, 2017).



Εικόνα 41: Συσχέτιση μεταξύ CTC και TTF Κατά την έναρξη της θεραπείας (d-0), οι ασθενείς με το χαμηλότερο πλήθος CTC (CTC<5) έχουν μεγαλύτερο TTF από τους ασθενείς με CTC>5 (Yang, et al, 2017).



Εικόνα 42: Συσχέτιση μεταξύ CTC και PFS Κατά το τέλος της θεραπείας (d-28), οι ασθενείς με το χαμηλότερο πλήθος CTC (CTC<5) έχουν μεγαλύτερο PFS από τους ασθενείς με CTC>5 (Yang, et al, 2017).

Τέλος, μία άλλη πιθανή εφαρμογή των CTCs είναι η ανάλυση PD-L1, η οποία δεν μπορεί να διερευνηθεί στο cfDNA. Η υπόθεση ότι η έκφραση PD-L1 σε CTCs θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης απόκρισης σε ICIs δυστυχώς δεν έχει επιβεβαιωθεί μέχρι σήμερα. Μελέτες για την έκφραση PD-L1 σε CTCs σε ασθενείς με προχωρημένο NSCLC έχουν συσσωρευτεί και ενώ η σκοπιμότητα είναι πλέον καθιερωμένη, ο ρυθμός PD-L1⁺ CTCs έχει βρεθεί πάντα ότι είναι πολύ υψηλός και σχετίζεται με κακή πρόγνωση, χωρίς σαφή επιστημονική εξήγηση (Guibert, et al, 2020). Για παράδειγμα, σε μια μελέτη 24 ασθενών με στάδιο NSCLC σταδίου IV που έλαβαν θεραπεία με νιβολουμάμπη, αναλύθηκαν CTCs για έκφραση PDL1. Είναι ενδιαφέρον ότι οι ασθενείς με αρνητικά CTCs PDL1 είχαν όλοι ένα κλινικό όφελος, ενώ οι ασθενείς με θετικά CTCs PDL1 όλοι παρουσίασαν προοδευτική νόσο (Nicolazzo, et al, 2016). Μόνο οι Ilié et al. (Ilié, et al, 2018) μπόρεσαν να δείξουν καλή αντιστοιχία μεταξύ ιστού και CTC, αλλά το ποσοστό θετικών δειγμάτων ήταν εκπληκτικά

χαμηλό και η συσχέτιση με την απόκριση στους PD1 / PD-L1 αναστολείς δεν μπορούσε να διερευνηθεί. Η σχέση μεταξύ των CTC και των κυκλοφορούντων ανοσοκυττάρων (υγρό μικροπεριβάλλον) είναι εξαιρετικά περίπλοκη, καθιστώντας τα CTCs ένα ενδιαφέρον εργαλείο για τη μελέτη των μεταστάσεων και τους μηχανισμούς ανοσοδιαφυγής, αλλά φαίνεται να μην υιοθετούνται ως βιοδείκτες στην καθημερινή πρακτική για την ανοσοθεραπεία στον καρκίνο([Guibert, et al, 2020](#)).

Συνολικά, αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι ο αριθμός CTC μπορεί να είναι χρήσιμος ως προγνωστικός δείκτης σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και μπορεί να είναι χρήσιμος στη λήψη αποφάσεων για τη θεραπεία, ειδικά για την επιλογή αυτών των χειρουργικά απορριφθέντων ασθενών με υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής που μπορεί να επωφεληθούν από επικουρικές θεραπείες([Pérez-Callejo, et al, 2016](#)). Επιπλέον, η ανάλυση μετάλλαξης σε CTCs μπορεί να συμβάλει στον προσδιορισμό των μηχανισμών αντίστασης([Rijavec, et al, 2019](#)). Παρά όλες αυτές τις τεχνολογικές εξελίξεις, τα CTC ακόμα δεν χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κλινική πρακτική ή ως πηγή υλικού για ανάλυση βιοδεικτών σε προηγμένο NSCLC. Παρόλο που η FDA ενέκρινε την CellSearch ως μέθοδος ανίχνευσης των CTC σε μεταστατικό καρκίνο του μαστού, του προστάτη και του παχέος εντέρου, αυτή δεν έχει ακόμη εγκριθεί σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του πνεύμονα([Pérez-Callejo, et al, 2016](#)). Αρκετοί περιορισμοί όπως η έλλειψη επιθηλιακών βιοδεικτών που εμποδίζουν την ανίχνευση CTC, η έλλειψη επικύρωσης με μεγάλες πολυκεντρικές μελέτες για την αξιολόγηση της αναπαραγωγιμότητας, η ειδικότητα, η ευαισθησία και η έλλειψη κλινικής επικύρωσης σε διαφορετικές ομάδες ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα τονίζουν την ανάγκη επιπρόσθετης έρευνας στο προχωρημένο NSCLC έτσι ώστε τα CTC να εφαρμόζονται πλέον στην καθημερινή κλινική πρακτική([Pérez-Callejo, et al, 2016](#)).

3.3.2.1. ΜΕΤΑΜΛΑΞΕΙΣ EGFR

Η κατάσταση EGFR έχει εξεταστεί σε CTC από ασθενείς με προχωρημένο NSCLC, επιτρέποντας τον προσδιορισμό των ευαίσθητων μεταλλάξεων και της ανθεκτικής μετάλλαξης T790M. Χρησιμοποιώντας το σύστημα CellSearch σε συνδυασμό με αλληλουχία επόμενης γενιάς (NGS), οι Marchetti et al.([Marchetti, et al, 2014](#)) αναγνώρισαν για πρώτη φορά μεταλλάξεις EGFR σε CTCs του 84% θετικών στο EGFR ασθενών σε αντιστοιχισμένα δείγματα ιστού. Σε μια άλλη μελέτη([Breitenbuecher, et al, 2014](#)), μία νέα προσέγγιση βασισμένη στην ανάλυση της RT-PCR και της καμπύλης τήξης αναπτύχθηκε για την ανίχνευση ενεργοποιητικών μεταλλάξεων EGFR σε κλάσματα αιμοσφαιρίων εμπλουτισμένα σε CTCs. Χρησιμοποιώντας αυτήν την ανάλυση, τα θετικά σε EGFR CTCs ανιχνεύθηκαν σε αιματολογικά δείγματα προ της θεραπείας και από τους οκτώ ασθενείς με μεταλλάξεις EGFR στον καρκίνο του πνεύμονα που μελετήθηκε. Παρά τις καλές αρχικές αποκρίσεις, όλοι οι ασθενείς με NSCLC που μεταφέρουν μεταλλάξεις ευαισθητοποίησης EGFR τελικά αναπτύσσουν αντίσταση σε EGFR-TKIs. Ως γνωστόν, η T790M μετάλλαξη υπάρχει στο 40-60% των ασθενών με εξέλιξη της νόσου. Η ανάπτυξη των EGFR αναστολέων τρίτης γενιάς που είναι ικανοί να ξεπεράσουν την αντίσταση στην μετάλλαξη αυτή οδήγησε στην ανάγκη για μη επεμβατικό έλεγχο της T790M. Σε μια πρόσφατη μελέτη που συνέκρινε τις ιστικές βιοψίες με ταυτόχρονα συλλεγόμενα CTCs και ctDNA, η μετάλλαξη που σχετίζεται με την αντίσταση ανιχνεύθηκε στο 47% έως 50% των ασθενών αντίστοιχα, με αντιστοιχία που κυμαίνεται από 57% έως 74%([Sundaresan, et al, 2016](#)). Σε αυτούς τους ασθενείς όπου η βιοψία ήταν αρνητική ή ασαφής, οι προσδιορισμοί CTCs και ctDNA επέτρεψαν από κοινού τον γονότυπο στο 35% των περιπτώσεων ([Perez-Callejo, et al, 2016](#)).

Η ^{Hb}CTC-Chip έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της μετάλλαξης T790M σε ασθενείς με μεταλλαγμένο EGFR NSCLC και για την παρακολούθηση της ανάπτυξης αντοχής στην θεραπεία EGFR TKI. Σε μια μελέτη που περιελάμβανε 40 ασθενείς με προχωρημένο NSCLC, ήταν δυνατός ο γονότυπος για 28 δείγματα CTC (70%) και η T790M μπορούσε να ανιχνευθεί για 14 (50%) ασθενείς, η οποία συμφωνούσε στο 57% με τα αποτελέσματα της πρωτογενούς βιοψίας ιστού. Σε μια άλλη μελέτη που περιελάμβανε επτά ασθενείς με προσωρημένο NSCLC, 100% συμφωνία επιτεύχθηκε στην ανίχνευση της μετάλλαξης EGFR L858R από δείγματα CTCs και από δείγματα βιοψίας ιστού. Δύο από τους ασθενείς είχαν τη μετάλλαξη EGFR T790M σε υποτροπιάζοντα δείγματα ιστού, και αυτό επίσης ανιχνεύθηκε στα προερχόμενα από ασθενή δείγματα CTC. Επιπλέον, τα σπάνια CTC μπορούν να απομονωθούν με 100% καθαρότητα. Μία μικρο-ρευστή συσκευή δέσμευσης ενός κυττάρου εφαρμόστηκε στην ανίχνευση των μεταλλάξεων EGFR L858R και T790M σε CTCs που προέρχονται από ασθενείς με αλληλουχία Sanger. Συνολικά απομονώθηκαν 26 CTC από έξι στους επτά ασθενείς, τα οποία ήταν 100% σύμφωνα με τα αντίστοιχα δείγματα βιοψίας ιστού ([Rijavec, et al, 2019](#)).

Η εμφάνιση μεταλλάξεων που προσδίδουν αντίσταση στη χρήση αναστολέων τυροσινικής κινάσης προτρέπει ερευνητές να βρουν μεθόδους που θα μπορούσαν να ανιχνεύσουν και να παρακολουθήσουν γονιδιωματικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της θεραπείας κατά του EGFR. Το 2008, οι Maheswaran et al. ([Maheswaran, et al, 2008](#)) απομόνωσαν CTC από 27 ασθενείς με μεταστατικό NSCLC, ταυτοποίησαν την μετάλλαξη EGFR T790M σε 11/12 και σε 4/12 θετικούς ασθενείς EGFR σε CTCs και σε αντιστοιχισμένα ελεύθερα κυκλοφορούντα DNA(cfDNA), αντίστοιχα ($p = 0,009$). Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μοριακή ανάλυση των CTC θα μπορούσε να προσφέρει μια έγκυρη επιλογή για την παρακολούθηση των αναδυόμενων μεταλλάξεων. Πολύ πρόσφατα, μια μελέτη από τον Zhang και τους συναδέλφους του ([Zhang, et al, 2019](#)) έδειξε χαμηλό ποσοστό ανίχνευσης για μεταλλάξεις EGFR (16,7%) στο ενιαίο επίπεδο CTC, αν και η ευαισθησία αυξήθηκε στο 33,3% όταν η ανάλυση έγινε σε 10 CTC ανά δείγμα. Απαιτούνται έτσι πολλαπλά CTC για την ανίχνευση ευαίσθητων μεταλλάξεων EGFR ([Rijavec, et al, 2019](#)).

Η ανίχνευση μεταλλάξεων EGFR σε DNA που εξάγεται από CTCs και ο συμπληρωματικός ρόλος του cfDNA και CTCs για αντίσταση στην γονοτύπηση, όπως καταδεικνύεται σε αρκετές μελέτες (σε επίκτητη αντίσταση στο EGFR-TKI συγκεκριμένα), δημιούργησε έντονο ενδιαφέρον για τα CTCs στη γονιδιωματική που μειώθηκε με τη συσσώρευση εξαιρετικά ευαίσθητων, ειδικών και γρήγορων πλατφορμών γονοτύπωσης cfDNA. Ο γονότυπος CTC είναι λιγότερο ευαίσθητος και περισσότερο επίπονος και κατά συνέπεια πιθανώς λιγότερο κατάλληλος για να χρησιμοποιηθεί στην ρουτίνα ([Guibert, et al, 2020](#)).

3.3.3. MicroRNA (MiRNA)

Τα MicroRNAs (miRNAs ή miRs) είναι μια οικογένεια ενδογενών και μικρών γονιδιακών προϊόντων RNA (19 – 25 σε μήκος νουκλεοτιδίων) (Wu, et al, 2017). Έχουν σχολιαστεί πάνω από 50% ανθρώπινα γονίδια miRNA, τα οποία βρίσκονται εντός των καρκινικών σχετιζόμενων γονιδιωματικών περιοχών ή σε εύθραυστες περιοχές και ασκούν σημαντικές λειτουργίες παρόμοιες με τα ογκογόνα ή τους καταστολείς κακοήθων όγκων. Αυτά τα μικρά μόρια RNA μπορούν να ανακτηθούν αποτελεσματικά από (σταθερά ή αποψυγμένα) δείγματα όγκων ή βιολογικά υγρά και εμφανίζουν υψηλή σταθερότητα και ιστό ειδικότητα (Wu, et al, 2017). Τα MicroRNAs (miRNAs) είναι βασικοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης, ενεργώντας μέσω μεταφραστικής αναστολής ή υποβάθμισης των αγγελιοφόρων RNA (mRNA) στόχων. Η τροποποίηση στην έκφραση του miRNA έχει εμπλακεί στην παθογένεση των περισσότερων καρκίνων (Knight, et al, 2017). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι ο αριθμός των miRNAs έχει δυνητικούς ρόλους στη διάγνωση, στην σταδιοποίηση και στην πρόβλεψη των αποτελεσμάτων σε διάφορους τύπους καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του πνεύμονα (Wu, et al, 2017). Συγκεκριμένα, τα επίπεδα κυκλοφορούντων εξωσωμάτων και το περιεχόμενό τους (RNA και miRNAs) έχουν μελετηθεί για να διευκρινίσουν τον πιθανό ρόλο τους στην καθοδήγηση της διάγνωσης και την πρόβλεψη της πρόγνωσης ασθενών με αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα. Επιπλέον, η ομοιότητα που βρέθηκε μεταξύ του κυκλοφορούντος εξωσωμικού miRNA και των προερχόμενων από τον όγκο μορίων miRNA οδήγησε στο να προταθεί ότι το κυκλοφορούν εξωσωμικό miRNA μπορεί να είναι χρήσιμο ως εξέταση διαλογής για αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα (Wadowska, et al, 2020). Μέχρι τώρα, πολλά miRNAs έχουν επίσης αναγνωριστεί ότι συσχετίζονται με την μετάσταση λεμφαδένων του καρκίνου του πνεύμονα, όπως φαίνεται στον Πίνακα 8 (Wu, et al, 2017). Ακόμα, ορισμένες μελέτες αποκάλυψαν ότι τα κυκλοφορούντα miRNA παίζουν σημαντικό ρόλο και στη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα. Τα προφίλ έκφρασης των microRNAs στον καρκίνο του πνεύμονα είναι διαφορετικά σε σύγκριση με αυτά που είναι σε υγιή ιστούς και με αυτά σε άλλους τύπους καρκίνου. Αυτό καθιστά δυνατή τη δημιουργία προφίλ έκφρασης microRNA που θα είναι ειδικά για τον καρκίνο του πνεύμονα και θα επιβεβαιώσουν την ασθένεια (Wadowska, et al, 2020).

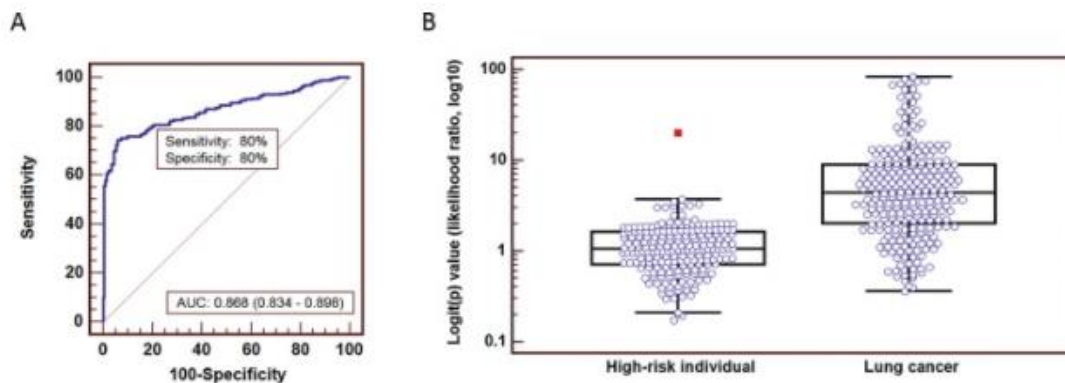
Πίνακας 8: Αντιπροσωπευτικά παραδείγματα miRNAs σε μεταστατικό και σε μη καρκινικό λεμφαδένα σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (Wu, et al, 2017).

miRNAs	Fold change (LN+ vs LN-)	P value
hsa-miR-375	59.917	0.013
hsa-miR-205	49.518	0.014
hsa-miR-200a	40.533	0.010
hsa-miR-183	39.393	0.010
hsa-miR-200b	38.828	0.008
hsa-miR-200b-star	29.311	0.019
hsa-miR-200c	15.411	0.005
hsa-miR-187	15.292	0.013
hsa-miR-224	14.627	0.002
hsa-miR-141	13.350	0.046

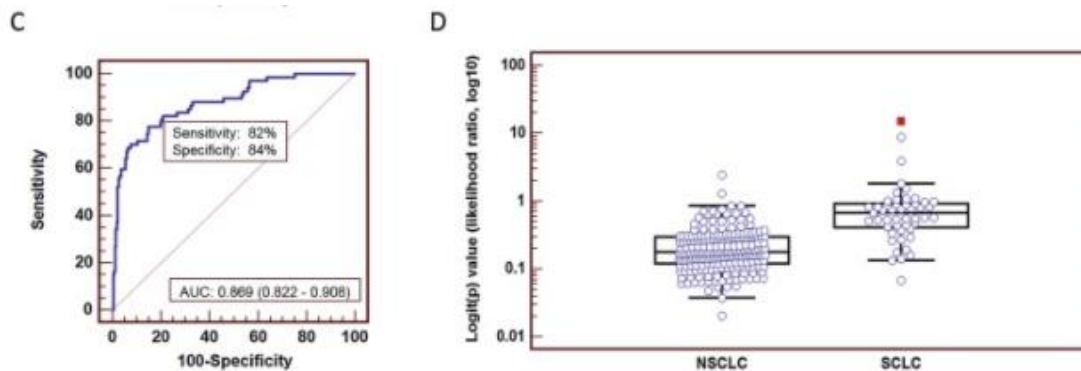
Έτσι, τα προφίλ των κυκλοφορικών miRNA είναι διαφορετικά για κάθε μικροπεριβάλλον του καρκίνου και για κάθε στάδιο εξέλιξης του όγκου. Η ανάλυση αυτών των προφίλ καθιστούν δυνατή την καλύτερη κατανόηση της αιτιοπαθογένεσης του όγκου και της προέλευσης του καρκίνου. Ακόμα, τα προφίλ της έκφρασης miRNAs είναι χρήσιμα στην περίπτωση καρκίνων με κακή διάγνωση και για μεταστάσεις με άγνωστη πρωτογενή προέλευση ([Wadowska, et al, 2020](#)).

Ένα παράδειγμα, let7 miRNA, είναι μη ρυθμιζόμενο στον ιστό του καρκίνου του πνεύμονα, αλλά όταν υπερεκφράζεται αναστέλλει την ανάπτυξη της κυτταρικής σειράς του καρκίνου του πνεύμονα ([Takamizawa, et al, 2004](#)). Αντίθετα, η υπερβολική έκφραση του miRNA-21 έχει αποδειχθεί και στις καρκινικές γραμμές αλλά και στους ιστούς των κυττάρων του πνεύμονα ([Liu, et al, 2013](#)). Μια άλλη μελέτη ανέφερε ένα μοντέλο βασισμένο σε microRNAs που προέρχονται από κυκλοφορούντα εξωσώματα ικανά να διακρίνουν μεταξύ του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα και του κοκκώματος ([Mamdani, et al, 2017](#)). Το 2018, μια ακόμα μελέτη που επικεντρώθηκε στον προσδιορισμό και την κατασκευή του πάνελ microRNA για τη διάγνωση καρκίνου του πνεύμονα ήταν η μελέτη των Lu et al. ([Lu, et al, 2018](#)). Οι ερευνητές κατασκεύασαν δύο πάνελ που αποτελούνταν από τα ακόλουθα microRNAs: μοντέλο A — miR-17, miR-190b, miR-19a, miR-19b, miR-26b και miR-375 και μοντέλο B — miR-17, miR-190b και miR-375. Το μοντέλο A κατασκευάστηκε προκειμένου να εκτιμηθεί ο κίνδυνος καρκίνου του πνεύμονα και χαρακτηρίστηκε από υψηλή ευαισθησία (81%) και ειδικότητα (80%). Και τα έξι microRNAs αποτελούσαν αποτελεσματικούς προγνωστικούς παράγοντες καρκίνου του πνεύμονα, με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στην ομάδα του καρκίνου του πνεύμονα παρά στην ασυμπτωματική ομάδα υψηλού κινδύνου. Το μοντέλο B κατασκευάστηκε για να εκτιμηθεί η πιθανότητα SCLC, με ευαισθησία 82% και ειδικότητα 84% (Εικ. 43, 44). Το 2019, οι Ulivi et al. ([Ulivi, et al, 2019](#)) επικεντρώθηκαν στο αρχικό στάδιο (IA-IIIa στην ταξινόμηση TNM) NSCLC για την ανάπτυξη ενός πάνελ microRNA (84miRNA) ως δυνητικού προγνωστικού βιοδείκτη σε ασθενείς που υποβάλλονται σε χειρουργική επέμβαση. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, πέντε microRNAs — miR-26a-5p, miR-126-3p, miR-130b-3p, miR-205-5p, και miR-21-5p - συσχετίστηκαν σημαντικά με την επιβίωση χωρίς νόσο (DFS) σε ασθενείς με SCC και τέσσερα από αυτά (miR-26a-5p, miR-126-3p, miR-130b-3p και miR-205-5p) συσχετίστηκαν επίσης με την συνολική επιβίωση (OS). Επιπλέον, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα, μόνο τα miR-222-3p, miR-22-3p και miR-93-5p συσχετίστηκαν σημαντικά με το DFS και το miR-196-3p συσχετίστηκε με την συνολική επιβίωση. Επιπροσθέτως, στην μελέτη αποδείχτηκε ότι το miR-126-3p έπαιξε έναν ανεξάρτητο προγνωστικό ρόλο που σχετίζεται με χαμηλότερο κίνδυνο υποτροπής ή θάνατο λόγω SCC. Ακόμα, προηγούμενες αναφορές έχουν δείξει ότι το miR-126 μπορεί να λειτουργήσει ως σημαντικός ρυθμιστικός παράγοντας για την ανάπτυξη του NSCLC. Τέλος, το 2019, οι Yan et al. ([Yan, et al, 2019](#)) διερεύνησαν την έκφραση και την κλινική σημασία των miRNA-99a και miRNA-224 στον ορό σε ασθενείς με NSCLC. Το επίπεδο έκφρασης του miR-99a ήταν αξιοσημείωτα χαμηλότερο στους ασθενείς με NSCLC παρά στην ομάδα ελέγχου, και συσχετίστηκε σημαντικά με το παθολογικό στάδιο, την παρουσία και απουσία μετάστασης λεμφαδένων, και την διαφοροποίηση του ιστού. Αντίθετα, η έκφραση του miR-224 ήταν σημαντικά υψηλότερη στους ασθενείς με NSCLC σε σύγκριση με τα υγιή άτομα, και αυτό

συσχετίστηκε επίσης με το παθολογικό στάδιο, την παρουσία και την απουσία μετάστασης των λεμφαδένων, και τον παθολογικό βαθμό ([Wadowska, et al, 2020](#)).



Εικόνα 43: Μοντέλο A (miR-17, miR-190b, miR-19a, miR-19b, miR-26b και miR-375) Όπως φαίνεται στο σχεδιάγραμμα A, το μοντέλο έχει υψηλή ευαισθησία (81%) και ειδικότητα (80%), ενώ στο σχεδιάγραμμα B, φαίνεται ότι ο κίνδυνος καρκίνου του πνεύμονα είναι πολύ μεγαλύτερος στην ομάδα με τον αντίστοιχο καρκίνο παρά στους ασυμπτωματικούς ασθενείς ([Lu, et al, 2018](#)).



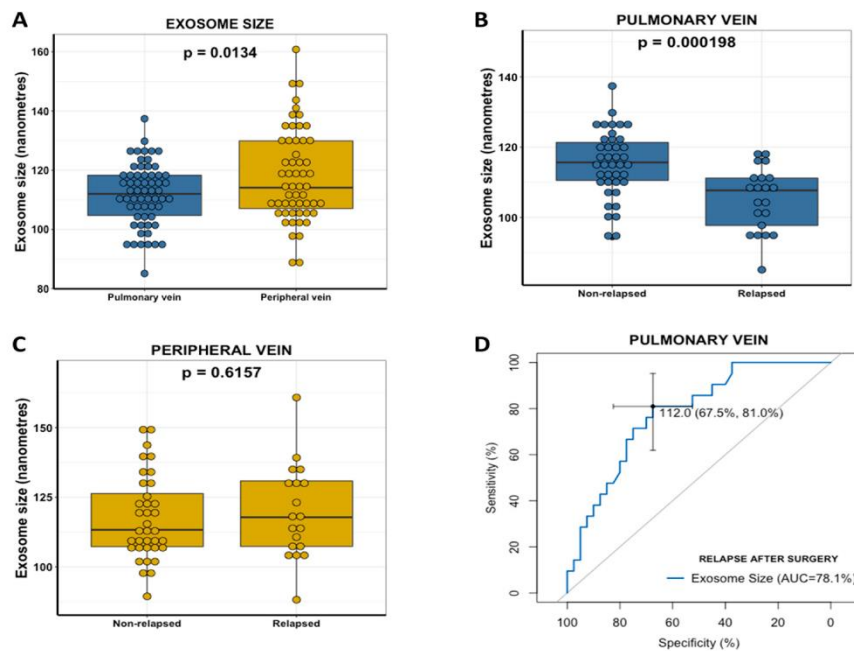
Εικόνα 44: μοντέλο B — miR-17, miR-190b και miR-375 Όπως φαίνεται στο σχεδιάγραμμα C, το μοντέλο έχει υψηλή ευαισθησία (82%) και ειδικότητα (84%), ενώ στο σχεδιάγραμμα D, φαίνεται η υψηλή διαγνωστική ακρίβεια κατά τη διάκριση του SCLC από τον NSCLC ([Lu, et al, 2018](#)).

Οι βασικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και την διερεύνηση της έκφρασης όλων αυτών των miRNA είναι η τεχνική στυπώματος Northern, η RT-PCR (αντίστροφη μεταγραφάση PCR) και οι μικροσυστοιχίες. Ειδικότερα, η RT-qPCR χρησιμοποιεί την τεχνική TaqMan, καθώς αυτή είναι το χρυσό πρότυπο στην ποσοτικοποίηση του miRNA ([Wadowska, et al, 2020](#)).

3.3.4. ΕΞΩΣΩΜΑΤΑ

Παρά την υπόστασή τους, τα εξωσώματα έχουν ενεργό ρόλο στη διαδικασία καρκινογένεσης, εξέλιξης και μετάστασης αρκετών όγκων, συμπεριλαμβανομένου του NSCLC, ο οποίος υλοποιείται μεταφέροντας το φορτίο τους. Για παράδειγμα, τα εξωσώματα μπορεί να προάγουν την αγγειογένεση με μεταφορά πρωτεϊνών όπως ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (FGF), ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), ο IL-6 και ο IL-8, και διεγείροντας αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω miRNAs ([Rijavec, et al, 2019](#)). Επίσης, περιέχουν υπερεκφραζόμενες ή μεταλλαγμένες πρωτεΐνες στην ίδια αναλογία με τους πρωτογενείς όγκους. Ως εκ τούτου, στην ιδιαίτερη περίπτωση εξωσωμάτων λαμβανόμενων από ασθενείς με NSCLC, EGFR, KRAS, claudins και άλλες πρωτεΐνες μπορούν

να αναλυθούν. Πρόσφατα, η αναδιάταξη ALK-EML4 έχει ταυτοποιηθεί μέσα στα εξωσώματα. Σε μία μελέτη, οι Al-Nedawi et al. (Al-Nedawi, et al, 2009) απέδειξαν ότι τα εξωσώματα που μεταφέρουν EGFR ήταν σε θέση να αλληλεπιδρούν με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενεργοποιώντας τα μονοπάτια MAPK και Akt, με αποτέλεσμα μια υπερέκφραση του VEGF και μια αύξηση της αγγείωσης του όγκου (Reclusa, et al, 2016). Σε μία πρόσφατη μελέτη (Navarro, et al, 2019), εξετάζοντας τα εξωσώματα που προέρχονται από πνευμονική φλέβα σε μια ομάδα 72 εκτομηθέντων NSCLC ασθενών, ο Navarro και οι συνάδελφοί του έδειξαν ότι το μέγεθος του εξωσώματος (cut-off: 112 nm) ήταν ικανό να διακρίνει ανάμεσα σε υποτροπιάζοντες ασθενείς με μεγαλύτερη ακρίβεια από τα κλινικά δεδομένα (εμπλοκή σταδίου και λεμφαδένων). Σε αυτήν την πολυπαραγοντική ανάλυση, το μέγεθος των εξωσωμάτων οδήγησε σε ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου τόσο για το χρόνο υποτροπής (HR: 6.66; 95% CI, 2,06-21,51; $p = 0,001$) όσο και για την συνολική επιβίωση (HR: 4,55, 95% CI, 1,43–14,49, $p = 0,010$), δηλαδή όσο μικρότερο ήταν το μέγεθος του εξωσώματος τόσο μικρότερος ήταν ο χρόνος υποτροπής (TTR) και η συνολική επιβίωση (OS) του ασθενούς (Εικ. 45) (Rijavec, et al, 2019). Επιπλέον, σε μία άλλη μελέτη, τα εξωσώματα θεωρήθηκαν κατάλληλα για την επιλεκτική και κατευθυνόμενη χορήγηση φαρμάκων σε ασθενείς με NSCLC (Reclusa, et al, 2016).



Εικόνα 45: Η σχέση μεταξύ εξωσωμικού μεγέθους και υποτροπής μετά από χειρουργική επέμβαση σε ασθενείς με NSCLC (A) Βοχplot που δείχνει την κατανομή του μεγέθους των εξωσωμάτων σε πνευμονική και περιφερική φλέβα σε ασθενείς με NSCLC (B) Βοχplot που δείχνει το εξωσωμικό μέγεθος της πνευμονικής φλέβας σε υποτροπιάζοντες και μη υποτροπιάζοντες ασθενείς με NSCLC (C) Βοχplot που δείχνει το εξωσωμικό μέγεθος της περιφερικής φλέβας σε υποτροπιάζοντες και μη υποτροπιάζοντες ασθενείς με NSCLC (D) Ανάλυση καμπύλης ROC των τιμών του εξωσωμικού μεγέθους της πνευμονικής φλέβας που προβλέπουν υποτροπή μετά από χειρουργική επέμβαση σε ασθενείς με NSCLC. Το όριο υποτροπής της νόσου μετά τη χειρουργική επέμβαση ορίστηκε στα 112 nm. Η περιοχή κάτω από την καμπύλη των 0,78 με τιμές εξωσωμικού μεγέθους πνευμονικής φλέβας <112 nm είχε ως αποτέλεσμα ευαισθησία 81% και ειδικότητα 67,5% (Navarro, et al, 2019).

Συμπερασματικά, προηγούμενες μελέτες δείχνουν ότι τα εξωσώματα είναι ιδανικά, καθώς είναι ένας από τους πιο πολλά υποσχόμενους δείκτες υγρής βιοψίας στον τομέα του

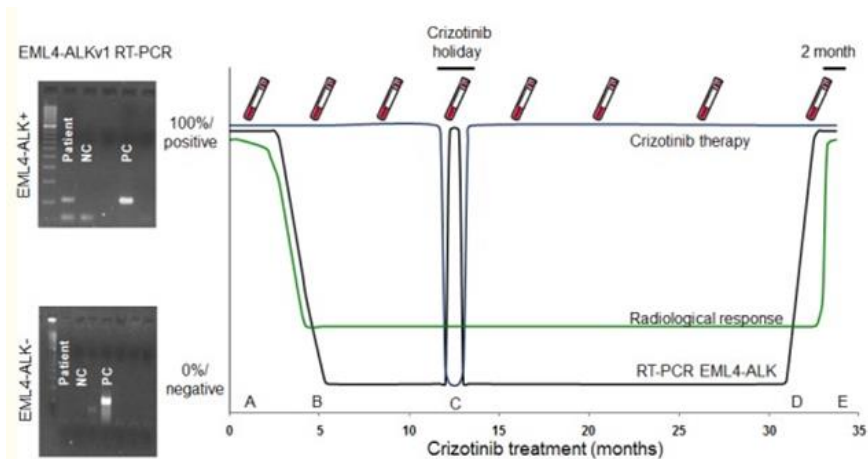
καρκίνου. Πράγματι, τα εξωσώματα είναι υψηλότερα σε ασθενείς με καρκίνο και το μέγεθός τους μπορεί, για παράδειγμα, να βοηθήσει τον κλινικό για την επιλογή ασθενών με δυσμενή αποτελέσματα. Τα εξωσώματα μπορούν να φέρουν μόρια που προέρχονται από όγκο (RNA και DNA), και εμφανίζονται ως πολλά υποσχόμενοι βιοδείκτες τόσο στη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα όσο και στην πρόγνωση. Ειδικότερα, η ανάλυση των εξωσωμικών νουκλεϊκών οξέων τους έδειξαν ότι είναι πιο ευαίσθητα στην αναγνώριση σχετικών μεταλλάξεων από αυτές του cfDNA. Ωστόσο, ορισμένα πιθανά μειονεκτήματα που συνδέονται με τη διαδικασία απομόνωσης μειώνουν τη δικιά τους χρησιμότητα σε κλινικό πλαίσιο. Επιπλέον, όπως έχει ήδη αναφερθεί στα κυκλοφορούντα miRNA, παρά το γεγονός ότι αρκετά εξωσωμικά miRNA έχουν προταθεί για έλεγχο καρκίνου του πνεύμονα, έχει γίνει ελάχιστη ή και καθόλου επικάλυψη σε όλες τις μελέτες, περιορίζοντας έντονα την κλινική τους χρησιμότητα ([Rijavec, et al, 2019](#)).

Έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές τεχνικές και βρίσκονται υπό ανάπτυξη για απομόνωση εξωσωμάτων, όπως MACS (Magnetic Activated Cell Sorting), απομόνωση που προκαλείται από ανοσοποιητικό σύστημα, μέθοδος βαθμίδωσης σακχαρόζης και υπερφυγοκέντρηση, όπως ήδη έχει αναφερθεί. Μόλις απομονωθούν, μπορούν να χρησιμοποιηθούν η Western Blot, η ποσοτική RT-PCR, η αλληλουχία νουκλεϊκών οξέων, η ELISA και άλλα κιτ που διατίθενται στο εμπόριο για τον χαρακτηρισμό του περιεχομένου RNA και των πρωτεϊνών των εξωσωμάτων. Καμία από αυτές τις τεχνικές δεν είναι επί του παρόντος σε κατάσταση για χρήση στην κλινική πρακτική. Ωστόσο, τα προκαταρκτικά αποτελέσματα είναι πολλά υποσχόμενα ([Mamdani, et al, 2017](#)).

3.3.5. ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

Στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, τα αιμοπετάλια σχετίζονται με την αντίσταση στη θεραπεία με TKI, καθώς μπορούν να μεταφέρουν αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες που προκαλούν παράκαμψη της σηματοδότησης EGFR, ενώ ταυτόχρονα ο αριθμός των αιμοπεταλίων είναι, από μόνος του, ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας επιβίωσης για ασθενείς που έχουν όγκους με μεταλλάξεις-EGFR και αντιμετωπίζονται με anti-EGFR TKIs ([Pasini, et al, 2019](#)). Επίσης, τα ίδια έχουν αξιολογηθεί ώστε να αναγνωρίζουν προγνωστικούς βιοδείκτες σε στοχευμένους παράγοντες ([Santarpia, et al, 2018](#)). Συγκεκριμένα, η ανάλυση των αιμοπεταλίων μπορεί να προβλέψει αντοχή στην κριζοτινίνη και στο PFS ασθενών με NSCLC με αναδιατάξεις EML4-ALK ([Pasini, et al, 2019](#)).

Πράγματι, οι Nilsson et al. ([Nilsson, et al, 2015](#)) ανέλυσαν τις αναδιατάξεις EML4-ALK με RT-PCR σε αιμοπετάλια και σε πλάσμα που απομονώθηκε από αίμα που ελήφθη από 77 ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, 38 από τους οποίους είχαν αναδιάταξη όγκων EML4-ALK (ευαισθησία 65% και 100% ειδικότητα). Στο υποσύνολο των 29 ασθενών που αντιμετωπίστηκαν με κριζοτινίνη, η επιβίωση χωρίς εξέλιξη ήταν 3,7 μήνες για ασθενείς με EML4-ALK+ αιμοπετάλια και 16 μήνες για ασθενείς με EML4-ALK- αιμοπετάλια (P = 0,02). Έτσι, τα TEP μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμα για την πρόβλεψη και την παρακολούθηση της έκβασης στην κριζοτινίνη, βελτιώνοντας τις κλινικές αποφάσεις που βασίζονται μόνο στην ακτινογραφική απεικόνιση. Επιπλέον, οι συγγραφείς ανέφεραν ότι η παρακολούθηση των αναδιατάξεων EML4-ALK στα αιμοπετάλια ενός ασθενούς για περίοδο 30 μηνών έδειξε αντίσταση στην κριζοτινίνη δύο μήνες πριν από την ακτινογραφική εξέλιξη της νόσου, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 46 ([Santarpia, et al, 2018](#)).



Εικόνα 46: Διαχρονική παρακολούθηση της απόκρισης της κριζοτινίμης σε έναν ασθενή Η κατάσταση των αιμοπεταλίων EML4-ALK επιβεβαιώθηκε (φαίνεται στα αριστερά) σε χρονικά σημεία που υποδεικνύονται από φιαλίδια που απεικονίζονται παραπάνω και ακτινολογική απόκριση αντιστοιχεί στα χρονικά σημεία που αντιπροσωπεύονται από τα γράμματα A-E. Κατά τη διάρκεια ανάπαυσης ενός μήνα από την κριζοτινίμη λόγω σκληροκοειδίτιδας, η EML4-ALK εμφανίστηκε ξανά στα αιμοπετάλια έως ότου ο ασθενής επέστρεψε στη αντίστοιχη θεραπεία. Η αναδιάταξη EML4-ALK ανιχνεύθηκε στα αιμοπετάλια δύο μήνες πριν από την ακτινογραφική εξέλιξη της νόσου ([Nilsson, et al, 2015](#)).

Επιπροσθέτως, σε μία έρευνα, ο Sheng και οι συνεργάτες του ανέλυσαν δεδομένα αλληλουχίας RNA των TEPs σε 402 ασθενείς με NSCLC και σε 231 δείγματα υγιών ατόμων. Οι συγγραφείς εντόπισαν 48 γονίδια που έχουν βασικό ρόλο στην ογκογένεση και στην εξέλιξη του καρκίνου που μπορεί να προβλέψει με ακρίβεια τον NSCLC, υποδηλώνοντας ότι τα TEPs μπορεί να είναι χρήσιμα για την πρώιμη ανίχνευση του NSCLC ([Sheng, et al, 2018](#)). Ακόμα, μία πρόσφατη μελέτη ([Best, et al, 2017](#)) έδειξε ότι οι αλγόριθμοι ενίσχυσης βελτιστοποίησης σωματιδίων-“σμήνων” επιτρέπουν την εύκολη επιλογή των γονιδιακών πάνελ από βιβλιοθήκες αλληλουχίας RNA αιμοπεταλίων, λαμβάνοντας μια ακριβή βασισμένη σε TEP ανίχνευση πρώιμου ή προχωρημένου σταδίου NSCLC ανεξάρτητα από το ιστορικό καπνίσματος, την ηλικία, τις συνθήκες φλεγμονής και τον χρόνο αποθήκευσης ολόκληρου του αίματος ([Rijavec, et al, 2019](#)). Ωστόσο, πιο ισχυρά δεδομένα, που πιθανόν προέρχονται από υποψήφιας, μελέτες περίπτωσης, απαιτούνται για τον περαιτέρω προσδιορισμό της διαγνωστικής αξίας RNA αιμοπεταλίων, μόνης ή συμπληρωματικής, με άλλους κυκλοφορούντες βιοδείκτες ή με τρέχων πρότυπες διαγνωστικές διαδικασίες ([Santarpia, et al, 2018](#)).

Εν κατακλείδι, αν και τα TEPs υπόσχονται ότι θα είναι πηγές υγρής βιοψίας, μεγάλες ποικίλες μελέτες και κλινικές δοκιμές είναι απαραίτητες στο μέλλον για να αποδείξουν την κλινική τους αξία ([Rijavec, et al, 2019](#)).

Ο Πίνακας 9 συνοψίζει τα πλεονεκτήματα και τις προκλήσεις της χρήσης των κυκλοφορούντων δεικτών στο NSCLC.

Πίνακας 9: Περίληψη των κύριων επισημάνσεων και προκλήσεων των κυκλοφορούντων δεικτών(Rijavec, et al, 2019).

	Source	Highlights	Challenges
CTCs	Peripheral blood	CTC number correlates with PFS and OS; Dynamic monitoring of molecular alterations during therapy; Assessment of tumor markers (e.g., PD-L1) at baseline and during therapy;	No FDA-approved technology for isolation; Rare events; Lack of reliable cut-off;
cfDNA ctDNA	Plasma, Serum, Cerebrospinal fluid, Pleural effusion, Ascites	Flexibility in processing (stable for up to 2 days in blood sample); No specific device required for isolation (benchtop centrifugation); cfDNA level correlates with PFS and OS; ctDNA reflects tumor heterogeneity; Dynamic monitoring of molecular alterations during therapy; Identification of novel targetable resistance mutations;	Lack of reliable cut-off; Contamination of germinal cfDNA; cfDNA level reflects changes in ctDNA and patient characteristics as well as medical conditions; Low portion of ctDNA in plasma; Not all gene mutations are expressed in ctDNA;
Ci-miRNAs	Plasma, Serum	More resistant to RNases than mRNA; No specific device required for isolation (benchtop centrifugation); Ci-miRNAs reflect the biology of the tumor; Ci-miRNAs can discriminate healthy individual from patients and early stage from advanced patients; Ci-miRNA expression correlates with tumor development, progression and metastases;	Lack of standardization (e.g., RNA isolation, quantification); High variability; Lack of large prospective studies;
Exosomes	Almost all body fluids	Stable sources of tumor-derived genetic material (e.g., DNA, RNA, miRNAs, and proteins); Exosome number is higher in patients than in healthy controls; Exosome size correlates with unfavorable outcome; Exo-miRNAs can discriminate healthy individual from patients and early stage from advanced patients; Exo-RNA and Exo-DNA have a higher sensitivity in detection of somatic mutations than plasma ctDNA;	Unreliable isolation procedures; Minimal overlap among exo-miRNA signatures; Lack of large prospective studies;
TEP	Peripheral blood	No specific device required for isolation (benchtop centrifugation); TEP-RNA reflects tumor transcriptome; TEP-RNA can discriminate healthy individual from patients and early stage from advanced patients;	Lack of large retrospective and prospective studies;

Abbreviations: CTC: circulating tumor cells; PFS: progression free survival; OS: overall survival; cfDNA: circulating cell-free DNA; ctDNA: circulating tumor DNA; ci-miRNA: circulating miRNA; Exo-DNA: Exosome DNA; Exo-RNA: Exosome RNA; TEP: tumor educated platelets.

3.3.6. TAAs και αυτοαντισώματα(TAAs)

Υπήρξαν πολλές μελέτες που αναζήτησαν αντισώματα που σχετίζονται με την παρουσία καρκίνου του πνεύμονα. Μεταξύ των πρώτων μελετών, αυτά που εντοπίστηκαν ήταν τα αντισώματα p53, τα οποία υπάρχουν περίπου στο 12% των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα (συμπεριλαμβανομένων των SCLC και NSCLC) (Knight, et al, 2017). Ωστόσο, λόγω της σπανιότητάς τους στην κυκλοφορία όταν προέρχονται από πρώιμο καρκίνο του πνεύμονα και ταυτόχρονα επειδή ένας ή πολλοί δείκτες ήταν δύσκολο να καλύψουν πλήρως τους διάφορους και ετερογενείς αντίστοιχους υπότυπους, συμβατικοί δείκτες TAAs, ανιχνεύσιμοι σε ορό, όπως το καρκινοεμβρυονικό αντιγόνο(CEA), το υδατανθρακικό αντιγόνο(CA) 125, το CA199, η ειδική για νευρώνες ενολάση(NSE), το θραύσμα κυτοκερατίνης 19 21-1 (Cyfra21-1) και το καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων (SCC), είναι δύσκολο να χρησιμοποιηθούν στην ανίχνευση πρώιμου καρκίνου του πνεύμονα λόγω κακής ευαισθησίας και ειδικότητας. Αντιθέτως, χρησιμοποιούνται πιο συχνά στη βοηθητική διάγνωση και στην αξιολόγηση της θεραπευτικής επίδρασης(Liang, et al, 2018).

Ωστόσο, τα TAAs στον ορό, αυτοαντισώματα έναντι υπερεκφρασμένων, μεταλλαγμένων, λανθασμένων ή αυθαίρετων κυτταρικών αντιγόνων, μπορεί να σχετίζονται με μοναδικά πλεονεκτήματα στην ταυτοποίηση ατόμων με πρώιμο καρκίνο του πνεύμονα. Αυτό έχει υποστηριχθεί θεωρητικά για λόγους, οι οποίοι περιλαμβάνουν πρώτον ότι η ανοσοεπιτήρηση εμφανίζεται στην πρώιμη φάση της καρκινικής διαδικασίας ανοσοεπεξεργασίας και συνεπώς αυτοαντισώματα μπορεί να είναι ανιχνεύσιμα σε πρώιμο στάδιο καρκίνου του πνεύμονα και δεύτερον ότι τα TAAs μπορεί να υπάρχουν σε υψηλούς τίτλους ακόμη και όταν η μάζα του όγκου είναι χαμηλή και είναι σταθερά στο αίμα(Liang, et al, 2018).

Πράγματι, οι υποσχόμενες δυνατότητές τους υπογραμμίστηκαν από την εμφάνιση αντισωμάτων p53 πριν από τον ακτινολογικά ανιχνεύσιμο καρκίνο του πνεύμονα. Από τότε

πολλά αντισώματα έχουν αναφερθεί ότι σχετίζονται με καρκίνο του πνεύμονα και έχουν συγχωνευτεί σε πάνελ για έγκαιρη ανίχνευση (Knight, et al, 2017). Για παράδειγμα, η ανίχνευση με χρήση του πάνελ 7-AABs, συμπεριλαμβανομένων των p53, GAGE7, PGP9.5, CAGE, MAGEA1, SOX2 και GBU4-5, ήταν η πρώτη εγκεκριμένη προσέγγιση υγρής βιοψίας από την China Food and Drug Administration (CFDA) για να βοηθήσει στη διάκριση των οζιδίων των πνευμόνων. Οι συγκεντρώσεις τους θα μπορούσαν να ποσοτικοποιηθούν με ενζυμική ανοσοπροσοφθητική δοκιμασία (ELISA), η οποία είναι σχετικά χαμηλού κόστους και είναι εύκολη στην εκτέλεση. Επομένως, η ανίχνευση που βασίστηκε σε αυτό το πάνελ AAB έδωσε υπόσχεση για ανίχνευση πρώιμου καρκίνου του πνεύμονα (Liang, et al, 2018).

Συνοψίζοντας, στον καρκίνο του πνεύμονα τα National Comprehensive Cancer Network (NCCN), Domestic Lung Cancer Clinical Guidelines, National Health and Family Planning Commission Diagnosis και τα Treatment Norms υποδηλώνουν ότι ορισμένες παραλλαγές γονιδίου “οδηγού”, συμπεριλαμβανομένης της μετάλλαξης των EGFR, KRAS, BRAF, της μετάλλαξης ή ενίσχυσης του HER2, των ALK, ROS1, NTRK και RET αναδιατάξεων και της ενίσχυσης του αριθμού αντιγράφων MET ή των μεταβλητών διατμητικών παραλλαγών στο MET του εξονίου 14 είναι τα βασικά μέρη των ιδιοστατικών γονιδίων. Στον Πίνακα 10, παρατίθεται το μοριακό τοπίο του καρκίνου του πνεύμονα με τις διαθέσιμες στοχευμένες θεραπείες. Τέλος, μελέτες έχουν αναφέρει ότι τα ψευδώς θετικά ποσοστά χαμηλής δόσης τομογραφίας υπολογιστή (LDCT) θα μπορούσαν να μειωθούν από 19,4% σε 3,7% με μια

Πίνακας 10: Το μοριακό τοπίο μη μικροκυτταρικού καρκινώματος του πνεύμονα (NSCLC) με τις διαθέσιμες επιλογές θεραπείας (Wadowska, et al, 2020).

Gene	Type of Genomic Aberrations	Frequency (%)	Currently Available Targeted Therapy *	Diagnostic Approaches
Adenocarcinomas (ADC)				
EGFR	EGFR-TKI sensitizing mutations: EGFR exon 21, EGFR exon 19, C719X, L861Q point mutations Copy number variations (gains)	30-40	pemetrized or bevacizumab therapy, afatinib, erlotinib, gefitinib, dacomitinib, osimertinib	PCR, sanger, real-time PCR, ddPCR, and NGS; IHC
KRAS	G12C mutation in KRAS gene	20-30	AMG-510	PCR, DNA sequencing
MET	MET exon 14 mutation (MET ex14), skipping mutations, overexpression, amplifications	2-5 3-4	skipping mutations—crizotinib, tepotinib; amplifications—crizotinib, capmatinib	mutations: sanger sequencing, NGS; amplifications: FISH, PCR, real-time PCR, NGS
ALK	ALK fusions	3-7	crizotinib, alectinib, ceritinib, brigatinib, lorlatinib	FISH (the gold standard); ALK-IHC has become a widely used technique with two validated antibodies in lung cancer (D5F3, 5A4)
BRAF	V600E mutation in BRAF gene; can co-exist with KRAS mutation	0.5-5	trametinib, dabrafenib	PCR, sanger, real-time PCR, and NGS
ROS1	ROS fusions	2-3	crizotinib	ROS1-IHC (screening) is still evolving (the use of the D1D6 rabbit monoclonal antibody) **; FISH; NGS
RET	RET rearrangements, gene fusion of KIF5B-RET; point mutations	1-2	vandetanib, cabozantinib, alectinib, BLU-667, LOXO-292	RT-PCR is typically combined with FISH; FISH; NGS
NTRK	NTRK rearrangements, gene fusions of NTRK1 (NTRKA), NTRK2 (NTRKB), NTRK3 (NTRKC)	1-2	entrectinib, larotrectinib, LOXO-195, napatrectinib	NGS with a panel that includes testing for NTRK1, NTRK2, NTRK3; IHC with subsequent confirmation by FISH or NGS
HER2 ***	mutations in the kinase domain (exon 20), the most frequent is p.A775_C776insYVMA Insertion amplifications, overexpressions	1-5 2-5	afatinib, dacomitinib, neratinib, trastuzumab, trastuzumab-emtansine, DS-8201a, poziotinib	mutations: PCR, sanger, real-time PCR and NGS; amplifications: FISH, NGS, real-time PCR
PTEN		1.7	NA	
PDGFRA		6-7	NA	
PIK3CA	mutations	5	NA	
TP53	copy number variations—gains	52	NA	****
ERBB2	losses	2-5	NA	
TERT		75	NA	
CDKN2A		7	NA	

επιπλέον διάγνωση που διεξήχθη χρησιμοποιώντας ένα πάνελ miRNA πλάσματος. Με βάση τις αλλαγές στο microRNA πλάσματος, ο καρκίνος του πνεύμονα θα μπορούσε να προβλεφθεί ακόμη και 24 μήνες νωρίτερα. Αυτό δείχνει ότι το πάνελ microRNA έχει προοπτική να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση καρκίνου του πνεύμονα σε πρώιμα στάδια. Για να αξιοποιηθούν οι δυνατότητες του microRNA, είναι απαραίτητο να τυποποιηθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός των κυκλοφορούντων microRNA και να διευκρινιστούν οι ατομικοί ή οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα κυκλοφορούντος microRNA ([Wadowska, et al, 2020](#)).

3.4. Ο ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ (SCLC)

Ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (small cell lung cancer-SCLC) αντιπροσωπεύει περίπου το 15% των διαγνώσεων όλων των καρκίνων του πνεύμονα ετησίως και έως και 25% των θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα. Το SCLC χαρακτηρίζεται από πιο επιθετικό κλινικό φαινότυπο από το NSCLC με εξέλιξη σε μεταστατική νόσο νωρίτερα στην πορεία της νόσου([Kapeleris, et al, 2018](#)).

Η ευρεία κλινική εφαρμογή υγρών βιοψιών στη θεραπεία ασθενών με SCLC είναι ένας ρεαλιστικός στόχος. Ο άμεσος στόχος είναι να αξιολογηθούν τα πιθανά οφέλη για τους ασθενείς με SCLC σε μελέτες με προοπτική όπου η μοριακή ανάλυση περιλαμβάνεται στη φροντίδα των ασθενών. Περαιτέρω συνδέσεις μεταξύ των χαρακτηριστικών γονιδιωματικών αλλαγών στο SCLC και πρόσθετων παθογόνων μεταλλάξεων που έχουν αναγνωριστεί πρέπει να καταγράφονται προσεκτικά για να εντοπίζονται μοριακά μοτίβα που μπορεί να αποδειχθούν ιδιαίτερα επιρρεπή σε νέες θεραπείες([Almodovar, et al, 2017](#)).

3.4.1. cfDNA-ctDNA

Αποτελέσματα μελετών επιβεβαιώνουν ότι το cfDNA που σχετίζεται με το SCLC είναι ανιχνεύσιμο στο περιφερικό αίμα σε πάνω από το 80% των ασθενών που χρησιμοποιούν το προσαρμοσμένο SCLC ειδικό γονιδιακό πάνελ. Τα μοναδικά διαχρονικά δεδομένα που παρέχονται από αναλύσεις θέτουν το στάδιο για μελλοντικές μελέτες του περιφερικού αίματος cfDNA ως πρώιμος προγνωστικός παράγοντας της εξέλιξης της νόσου σε ασθενείς με SCLC. Επιπλέον, αποδεικνύεται ότι η παρακολούθηση cfDNA σε ασθενείς με SCLC έχει τη δυνατότητα να είναι ένα χρήσιμο κλινικό εργαλείο. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι η παρακολούθηση της αφθονίας μετάλλαξης cfDNA μπορεί να ανιχνεύσει την υποτροπή της νόσου και την απόκρυφη νόσο που δεν είναι εμφανής με ακτινογραφική απεικόνιση. Ακόμα, μελέτες αποδεικνύουν ότι οι ποσοτικές αλλαγές στα επίπεδα cfDNA συσχετίζονται με αποκρίσεις στη θεραπεία και με την αποτελεσματικότητα αυτής([Almodovar, et al, 2017](#)).

Σε μία μελέτη([Devarakonda, et al, 2019](#)) εξετάστηκαν τα προφίλ ctDNA σχεδόν 600 ασθενών με SCLC, καθιστώντας αυτήν τη μεγαλύτερη μελέτη για την εξέταση των γονιδιωματικών χαρακτηριστικών του SCLC μέχρι σήμερα, είτε στον ιστό είτε στο πλάσμα. Αυτό το μεγάλο μέγεθος δείγματος επέτρεψε να γίνουν αρκετές σημαντικές παρατηρήσεις και να διερευνηθεί η χρησιμότητα του ctDNA στον εντοπισμό δυνητικά στοχευόμενων μεταλλάξεων στο SCLC. Ο ρόλος της σηματοδότησης RTK / RAS στο SCLC είναι αμφιλεγόμενος. Παρατηρήθηκε γνωστό σηματοδοτικό μονοπάτι RTK / RAS μεταλλάξεων ενεργοποίησης σχεδόν στο 18% των ασθενών, συμπεριλαμβανομένων θεραπευτικά στοχευόμενων τροποποιήσεων σε EGFR, BRAF, ERBB2 και MET. Ενώ είναι πιθανό αυτά τα ευρήματα να είναι συνέπεια της εσφαλμένης ταξινόμησης NSCLC ή καρκίνων νευροενδοκρινών μεγάλων κυττάρων ως SCLC, η παρουσία μικτών ιστολογικών όγκων ή η ταυτοποίηση αιματοποιητικών

παραλλαγών από τον έλεγχο του ctDNA, οι μεταβολές στα γονίδια μονοπατιών RAS και / ή ενεργοποίηση μονοπατιού στο SCLC έχουν προηγουμένως αναφερθεί. Η ικανότητα στόχευσης RAS σηματοδότησης έχει αναφερθεί σε SCLC με συνδυαστικές θεραπείες. Παρατηρήθηκαν επίσης ενισχύσεις σε ERBB2 και MET στο 12% των δειγμάτων. Αν και δεν υπάρχουν δεδομένα σε SCLC, μελέτες έχουν αναφέρει όφελος από τη στόχευση αυτών των αλλοιώσεων σε άλλους συμπαγείς όγκους(Devarakonda, et al, 2019) Επιπλέον, οι κανονικές μεταλλάξεις σε ασθενείς με SCLC είναι μεταβολές στα TP53 και RB1. Σε μελέτες όγκου ιστών κυρίως από ασθενείς με LS-SCLC πριν από τη χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής, οι μεταλλάξεις TP53 ταυτοποιήθηκαν στο 80-95% των ασθενών και οι μεταλλάξεις RB1 ταυτοποιήθηκαν στο 35-70% των ασθενών(Almodovar, et al, 2017)(Πίνακας 11).

Πίνακας 11: Οι συχνότερες γονιδιακές μεταλλάξεις στο SCC με την αντίστοιχη συχνότητα και τις διαθέσιμες θεραπείες(Wadowska, et al, 2020).

Gene	Type of Genomic Aberrations	Frequency [%]	Currently Available Targeted Therapy
Squamous cell carcinoma (SCC)			
	gene fusion of FGFR3-TACC3, mutations of FGFR1, FGFR2		
FGFR	tumor suppressor mutations, copy number variations	23	NA
TP53	(gains)	79	NA
NF1	mutations of NF1	10	NA
DDR2	point mutations of DDR2	2-3	NA
PDGFRA	amplification	4	NA
PIK3CA	amplification	15	NA
PTEN	tumor suppressor mutations, copy number variations	10	NA
SOX2	(losses)	8	NA
CDKN2A	amplification and copy number variation (gain)	65	NA
	copy number variation (loss)	15	

Η δημιουργία προφίλ ctDNA υπόσχεται εξέταση μηχανισμών ανοχής στη θεραπεία και καθοδήγηση κλινικής φροντίδας στο SCLC διευκολύνοντας την ταχεία αναγνώριση πιθανών στοχευόμενων αλλαγών. Περαιτέρω μελέτες ctDNA σε ασθενείς με SCLC μπορεί να βοηθήσουν στην επιτάχυνση της ανακάλυψης και της ανάπτυξης νέων φαρμάκων κατά αυτής της αδυσώπητης νόσου(Devarakonda, et al, 2019).

3.4.2. CTC

Η παρουσία και η κλινική σημασία των CTC έχει ήδη αποδειχθεί σε πολλούς τύπους κακοήθειας, μεταξύ των οποίων είναι ο καρκίνος του μαστού, του παχέος εντέρου, του προστάτη και του πνεύμονα. Σε αντίθεση με τους περισσότερους άλλους τύπους καρκίνου, ο SCLC χαρακτηρίζεται από μεγάλο αριθμό CTC στην κυκλοφορία. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει την προγνωστική αξία των μετρήσεων CTC στο SCLC, οι περισσότερες από τις οποίες χρησιμοποιούν την εγκεκριμένη από το US Food and Drug Administration (FDA) μέθοδο CellSearch. Εκτός από τον αριθμό των CTC που βρέθηκαν, ο μοριακός χαρακτηρισμός τους μπορεί να αποτελεί μέρος μιας πιο ολοκληρωμένης προσέγγισης που παρέχει περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με, π.χ., την μειορύθμιση των επιθηλιακών δεικτών ή την παρουσία φαρμακευτικών στόχων. Πρόσφατα, αποδείχτηκε ότι η επεξεργασία δειγμάτων αίματος χρησιμοποιώντας την τεχνολογία μικρορευστού Parsortix βελτίωσε σημαντικά τη μοριακή

ανάλυση των εμπλουτισμένων CTCs. Λαμβάνοντας υπόψη την αφθονία των CTC και την ευκολία λήψης/εκτέλεσης υγρών βιοψιών επεκτείνονται οι δυνατότητες διαλογικής διάγνωσης και διαστρωμάτωσης των ασθενών. Για αυτούς τους λόγους πιστεύεται ότι ο μοριακός χαρακτηρισμός των CTCs στο SCLC μπορεί να είναι ύψιστης σημασίας για αυτόν τον τύπο καρκίνου του πνεύμονα ([Obermayr, et al, 2019](#)).

Επίσης, τα CTCs έχουν εντοπιστεί και σχετίζονται με κακή πρόγνωση σε ένα εύρος καρκινικών υπότυπων. Έχουν καθιερωθεί πολυάριθμες μέθοδοι εμπλουτισμού και απαρίθμησης αυτών των σχετικά σπάνιων κυττάρων από φλεβικό αίμα, επιτρέποντας την εξερεύνηση της κλινικής σημασίας και της συνάφειάς τους ως βιοδείκτη όγκου. Συγκεκριμένα, οι Kularatne et al. ([Kularatne, et al, 2002](#)) χρησιμοποίησαν κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση CTC σε ασθενείς με SCLC το 2002. Από την ανακάλυψη αυτή τόσο οι εξαρτώμενες όσο και οι ανεξάρτητες από επίτοπο μέθοδοι εμπλουτισμού έχουν ανιχνεύσει μια αφθονία CTC σε ασθενείς με SCLC, σε σύγκριση με άλλους τύπους όγκων. Το 70-95% των ασθενών με SCLC έχουν ανιχνεύσιμα CTC. Ωστόσο, ο υψηλός αριθμός CTC σχετίζεται με κακή συνολική επιβίωση και επιβίωση χωρίς εξέλιξη (PFS) σε ένα διαφορετικό εύρος καρκίνων. Ανεξάρτητα από την τεχνική απαρίθμησης και τις στατιστικές μεθόδους που εφαρμόστηκαν, ο βασικός αριθμός CTC προ της θεραπείας συσχετίζεται σταθερά με την συνολική επιβίωση. Αν και ο βασικός αριθμός CTC είναι αποδεδειγμένος προγνωστικός βιοδείκτης για OS και PFS, ο βασικός αριθμός CTC δεν προβλέπει απόκριση. Ωστόσο, μια αλλαγή στον αριθμό CTC κατά τη διάρκεια της θεραπείας κατά το χρόνο της εξέλιξης μπορεί να παρέχει προγνωστική σημασία. Συνολικά, αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι ο αριθμός CTC είναι παράγοντας διαστρωμάτωσης σε κλινικές δοκιμές για ασθενείς με SCLC. Αρκετές κλινικές δοκιμές που διεξήχθησαν σε ασθενείς με SCLC έχουν πλέον ενσωματώσει την CTC απαρίθμηση ως διερευνητικό βιοδείκτη για την πρόβλεψη της απόκρισης ή της αντίστασης στη θεραπεία. Μια πολλά υποσχόμενη χρησιμότητα της καταμέτρησης CTC σε δοκιμές πρώιμης φάσης είναι η σειριακή παρακολούθηση ως υποκατάστατο της απόκρισης. Η κλινική χρησιμότητα των CTC σε SCLC περιορισμένου σταδίου δεν έχει ακόμη διερευνηθεί πλήρως ([Foy, et al, 2017](#)).

Τέλος, η παρακολούθηση των CTCs μπορεί να βοηθήσει στον εντοπισμό της πρώιμης υποτροπής και της αντίστασης στη θεραπεία παρέχοντας ευκαιρία για θεραπευτική αλλαγή στο στενό παράθυρο ευκαιριών πριν από τη συμπτωματική μείωση. Η απαρίθμηση CTC θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί ως φαρμακοδυναμικός βιοδείκτης στην ανάπτυξη φαρμάκων και να καθοδηγήσει τη βέλτιστη θεραπευτική δοσολογία που φέρνει επανάσταση στην τρέχουσα, σχετικά ακατέργαστη μέθοδο, της μέγιστης ανεκτής δόσης. Πιθανώς οι πιο σημαντικές εξελίξεις θα προκύψουν από τον μοριακό χαρακτηρισμό των CTCs ([Foy, et al, 2017](#)).

Παρά τα πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα, τα ευρήματα πρέπει να επικυρωθούν σε μεγαλύτερες μελέτες ασθενών με SCLC. Συμπερασματικά, η μοριακή ανάλυση των CTCs μπορεί να προσθέσει σχετικές πληροφορίες σε παραδοσιακές βιοψίες ιστών ή σε κυτταρολογικά δείγματα σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα μικρών κυττάρων, ειδικά στην επιλογή της θεραπείας και στην παρακολούθηση των ασθενών ([Obermayr, et al, 2019](#)), ενώ ταυτόχρονα μπορεί να παρέχει μια “υγρή βιοψία” που επιτρέπει την επανειλημμένη εξέταση των χαρακτηριστικών του όγκου και προσφέρει άνευ προηγουμένου δυνατότητα να προσαρμόσει μια πραγματικά δυναμική εξατομικευμένη ιατρική προσέγγιση ([Foy, et al, 2017](#)).

Έτσι, τα τελευταία χρόνια, η πρόοδος των μοριακών στρατηγικών και των αναλυτικών πλατφορμών, συμπεριλαμβανομένων γονιδιωματική, επιγονιδιωματική και πρωτεωμική, έχει παρατηρηθεί επιτρέποντας την ανάλυση των γονιδιωματικών αλλαγών που παίζουν βασικό ρόλο στην παθογένεση και στην εξέλιξη του καρκίνου του πνεύμονα. Η έρευνα του γονιδιωματικού καρκίνου ξεκλειδώνει δυνατότητες για την κατανόηση σωματικών τροποποιήσεων στον καρκίνο που μπορεί να χρησιμοποιούνται ως εργαλείο πρόληψης, έγκαιρης διάγνωσης, νέων θεραπειών και παρακολούθησης της αντίστασης. Ως εκ τούτου, οι γονιδιωματικοί έλεγχοι μπορούν να βοηθήσουν στον εντοπισμό των γονιδιωματικών αλλαγών ως δυνητικών βιοδεικτών καρκίνου του πνεύμονα. Ωστόσο, το ευρύ φάσμα των γονιδιωματικών αλλαγών και η έλλειψη καθολικής τεχνικής για την ανίχνευσή τους απαιτεί μια κλιμακωτή προσέγγιση στην ανάλυσή τους([Wadowska, et al, 2020](#)).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ρόλος και η κλινική χρησιμότητα της υγρής βιοψίας στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα

Καλησπεράτη Πολυξένη

Ο καρκίνος αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα παγκοσμίως που πλήττει ολοένα και περισσότερο την δημόσια υγεία, την κοινωνικοοικονομική ανάπτυξη και την ευημερία. Ως εκ τούτου, η εφαρμογή συγκεκριμένων πολιτικών δράσης αλλά και ειδικών μοριακών διαγνωστικών μεθόδων για τον έλεγχο και την παρακολούθηση αυτής της ασθένειας έχουν σημαντικά οφέλη στους δείκτες ζωής του παγκόσμιου πληθυσμού αλλά και στην ποιότητα ζωής των καρκινοπαθών ([Πατελάρου, et al, 2011](#)). Η μέθοδος της υγρής βιοψίας είναι μία καινοτόμα λύση των τελευταίων ετών με σημαντικότερες εφαρμογές της σε ποικίλα στάδια του καρκίνου, όπως στον προσυμπτωματικό έλεγχο, στην έγκαιρη ανίχνευση, στην πρόβλεψη της πρόγνωσης, στην σταδιοποίηση, στην παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου και του κινδύνου υποτροπής καθώς επίσης και στην παρακολούθηση της απόκρισης των ασθενών και στον εντοπισμό της ελάχιστης υπολειμματικής νόσου. Η πλειοψηφία των βιοδεικτών που χρησιμοποιούνται στις μέρες μας συνεισφέρουν στις γνώσεις μας για την γονιδιωματική του καρκίνου, αποκαλύπτοντας γενετικές παραλλαγές, μοριακές αλλαγές και μεταλλάξεις που σχετίζονται με αυτή την νόσο. Οι σημαντικότερες εξ' αυτών εντοπίζονται στο κυκλοφορούν καρκινικό DNA (ctDNA) καθώς είναι ο πιο μελετημένος βιοδείκτης υγρής βιοψίας και ακολουθούν τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs), τα RNA (miRNA), τα εξωσώματα (EVs), τα αιμοπετάλια(TEPs) και οι πρωτεΐνες. Μεγάλα ερευνητικά προγράμματα και ποικίλες μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι βιοδείκτες αυτοί χρησιμοποιούνται ευρέως σε διάφορους καρκίνους συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του πνεύμονα ([Leers, 2019](#)). Σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία, ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ο πιο συχνά διαγνωσμένος καρκίνος παγκοσμίως και η κυριότερη αιτία θανάτου από καρκίνο στους άνδρες στον παγκόσμιο πληθυσμό ([UICC, 2020](#)). Πρόκειται για μία ετερογενής ασθένεια με φτωχή πρόγνωση και κακή συνολική επιβίωση. Παρόλα αυτά η πρόοδος της ιατρικής επιστήμης έφερε στο προσκήνιο τις λεγόμενες βιολογικές ή στοχευμένες θεραπείες, όπου ουσιαστικά κατέστη δυνατή η ανάπτυξη νέων φαρμάκων-αναστολέων με δράση κατά συγκεκριμένων τμημάτων του όγκου. Τα πιο αντιπροσωπευτικά παραδείγματα στον καρκίνο αυτό είναι τα φάρμακα ερλοτινίμη ή γεφτινίμη για τις μεταλλάξεις στον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα-EGFR , η κριζοτινίμη για τις αναδιατάξεις στην κινάση του αναπλαστικού λεμφώματος-ALK και η σοραφενίμη για τις παραλλαγές του ογκογονιδίου της οικογένειας των RAS πρωτεϊνών-KRAS. Οι μεταλλάξεις αυτές εντοπίζονται στο μεγαλύτερο ποσοστό στο ctDNA και στα CTCs στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC), καθώς αυτός είναι ο κύριος ιστολογικός υπότυπος καρκίνου του πνεύμονα και έχουν μελετηθεί οι περισσότεροι επικυρωμένοι προγνωστικοί βιοδείκτες. Επίσης, εντοπίζονται οι μεταλλάξεις MET, BRAF, ROS1, RET, NTRK, HER2, PI3Ks, FGFR, DDR2, MEK1 σε ένα πολύ μικρότερο ποσοστό της τάξης του 1-5%. Επιπλέον, στον δευτερεύοντα ιστολογικό υπότυπο, τον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα(SCLC) έχουν βρεθεί ορισμένες μεταλλάξεις (FGFR, TP53, DDR2, PI3KCA) με διαφορετική συχνότητα στο ctDNA και στα CTCs, ωστόσο δεν έχουν βρεθεί ακόμα οι κατάλληλες θεραπευτικές επιλογές ([Villalobos, et al, 2017](#)). Έτσι, χάρη σε πρόσφατες εξελίξεις σε μοριακές στρατηγικές και αναλυτικές πλατφόρμες, έχει αυξηθεί ο αριθμός των δυνατοτήτων των βιοδεικτών της υγρής βιοψίας στα πρώιμα αλλά και στα θεραπευτικά στάδια του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του

πνεύμονα. Ωστόσο, η ακριβής και έγκαιρη διάγνωση όλων των ιστολογικών υπότυπων καρκίνου του πνεύμονα είναι ζωτικής σημασίας για την αποτελεσματικότερη θεραπεία του αλλά και για την καλύτερη ποιότητα ζωής των καρκινοπαθών ([Wadowska, et al, 2020](#)). Μελλοντικά, θα πρέπει να ξεπεραστούν οι υπάρχοντες περιορισμοί που σχετίζονται με την υγρή βιοψία, να αναπτυχθούν ακόμα πιο ισχυρές και ευαίσθητες τεχνολογίες για την απομόνωση και την ανάλυση των κυκλοφορούντων βιοδεικτών και να μελετηθεί και να εκτιμηθεί περαιτέρω η κλινική χρησιμότητα τους σε όλα τα στάδια του καρκίνου. Έτσι, περισσότερες πληροφορίες από ενεργές συνεργασίες μεταξύ κλινικών και ακαδημαϊκών ερευνητικών εργαστηρίων θα συμβάλλουν στην καλύτερη κατανόηση της ετερογένειας και της εξέλιξης του καρκίνου, στους μηχανισμούς μετάστασης, στην διαχρονική παρακολούθησή του αλλά και στην κλινική επικύρωση των νέων τεχνολογιών, με άμεση συνέπεια την καθολική εφαρμογή της υγρής βιοψίας σε όλα τα στάδια των ποικίλων τύπων καρκίνου ([Minji, et al, 2018](#)).

SUMMARY

The role and clinical utility of liquid biopsy in non-small cell lung cancer

Kalisperati Polyxeni

Cancer is one of the major problems in the world, increasingly affecting public health, socio-economic development and prosperity. Therefore, the implementation of specific action policies and specific molecular diagnostic methods for the control and monitoring of this disease have significant benefits on the life indicators of the global population and the quality of life of cancer patients ([Πατελάρου, et al, 2011](#)). The liquid biopsy method is an innovative solution of recent years with its most important applications in various stages of cancer, such as screening, early detection, prognosis, staging, monitoring the progression of the disease and the risk of recurrence. as well as monitoring patient response and detecting minimal residual disease. The majority of biomarkers used today contribute to our knowledge of cancer genomics, revealing genetic variants, molecular changes, and mutations associated with this disease. The most important of these are found in circulating tumor DNA (ctDNA) as it is the most studied biomarker of liquid biopsy, followed by circulating cancer cells (CTCs), RNAs (miRNAs), exosomes (EVs), platelets (TEPs) and proteins. Major research projects and a variety of studies have shown that these biomarkers are widely used in a variety of cancers including lung cancer ([Leers, 2019](#)). According to statistics, lung cancer is the most commonly diagnosed cancer worldwide and the leading cause of cancer death in men worldwide ([UICC, 2020](#)). It is a heterogeneous disease with a poor prognosis and poor overall survival. Nevertheless, the progress of medical science has brought to the fore the so-called biological or targeted therapies, where it has become possible to develop new inhibitor drugs with action against specific parts of the tumor. The most representative examples of this cancer are the drugs erlotinib or gefitinib for mutations in epidermal growth factor receptor-EGFR, crizotinib for rearrangements in regenerative lymphoid kinase-ALK and sorafenib for oncogenic variants in the RAS family of proteins-KRAS. These mutations are most common in ctDNA and CTCs in non-small cell lung cancer (NSCLC), as this is the major histological subtype of lung cancer and the most validated prognostic biomarkers have been studied in this subtype. MET, BRAF, ROS1, RET, NTRK, HER2, PI3Ks, FGFR, DDR2, MEK1 mutations are also detected in a much smaller percentage of 1-5%. In addition, in the secondary histological subtype, small cell lung cancer (SCLC), certain mutations (FGFR, TP53, DDR2, PI3KCA) have

been found with different frequencies in ctDNA and CTCs, but the appropriate treatment options have not yet been found ([Villalobos, et al, 2017](#)). Thus, thanks to recent advances in molecular strategies and analytical platforms, the number of liquid biopsy biomarkers in the early and therapeutic stages of non-small cell lung cancer has increased. However, accurate and timely diagnosis of all histological subtypes of lung cancer is vital for its more effective treatment but also for the better quality of life of cancer patients ([Wadowska, et al, 2020](#)). In the future, existing limitations associated with liquid biopsy should be overcome, even more robust and sensitive technologies for the isolation and analysis of circulating biomarkers should be developed, and their clinical utility at all stages of cancer should be further studied and evaluated. Thus, more information from active collaborations between clinical and academic research laboratories will contribute to a better understanding of the heterogeneity and evolution of cancer, the mechanisms of metastasis, its monitoring over time and the clinical validation of new technologies, with immediate consequence of liquid biopsy's universal application at all stages of various types of cancer ([Minji, et al, 2018](#)).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. [Shuncong, W., Yewei, L., Yuanbo, F., Zhang, J., Swinnen, J., Yue, L., Yicheng, N. \(2019\) A Review on Curability of Cancers: More Efforts for Novel Therapeutic Options Are Needed. Cancers 2019, 11, 1782: 1-32](#)
2. [Πατελάρου, Α., Σηφάκη-Πιστόλλα, Δ., Ξυλούρη, Α., Πρινάρη, Α. \(2011\) Πρόσφατα επιδημιολογικά δεδομένα για την εξάπλωση του καρκίνου στην Ελλάδα και την οργάνωση φορέων πρόληψης σε παγκόσμιο επίπεδο : Μια ανασκόπηση της βιβλιογραφίας. ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ ΤΗΣ ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ 4: 70-77](#)
3. [Tzoganakos, I. \(2020\) Καρκίνος | Παγκόσμια Ημέρα 2020. e-periodiko Megamed.gr](#)
4. [Gelbrand, H., Bray, F., Soerjomataram, I., Liberman, J., \(support from Arora, M., Kiyange, F., Schneidman, M., Storm, H.\), Bertram, M., \(support from Meheus, F., Gauvreau, C.\), Wiesner, C., \(support from Murillo, R.\), Sankaranarayanan, R., \(support from Arrossi, S., Denny, L., Kataria, I., Parham, G., Zaghoul, M.\), Borrás Andres, J.M., Gyawali, B., Krakauer, E., Trapani, D., Albrecht, T., Moreno, J.M. \(support from Sullivan, T.\), Meheus, F., Gauvreau, C., Anderson, B., Duggan, C., Tugsbayar, D., \(support from Ganbaatar, A., Murthy, S.\), Gershenwald, J., Giles, C., Lam, C., Rodriguez-Galindo, C., Stevens L. \(2020\) WHO REPORT ON CANCER: SETTING PRIORITIES, INVESTING WISELY AND PROVIDING CARE FOR ALL. 3.0 IGO \(ISBN 978-92-4-000129-9\): 1-160](#)
5. [Van Meter, S. \(2016\) The Value of Molecular Diagnostics: Advancing Cancer Treatment and Care. e-periodiko AdvaMedDx.org: 1-16](#)
6. [Chen, X.J., Zhang, X.Q., Liu, Q., Zhang, J., Zhou, G. \(2018\) Nanotechnology: a promising method for oral cancer detection and diagnosis. Journal of Nanobiotechnology 52: 1-17](#)
7. [De Rubis, G., Krishnan, S.R., Bebawy, M. \(2019\) Liquid Biopsies in Cancer Diagnosis, Monitoring, and Prognosis. Trends in Pharmacological Science 40: 172-186](#)
8. [Παπαδάκου, Μ. \(2017\) Επιδημιολογία του καρκίνου. Επαγγελματική Ένωση Παθολόγων – Ογκολόγων Ελλάδος Κεφάλαιο 11: 157-183](#)
9. [BeStrong \(2014\) Στατιστικά στοιχεία για τον καρκίνο BeSTRONG.ORG.GR](#)
10. [Ζαφράκας, Μ., Τσαλίκης, Τ., Τζεβελέκης, Φ., Αργυρίου, Θ., Ταρλατζής, Β. \(2009\) Πρωτογενής και Δευτερογενής Πρόληψη του Καρκίνου του Μαστού. ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ & ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑ 21\(2\): 138-147](#)
11. [Ελληνική Μαιευτική και Γυναικολογική Εταιρεία \(2014\) Πρωτογενής και δευτερογενής πρόληψη έναντι του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. ΚΑΤΕΥΘΥΝΤΗΡΙΕΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ΚΑΙ ΣΥΝΑΙΝΕΣΕΙΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΣΤΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑ 13: 120-125](#)
12. [Murray, C. \(2011\) The Future of Molecular Diagnostics For Cancer: A Personalised Approach. Pathology Drug Discovery World: 6-13](#)
13. [National Cancer Institute \(2020\) Molecular Diagnostics for Cancer Treatment: Expanding beyond the Genome](#)
14. [Sokolenko, A.P., Imyanitov, E.N. \(2018\) Molecular Diagnostics in Clinical Oncology. Frontiers in Molecular Biosciences \(section Molecular Diagnostics and Therapeutics\) 5\(76\): 1-15](#)
15. [Leers, P.G.M. \(2019\) Circulating tumor DNA and their added value in molecular oncology. De Gruyter 58\(2\): 152-161](#)
16. [Siravegna, G., Marsoni, S., Siena, S., Bardelli, A. \(2017\) Integrating liquid biopsies into the management of cancer. NATURE REVIEWS CLINICAL ONCOLOGY 14: 531-548](#)
17. [Wan, C.M.J., Massie, C., Garcia-Corbacho, J., Mouliere, F., Brenton, D.J., Caldas, C., Pacey, S., Baird, R., Rosenfeld, N. \(2017\) Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. NATURE REVIEWS CANCER 17: 223–238](#)

18. [Guibert, N., Pradines, A., Favre, G., Mazieres, J. \(2020\) Current and future applications of liquid biopsy in nonsmall cell lung cancer from early to advanced stages. Cells 9\(11\): 1-15](#)
19. [Thierry, A.R., Messaoudi, S.E., Gahan, P.B., Anker, P., Stroun, M. \(2016\) Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. Cancer and Metastasis Reviews 35: 347–376](#)
20. [LEVY, B., ZISHUO, I.H., CORDOVA, N.K., CLOSE, S., LEE, K., BECKER, D. \(2016\) Clinical Utility of Liquid Diagnostic Platforms in Non-Small Cell Lung Cancer. The Oncologist 21: 1–10](#)
21. [Minji, L., Chi-Ju, K., Vijaya, S., Mi-Hyun, K., Yoon-Kyoung, C. \(2018\) Liquid Biopsy in Lung Cancer: Clinical Applications of Circulating Biomarkers \(CTCs and ctDNA\). Micromachines 9\(3\): 1-18](#)
22. [Pasini, L., Ulivi, P. \(2019\) Liquid Biopsy for the Detection of Resistance Mechanisms in NSCLC: Comparison of Different Blood Biomarkers. J. Clin. Med. 8\(7\): 1-24](#)
23. [Buscail, E., Chiche, L., Laurent, C., Vendrely, V., Denost, Q., Denis, J., Thumerel, M., Lacorte, J.M., Bedel, A., Moreau-Gaudry, F., Dabernat, S., Alix-Panabieres, C. \(2019\) Tumor-proximal liquid biopsy to improve diagnostic and prognostic performances of circulating tumor cells. Molecular Oncology 13: 1811–1826](#)
24. [Rolfo, C., Castiglia, M., Hong, D., Alessandro, R., Mertens, I., Baggerman, G., Zwaenepoel, K., Gil-Bazo, I., Passiglia, F., Carreca, A.P., Taverna, S., Vento, R., Santini, D., Peeters, M., Russo, A., Pauwels, P. \(2014\) Liquid biopsies in lung cancer: The new ambrosia of researchers. BBA Reviews on Cancer 1846\(2\): 539-546](#)
25. [Κυριαζής, Ι.Δ., Καμπούρης, Μ.Ε., Πουλάς, Κ., Πατρinός, Γ.Π. \(2013\) Μοριακές τεχνικές για την ανίχνευση και το χαρακτηρισμό μικροοργανισμών. ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 31\(1\): 23-40](#)
26. [Rolfo, C., Mack, C.P., Scagliotti, G.V., Baas, P., Barlesi, F., Bivona, T.G., Herbst, R.S., Mok, T.S., Peled, N., Pirker, R., Raez, L.E., Reck, M., Riess, J.W., Sequist, L.V., Shepherd, F.A., Sholl, L.M., Tan, D.S.W., Wakelee, H.A., Wistuba, I.I., Wynes, M.W., Carbone, D.P., Hirsch, F.R., Gandara, D.R. \(2018\) Liquid Biopsy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer \(NSCLC\): A Statement Paper from the IASLC Journal of Thoracic Oncology 13\(9\): 1248-1268](#)
27. [Zhang, Y.C., Zhou, Q., Wu, Y.L. \(2017\) The emerging roles of NGS-based liquid biopsy in non-small cell lung cancer. Journal of Hematology & Oncology 10: 1-8](#)
28. [Malapelle, U., Pisapia, P., Rocco, D., Smeraglio, R., Di Spirito, M., Bellevicine, C., Troncone, G. \(2016\) Next generation sequencing techniques in liquid biopsy: focus on non-small cell lung cancer patients. Transl Lung Cancer Res 5\(5\): 505-510](#)
29. [Yap, T.A., Lorente, D., Omlin, A., Olmos, D., De Bono, J.S. \(2014\) Circulating Tumor Cells: A Multifunctional Biomarker. Clin Cancer Res. 20\(10\): 2553–2568](#)
30. [Cui, S., Cheng, Z., Qin, W., Jiang, L. \(2018\) Exosomes as a liquid biopsy for lung cancer. Lung Cancer 116: 46-54](#)
31. [Lee, H., Na, W., Park, C., Park K.H., Shin, S. \(2018\) Centrifugation-free extraction of circulating nucleic acids using immiscible liquid under vacuum pressure. Scientific Reports 8: 5467](#)
32. [Nayak, S., Yeo, W.S., Mrksich, M. \(2007\) Determination of Kinetic Parameters for Interfacial Enzymatic Reactions on Self-Assembled Monolayers. Langmuir 23\(10\): 5578–5583](#)
33. [Dharmaraj, S. \(...\) The Basics: RT-PCR Thermo Fisher Scientific](#)
34. [Wadowska, K., Bil-Lula, I., Trembecki, L., Sliwinska-Mosso, M. \(2020\) Genetic Markers in Lung Cancer Diagnosis: A Review. International Journal of Molecular Science 21\(13\), 4569: 1-22](#)

35. [Grigoriu, B., Lal, R., John-Brooks, K., Harrison, P., Χαρδαβέλλα, Γ. \(2016\) Καρκίνος του πνεύμονα. ERS, ELF: 1-14](#)
36. [Kapeleris, J., Kulasinghe, A., Warkiani, M.E., Vela, I., Kenny, L., O'Byrne, K., Punyadeera, C. \(2018\) The Prognostic Role of Circulating Tumor Cells \(CTCs\) in Lung Cancer. Frontiers in Oncology 8\(311\): 1-13](#)
37. [Villalobos, P., Wistuba, I.I. \(2017\) Lung Cancer Biomarkers. Hematol Oncol Clin North Am. 31\(1\): 13–29](#)
38. [Poroyko, V., Mirzapoiuzova, T., Nam, A., Mambetsariev, I., Mambetsariev, B., Wu, X., Husain, A., Vokes, E.E., Wheeler, D.L., Salgia, R. \(2018\) Exosomal miRNAs species in the blood of small cell and nonsmall cell lung cancer patients. Oncotarget 9\(28\): 19793-19806](#)
39. [Cagle, P.T., Chirieac, L.R. \(2012\) Advances in Treatment of Lung Cancer With Targeted Therapy. Arch Pathol Lab Med. 136: 504–509](#)
40. [Λινάρδου, Ε. \(2018\) Ανοσοθεραπεία: η επαναστατική θεραπεία αλλάζει τα δεδομένα και στον καρκίνο του πνεύμονα. METROPOLITAN BLOG](#)
41. [Liang, W., Zhao, Y., Huang, W., Liang, H., Zeng, H., He, J. \(2018\) Liquid biopsy for early stage lung cancer. Journal of Thoracic Disease 10\(7\): S876-S881](#)
42. [ASCO \(AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY\) \(2020\) ASCO answers: Lung Cancer. Cancer.Net](#)
43. [Βλάχση, Ι., επιστημονική ομάδα doctoranytime, Μηλάκη, Γ. \(2019\) Καρκίνος του πνεύμονα. doctoranytime](#)
44. [FORAMELEFKO \(2019\) Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ: ΘΕΡΑΠΕΙΑ](#)
45. [GEORGAKOPOULOS \(2015\) Καρκίνος Πνεύμονα Διάγνωση και Θεραπεία.](#)
46. [Wu, L., Hu, B., Zhao, B., Liu, Y., Yang, Y., Zhang, L., Chen J. \(2017\) Circulating microRNA-422a is associated with lymphatic metastasis in lung cancer. Oncotarget 8 \(26\): 42173–42188](#)
47. [Knight, S.B., Crosbie, P.A., Balata, H., Chudziak, J., Hussell, T., Dive, C. \(2017\) Progress and prospects of early detection in lung cancer. OPEN BIOLOGY 7\(9\): 1-12](#)
48. [Mamdani, H., Ahmed, S., Armstrong, S., Mok, T., Jalal, S.I. \(2017\) Blood-based tumor biomarkers in lung cancer for detection and treatment. Transl Lung Cancer 6\(6\): 648-660](#)
49. [Heydt, C., Michels, S., Thress, K.S., Bergner, S., Wolf, J., Buettner, R. \(2018\) Novel approaches against epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor resistance. Oncotarget 9 \(20\): 15418-15434](#)
50. [Hofman \(2017\) ALK Status Assessment with Liquid Biopsies of Lung Cancer Patients. Cancers 9 \(106\): 1-9](#)
51. [Metro, G., Bouche, G., Jezdic, S., D' Addario, G., Crinò, L., Felip, E., Kornek, G., Jost, L., Vallone, S., Rapetti, S. \(Ελληνική μετάφραση και επιμέλεια των Οδηγιών για Ασθενείς της ESMO έγινε από: Κεσίσης, Γ., Κρικέλης, Δ., Λαζαρίδης, Γ., Τσουκαλάς, Ν.\) \(2014\) ΜΗ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ \(ΜΜΚΠ\): ΕΝΑΣ ΟΔΗΓΟΣ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ. Anticancer Fundμε την άδεια της ESMO: 1-34](#)
52. [Salgia, R. \(2016\) Mutation testing for directing upfront targeted therapy and post-progression combination therapy strategies in lung adenocarcinoma. Expert Review of Molecular Diagnostics 7\(16\): 737-749](#)
53. [GU, Y., ZHU, X., CAO, B., WU, X., TONG, X., SHAO, Y.W., LIANG, L. \(2019\) Transformation to small cell lung cancer and activation of KRAS during long-term erlotinib maintenance in a patient with non-small cell lung cancer: A case report. ONCOLOGY LETTERS 17: 5219-5223](#)

54. [Rijavec, E., Coco, S., Genova, C., Rossi, G., Longo, L., Grossi, F. \(2019\) Liquid Biopsy in Non-Small Cell Lung Cancer: Highlights and Challenges. *Cancers* 12,17: 1-17](#)
55. [Pinsolle, J., McLeer-Florin, A., Levra, M.G., de Fraipont, F., Emprou, C., Gobbin, E., Toffart, A.C. \(2019\) Translating Systems Medicine Into Clinical Practice: Examples From Pulmonary Medicine With Genetic Disorders, Infections, Inflammations, Cancer Genesis, and Treatment Implication of Molecular Alterations in Non-small-cell Lung Cancers and Personalized Medicine. *Frontiers in Medicine* 6\(233\): 1-14](#)
56. [Garzón, M., Villatoro, S., Teixidó, C., Mayo, C., Martínez, A., de los Llanos Gil, M., Viteri, S., Morales-Espinosa, D., Rosell, R. \(2016\) KRAS mutations in the circulating free DNA \(cfDNA\) of non-small cell lung cancer \(NSCLC\) patients. *Transl Lung Cancer* 5\(5\): 511-516](#)
57. [Union for International Cancer Control \(UICC\) \(2020\) GLOBOCAN 2020: New Global Cancer Data.](#)
58. [Conrad Stöppler, M. \(2020\) What Is Non-Small-Cell Lung Cancer \(NSCLC\)? *eMedicineHealth*](#)
59. [Δεβετζόγλου, Γ. \(2020\) «Θερίζει» ο καρκίνος του πνεύμονα στην Ελλάδα. *Protagon*](#)
60. [Lee, E.Y., Kulkarni, R.P. \(2019\) Circulating biomarkers predictive of tumor response to cancer immunotherapy. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 19\(10\)](#)
61. [Pérez-Callejo, D., Romero, A., Provencio, M., Torrente, M. \(2016\) Liquid biopsy based biomarkers in non-small cell lung cancer for diagnosis and treatment monitoring. *Transl Lung Cancer Res.* 5\(5\): 455–465](#)
62. [Almodovar, K., Iams, W.T., Meador, C.B., Zhao, Z., York, S., Horn, L., Yan, Y., Hernandez, J., Chen, H., Shyr, Y., Lim, L.P., Raymond, C.K., Lovely, C.M. \(2017\) Longitudinal cell-free DNA analysis in patients with small cell lung cancer reveals dynamic insights into treatment efficacy and disease relapse. *Journal of Thoracic Oncology* 13\(1\): 112-123](#)
63. [Devarakonda, S., Sankararaman, S., Herzog, B.H., Gold, K.A., Waqar, S.N., Ward, J., Raymond, V.M., Lanman, R.B., Chaudhuri, A., Owonikoko, T.K., Li, B.T., Poirier, J.T., Rudin, C.M., Govindan, R., Morgensztern, D. \(2019\) Circulating Tumor DNA Profiling in Small Cell Lung Cancer Identifies Potentially Targetable Alterations. *CLINICAL CANCER RESEARCH* 25\(20\): 1-31](#)
64. [Obermayr, E., Agreiter, C., Schuster, E., Fabikan, H., Weinlinger, C., Baluchova, K., Hamilton, G., Hochmair, M., Zeillinger, R. \(2019\) Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells Enriched by A Microfluidic Platform in Patients with Small-Cell Lung Cancer. *Cells* 8\(8\): 1-12](#)
65. [Foy, V., Fernandez-Gutierrez, F., Faivre-Finn, C., Dive, C., Blackhall, F. \(2017\) The clinical utility of circulating tumour cells in patients with small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 6\(4\): 409–417](#)
66. [Wikipedia Καρκίνος του πνεύμονα](#)
67. [Reclusa, P., Sirera, R., Araujo, A., Giallombardo, M., Valentino, A., Sorber, L., Bazo, I.G., Pauwels, P., Rolfo, C. \(2016\) Exosomes genetic cargo in lung cancer: a truly Pandora's box. *Transl Lung Cancer Res* 5\(5\): 483-491](#)
68. [Santarpia, M., Liguori, A., D'Aveni, A., Karachaliou, N., Gonzalez-Cao, M., Daffinà, M.G., Lazzari, C., Altavilla, G., Rosell, R. \(2018\) Liquid biopsy for lung cancer early detection. *J Thorac Dis* 10\(7\): 882-897](#)
69. [Liao, B.C., Griesing, S., Chih-Hsin Yang, J. \(2019\) Second-line treatment of EGFR T790M-negative non-small cell lung cancer patients. *Ther Adv Med Oncol* 11: 1–16](#)

70. [Stockley, T., Souza, C.A., Cheema, P.K., Melosky, B., Kamel-Reid, S., Tsao, M.S., Spatz, A., Karsan, A. \(2018\) Evidence-based best practices for EGFR T790M testing in lung cancer in Canada. *Curr Oncol.* 25\(2\): 163-169](#)
71. [Bruno, R., Fontanini, G. \(2020\) Next Generation Sequencing for Gene Fusion Analysis in Lung Cancer: A Literature Review. *Diagnostics* 10\(521\): 1-17](#)
72. [GEN: Genetic Engineering & Biotechnology News \(2019\) Liquid Biopsies Can Point to Best Ovarian Cancer Treatment. *Translational Medicine*](#)
73. [Zhang, L., Liang, Y., Li, S., Zeng, F., Meng, Y., Chen, Z., Liu, S., Tao, Y., Yu, F. \(2019\) The interplay of circulating tumor DNA and chromatin modification, therapeutic resistance, and metastasis. *Molecular Cancer* 18\(36\): 1-20](#)
74. [Segura, J.C.T., Balleste, L. \(2020\) Colocación de implantes sin hueso. *Dentalut clinica*](#)
75. [Geddes, L. \(2012\) Αμποπετάλια: οι «μπαλαντέρ» του ανοσοποιητικού. *Science*](#)
76. [Best, M.G., Sol, N., Kooi, I., Tannous, J., Westerman, B.A., Rustenburg, F., Schellen, P., Verschueren, H., Post, E., Koster, J., Ylstra, B., Ameziane, N., Dorsman, J., Smit, E.F., Verheul, H.M., Noske, D.P., Reijneveld, J.C., Nilsson, R.J.A., Wurdinger, T. \(2015\) RNA-Seq of Tumor-Educated Platelets Enables Blood-Based Pan-Cancer, Multiclass, and Molecular Pathway Cancer Diagnostics. *Cancer Cell* 28\(5\) 9: 666-676](#)
77. [TGA: Therapeutic Goods Administration \(2019\) Regulation of platelet-rich plasma \(PRP\), platelet-rich fibrin \(PRF\) and conditioned serum. Department of Health Australian Government](#)
78. [GEN: Genetic Engineering & Biotechnology News \(2019\) RNA Sequencing Technology Developed That Is Reportedly Faster and Cheaper. *Bioinformatics*](#)
79. [VYCAP \(2011\) APPLICATIONS: Enumerating CTC in humans](#)
80. [Truini, A., Alama, A., Dal Bello, M.G., Coco, S., Vanni, I., Rijavec, E., Genova, C., Barletta, G., Biello, F., Grossi, F. \(2014\) Clinical applications of circulating tumor cells in lung cancer patients by CellSearch system. *Frontiers in Oncology* 4\(242\): 1-5](#)
81. [Haber, D.A., Velculescu, V.E. \(2014\) Blood-Based Analyses of Cancer: Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA. *Cancer Discovery* 4\(6\): 650-661](#)
82. [Nagrath, S., Jack, R.M., Sahai, V., Simeone, D.M. \(2016\) Opportunities and Challenges for Pancreatic Circulating Tumor Cells. *REVIEWS AND PERSPECTIVES IN BASIC AND CLINICAL GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY* 151\(3\): 412-426](#)
83. [Contreras-Naranjo, J.C., Wu, H.J., Ugaz, V.M. \(2017\) Microfluidics for exosome isolation and analysis: enabling liquid biopsy for personalized medicine. *Lab Chip*\(17\): 3558-3577](#)
84. [Κονιδάρης, Π. \(2020\) Polymerase-Chain-Reaction-PCR. *Meganisi Times*](#)
85. [Walker-Daniels, J. \(2012\) Current PCR Methods. *Labome*](#)
86. [NCBI: National Center for Biotechnology Information \(2017\) Real-Time qRT-PCR](#)
87. [Kang, M. \(2017\) qPCR amplification curve height difference in standard curve. *ResearchGate*](#)
88. [Castellanos, J.E., Prada-Arismendy, J. \(2013\) Real time PCR. Application in dengue studies. *Colombia Médica* 42\(2\): 1-17](#)
89. [Raimondi, L., De Luca, A., Costa, V., Amodio, N., Carina, V., Bellavia, D., Tassone, P., Pagani, S., Fini, M., Alessandro, R., Giavaresi, G. \(2017\) Circulating biomarkers in osteosarcoma: new translational tools for diagnosis and treatment. *Oncotarget* 8\(59\): 100831–100851](#)
90. [Chiriaco, M.S., Bianco, M., Nigro, A., Primiceri, E., Ferrara, F., Romano, A., Quattrini, A., Furlan, R., Arima, V., Maruccio, G. \(2018\) Lab-on-Chip for Exosomes and Microvesicles Detection and Characterization. *Sensors* 18\(10\): 1-41](#)

91. [Li, P., Kaslan, M., Lee, S.H., Yao, J., Gao, Z. \(2017\) Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics* 7\(3\): 789–804](#)
92. [Jafari, A., Doosti, A., Ghasemi-Dehkordi, P., Arshi, A. \(2013\) Molecular Detection of Bacteria in Activated Sludge from Municipal Wastewater of Cold Climate Regions. *JOURNAL OF PURE AND APPLIED MICROBIOLOGY* 7\(2\): 1107-1111](#)
93. [Pignatelli, D., Carvalho, B.L., Palmeiro, A., Barros, A., Guerreiro, S.G., Maçut, D. \(2019\) The Complexities in Genotyping of Congenital Adrenal Hyperplasia: 21-Hydroxylase Deficiency. *Frontiers in Endocrinology* 10\(432\): 1-17](#)
94. [TADEO, X. \(2016\) Droplet Digital PCR to Measure Tumor Load. *labcritics*](#)
95. [Yang, B., Qin, A., Zhang, K., Ren, H., Liu, S., Liu, X., Pan, X., Yu, G. \(2017\) Circulating Tumor Cells Predict Prognosis Following Tyrosine Kinase Inhibitor Treatment in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Oncol Res.* 25\(9\): 1601–1606](#)
96. [Lu, S., Kong, H., Houa, Y., Gec, D., Huang, W., Ou, J., Yange, D., Zhang, L., Wu, G., Song, Y., Zhang, X., Zhaia, C., Wang, Q., Zhu, H., Wu, Y., Bai, C. \(2018\) Two plasma microRNA panels for diagnosis and subtype discrimination of lung cancer. *Lung Cancer* 123: 44-51](#)
97. [Navarro, A., Molins, L., Marrades, R.M., Moises, J., Viñolas, N., Morales, S., Canals, J., Castellano J.J., Ramírez, J., Monzo, M. \(2019\) Exosome Analysis in Tumor-Draining Pulmonary Vein Identifies NSCLC Patients with Higher Risk of Relapse after Curative Surgery. *Cancers* 11\(2\)](#)
98. [Nilsson, R.J.A., Karachaliou, N., Berenguer, J., Gimenez-Capitan, A., Schellen, P., Teixido, C., Tannous, J., Kuiper, J.L., Drees, E., Grabowska, M., Van Keulen, M., Heideman, D.A.M., Thunnissen, E., Dingemans, A.C., Viteri, S., Tannous, B.A., Drozdowskyj, A., Rosell, R., Smit, E.F., Wurdinger, T. \(2015\) Rearranged EML4-ALK fusion transcripts sequester in circulating blood platelets and enable blood-based crizotinib response monitoring in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 7\(1\): 1066–1075](#)
99. [McCoach, C.E., Blakely, C.M., Banks, K.C., Levy, B., Chue, B.M., Raymond, V.M., Le, A.T., Lee, C.E., Diaz, J., Waqar, S.N., Purcell, W.T., Aisner, D.L., Davies, K.D., Lanman, R.B., Shaw, A.T., Doebele, R.C. \(2018\) Clinical Utility of Cell-Free DNA for the Detection of ALK Fusions and Genomic Mechanisms of ALK Inhibitor Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research* 24\(12\): 1-14](#)
100. [Leighl, N.B., Page, R.D., Raymond, V.M., Daniel, D.B., Divers, S.G., Reckamp, K.L., Villalona-Calero, M.A., Dix, D., Odegaard, J.I., Lanman, R.B., Papadimitrakopoulou, V.A. \(2019\) Clinical Utility of Comprehensive Cell-free DNA Analysis to Identify Genomic Biomarkers in Patients with Newly Diagnosed Metastatic Non-small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* 25: 4691–4700](#)
101. [Pinzani, P., D’Argenio, V., Del Re, M., Pellegrini, C., Cucchiara, F., Salvianti, F., Galbiati, S. \(2021\) Updates on liquid biopsy: current trends and future perspectives for clinical application in solid tumors. *Clin Chem Lab Med* 59\(7\): 1181–1200](#)
102. [Reckamp, K.L., Melnikova, V.O., Karlovich, C., Sequist, L.V., Camidge, D.R., Wakelee, H., Perol, M., Oxnard, G.R., Kosco, K., Croucher, P., Samuelsz, E., Vibat, C.R., Guerrero, S., Geis, J., Berz, D., Mann, E., Matheny, S., Rolfe, L., Gadgeel, S. \(2016\) A highly sensitive and quantitative test platform for detection of NSCLC EGFR mutations in urine and plasma. *J. Thorac. Oncol.* 11\(10\): 1690–1700](#)
103. [Couraud, S., Vaca-Paniagua, F., Villar, S., Oliver, J., Schuster, T., Blanché, H., Girard, N., Trédaniel, J., Guillemineault, L., Gervais, R., Prim, N., Vincent, M., Margery, J., Larivé, S., Foucher, P., Duvert, B., Vallee, M., Le Calvez-Kelm, F., McKay, J., Missy,](#)

- [P., Morin, F., Zalcmán, G., Olivier, M., Souquet, P.J. \(2014\) Noninvasive diagnosis of actionable mutations by deep sequencing of circulating free DNA in lung cancer from never-smokers: A proof-of-concept study from BioCAST/IFCT-1002. Clin. Cancer Res. 20\(17\): 4613–4624](#)
104. [ForsheW, T., Murtaza, M., Parkinson, C., Gale, D., Tsui, D.W.Y., Kaper, F., Dawson, S.-J., Piskorz, A.M., Jimenez-Linan, M., Bentley, D., Hadfield, J., May, A.P., Caldas, C., Brenton, J.D., Rosenfeld, N. \(2012\) Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. Sci. Transl. Med. 4\(136\): 136ra68](#)
105. [Newman, A.M., Bratman, S.V., To, J., Wynne, J.F., Eclow, N.C.W., Modlin, L.A., Liu, C.L., Neal, J.W., Wakelee, H.A., Merritt, R.E., Shrager, J.B., W Loo Jr, B., Alizadeh, A.A., Diehn, M. \(2014\) An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. Nat. Med. 20: 548–554](#)
106. [Newman, A.M., Lovejoy, A.F., Klass, D.M., Kurtz, D.M., Chabon, J.J., Scherer, F., Stehr, H., Liu, C.L., Bratman, S.V., Say, C., Zhou, L., Carter, J.N., West, R.B., Sledge Jr, G.W., Shrager, J.B., Loo Jr, B.W., Neal, J.W., Wakelee, H.A., Diehn, M., Alizadeh, A.A. \(2016\) Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA. Nat. Biotechnol. 34: 547–555](#)
107. [Phallen, J., Sausen, M., Adleff, V., Leal, A., Hruban, C., White, J., Anagnostou, V., Fiksel, J., Cristiano, S., Papp, E., Speir, S., Reinert, T., Worm Orntoft, M.B., Woodward, B.D., Murphy, D., Parpart-Li, S., Riley, D., Nesselbush, M., Sengamalay, N., Georgiadis, A., Li, Q.K., Madsen, M.R., Mortensen, F.V., Huisken, J., Punt, C., Van Grieken, N., Fijneman, R., Meijer, G., Husain, H., Scharpf, R.B., Diaz Jr, L.A., Jones, S., Angiuoli, S., Ørntoft, T., Nielsen, H.J., Andersen, C.L., Velculescu, V.E. \(2017\) Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. Sci. Transl. Med. 9\(403\)](#)
108. [Abbosh, C., Birkbak, N.J., Wilson, G.A., Jamal-Hanjani, M., Constantin, T., Salari, R., Le Quesne, J., Moore, D.A., Veeriah, S., Rosenthal, R., Marafioti, T., Kirkizlar, E., Watkins, T.B.K., McGranahan, N., Ward, S., Martinson, L., Riley, J., Fraioli, F., Al Bakir, M., Grönroos, E., Zambrana, F., Endozo, R., Linda Bi, W., Fennessy, F.M., Sponer, N., Johnson, D., Laycock, J., Shafi, S., Czyzewska-Khan, J., Rowan, A., Chambers, T., Matthews, N., Turajlic, S., Hiley, C., Ming Lee, S., Forster, M.D., Ahmad, T., Falzon, M., Borg, E., Lawrence, D., Hayward, M., Kolvekar, S., Panagiotopoulos, N., Janes, S.M., Thakrar, R., Ahmed, A., Blackhall, F., Summers, Y., Hafez, D., Naik, A., Ganguly, A., Kareht, S., Shah, R., Joseph, L., Quinn, A.M., Crosbie, P.A., Naidu, B., Middleton, G., Langman, G., Trotter, S., Nicolson, M., Remmen, H., Kerr, K., Chetty, M., Gomersall, L., Fennell, D.A., Nakas, A., Rathinam, S., Anand, G., Khan, S., Russell, P., Ezhil, V., Ismail, B., Irvin-Sellers, M., Prakash, V., Lester, J.F., Kornaszewska, M., Attanoos, R., Adams, H., Davies, H., Oukrif, D., Akarca, A.U., Hartley, J.A., Lowe, H.L., Lock, S., Iles, N., Bell, H., Ngai, Y., Elgar, G., Szallasi, Z., Schwarz, R.F., Herrero, J., Stewart, A., Quezada, S.A., Peggs, K.S., Van Loo, P., Dive, C., Lin, C.J., Rabinowitz, M., Aerts, H.J.W.L., Hackshaw, A., Shaw, J.A., Zimmermann, B.G., The TRACERx consortium, The PEACE consortium, Swanton C. \(2017\) Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. Nature 545: 446–451](#)
109. [Iijima, Y., Hirotsu, Y., Amemiya, K., Ooka, Y., Mochizuki, H., Oyama, T., Nakagomi, T., Uchida, Y., Kobayashi, Y., Tsutsui, T., Kakizaki, Y., Goto, T., Miyashita, Y., Omata, M. \(2017\) Very early response of circulating tumour-derived DNA in plasma predicts efficacy of nivolumab treatment in patients with non-small cell lung cancer. Eur. J. Cancer. 86: 349–357](#)

110. [Ilie, M., Hofman, V., Long-Mira, E., Selva, E., Vignaud, J.M., Padovani, B., Mouroux, J., Marquette, C.H., Hofman, P. \(2014\) "Sentinel" circulating tumor cells allow early diagnosis of lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease. PLOS ONE 9](#)
111. [Leroy, S., Benzaquen, J., Mazzetta, A., Marchand-Adam, S., Padovani, B., Israel-Biet, D., Pison, C., Chanez, P., Cadranet, J., Mazières, J., Jounieaux, V., Cohen, C., Hofman, V., Ilie, M., Hofman, P., Marquette, C.H. \(2017\) Circulating tumour cells as a potential screening tool for lung cancer \(the AIR study\): protocol of a prospective multicentre cohort study in France. BMJ Open 7](#)
112. [Tanaka, F., Yoneda, K., Kondo, N., Hashimoto, M., Takuwa, T., Matsumoto, S., Okumura, Y., Rahman, S., Tsubota, N., Tsujimura, T., Kuribayashi, K., Fukuoka, K., Nakano, T., Hasegawa, S. \(2009\) Circulating Tumor Cell as a Diagnostic Marker in Primary Lung Cancer. CLINICAL CANCER RESEARCH 15\(22\): 6980-6986](#)
113. [Wong, M.P. \(2012\) Circulating tumor cells as lung cancer biomarkers. Journal of Thoracic Disease 4\(6\): 631–634](#)
114. [Krebs, M.G., Sloane, R., Priest, L., Lancashire, L., Hou, J.M., Greystoke, A., Ward, T.H., Ferraldeschi, R., Hughes, A., Clack, G., Ranson, M., Dive, C., Blackhall, F.H. \(2011\) Evaluation and Prognostic Significance of Circulating Tumor Cells in Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY 29\(12\): 1556-1563](#)
115. [Hofman, V., Ilie, M.I., Long, E., Selva, E., Bonnetaud, C., Molina, T., Vénissac, N., Mouroux, J., Vielh, P., Hofman, P. \(2011\) Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: comparison of the efficacy of the CellSearch Assay™ and the isolation by size of epithelial tumor cell method. International Journal Of Cancer 129\(7\): 1651-1660](#)
116. [Punnoose, E.A., Atwal, S., Liu, W., Raja, R., Fine, B.M., Hughes, B.G., Hicks, R.J., Hampton, G.M., Amler, L.C., Pirzkall, A., Lackner, M.R. \(2012\) Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non–small cell lung cancer: Association with clinical endpoints in a phase ii clinical trial of pertuzumab and erlotinib. Clin. Cancer Res. 18\(8\): 2391–2401](#)
117. [Zhou, J., Dong, F., Cui, F., Xu, R., Tang, X. \(2017\) The role of circulating tumor cells in evaluation of prognosis and treatment response in advanced non-small-cell lung cancer. Cancer Chemother. Pharmacol. 79: 825–833](#)
118. [Bernaudin, J., Coulon, S., Saintigny, P., Bazelly, B., Ricci, S., Le Pimpec Barthes, E., Milleron, B. \(2005\) PD-085 detection of circulating cancer cells by real time RTPCR in the pulmonary vein of patients with non-small cell lung cancer. Lung Cancer 49](#)
119. [Massard, C., Borget, I., Farace, F., Aspeslagh, S., Le Deley, M.C., Le Tourneau, C., Bidard, F.C., Pierga, J.Y., Dieras, V., Hofman, P., Spano, J.P., Ferte, C., Lacroix, L., Soria, J.C. \(2017\) RECIST response and variation of circulating tumour cells in phase 1 trials: a prospective multicentric study. Eur J Cancer 83: 185–193](#)
120. [Sun, M., Behrens, C., Feng, L., Ozburn, N., Tang, X., Yin, G., Komaki, R., Varella-Garcia, M., Hong, W.K., Aldape, K.D., Wistuba, I.I. \(2009\) HER family receptor abnormalities in lung cancer brain metastases and corresponding primary tumors. Clin. Cancer Res. 15: 4829–4837](#)
121. [Scharpenseel, H., Hanssen, A., Loges, S., Mohme, M., Bernreuther, C., Peine, S., Lamszus, K., Goy, Y., Petersen, C., Westphal, M., Glatzel, M., Riethdorf, S., Pantel,](#)

- [K., Wikman, H. \(2019\) EGFR and HER3 expression in circulating tumor cells and tumor tissue from non-small cell lung cancer patients. Sci. Rep. 9\(7406\)](#)
122. [Nicolazzo, C., Raimondi, C., Mancini, M., Caponnetto, S., Gradilone, A., Gandini, O., Mastromartino, M., Del Bene, G., Prete, A., Longo, F., Cortesi, E., Gazzaniga, P. \(2016\) Monitoring PD-L1 positive circulating tumor cells in non-small cell lung cancer patients treated with the PD-1 inhibitor Nivolumab. Sci. Rep. 6 \(31726\)](#)
123. [Ilić, M., Szafer-Glusman, E., Hofman, V., Chamorey, E., Lalvée, S., Selva, E., Leroy, S., Marquette, C.H., Kowanetz, M., Hedge, P., Punnoose, E., Hofman, P. \(2018\) Detection of PD-L1 in circulating tumor cells and white blood cells from patients with advanced non-small cell lung cancer. Ann Oncol 29\(1\): 193–199](#)
124. [Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T., Takahashi, T. \(2004\) Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. Cancer Res. 64\(11\): 3753–3756](#)
125. [Liu, Z.L., Wang, H., Liu, J., Wang, Z.X. \(2013\) MicroRNA-21 \(miR-21\) expression promotes growth, metastasis, and chemo- or radioresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN. Mol. Cell. Biochem. 372: 35–45](#)
126. [Ulivi, P., Petracci, E., Marisi, G., Baglivo, S., Chiari, R., Billi, M., Canale, M., Pasini, L., Racanicchi, S., Vagheggin, A., Delmonte, A., Mariotti, M., Ludovini, V., Bonafè, M., Crinò, L., Grignani, F. \(2019\) Prognostic Role of Circulating miRNAs in Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. J. Clin Med. 23\(131\)](#)
127. [Yan, H.Z., Wang, W., Du, X., Jiang, X.D., Lin, C.Y., Guo, J.L., Zhang, J. \(2019\) The Expression and Clinical Significance of miRNA-99a and miRNA-224 in Non-Small-Cell Lung Cancer. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 23: 1545–1552](#)
128. [Al-Nedawi, K., Meehan, B., Kerbel, R.S., Allison, A.C., Rak, J. \(2009\) Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 3794-3799](#)
129. [Sheng, M., Dong, Z., Xie, Y. \(2018\) Identification of tumor-educated platelet biomarkers of non-small-cell lung cancer. OncoTargets Ther. 11: 8143–8151](#)
130. [Best, M.G., Sol, N., In 't Veld, S.G.J.G., Vancura, A., Muller, M., Niemeijer, A.N., Fejes, A.V., Tjon Kon Fat, L.A., Huis In 't Veld, A.E., Leurs, C., Le Large, T.Y., Meijer, L.L., Kooi, I.E., Rustenburg, F., Schellen, P., Verschueren, H., Post, E., Wedekind, L.E., Wurdinger, T. \(2017\) Swarm Intelligence-Enhanced Detection of Non-Small Cell Lung Cancer Using Tumor-Educated Platelets. Cancer Cell 32: 238–252](#)
131. [Wang, Z., Yang, J.J., Huang, J., Ye, J.Y., Zhang, X.C., Tu, H.Y., Han-Zhang, H., Wu, Y.L. \(2017\) Lung Adenocarcinoma Harboring EGFR T790M and In Trans C797S Responds to Combination Therapy of First- and Third-Generation EGFR TKIs and Shifts Allelic Configuration at Resistance. J Thorac Oncol. 12: 1723-1727](#)
132. [Arulananda, S., Do, H., Musafir, A., Mitchell, P., Dobrovic, A., John, T. \(2017\) Combination Osimertinib and Gefitinib in C797S and T790M EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer. J Thorac Oncol. 12: 1728-1732](#)
133. [Yang, C.H., Wu, Y.L., Schuler, M., Sebastian, M., Popat, S., Yamamoto, N., Zhou, C., Hu, C.P., O'Byrne, K., Feng, J., Lu, S., Huang, Y., Geater, S., Lee, K.Y., Tsai, C.M., Gorbunova, V., Hirsh, V., Bannouna, J., Sequist, L. \(2015\) Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma \(LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6\): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. Lancet Oncol. 16\(2\): 141-151](#)

134. [Mitsudomi, T., Tsai, C., Shepherd, F.A. \(2015\) AZD9291 in pre-treated T790M positive advanced NSCLC: AURA2 Phase II study. Presented at the 16th World Conference on Lung Cancer. Denver, CO. Abstract 1406](#)
135. [Tan, D.S.W, Seto, T., Leigh, N.B., Riely, G.J., Sequist, L.V., Wolf, E.F., Yang, J.C.H., Matushansky, I., Yu, X., Schmitz, S.F.H., Cui, X., Kim, D.W. \(2015\) First-in-human phase I study of EGF816, a third generation, mutant-selective EGFR tyrosine kinase inhibitor, in advanced non-small cell lung cancer \(NSCLC\) harboring T790M. J Clin Oncol. 33\(8013\)](#)
136. [Khozin, S., Blumenthal, G.M., Jiang, X., He, K., Boyd, K., Murgo, A., Justice, R., Keegan, P., Pazdur, R. \(2014\) U.S. Food and Drug Administration approval summary: Erlotinib for the first-line treatment of metastatic non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor exon 19 deletions or exon 21 \(L858R\) substitution mutations. Oncologist. 19\(7\): 774-779](#)
137. [Park, K., Yu, C.J., Kim, S.W., Lin, M.C., Sriuranpong, V., Tsai, C.M., Lee, J.S., Kang, J.H., Chan, K.C., Perez-Moreno, P., Button, P., Ahn, M.J., Mok, T. \(2016\) First-line erlotinib therapy until and beyond Response Evaluation Criteria in Solid Tumors progression in Asian patients with epidermal growth factor receptor mutation-positive non-small-cell lung cancer: the ASPIRATION study. JAMA Oncol. 2: 305-312](#)
138. [Thress, K.S., Brant, R., Carr, T.H., Dearden, S., Jenkins, S., Brown, H., Hammett, T., Cantarini, M., Barrett, J.C. \(2015\) EGFR mutation detection in ctDNA from NSCLC patient plasma: A cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AZD9291. Lung Cancer 90: 509–515](#)
139. [Sacher, A.G., Paweletz, C., Dahlberg, S.E., Alden, R.S., O’Connell, A., Feeney, N., Mach, S.L., Jänne, P.A., Oxnard, G.R. \(2016\) Prospective validation of rapid plasma genotyping for the detection of EGFR and KRAS mutations in advanced lung cancer. JAMA Oncol. 2: 1014–1022](#)
140. [Zheng, D., Ye, X., Zhang, M.Z., Sun, Y., Wang, J.Y., Ni, J., Zhang, H.P., Zhang, L., Luo, J., Zhang, J., Tang, L., Su, B., Chen, G., Zhu, G., Gu, Y., Xu, J.F. \(2016\) Plasma EGFR T790M ctDNA status is associated with clinical outcome in advanced NSCLC patients with acquired EGFR-TKI resistance. Sci. Rep. 6\(20913\)](#)
141. [Oxnard, G.R., Thress, K.S., Alden, R.S., Lawrence, R., Paweletz, C.P., Cantarini, M., Yang, J.C.-H., Barrett, J.C., Jänne, P.A. \(2016\) Association between plasma genotyping and outcomes of treatment with osimertinib \(AZD9291\) in advanced non-small-cell lung cancer. J. Clin. Oncol. 34: 3375–3382](#)
142. [Douillard, J.Y., Ostoros, G., Cobo, M., Ciuleanu, T., Cole, R., McWalter, G., Walker, J., Dearden, S., Webster, A., Milenkova, T., McCormack, R. \(2014\) Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status. J Thorac Oncol 9: 1345-1353](#)
143. [Mok, T., Wu, Y.L., Lee, J.S., Yu, C.J., Sriuranpong, V., Sandoval-Tan, J., Ladrera, G., Thongprasert, S., Srimuninnimit, V., Liao, M., Zhu, Y., Zhou, C., Fuerte, F., Margono, B., Wen, W., Tsai, J., Truman, M., Klughammer, B., Shames, D.S., Wu, L. \(2015\) Detection and Dynamic Changes of EGFR Mutations from Circulating Tumor DNA as a Predictor of Survival Outcomes in NSCLC Patients Treated with First-line Intercalated Erlotinib and Chemotherapy. Clin Cancer Res 21: 3196-3203](#)
144. [Arcila, M.E., Oxnard, G.R., Nafa, K., Riely, G.J., Solomon, S.B., Zakowski, M.F., Kris, M.G., Pao, W., Miller, V.A., Ladanyi, M. \(2011\) 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 17: 1169-1180](#)

145. [Mok, T.S., Wu, Y.L., Ahn, M.J., Garassino, M.C., Kim, H.R., Ramalingam, S.S., Shepherd, F.A., He, Y., Akamatsu, H., Theelen, W.S.M.E., Lee, C.K., Sebastian, M., Templeton, A., Mann, H., Marotti, M., Ghiorghiu, S., Papadimitrakopoulou, V.A. \(2017\) Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med* 376: 629-640](#)
146. [Jänne, P.A., Yang, J.C., Kim, D.W., Planchard, D., Ohe, Y., Ramalingam, S.S., Ahn, M.J., Kim, S.W., Su, W.C., Horn, L., Haggstrom, D., Felip, E., Kim, J.H., Frewer, P., Cantarini, M., Brown, K.H., Dickinson, P.A., Ghiorghiu, S., Ranson, M. \(2015\) AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 372: 1689-1699.](#)
147. [Marchetti, A., Del Grammastro, M., Felicioni, L., Malatesta, S., Filice, G., Centi, I., De Pas, T., Santoro, A., Chella, A., Brandes, A.A., Venturino, P., Cuccurullo, F., Crinò, L., Buttitta, F. \(2014\) Assessment of EGFR mutations in circulating tumor cell preparations from NSCLC patients by next generation sequencing: toward a real-time liquid biopsy for treatment. *PLOS One* 9: e103883](#)
148. [Breitenbuecher, F., Hoffarth, S., Worm, K., Cortes-Incio, D., Gauler, T.C., Köhler, J., Herold, T., Schmid, K.W., Freitag, L., Kasper, S., Schuler, M. \(2014\) Development of a highly sensitive and specific method for detection of circulating tumor cells harboring somatic mutations in non-small-cell lung cancer patients. *PLOS One* 9: e85350](#)
149. [Sundaresan, T.K., Sequist, L.V., Heymach, J.V., Riely, G.J., Jänne, P.A., Koch, W.H., Sullivan, J.P., Fox, D.B., Maher, R., Muzikansky, A., Webb, A., Tran, H.T., Giri, U., Fleisher, M., Yu, H.A., Wei, W., Johnson, B.E., Barber, T.A., Walsh, J.R., Engelman, J.A., Stott, S.L., Kapur, R., Maheswaran, S., Toner, M., Haber, D.A. \(2016\) Detection of T790M, the Acquired Resistance EGFR Mutation, by Tumor Biopsy versus Noninvasive Blood-Based Analyses. *Clin Cancer Res* 22: 1103-1110](#)
150. [Maheswaran, S., Sequist, L.V., Nagrath, S., Ulkus, L., Brannigan, B., Collura, C.V., Inserra, E., Diederichs, S., Iafrate, A.J., Bell, D.W., Digumarthy, S., Muzikansky, A., Irimia, D., Settleman, J., Tompkins, R.G., Lynch, T.J., Toner, M., Haber, D.A. \(2008\) Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N. Engl. J. Med.* 359: 366–377](#)
151. [Zhang, Q., Nong, J., Wang, J., Yan, Z., Yi, L., Gao, X., Liu, Z., Zhang, H., Zhang, S. \(2019\) Isolation of circulating tumor cells and detection of EGFR mutations in patients with non-small-cell lung cancer. *Oncol. Lett.* 17: 3799–3807](#)
152. [Supplee, J.G., Milan, M.S.D., Lim, L.P., Potts, K.T., Sholl, L.M., Oxnard, G.R., Paweletz, C.P. \(2019\) Sensitivity of next-generation sequencing assays detecting oncogenic fusions in plasma cell-free DNA. *Lung Cancer* 134: 96–99](#)
153. [Wang, Y., Tian, P.W., Wang, W.Y., Wang, K., Zhang, Z., Chen, B.J., He, Y.Q., Li, L., Liu, H., Chuai, S., Li, W.M. \(2016\) Noninvasive genotyping and monitoring of anaplastic lymphoma kinase \(ALK\) rearranged non-small cell lung cancer by capture-based next-generation sequencing. *Oncotarget* 7: 65208–65217](#)
154. [Plagnol, V., Woodhouse, S., Howarth, K., Lensing, S., Smith, M., Epstein, M., Madi, M., Smalley, S., Leroy, C., Hinton, J., De Kievit, F., Musgrave-Brown, E., Herd, C., Baker-Neblett, K., Brennan, W., Dimitrov, P., Campbell, N., Morris, C., Rosenfeld, N., Clark, J., Gale, D., Platt, J., Calaway, J., Jones, G., Forshew, T. \(2018\) Analytical validation of a next generation sequencing liquid biopsy assay for high sensitivity broad molecular profiling. *PLOS ONE* 13: e0193802](#)
155. [Kunimasa, K., Kato, K., Imamura, F., Kukita, Y. \(2019\) Quantitative detection of ALK fusion breakpoints in plasma cell-free DNA from patients with non-small cell](#)

- lung cancer using PCR-based target sequencing with a tiling primer set and two-step mapping/alignment. *PLOS ONE* 14: e0222233
156. [Papadopoulou, E., Tsoulos, N., Tsantikidi, K., Metaxa-Mariatou, V., Stamou, P.E., Kladi-Skandali, A., Kapeni, E., Tsaousis, G., Pentheroudakis, G., Petrakis, D., Lampropoulou, D.I., Aravantinos, G., Varthalitis, I., Kesisis, G., Boukovinas, I., Papakotoulas, P., Katirtzoglou, N., Athanasiadis, E., Stavridi, F., Christodoulou, C., Koumarianou, A., Eralp, Y., Nasioulas, G. \(2019\) Clinical feasibility of NGS liquid biopsy analysis in NSCLC patients. *PLOS ONE* 14: e0226853](#)
 157. [Pailler, E., Adam, J., Barthelemy, A., Oulhen, M., Auger, N., Valent, A., Borget, I., Planchard, D., Taylor, M., Andre', F., Soria, J.C., Vielh, P., Besse, B., Farace, F. \(2013\) Detection of circulating tumor cells harboring a unique ALK rearrangement in ALK-positive non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 31: 2273-2281](#)
 158. [Ilie, M., Long, E., Butori, C., Hofman, V., Coelle, C., Mauro, V., Zahaf, K., Marquette, C.H., Mouroux, J., Paterlini-Bréchet, P., Hofman, P. \(2012\) Institute for Research on Cancer and Ageing \(IRCAN\), INSE et al. ALK-gene rearrangement: a comparative analysis on circulating tumour cells and tumour tissue from patients with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol* 23: 2907-2913](#)
 159. [Nilsson, R.J., Balaj, L., Hulleman, E., Van Rijn, S., Pegtel, D.M., Walraven, M., Widmark, A., Gerritsen, W.R., Verheul, H.M., Vandertop, W.P., Noske, D.P., Skog, J., Würdinger, T. \(2011\) Blood platelets contain tumor-derived RNA biomarkers. *Blood* 118: 3680-3683](#)
 160. [Nilsson, R.J., Karachaliou, N., Berenguer, J., Gimenez-Capitan, A., Schellen, P., Teixido, C., Tannous, J., Kuiper, J.L., Drees, E., Grabowska, M., Van Keulen, M., Heideman, D.A.M., Thunnissen, E., Dingemans, A.M.C., Viteri, S., Tannous, B.A., Drozdowskyj, A., Rosell, R., Smit, E.F., Würdinger, T. \(2016\) Rearranged EML4-ALK fusion transcripts sequester in circulating blood platelets and enable blood-based crizotinib response monitoring in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 7: 1066-1075](#)
 161. [Shaw, A.T., Solomon, B., Kenudson, M.M. \(2011\) Crizotinib and testing for ALK. *J. Natl. Compr. Canc Netw.* 9\(12\): 1335-1341](#)
 162. [Shaw, A.T., Engelman, J.A. \(2013\) ALK in lung cancer: past, present, and future. *J. Clin. Oncol.* 31\(8\): 1105-1111](#)
 163. [Solomon, B.J., Mok, T., Kim, D.W., Wu, Y.L., Nakagawa, K., Mekhail, T., Felip, E., Cappuzzo, F., Paolini, J., Usari, T., Iyer, S., Reisman, A., Wilner, K.D., Tursi, J., Blackhall, F. \(2014\) First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 371\(23\): 2167-2177](#)
 164. [Shaw, A.T., Kim, D.W., Mehra, R., Tan, D.S.W., Felip, E., Chow, L.Q.M., Camidge, R., Vansteenkiste, J., Sharma, S., De Pas, T., Riely, G.J., Solomon, B.J., Wolf, J., Thomas, M., Schuler, M., Liu, G., Santoro, A., Lau, Y.Y., Goldwasser, M., Boral, A.L., Engelman, J.A. \(2014\) Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 370\(13\): 1189-1197](#)
 165. [Mok, T.S., Spigel, D.R., Felip, E., De Marinis, F., Ahn, M.J., Wakelee, H.J.M.G.A., Hida, T., Crino, L., Nishio, M., Scagliotti, G.V., Branle, F., Emeremni, C., Quadrigli, M., Zhang, J., Shaw, A.T. \(2015\) ASCEND-2: A single-arm, open-label, multicenter phase II study of ceritinib in adult patients \(pts\) with ALK-rearranged \(ALK+\) nonsmall cell lung cancer \(NSCLC\) previously treated with chemotherapy and crizotinib \(CRZ\). *J Clin Oncol.* 33\(8059\)](#)
 166. [Felip, E., Orlov, S., Park, K., Yu, C.J., Tsai, C.M., Dols, M.N.C., McKeage, M.J., Su, W.C., Mok, T., Scagliotti, G.V., Spigel, D., Branle, F., Emeremni, C., Quadrigli, M.,](#)

- [Shaw, A.T. \(2015\) ASCEND-3: A single-arm, open-label, multicenter phase II study of ceritinib in ALKi-naïve adult patients \(pts\) with ALK-rearranged \(ALK+\) non-small cell lung cancer \(NSCLC\). J Clin Oncol. 33\(8060\)](#)
167. [Gainor, J.F., Tan, D.S., De Pas, T., Solomon, B.J., Ahmad, A., Lazzari, C., De Marinis, F., Spitaleri, G., Schultz, K., Friboulet, L., Yeap, B.Y., Engelman, J.A., Shaw, A.T. \(2015\) Progression-Free and Overall Survival in ALK-Positive NSCLC Patients Treated with Sequential Crizotinib and Ceritinib. Clin. Cancer Res. 21\(12\): 2745-2752](#)
 168. [Friboulet, L., Li, N., Katayama, R., Lee, C.C., Gainor, J.F., Crystal, A.S., Michellys, P.Y., Awad, M.M., Yanagitani, N., Kim, S., Pferdekemper, A.C., Li, J., Kasibhatla, S., Sun, F., Sun, X., Hua, S., McNamara, P., Mahmood, S., Lockerman, E.L., Fujita, N., Nishio, M., Harris, J.L., Shaw, A.T., Engelman, J.A. \(2014\) The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. Cancer. Discov. 4\(6\): 662-673](#)
 169. [Wolf, J., Seto, T., Han, J.Y., Reguart, N., Garon, E.B., Groen, H.J.M., Tan, D.S.W., Hida, T., De Jonge, M.J., Orlov, S.V., Smit, E.F., Souquet, P.J., Vansteenkiste, J.F., Giovannini, M., Le Mouhaer, S., Robeva, A., Waldron-Lynch, M., Heist, R.S. \(2019\) Capmatinib \(INC280\) in MET1ex14-mutated advanced non-small cell lung cancer \(NSCLC\): efficacy data from the phase II GEOMETRY mono-1 study. J Clin Oncol. 37\(9004\)](#)
 170. [Drilon, A., Laetsch, T.W., Kummar, S., DuBois, S.G., Lassen, U.N., Demetri, G.D., Nathenson, M., Doebele, R.C., Farago, A.F., Pappo, A.S., Turpin, B., Dowlati, A., Brose, M.S., Mascarenhas, L., Federman, N., Berlin, J., El-Deiry, W.S., Baik, C., Deeken, J., Boni, V., Nagasubramanian, R., Taylor, M., Rudzinski, E.R., Meric-Bernstam, F., Sohal, D.P.S., Ma, P.C., Raez, L.E., Hechtman, J.F., Benayed, R., Ladanyi, M., Tuch, B.B., Ebata, K., Cruickshank, S., Ku, N.C., Cox, M.C., Hawkins, D.S., Hong, D.S., Hyman, D.M. \(2018\) Efficacy of larotrectinib in TRK fusion-positive cancers in adults and children. N Engl J Med. 378: 731–739](#)
 171. [Moro-Sibilot, D., Faivre, L., Zalcman, G., Pérol, M., Barlesi, F., Otto, J., Monnet, I., Cortot, A.B., Wislez, M., Lena, H., Mazières, J., Durando, X., Lantuejoul, S., Rouquette, I., McLeer Florin, A., Ferretti, G., Labouret, N.H., Nowak, F., Jimenez, M., Vassal, G. \(2019\) Crizotinib in c-MET- or ROS1-positive NSCLC: results of the AcSé phase II trial. Ann Oncol.](#)
 172. [Planchard, D., Loriot, Y., André, F., Gobert, A., Auger, N., Lacroix, L., Soria, J.C. \(2015\) EGFR-independent mechanisms of acquired resistance to AZD9291 in EGFR T790M-positive NSCLC patients. Ann Oncol. 26: 2073-2078](#)
 173. [Jänne, P.A., Shaw, A.T., Pereira, J.R., Jeannin, G., Vansteenkiste, J., Barrios, C., Franke, F.A., Grinsted, L., Zazulina, V., Smith, P., Smith, D., Crinò, L. \(2013\) Selumetinib plus docetaxel for KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. Lancet Oncol. 14\(1\): 38–47](#)
 174. [Dingemans, A.M., Mellema, W.W., Groen, H.J., Van Wijk, A., Burgers, S.A., Kunst, P.W.A., Thunnissen, E., Heideman, D.A.M., Smit, E.F. \(2013\) A phase II study of sorafenib in patients with platinum-pretreated, advanced \(Stage IIIb or IV\) non-small cell lung cancer with a KRAS mutation. Clin Cancer Res. 19\(3\): 743–751](#)
 175. [Blumenschein, G.R. Jr, Smit, E.F., Planchard, D., Kim, D.W., Cadranet, J., De Pas, T., Dunphy, F., Udud, K., Ahn, M.J., Hanna, N.H., Kim, J.H., Mazieres, J., Kim, S.W., Baas, P., Rappold, E., Redhu, S., Puski, A., Wu, F.S., Jänne, P.A. \(2015\) A randomized phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor trametinib \(GSK1120212\) compared with docetaxel in KRAS-mutant advanced non-small-cell lung cancer \(NSCLC\). Ann Oncol. 26\(5\): 894–901](#)

176. [Yu, H.A., Sima, C.S., Shen, R., Kass, S., Gainor, J., Shaw, A., Hames, M., Iams, W., Aston, J., Lovly, C.M., Horn, L., Lydon, C., Oxnard, G.R., Kris, M.G., Ladanyi, M., Riely, G.J. \(2015\) Prognostic impact of KRAS mutation subtypes in 677 patients with metastatic lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol* 10: 431-437](#)
177. [Lito, P., Solomon, M., Li, L.S., Hansen, R., Rosen, N. \(2016\) Allele-specific inhibitors inactivate mutant KRAS G12C by a trapping mechanism. *Science* 351: 604-608](#)
178. [Drilon, A., Wang, L., Hasanovic, A., Suehara, Y., Lipson, D., Stephens, P., Ross, J., Miller, V., Ginsberg, M., Zakowski, M.F., Kris, M.G., Ladanyi, M., Rizvi, N. \(2013\) Response to Cabozantinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas. *Cancer. Discov.* 3\(6\): 630-635](#)
179. [Pawelczak, C.P., Sacher, A.G., Raymond, C.K., Alden, R.S., O'Connell, A., Mach, S.L., Kuang, Y., Gandhi, L., Kirschmeier, P., English, J.M., Lim, L.P., Jänne, P.A., Oxnard, G.R. \(2016\) Bias-Corrected Targeted Next-Generation Sequencing for Rapid, Multiplexed Detection of Actionable Alterations in Cell-Free DNA from Advanced Lung Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 22: 915-922](#)
180. [Kularatne, B.Y., Lorigan, P., Browne, S., Suvarna, S.K., Smith, M.O., Lawry, J. \(2002\) Monitoring tumour cells in the peripheral blood of small cell lung cancer patients. *Cytometry* 50: 160-167](#)
181. [Pérez-Barrios, C., Sánchez-Herrero, E., García-Simón, N., Barquín, M., Blanco Clemente, M., Provencio, M., Romero, A. \(2021\) ctDNA from body fluids is an adequate source for EGFR biomarker testing in advanced lung adenocarcinoma. *Clin Chem Lab Med* 59\(7\): 1221–1229](#)
182. [Calverley, D.C., Phang T.L., Choudhury Q.G., Gao, B., Oton A.B., Weyant M.J., Geraci M.W. \(2010\) Significant downregulation of platelet gene expression in metastatic lung cancer. *Clin. Transl. Sci.* 3: 227–232](#)
183. [Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Math, M., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P., Varela, I., Phillimore, B., Begum, S., McDonald, N.Q., Butler, A., Jones, D., Raine, K., Latimer, C., Santos, C.R., Nohadani, M., Eklund, A.C., Spencer-Dene, B., Clark, G., Pickering, L., Stamp, G., Gore, M., Szallasi, Z., Downward, J., Futreal, P.A., Swanton, C. \(2012\) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 366: 883–892](#)
184. [Diehl, F., Schmidt, K., Choti, M.A., Romans, K., Goodman, S., Li, M., Thornton, K., Agrawal, N., Sokoll, L., Szabo, S.A., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Diaz, L.A. \(2008\) Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 14: 985–990](#)
185. [Dharajiy, N.G., Grosu, D.S., Farkas, D.H., McCullough, R.M., Almasri, E., Sun, Y., Kim, S.K., Jensen, T.J., Saldivar, J.S., Topol, E.J., Van den Boom, D., Ehrich, M. \(2018\) Incidental detection of maternal neoplasia in noninvasive prenatal testing. *Clin Chem* 64: 329–335](#)
186. [Krimmel, J.D., Schmitt, M.W., Harrell, M.I., Agnew, K.J., Kennedy, S.R., Emond, M.J., Loeb, L.A., Swisher, E.M., Risques, R.A. \(2016\) Ultra-deep sequencing detects ovarian cancer cells in peritoneal fluid and reveals somatic TP53 mutations in noncancerous tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: 6005–6010](#)
187. [Chaudhuri, A.A., Chabon, J.J., Lovejoy, A.F., Newman, A.M., Stehr, H., Azad, T.D., Khodadoust, M.S., Esfahani, M.S., Liu, C.L., Zhou, L., Scherer, F., Kurtz, D.M., Say, C., Carter, J.N., Merriott, D.J., Dudley, J.C., Binkley, M.S., Modlin, L., Padda, S.K., Gensheimer, M.F., West, R.B., Shrager, J.B., Neal, J.W., Wakelee, H.A., Loo, B.W.,](#)

- Alizadeh, A.A., Diehn, M. (2017) Early detection of molecular residual disease in localized lung cancer by circulating tumor DNA profiling. *Cancer Discov* 7: 1394–1403
188. [Tie, J., Kinde, I., Wang, Y., Wong, H.L., Roebert, J., Christie, M., Tacey, M., Wong, R., Singh, M., Karapetis, C.S., Desai, J., Tran, B., Strausberg, R.L., Diaz, L.A., Papadopoulos, N., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Gibbs, P. \(2015\) Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 26: 1715–1722](#)
189. [Siravegna, G., Mussolin, B., Buscarino, M., Corti, G., Cassingena, A., Crisafulli, G., Ponzetti, A., Cremolini, C., Amatu, A., Lauricella, C., Lamba, S., Hobor, S., Avallone, A., Valtorta, E., Rospo, G., Medico, E., Motta, V., Antoniotti, C., Tatangelo, F., Bellosillo, B., Veronese, S., Budillon, A., Montagut, C., Racca, P., Marsoni, S., Falcone, A., Corcoran, R.B., Di Nicolantonio, F., Loupakis, F., Siena, S., Sartore-Bianchi, A., Bardelli, A. \(2015\) Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat Med* 21: 795–801](#)
190. [Hidestrand, M., Stokowski, R., Song, K., Oliphant, A., Deavers, J., Goetsch, M., Simpson, P., Kuhlman, R., Ames, M., Mitchell, M., Tomita-Mitchell, A. \(2012\) Influence of temperature during transportation on cell-free DNA analysis. *Fetal Diagn Ther* 31: 122–128](#)
191. [Potrich, C., Vaghi, V., Lunelli, L., Pasquardini, L., Santini, G.C., Ottone, C., Quaglio, M., Cocuzza, M., Pirri, C.F., Ferracin, M., Negrini, M., Tiberio, P., De Sanctis, V., Bertorellii, R., Pederzollia C. \(2014\) OncomiR detection in circulating body fluids: a PDMS microdevice perspective. *Lab Chip* 14: 4067-4075](#)
192. [Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Haserlat, S.M., Supko, J.G., Haluska, F.G., Louis, D.N., Christiani, D.C., Settleman, J., Haber, D.A. \(2004\) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 350: 2129–2139](#)
193. [Paez, J.G., Jänne, P.A., Lee, J.C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F.J., Lindeman, N., Boggon, T.J., Naoki, K., Sasaki, H., Fujii, Y., Eck, M.J., Sellers, W.R., Johnson, B.E., Meyerson, M. \(2004\) Mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304\(1497\)](#)
194. [Park, E., Shim, H.S. \(2020\) Detection of Targetable Genetic Alterations in Korean Lung Cancer Patients: A Comparison Study of Single-Gene Assays and Targeted Next-Generation Sequencing. *Cancer Res. Treat* 52: 543–551](#)
195. [Devarakonda, S., Rotolo, F., Tsao, M.S., Lanc, I., Brambilla, E., Masood, A., Olausson, K.A., Fulton, R., Sakashita, S., McLeer-Florin, A., Ding, K., Teuff, G.L., Shepherd, F.A., Pignon, J.P., Graziano, S.L., Kratzke, R., Soria, J.C., Seymour, L., Govindan, R., Michiels, S. \(2018\) Tumor Mutation Burden as a Biomarker in Resected Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* 36: 2995–3006](#)