



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ανοσοϊστοχημική Μελέτη του μεταγραφικού παράγοντα INSM1 στον
Μικροκυτταρικό Καρκίνο του Πνεύμονα**

Λιάκου Ζωή

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Σαμαρά Μαρία, Επίκουρος Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής με έμφαση στη Μοριακή Ιστοπαθολογία (Επιβλέπουσα Καθηγήτρια)
- Κουκούλης Γεώργιος, Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής
- Σπελέτας Ματθαίος, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Μοριακή Ιστοπαθολογία.

Λάρισα, Ιούλιος, 2020



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS
Immunohistochemical expression of the transcription factor
INSM1 in small cell lung cancer

By
Liakou Zoi

Advisory committee:

- Samara Maria, Assistant Professor of Pathology with an emphasis in Molecular Histopathology, (Supervisor)
- Koukoulis George, Professor of Pathology
- Speletas Matthaïos, Professor of Medical Immunology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Molecular Histopathology.

Larissa, July, 2020

Συντομογραφίες

ACs	Adenocarcinoma
ASCL1	Achaetescute homolog-like 1
BRN2 (Pou3f2)	BRaiN-specific homeobox/POU domain, class 3, transcription factor 2
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
ChIP	Chromatin Immuno-Precipitation
DAB	3'-Diaminobenzidine
DLL3	Delta like Canonical Notch Ligand 3
EGFR-TKIs	Receptor-tyrosine kinase inhibitors
EWSR1	EWS RNA Binding Protein 1
FNAs	Fine-needle aspirations
FFPET	Formalin-fixed paraffin-embedded tissues
Gata2/3	GATA binding protein 2/3
HDAC-3	Histone deacetylase 3
Hes1	Hairy and enhancer of split- Hes Family BHLH Transcription Factor 1
HIER	Heat Induced Epitope Retrieval
HPFs	High power fields
IA-1	Insulinoma-associated-1
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer
InR	Insulin receptor
LCNEC	Large cell neuroendocrine carcinoma
LCNECs	Large cell neuroendocrine carcinomas
LSD1	Lysine-specific demethylase 1
Mash1	Achaete-scute complex homolog-like 1
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NeuroD/β2	Neurogenic differentiation 1
NeuroD1	Neurogenic differentiation factor 1
Ngn3	Neurogenin 3
NK	Natural killer cells

NLS	Nuclear localization signaling
NORDIQC	Nordic Immunohistochemical Quality Control
NSCLCs	Non–small cell lung cancers
ORF	Open reading frame
Phox2a/b	Paired-like homeobox 2a/b
PNECs	Pulmonary neuroendocrine cells
RACK1	Receptor For Activated C Kinase 1
RB1	Retinoblastoma 1
Riply3	Riply transcription repressor 3
SCLC	Small cell lung cancer
Shh	Sonic hedgehog
SP-A	Surfactant protein-A
SqCCs	Squamous cell carcinoma
TMs	Tissue microarrays
VALSG	Veterans' Administration Lung Study Group
WGS	Whole Genome Sequencing
WHO	World Health Organization
TTF-1	Thyroid transcription factor 1

Abstract

Introduction: Insulinoma-associated protein 1 (INSM1), is a zinc-finger transcription factor, encoded by the gene *INSM1*. It plays a vital role in neuroendocrine differentiation, as a transcriptional repressor and a regulator of the cell cycle. INSM1 is expressed in developing neuroendocrine tissues during embryogenesis but also in neuroendocrine tumours. Recent studies have shown that INSM1 is a sensitive marker for the diagnosis of neuroendocrine tumours.

Aim of the study: The goal of this study was to evaluate INSM1 expression in primary small cell lung carcinomas (SCLCs), in order to evaluate its sensitivity as a marker against NCAM CD56 and synaptophysin markers that are widely used.

Methods: Thirty one SCLC cases were retrieved from the archive of the Pathology Department. Small biopsies (formalin-fixed paraffin-embedded tissues, FFPET), histologically confirmed as SCLC, were used. Immunohistochemical staining with antibodies against INSM1, synaptophysin, CD56, TTF-1, CKAE1/AE3 and MIB1 was performed on the SCLC samples. Evaluation of the immunohistochemical stains was performed semi-quantitatively.

Results: INSM1 immunostaining is characterised by a high sensitivity (31/31, 100%) for the diagnosis of SCLC, compared to other neuroendocrine markers such as synaptophysin and CD56 (29/31, 93.5%). Two SCLC cases were positive for INSM1 but negative, regarding synaptophysin and CD56 immunoexpressions. 24 of the 31 (77.4%) cases of SCLCs showed a strong/diffuse pattern of INSM1, which was better than that of synaptophysin in terms of distribution and intensity. The intensity of nuclear staining on positive cells was high and nonspecific reactions were minimal. Intense cell proliferation was observed, with an index of MIB1 of 80% and above. Pankeratin AE1/AE3 showed the characteristic dot like distribution pattern. Positive immunostaining of TTF-1 was detected in 25/31 (80.6%) of SCLC cases. Nuclear immunostaining of INSM1 was easier to interpret in small biopsies, even in areas where extensive crush artifact is observed.

Conclusion: INSM1 nuclear immunostaining can be a useful and a low cost marker in the diagnosis of SCLCs compared with traditional, cytoplasmic neuroendocrine markers like synaptophysin and CD56.

Keywords: *Neuroendocrine tumors, Small cell lung cancer, Insulinoma-associated protein 1, Synaptophysin, CD56, Immunohistochemistry, Small biopsies.*

Περίληψη

Εισαγωγή: Η πρωτεΐνη INSM1 (Insulinoma-associated protein 1) είναι ένας μεταγραφικό παράγοντας με δακτυλίους ψευδαργύρου που κωδικοποιείται από το γονίδιο *INSM1*. Παίζει σημαντικό ρόλο στη νευροενδοκρινή διαφοροποίηση, ως μεταγραφικός καταστολέας και ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου. Η INSM1 εκφράζεται σε αναπτυσσόμενους νευροενδοκρινικούς ιστούς κατά την εμβρυογένεση και σε νευροενδοκρινείς όγκους. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η INSM1 συνιστά έναν δείκτη με υψηλή ευαισθησία σε νευροενδοκρινείς όγκους.

Σκοπός της μελέτης: Σκοπός της μελέτης ήταν η αξιολόγηση της έκφρασης της INSM1 σε πρωτοπαθή μικροκυτταρικά καρκινώματα του πνεύμονα, (SCLC, small cell lung cancer), έτσι ώστε να εκτιμηθεί η ευαισθησία της, σε σύγκριση με τους δείκτες NCAM CD56 και συναπτοφυσίνη.

Υλικά-Μέθοδοι: Συνολικά 31 δείγματα βιοψιών βρόγχου, μονιμοποιημένων σε φορμόλη και εγκλεισμένων σε παραφίνη ανευρέθηκαν από το αρχείο του εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Λάρισας, από ασθενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένο SCLC. Πραγματοποιήθηκαν ειδικές ανοσοϊστοχημικές χρώσεις με αντισώματα έναντι των δεικτών INSM1, συναπτοφυσίνης, CD56, TTF-1, CKAE1/AE3 και MIB1. Η αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων έγινε ημι-ποσοτικά.

Αποτελέσματα: Η ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι της INSM1 χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία (31/31, 100%) για τη διάγνωση του, σε σύγκριση με τους νευροενδοκρινείς δείκτες της συναπτοφυσίνης και της CD56 (29/31, 93,5%). Δύο θετικές στην INSM1 περιπτώσεις SCLC ήταν αρνητικές ως προς την έκφραση της συναπτοφυσίνης και της CD56. 24 από τα 31 (77,4%) δείγματα SCLCs παρουσίασαν έντονη/διάχυτη έκφραση της INSM1, η οποία ήταν καλύτερη από εκείνη της συναπτοφυσίνης, όσον αφορά τη κατανομή και την ένταση της ανοσοχρώσης. Η ένταση της πυρηνικής χρώσης στα θετικά για την INSM1 κύτταρα ήταν υψηλή ενώ οι μη ειδικές αντιδράσεις ήταν ελάχιστες. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε έντονος κυτταρικός πολλαπλασιασμός με τον δείκτη MIB1 να είναι πάνω από 80%. Η πανκερατίνη AE1/AE3 παρουσίασε το χαρακτηριστικό για το SCLC dot-like περιπυρηνικό πρότυπο κατανομής. Θετική ανοσοχρώση έναντι του TTF-1 ανιχνεύθηκε στο 80,6% (25/31) των δειγμάτων. Η πυρηνική ανοσοχρώση έναντι της INSM1 δίνει τη δυνατότητα ευχερέστερης μελέτης των μικρών ενδοσκοπικών βιοψιών των SCLCs, ακόμα και σε περιοχές που εντοπίζεται εκτεταμένο artifact κυτταρικής σύνθλιψης.

Συμπεράσματα: Η πυρηνική ανοσοχρώση έναντι της INSM1 μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο και οικονομικό εργαλείο για την διάγνωση του SCLC, σε σύγκριση με τους παραδοσιακούς κυτταροπλασματικούς δείκτες όπως είναι η συναπτοφυσίνη και η CD56.

Λέξεις-κλειδιά: Νευροενδοκρινείς όγκοι, μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα,, *Insulinoma-associated protein 1*, συναπτοφυσίνη, CD56, ανοσοϊστοχημεία, μικρές ενδοσκοπικές βιοψίες.

Περιεχόμενα

Συνοτομογραφίες.....	3
Abstract	5
Περίληψη.....	6
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 ΝΕΥΡΟΕΝΔΟΚΡΙΝΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	9
1.2 ΤΟ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ (SCLC)	18
1.3 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΩΝ SCLCS.....	25
1.4 Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ INSM1	28
1.5 Ο ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ INSM1 ΣΤΗ ΝΕΥΡΟΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ	31
1.6 ΈΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ INSM1 ΣΕ ΝΕΥΡΟΕΝΔΟΚΡΙΝΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ.....	38
1.7 ΈΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ INSM1 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ.....	38
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	49
2.1 ΣΚΟΠΟΣ	49
2.2 ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ	49
2.2.1 Υλικό μελέτης	49
2.2.2 Ανοσοϊστοχημεία	49
2.2.3 Μονιμοποίηση ιστών και ιστολογική επεξεργασία	51
2.2.4 Ανοσοϊστοχημική μελέτη	52
2.2.5 Αξιολόγηση ιστολογικών και ανοσοϊστοχημικών χρώσεων	54
3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	55
4.1 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ	69
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	75

Περιεχόμενα εικόνων

Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση του προτεινόμενου ρυθμιστικού μηχανισμού της κυτταρικής διαφοροποίησης στο αναπνευστικό επιθήλιο ποντικών κατά την εμβρυογένεση (Ito et al, 2000).	27
Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση υποθετικού μοντέλου ανάπτυξης SCLC (Meder et al (2016)	28
Εικόνα 3: Δομή του γονιδίου της INSM1 (Lan et al, 2009).	30
Εικόνα 4: Αλληλεπιδράσεις INSM1 σε πρωτεϊνικό και μοριακό επίπεδο (Lan et al, 2009)..	33
Εικόνα 5: Απεικόνιση των ανοσοαντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά τις ανοσοϊστοχημικές τεχνικές (HRP, horseradish peroxidase) (Kim et al, 2016).	51
Εικόνα 6: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, αρχικά σε ενδιάμεση μεγέθυνση 100x.	62
Εικόνα 7: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, σε μεγάλη μεγέθυνση 400x. Παρατηρούμε τη χαρακτηριστική μορφολογία των νεοπλασματικών κυττάρων.	62
Εικόνα 8: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, ανοσοχρώση CKAE1/AE3 (400x).	63
Εικόνα 9: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, ανοσοχρώση CD56 (200x).	63
Εικόνα 10: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, ανοσοχρώση Synaptophysin 400x	64
Εικόνα 11: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, ανοσοχρώση TTF1 (400x).	64
Εικόνα 12: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, ανοσοχρώση MIB1 (400x).	65
Εικόνα 13: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, ανοσοχρώση INSM1 (400x).	65
Εικόνα 14: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, ανοσοχρώση INSM1 (400x).	66
Εικόνα 15: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, ανοσοχρώση συναπτοφυσίνη (400x).	66
Εικόνα 16: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, ανοσοχρώση INSM1 (400x).	67
Εικόνα 17: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, Συναπτοφυσίνη (400x).	67
Εικόνα 18: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, INSM1 400x.	68
Εικόνα 19: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, Συναπτοφυσίνη 400x.	68

Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1: Διαγνωστικά κριτήρια και ταξινόμηση των νευροενδοκρινικών νεοπλασμάτων του πνεύμονα (Karachaliou et al, 2016).	13
Πίνακας 2: Ανοσοϊστοχημικοί δείκτες των νευροενδοκρινικών νεοπλασμάτων του πνεύμονα (Woo et al, 2017).	16
Πίνακας 3: Ταξινόμηση του SCLC (Rekhtman, 2010; Travis et al, 2015).	21
Πίνακας 4: Ποσοστά θετικών ανοσοϊστοχημικών χρώσεων και ευαισθησία των δεικτών INSM1, συναπτοφυσίνη, CD56 και χρωμογρανίνη Α, σε ιστολογικά και κυτταρολογικά δείγματα ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, στις διαφορετικές ανοσοϊστοχημικές μελέτες.	48
Πίνακας 5: Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικών χρώσεων στις μικρές ενδοσκοπικές βιοψίες βρόχου ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.	59
Πίνακας 6: Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικών χρώσεων των δεικτών INSM1, συναπτοφυσίνης, CD56 και TTF-1 στις μικρές ενδοσκοπικές βιοψίες βρόχου ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.	60
Πίνακας 7: Ευαισθησία των ανοσοϊστοχημικών δεκτών INSM1, synaptophysin, CD56 και TTF-1 σε μικροκυτταρικά καρκινώματα πνεύμονα.	60

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί τη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο σε παγκόσμιο επίπεδο, σε άνδρες και γυναίκες. Στους κύριους παράγοντες κινδύνου συγκαταλέγονται το κάπνισμα (ενεργητικό, παθητικό), η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, η επαγγελματική έκθεση σε καρκινογόνους παράγοντες (αμίαντος, καύσιμα μηχανών εσωτερικής καύσης, βηρύλλιο, χρώμιο, κάδμιο, φορμαλδεΐδη, νικέλιο), η περιβαλλοντική έκθεση σε αυξημένη συγκέντρωση μικρών αιωρούμενων σωματιδίων και ραδονίου στον ατμοσφαιρικό αέρα και αρσενικού στο πόσιμο νερό. Επιπρόσθετα, η διατροφή αλλά και γενετικοί παράγοντες συνεισφέρουν περαιτέρω στην εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα (Barta et al, 2019).

Ο καρκίνος του πνεύμονα ταξινομείται σε δύο κύριες ομάδες, τον μικροκυτταρικό (small-cell lung cancer, SCLC) και τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (non-small-cell lung cancer, NSCLC). Ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα περιλαμβάνει 3 κυρίως υπότυπους: το αδενοκαρκίνωμα (adenocarcinoma, AC), το πλακώδες καρκίνωμα (squamous cell carcinoma, SqCC) και το καρκίνωμα από μεγάλα κύτταρα (large-cell lung carcinoma). Το μικροκυτταρικό καρκίνωμα συγκαταλέγεται μαζί με άλλους ιστολογικούς τύπους στα νευροενδοκρινικά νεοπλάσματα του πνεύμονα (Travis et al, 2015).

Τα SCLC συνιστούν περίπου το 15% του συνόλου των καρκινωμάτων του πνεύμονα και παρουσιάζουν διακριτά ιστοπαθολογικά, βιολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά έναντι των άλλων τύπων καρκινωμάτων του πνεύμονα. Οι ασθενείς με SCLCs, έχουν συνήθως ήδη μεταστάσεις τη στιγμή της διάγνωσης. Επιπρόσθετα, τα SCLCs, παρουσιάζουν αρχικά απόκριση στην κυτταροτοξική θεραπεία, ωστόσο στη συνέχεια υποτροπιάζουν και αναπτύσσουν ανοχή στη θεραπεία. Μέχρι σήμερα, εδώ και 30 έτη, δεν έχουν αναπτυχθεί νέες θεραπευτικές προσπελάσεις, και σημαντικός ανασταλτικός παράγοντας για τη μελέτη των καρκινωμάτων αυτών αποτελεί η μειωμένη διαθεσιμότητα των εν λόγω ιστών (Gazdar et al, 2017).

Η πρωτεΐνη INSM1 (Insulinoma-Associated protein 1) είναι ένας μεταγραφικός καταστολέας με δομή δακτυλίων ψευδαργύρου, που συνιστά ένα δείκτη νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης. Απομονώθηκε αρχικά από φυσιολογικό ανθρώπινο παγκρεατικό ιστό και από κυτταροκαλλιέργειες ινσουλινώματος ποντικών (Goto et al, 1992). Η πυρηνική έκφραση της INSM1 έχει παρατηρηθεί σε νευροενδοκρινικά νεοπλάσματα ποικίλων ιστών συμπεριλαμβανομένων του παγκρέατος (Tanigawa et al, 2017), της κεφαλής και του τραχήλου (Rooper et al, 2018), του προστάτη (Xin et al, 2018) και του τραχήλου της μήτρας (Kuji et al, 2017), με υψηλά ποσοστά διαγνωστικής ευαισθησίας και ειδικότητας. Όσο αφορά τα πρωτοπαθή νευροενδοκρινή νεοπλάσματα του πνεύμονα, η INSM1 φαίνεται να αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο διαγνωστικό δείκτη με υψηλή ευαισθησία (92-97%) και υψηλή ειδικότητα (96 έως 100%) (Fujino et al, 2015; Kriegsmann et al, 2018; Rodriguez et al, 2018; Doxtader et al, 2018; Mukhopadhyay et al, 2019).

Τα υψηλά ποσοστά ειδικότητας και ευαισθησίας ώθησαν αρκετούς ερευνητές να προτείνουν την INSM1 πρωτεΐνη ως έναν ανεξάρτητο δείκτη νευροενδοκρινούς διαφοροποίησης (Rooper et al, 2017). Η ανοσοθετικότητα της INSM1 έχει αναφερθεί σε μικρό αριθμό SCLC, τα οποία είναι αρνητικά σε άλλους νευροενδοκρινούς δείκτες (Rooper et al, 2017). Επιπρόσθετα, υψηλή ευαισθησία της INSM1 έχει καταγραφεί σε κυτταρολογικά δείγματα (Doxtader et al, 2018; Rodriguez et al, 2018; Nakra et al, 2019).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανοσοϊστοχημική εκτίμηση της INSM1 ως διαγνωστικός δείκτης σε βιοψίες βρόγχου χαρακτηρισμένες ως SCLC και η σύγκρισή της με τους συνήθεις νευροενδοκρινικούς δείκτες, συναπτοφυσίνη και CD56, που εφαρμόζονται στη εργαστηριακή πρακτική.

1.1 ΝΕΥΡΟΕΝΔΟΚΡΙΝΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Οι νευροενδοκρινείς όγκοι συνιστούν μία σχετικά ετερογενή ομάδα νεοπλασμάτων που προέρχονται από πολυδύναμα αρχέγονα εκτοδερμικά κύτταρα. Τα κοινά χαρακτηριστικά των συγκεκριμένων νεοπλασμάτων περιλαμβάνουν τη νευροενδοκρινική μορφολογία (οργάνωση σε νησίδες), την ανοσοϊστοχημική έκφραση δεικτών νευροενδοκρινούς διαφοροποίησης και τον εντοπισμό στο κυτταρόπλασμα εκκριτικών κυστιδίων (Kaltsas et al, 2004).

Οι νευροενδοκρινείς όγκοι του πνεύμονα αντιπροσωπεύουν το 10-15% περίπου του συνόλου των πρωτοπαθών πνευμονικών νεοπλασμάτων. Τα καθοριστικά χαρακτηριστικά τους, περιλαμβάνουν την παρουσία νευροενδοκρινικών μορφολογικών χαρακτηριστικών, όπως στικτή κοκκώδη χρωματίνη, απουσία εμφανών πυρηνίων και νευροενδοκρινική αρχιτεκτονική δομή που περιλαμβάνει οργανοειδές πρότυπο ανάπτυξης και τη δημιουργία ροζετών και δοκίδων, ενώ είναι χαρακτηριστική η έντονη αγγείωση (Rekhtman, 2010).

Η ξεχωριστή ταξινόμηση των νευροενδοκρινών όγκων του πνεύμονα σε 4 ομάδες έγινε για πρώτη φορά από τους Travis et al (1998) και βασίστηκε στα μορφολογικά χαρακτηριστικά, τον αριθμό των μιτώσεων και την παρουσία νεκρώσεων. Η ταξινόμηση αυτή υιοθετήθηκε και διατηρήθηκε σε μεγάλο βαθμό από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) μέχρι και την τελευταία ταξινόμηση των όγκων του πνεύμονα (Travis et al, 2015). Έτσι, τα νευροενδοκρινή νεοπλάσματα του πνεύμονα κατηγοριοποιούνται, βάσει των μορφολογικών χαρακτηριστικών, του μιτωτικού δείκτη και της έκφρασης νευροενδοκρινικών δεικτών, στο χαμηλής κακοηθείας τυπικό καρκινοειδές (typical carcinoid), στο ενδιάμεσου βαθμού κακοηθείας άτυπο καρκινοειδές (atypical carcinoid) και στους υψηλής κακοηθείας όγκους, το μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα (Large cell neuroendocrine carcinoma, LCNEC) και το μικροκυτταρικό καρκίνωμα (Small cell lung cancer, SCLC). Τα LCNEC και SCLC καρκινώματα παρουσιάζουν υψηλότερη μιτωτική δραστηριότητα, περισσότερη νέκρωση και πολύ περισσότερες γενετικές διαταραχές συγκριτικά με τα καρκινοειδή νεοπλάσματα (Travis et al, 2015; Pelosi et al, 2017).

Το τυπικό καρκινοειδές διαθέτει χαρακτηριστικά καρκινοειδούς, λιγότερες από 2 μιτώσεις ανά 10 οπτικά πεδία (High Power Fields, HPFs), είναι μεγαλύτερο από 0,5 εκατοστά ενώ δεν παρουσιάζει νεκρώσεις. Το άτυπο καρκινοειδές έχει τα μορφολογικά χαρακτηριστικά καρκινοειδούς, 2-10 μιτώσεις ανά 10 HPFs, ή παρουσία νεκρώσεων. Το LCNEC χαρακτηρίζονται από υψηλή μιτωτική δραστηριότητα (περισσότερες από 10 μιτώσεις ανά 10 HPFs), μεγάλα σε μέγεθος κύτταρα πολυγωνικού σχήματος με άφθονο πρωτόπλασμα και προέχον πυρήνιο, νευροενδοκρινική μορφολογία (οργανοειδές πρότυπο ανάπτυξης-ροζέττες), ανοσοϊστοχημική έκφραση ειδικών νευροενδοκρινικών δεικτών και νεκρώσεις σε μεγάλη έκταση. Το SCLC χαρακτηρίζεται από κύτταρα με λιγιστό κυτταρόπλασμα, λεπτοκοκκιώδη υφή

χρωματίνης, απουσία πυρηνίου, υψηλή μιτωτική δραστηριότητα >11 ανά 2 mm² (10 HPF) και εκτεταμένη νέκρωση (Travis et al, 2015).

Τα άτομα με καρκινοειδή είναι νεότερα σε ηλικία, έχουν καλύτερη πρόγνωση και δεν παρουσιάζουν συσχέτιση με το κάπνισμα, σε αντίθεση με τα SCLC και LCNEC καρκινώματα. Η χαρακτηριστική ανάπτυξη των καρκινοειδών (τυπικά και άτυπα) είναι ενδοβρογχική και μπορεί να εντοπίζονται τόσο κεντρικά όσο και περιφερειακά. Σε σύγκριση με τα καρκινοειδή, τα SCLC και LCNEC καρκινώματα παρουσιάζουν υψηλότερη μιτωτική δραστηριότητα και νεκρώσεις και μπορεί να συνυπάρχουν με άλλους τύπους καρκίνου του πνεύμονα όπως το αδenoκαρκίνωμα και το πλακώδες καρκίνωμα. Αντιθέτως, τα καρκινοειδή δεν συναντώνται σε συνδυασμό με άλλα καρκινώματα, σε αντίθεση με τα νευροενδοκρινικά καρκινώματα υψηλής κακοηθείας. Επιπρόσθετα, τα καρκινοειδή χαρακτηρίζονται από λιγότερες γενετικές ανωμαλίες σε σχέση με τα SCLC και LCNEC. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, τα SCLC και τα καρκινοειδή μπορούν να διαγνωστούν με τη χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης και σε καλώς διατηρημένα κυτταρολογικά υλικά. Ωστόσο η ανοσοϊστοχημεία μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στη διάγνωση των νευροενδοκρινικών νεοπλασμάτων του πνεύμονα (Travis et al, 2015).

Πίνακας 1: Διαγνωστικά κριτήρια και ταξινόμηση των νευροενδοκρινικών νεοπλασμάτων του πνεύμονα (Karachaliou et al, 2016).

Κριτήρια	Τυπικό καρκινοειδές	Άτυπο καρκινοειδές	Μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα	Μικροκυτταρικό καρκίνωμα
Βαθμός κακοήθειας (grade)	Χαμηλής	Ενδιάμεσης	Υψηλής	Υψηλής
Μορφολογία	Καλώς διαφοροποιημένο	Καλώς διαφοροποιημένο	Χαμηλής διαφοροποίησης	Χαμηλής διαφοροποίησης
Μιτώσεις ανά 10 οπτικά πεδία (high power fields, HPFs)	<2	2–10	>10 (διάμεση τιμή 70)	>10 (διάμεση τιμή 80)
Νέκρωση	Καμία	Παρούσα (εστιακά)	Παρούσα (εκτεταμένη)	Παρούσα (εκτεταμένη)

Η διάγνωση των νευροενδοκρινικών νεοπλασμάτων του πνεύμονα και η διάκρισή τους από τα μη μικροκυτταρικά νεοπλάσματα, (Non–small cell lung cancers, NSCLCs), (αδενοκαρκινώματα, πλακώδη καρκινώματα, μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα) είναι κρίσιμη, καθώς παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στη θεραπευτική τους προσέγγιση (Zappa & Mousa, 2016).

Η διαφορική διάγνωση σε χειρουργικά παρασκευάσματα δεν είναι δύσκολη. Με τη βοήθεια του αξονικού τομογράφου και τη χρήση βιοψίας δια βελόνης (fine-needle aspiration, FNA), επιτυγχάνεται η διάγνωση των νεοπλασμάτων του πνεύμονα προεγχειρητικά σε δείγματα βιοψιών ή σε υλικό FNA. Ωστόσο, τα υλικά αυτά χαρακτηρίζονται ενδεχομένως από μικρό αριθμό νεοπλασματικών κυττάρων και από απύεση ή ελάχιστη διαταραγμένη αρχιτεκτονική, επιτρέποντας την πιθανή σύγχυση των πρωτοπαθών νευροενδοκρινικών νεοπλασμάτων με τα NSCLC καρκινώματα. Ορισμένα παραδείγματα χάριν χαμηλής διαφοροποίησης αδενοκαρκινώματα ενδέχεται να σχηματίζουν φωλιές με μη διακριτή αδενική αρχιτεκτονική ή παραγωγή βλέννης, γεγονός που ενδεχομένως δυσκολεύει τη διάκρισή τους από ορισμένους νευροενδοκρινικούς όγκους του πνεύμονα. Η ανοσοϊστοχημεία μπορεί να συμβάλει σημαντικά στην ταξινόμηση των νεοπλασμάτων του πνεύμονα σε βιοπτικό υλικό (Zhang et al, 2014).

Οι παραδοσιακοί ανοσοϊστοχημικοί δείκτες της νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες χρωμογρανίνη, συναπτοφυσίνη και την πρωτεΐνη κυτταρικής προσκόλλησης των νευρικών κυττάρων CD56 (Neural cell

adhesion molecule, NCAM), που χαρακτηρίζονται από ποικίλη διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα στα νευροενδοκρινικά νεοπλάσματα του πνεύμονα (Filosso et al, 2018). Πρέπει να σημειωθεί ότι ένα ποσοστό της τάξης 10-20% των NSCLCs παρουσιάζουν νευροενδοκρινικό φαινότυπο και εκφράζουν θετική ανοσοχρώση των νευροενδοκρινικών δεικτών σε μικρό αριθμό κυττάρων (Feng et al, 2016). Επιπλέον, έχει σημειωθεί ότι σε μικρό ποσοστό ασθενών (14%) με αδenoκαρκίνωμα του πνεύμονα (NSCLC) και μεταλλάξεις στο γονίδιο του EGFR υποδοχέα, μπορεί να παρατηρηθεί φαινοτυπική μετατροπή σε SCLC, που συνιστά έναν πιθανό μηχανισμό ανάπτυξης ανθεκτικότητας στη θεραπεία με αναστολείς EGFR τυροσινικής κινάσης (receptor-tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKIs) (Oser et al, 2015).

Σύμφωνα με την ισχύουσα ταξινόμηση κατά WHO (World Health Organization), οι πρωτεΐνες συναπτοφυσίνη, χρωμογρανίνη A, και CD56 χρησιμοποιούνται ως νευροενδοκρινικοί δείκτες. Ειδικότερα, προτείνεται η χρήση και των τριών δεικτών σε ανοσοϊστοχημικό πάνελ, για τον προσδιορισμό των νευροενδοκρινικών όγκων με όριο θετικής ανοσοχρώσης ποσοστό της τάξης του 10% των νεοπλασματικών κυττάρων (Travis et al, 2017). Οι νευροενδοκρινικοί δείκτες συναπτοφυσίνη, χρωμογρανίνη A και CD56 παρουσιάζουν περιορισμένη ευαισθησία και ειδικότητα. Συγκεκριμένα, η συναπτοφυσίνη και η CD56 πρωτεΐνη παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία αλλά μικρότερη ειδικότητα, ενώ η χρωμογρανίνη A, αν και είναι πιο ειδική, παρουσιάζει περιορισμένη ευαισθησία, όσον αφορά την εφαρμογή τους σε νευροενδοκρινικά καρκινώματα του πνεύμονα. Επιπρόσθετα, η κυτταροπλασματική κατανομή των χρώσεων αυτών ενδεχομένως να είναι δύσκολο να διακριθεί όταν είναι εστιακή κι ασθενής (Rooper et al, 2017).

Η χρωμογρανίνη A είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 48 kDa, που εντοπίζεται στα υψηλής πυκνότητας εκκριτικά κυστίδια των νευροενδοκρινικών κυττάρων. Η χρωμογρανίνη A αποτελεί πρόδρομο μόριο των 439 αμινοξέων για έναν αριθμό βιολογικά ενεργών πεπτιδίων όπως είναι η αγγειοστατίνη I, που έχει αντιδρενεργική δράση, η παραστατίνη, η οποία αναστέλλει την έκκριση της παραθυρεοειδικής ορμόνης ως απόκριση σε χαμηλά επίπεδα ασβεστίου και η παγκρεαστατίνη, που ασκεί ανασταλτική δράση στην έκκριση ινσουλίνης που επάγεται από την αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα και η κατεστατίνη, που αναστέλλει την έκκριση των κατεχολαμινών από τα χρωμόφιλα κύτταρα. Στην κλινική πράξη, οι ψευδώς θετικές περιπτώσεις είναι σπάνιες, ενώ τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα είναι συχνά λόγω της χαμηλής ευαισθησίας των διαθέσιμων στο

εμπόριο αντισωμάτων ή της απουσίας πυκνών κοκκίων σε όγκους χαμηλής διαφοροποίησης (Gut et al, 2016).

Η συναπτοφυσίνη συνιστά μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη των συναπτικών κυστιδίων με μοριακό βάρος 38 Kda που εντοπίζεται σε όλες σχεδόν τις συνάψεις και είναι υψηλά συντηρημένη μεταξύ των διαφορετικών ειδών θηλαστικών. Η συναπτοφυσίνη αλληλεπιδρά με πλήθος νευροτελικών πρωτεϊνών και προηγούμενες μελέτες υποστηρίζουν το ρόλο της συναπτοφυσίνης στην απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών (Valtorta et al, 2004).

Η CD56 είναι μια επιφανειακή γλυκοπρωτεΐνη που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εμβρυογένεση του εγκεφάλου και άλλων ιστών και οργάνων. Στους ενήλικες, εντοπίζεται στο νευρικό σύστημα (εγκέφαλος και παρεγκεφαλίδα), στις νευρομυϊκές συνάψεις καθώς και στα νευροενδοκρινικά όργανα. Στον αιμοποιητικό ιστό, παρατηρείται έκφραση της CD56, στα NK- λεμφοκύτταρα (Natural killer cells). Το εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου της, που εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 11q13 οδηγεί στην έκφραση τριών κύριων ισομορφών που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τα ενδοκυττάρια τμήματά τους και τη σύνδεσή τους με την κυτταρική μεμβράνη (CD56120kD, CD56140kD, CD56180kD) (Gattenlöhner et al, 2009). Το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της CD56 πρωτεΐνης παρουσιάζει υψηλή διαγνωστική αξία και μεγάλη ευαισθησία στη διάγνωση των νευροενδοκρινικών νεοπλασμάτων του πνεύμονα (Mlika et al, 2014).

Πίνακας 2: Ανοσοϊστοχημικοί δείκτες των νευροενδοκρινικών νεοπλασμάτων του πνεύμονα (Woo et al, 2017).

Ανοσοχρώση	Τυπικό Καρκινοειδές	Άτυπο καρκινοειδές	Μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα	Μικροκυτταρικό καρκίνωμα
AE1/AE3*	+	+	+	+
CAM5.2	+/-	+/-	+	+
CK7	-	-	+	+/-
CK20	-	-	-	-
CD56*	+	+	+/-	+
Synaptophysin*	+	+	+	+/-
Χρωμογρανίνη Α*	+	+	+/-	+/-
TTF1*	-	-	+	+
Ki-67*	≤5%	≤20%	40-80%	50-100%

*: συνηθέστεροι δείκτες με υψηλή διαγνωστική αξία

Ο θυρεοειδικός μεταγραφικός παράγοντας -1 (Thyroid Transcription factor 1, TTF-1) μεγέθους 38 kDa ενεργοποιεί την έκφραση επιλεκτικών γονιδίων στον θυρεοειδή, στον πνεύμονα και στον εγκέφαλο. Ο TTF-1 παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της εμβρυικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης (Huang et al, 2017). Στον πνεύμονα, η έκφραση της TTF-1 πρωτεΐνης περιορίζεται στα πνευμονοκύτταρα τύπου II. Η TTF-1 πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για την έκφραση των γονιδίων των επιφανειοδραστικών πρωτεϊνών A, B και C (surfactant protein-A, SP-A; surfactant protein-B, SP-B; surfactant protein-C, SP-C), της εκκριτικής πρωτεΐνης των κυττάρων Clara (Clara cell secretory protein, CCSP) και του συνδεδεμένου με ATP πρωτεϊνικού μεταφορέα ABCA3 (ATP-binding-cassette transporter A3, ABCA3) (Zhou et al, 2001). Η TTF-1 πρωτεΐνη αποτελεί διαγνωστικό δείκτη με υψηλή ευαισθησία, κυρίως για τα αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα και τα SCLCs, ενώ αποτελεί αξιόπιστο προγνωστικό δείκτη για την ολική επιβίωση και την επιβίωση ελεύθερης νόσου σε σταδίου IV ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα (Parke et al, 2019). Η ευαισθησία του TTF-1 δείκτη, στα LCNECs κυμαίνεται από 37.5%, έως 75%. Στα τυπικά και στα άτυπα καρκινοειδή του πνεύμονα, η ευαισθησία του TTF-1 κυμαίνεται από 0 έως 100% (Zamecnik et al, 2002; Du et al, 2004). Σημειώνεται ότι η ανοσοθετικότητα είναι υψηλότερη στα SCLC (>90%), σε σχέση με τα αδενοκαρκινώματα (70%) (Phelps et al, 2018).

Στους νευροενδοκρινικούς όγκους του πνεύμονα, η ανοσοχρώση AE1/AE3 χρησιμοποιείται για να επιβεβαιώσει ή να αποκλείσει την επιθηλιακή προέλευση του όγκου (Rekhtman et al, 2010). Το αντίσωμα έναντι της πανκρατίνης AE1/AE3 αποτελείται από ένα μίγμα αντισωμάτων που αναγνωρίζουν μια ευρεία ποικιλία κερατινών διαφορετικών μοριακών βαρών. Συγκεκριμένα, η κερατίνη AE1 αναγνωρίζει όξινες κυτοκερατίνες (CK10, CK15, CK16, CK19) ενώ η κερατίνη AE3 αναγνωρίζει βασικές κυτοκερατίνες (CK1-CK8).

Ο δείκτης μιτωτικής δραστηριότητας Ki-67 είναι σημαντικός στη ταξινόμηση των νευροενδοκρινών όγκων του πνεύμονα. Πρόκειται για μια πυρηνική πρωτεΐνη μεγέθους 359kD, με σύντομο χρόνο ημιζωής που συνδέεται στο DNA. Η πρωτεΐνη κωδικοποιείται από το γονίδιο MKI67 που εδράζεται στη χρωμοσωμική θέση 10q26.2 (Pelosi et al, 2014). Η πρωτεΐνη Ki-67 παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο και τον χρονισμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού καθώς εκφράζεται σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων που πολλαπλασιάζονται εκτός της φάσης G₀ και στις φάσεις επιδιόρθωσης του DNA. Το μονοκλωνικό αντίσωμα MIB-1 θεωρείται ως το πιο αξιόπιστο για την αναγνώριση του Ki-67 σε ιστολογικό υλικό και έχει αξιολογηθεί σε πλήθος μελετών (Chirieac et al, 2016).

Ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 χρησιμοποιείται για τη διάκριση των υψηλής κακοήθειας SCLC και LCNEC καρκινωμάτων από τα καρκινοειδή σε μικρές βιοψίες που ενδεχομένως φέρουν θρυμματισμένα και/ή νεκρωτικά κύτταρα (Travis et al, 2015).

1.2 ΤΟ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ (SCLC)

Το μικροκυτταρικό καρκίνωμα (small cell lung cancer, SCLC) αφορά σε νευροενδοκρινικό νεόπλασμα, με ιδιαίτερα επιθετική βιολογική συμπεριφορά. Ενδοπνευμονικά, ο όγκος τυπικά επεκτείνεται κατά μήκος των βρόγχων, υποβλεννογονίως και κυκλοτερώς, με συχνή συμμετοχή λεμφαγγείων. Το SCLC συνιστά το ~15% των νεοπλασμάτων του πνεύμονα ενώ σχετίζεται με το κάπνισμα σε σημαντικό βαθμό. Το SCLC απαιτεί διαφορετική κλινική και χημειοθεραπευτική διαχείριση σε σύγκριση με άλλα νευροενδοκρινή και μη νευροενδοκρινή νεοπλάσματα του πνεύμονα (Filosso et al, 2018).

Το SCLC σταδιοποιείται σε περιορισμένη (Limited Disease, LD) ή εκτεταμένη νόσο (Extended Disease, ED), σύμφωνα με τις συστάσεις κατά VALSG (Veterans' Administration Lung Study Group). Ειδικότερα, η LD εντοπίζεται στον έναν πνευμονικό λοβό, στο μεσοθωράκιο ή/και στους κοντινούς λεμφαδένες ενώ στην ED, το SCLC εντοπίζεται στον άλλο πνευμονικό λοβό, σε πιο μακρινούς λεμφαδένες και απομακρυσμένα όργανα. Η προαναφερθείσα διάκριση του SCLC έχει κλινική σημασία καθώς οι ασθενείς με εκτεταμένη νόσο λαμβάνουν μόνο χημειοθεραπεία ενώ στους ασθενείς με περιορισμένη νόσο χορηγείται συνδυασμός ακτινοθεραπείας και χημειοθεραπείας. Η σταδιοποίηση του SCLC περιλαμβάνει τη διενέργεια αξονικής τομογραφίας θώρακα και κοιλιάς, αξονική ή μαγνητική εγκεφάλου και οστική σάρωση (Kalemkerian, 2012).

Εξαιτίας του επιπολασμού και της θνησιμότητας του σε παγκόσμιο επίπεδο, το SCLC αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας. Υπολογίζεται ότι πάνω από 200,000 άτομα πεθαίνουν από SCLC, κάθε χρόνο παγκοσμίως. Σύμφωνα με πρόσφατα επιδημιολογικά στοιχεία, το ποσοστό πενταετούς επιβίωσης των ασθενών με SCLC ήταν 6.5% ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τους ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (non-small cell lung cancer, NSCLC) ήταν 22.1% (Dayen et al, 2017).

Η δυσμενής πρόγνωση αντανακλά την ταχεία ανάπτυξη των SCLC, την υψηλή τάση για εξάπλωση, δίνοντας μεταστάσεις στους λεμφαδένες και σε απομακρυσμένα όργανα και το γεγονός ότι οι περισσότεροι ασθενείς βρίσκονται σε προχωρημένο στάδιο της νόσου κατά την διάγνωση τους, με το 60% -65% να παρουσιάζουν ήδη μεταστάσεις σε περιοχές όπως είναι τα οστά, ο εγκέφαλος, το ήπαρ (Inoue et al, 2012). Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν κόπωση, βήχα, δύσπνοια, μείωση της όρεξης, απώλεια βάρους, πόνο

και αιμόπτυση. Οι μέθοδοι απεικόνισης του θώρακα, αναδεικνύουν την παρουσία μάζας μεγάλου μεγέθους η οποία διηθεί ή πιέζει το μεσοθωράκιο με συνυπάρχουσα λεμφαδενοπάθεια. Στο 10% των ασθενών με SCLC παρουσιάζεται σύνδρομο συμπίεσης της άνω κοίλης φλέβας (Travis, 2010). Επιπλέον, παρατηρούνται παρανεοπλαστικά σύνδρομα σε ασθενείς με SCLC όπως το σύνδρομο Cushing's, το σύνδρομο της απρόσφορης έκκρισης αντιδιουρητικής ορμόνης και νευρολογικά παρανεοπλαστικά σύνδρομα όπως οι αυτοάνοσες νευροπάθειες και η εγκεφαλομυελίτιδα (Kanaji et al, 2014).

Η πρώτη γραμμής θεραπεία στα προχωρημένου σταδίου SCLC είναι η χημειοθεραπεία με πλατίνα. Ωστόσο, τα SCLC καρκινώματα συνιστούν ένα ετερογενές νόσημα που περιλαμβάνει χημειοευαίσθητους και χημειοανθεκτικούς κλώνους. Για το λόγο αυτό, ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών ενώ αρχικά ανταποκρίνονται στη χημειοθεραπεία, αναπτύσσουν χημειοανθεκτικότητα, υποτροπιάζουν και τελικά καταλήγουν (Bernhardt & Jalal, 2016). Η έκβαση της νόσου παραμένει φτωχή με τη μέση ολική επιβίωση να κυμαίνεται περίπου στους 10 μήνες (Farago et al, 2018). Τα SCLCs παρουσιάζουν υψηλό φορτίο μεταλλάξεων, γεγονός που καθιστά τους συγκεκριμένους όγκους ονοσογόνους με πιθανή ανταπόκριση σε αναστολείς του ανοσοποιητικού συστήματος (Rizvi et al, 2018).

Η πρόσφατη ενσωμάτωση του μονοκλωνικού αντισώματος ατεζολιζουμάμπη (atezolizumab), ενός μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του PD-L1 συνδέτη (Programmed Death-Ligand 1) ως θεραπεία πρώτης γραμμής για τα προχωρημένου σταδίου SCLCs είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της μέσης επιβίωσης από 10.3 σε 12.3 μήνες, γεγονός που καθιστά την ανοσοθεραπεία πολλά υποσχόμενη στα SCLC καρκινώματα (Horn et al, 2018).

Δύο θεραπευτικές επιλογές που εγκρίθηκαν από τον FDA για τη θεραπευτική αντιμετώπιση των προχωρημένου σταδίου SCLCs είναι η τοποτεκάνη (topotecan) και η νιβολουμάμπη (nivolumab). Η τοποτεκάνη αναστέλλει την τοποϊσομεράση I, ένα ένζυμο απαραίτητο για τον αναδιπλασιασμό του DNA και εφαρμόζεται ως θεραπεία δεύτερης γραμμής σε SCLC που έχουν παρουσιάσει υποτροπή, με υψηλή τοξικότητα ωστόσο. Η νιβολουμάμπη είναι ένα ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα IgG4 ανοσοσφαιρίνης που προσδένεται στον PD-1 υποδοχέα και αναστέλλει την αλληλεπίδραση με τους PD-L1 και PD-L2 συνδέτες. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες η νιβολουμάμπη φαίνεται να έχει θετική επίδραση σε ποσοστό της τάξης του 15% των ασθενών με μεταστατικό SCLC (Horita et al, 2015; Ready et al, 2018).

Το SCLC χαρακτηρίζεται ιστολογικά από διάχυτη ανάπτυξη νεοπλασματικών κυττάρων, τα οποία είναι στρογγυλά, ωσειδή και ατρακτόμορφα και έχουν μικρό μέγεθος, περίπου δυο με τρεις φορές μεγαλύτερο από το φυσιολογικό λεμφοκύτταρο. Στην κλασσική μορφή του, τα κύτταρα έχουν ελάχιστο κυτταρόπλασμα, δυσδιάκριτα κυτταρικά όρια, και λεπτοκοκκιώδη κατανομή της πυρηνικής χρωματίνης, δίχως εμφανή πυρήνια, ενώ παρουσιάζουν αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα. Πυρηνικό molding ανευρίσκεται συχνά. Σε βιοπτικό υλικό συχνά παρατηρείται artifact κυτταρικής σύνθλιψης που οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην απουσία κυτταροσκελετού. Επίσης, συχνά παρατηρείται νέκρωση του νεοπλάσματος. Σημειώνεται ότι μπορεί να εντοπιστούν μεγαλύτερα σε μέγεθος κύτταρα του SCLC σε ποσοστό έως και 30% (Rekhtman, 2010). Σύμφωνα με την τελευταία ταξινόμηση κατά WHO, (Travis et al, 2015), αναγνωρίζονται δύο τύποι SCLCs: τα αμιγή και μικτά. Προηγούμενες υποκατηγορίες του SCLC (κύτταρα παρόμοια με κόκκους βρώμης- oat cell, κύτταρα παρόμοια με λεμφοκύτταρα- lymphocyte-like, και ενδιάμεσο) παρουσίαζαν προβλήματα ως προς τη διαγνωστική τους αναπαραγωγισιμότητα και την προγνωστική τους αξία (Travis, 2012).

Εκτός από το αμιγές SCLC, υπάρχει και το μικτό μικροκυτταρικό καρκίνωμα, το οποίο ορίζεται από τον WHO, ως ένα SCLC το οποίο συνδυάζεται με ένα επιπλέον στοιχείο, που αφορά σε ιστολογικούς τύπους μη μικροκυτταρικών καρκινωμάτων. Οι συνηθέστεροι τύποι περιλαμβάνουν το αδενοκαρκίνωμα (ADC), τα πλακώδες καρκίνωμα (SCC), το LCNEC ενώ οι λιγότεροι συχνοί το ατρακτοκυτταρικό ή το γιγαντοκυτταρικό καρκίνωμα (Travis, 2015). Η συχνότητα των SCLC κυμαίνεται από 5% σε 28% σε διαφορετικές μελέτες και φαίνεται να σχετίζεται με το είδος των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται. Ειδικότερα, η συχνότητα διάγνωσης του μικτού μικροκυτταρικού καρκινώματος είναι υψηλότερη στις χειρουργικές εκτομές σε σχέση με τις μικρές βιοψίες και τα κυτταρολογικά δείγματα (βιοψίες βρόγχου, δια λεπτής βελόνης αναρρόφηση) (Luo et al, 2015; Zhang et al, 2017). Δεν έχουν καταγραφεί σημαντικές αλλαγές στα σχήματα χημειοθεραπειών του μικτού μικροκυτταρικού καρκινώματος, τα οποία βασίζονται σε εκείνα του SCLC, και στα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών. Η αποτελεσματικότητα των στοχευόμενων θεραπειών με αναστολείς EGFR τυροσινικής κινάσης (receptor-tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKIs) παραμένει ασαφής (Qin & Lu, 2018).

Πίνακας 3: Ταξινόμηση του SCLC (Rekhtman, 2010; Travis et al, 2015).

WHO 1967	WHO 1981	IASLC 1998	WHO/IASLC1999, 2004, 2015
Παρόμοια με λεμφοκύτταρα lymphocyte-like	Παρόμοια με κόκκους βρώμης oat cell,	Αμιγές SCLC	SCLC
Με άτρακτο ή πολυγωνικά στοιχεία	Ενδιάμεσο	Μικτό SC/LC	Μικτό
Με πλακώδες ή αδενικό στοιχείο	Μικτό	Μικτό	
<i>IASLC, International Association for the Study of Lung Cancer; SC/LC, small cell/large cell carcinoma;</i>			

Όσον αφορά την ιστογένεση του SCLC, το προγονικό του κύτταρο δεν είναι γνωστό, αν και είναι πιθανή η ύπαρξη ενός πολυδύναμου βρογχικού πρόδρομου κυττάρου από το οποίο προκύπτει. Μελέτες σε ζωικά μοντέλα του SCLC και κυτταροκαλλιέργειες ανθρώπινων εμβρυικών βλαστοκυττάρων, δείχνουν ότι οι κυτταρικοί στόχοι του κακοήθους μετασχηματισμού πιθανόν να είναι τα αναπνευστικά νευροενδοκρινή κύτταρα (PNECs pulmonary neuroendocrine cells), λαμβάνοντας υπόψη και τη μορφολογία των καρκινικών κυττάρων και την έκφραση νευροενδοκρινικών δεικτών (Song et al, 2012; Chen et al, 2019). Τα PNECs εντοπίζονται συχνά ως μεμονωμένα κύτταρα, αλλά μπορούν να σχηματίσουν ομάδες κυττάρων (νευροεπιθηλιακά σωματίδια) που εντοπίζονται συνήθως στους ενδοπνευμονικούς αεραγωγούς και περιέχουν εκκριτικά κοκκία που αποθηκεύουν αμίνες και πεπτίδια όπως η σεροτονίνη, η καλσιτονίνη, η σωματοστατίνη, η χρωμογρανίνη Α και η συναπτοφυσίνη. Τα PNECs φαίνεται να συμμετέχουν στην αντίληψη της ποσότητας του οξυγόνου στους αεραγωγούς, στη ρύθμιση της ροής του αίματος της αναπνευστικής κυκλοφορίας, στον έλεγχο του βρογχικού τόνου, τη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης και την παροχή βλαστικών κυττάρων σε περιπτώσεις πνευμονικής βλάβης (Song et al, 2012).

Η διάγνωση του SCLC στηρίζεται στη χρήση μικρών δειγμάτων όπως είναι οι βρογχοσκοπικές βιοψίες, η βιοψία αναρρόφησης δια λεπτής βελόνας, η βιοψία πυρήνα (core biopsy) και η κυτταρολογία, εξαιτίας του προχωρημένου σταδίου του νοσήματος. Στην περίπτωση των εκτομών του πνεύμονα, ο όγκος είναι συνήθως ένα περιγεγραμμένο περιφερικό οζίδιο, διαμέτρου 2-4 cm με νεκρωτική επιφάνεια κοπής. Σημειώνεται ότι στις μικρές βιοψίες παρατηρείται συχνά εκτεταμένη σύνθλιψη των κυττάρων γεγονός που μπορεί να δυσχεραίνει την αξιολόγηση των ιστολογικών τομών.

Επίσης, στα δείγματα των εκτομών, τα καρκινικά κύτταρα του SCLC μπορεί να παρουσιάζονται με μεγαλύτερο μέγεθος σε σχέση με τις μικρές βιοψίες εξαιτίας της καλύτερης μονιμοποίησης του υλικού (Travis, 2010).

Η ιστολογική ταξινόμηση ενός καρκινώματος στην κατηγορία του μικροκυτταρικού καρκινώματος απαιτεί την κατάδειξη χαρακτήρων νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης (μορφολογική ή ανοσοϊστοχημική). Οι κύριες ανοσοϊστοχημικές χρώσεις που εφαρμόζονται είναι η συναπτοφυσίνη, η χρωμογρανίνη Α και η CD56. Επιπρόσθετα, τα νεοπλασματικά κύτταρα εμφανίζουν ανοσοθετικότητα σε κυτταροκίνες χαμηλού μοριακού βάρους με ειδικό πρότυπο κατανομής της χρώσεως (dot-like) ενώ σημειώνεται η συχνή ανοσοθετικότητα σε TTF-1 και ο αυξημένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός (Ιωάννου, 2009).

Η CD56 εφαρμόζεται συχνά για την επιβεβαίωση της διάγνωσης του SCLC καθώς παρουσιάζει συγκριτικά με τους υπολοίπους νευροενδοκρινικούς δείκτες, την υψηλότερη ευαισθησία για το SCLC (Rekhtman, 2010). Επιπρόσθετα, η ανοσοχρώση έναντι της CD56 στο SCLC είναι χρήσιμη, και στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται βιοπτικά υλικά που παρουσιάζουν εκτεταμένη κυτταρική σύνθλιψη (Kontogianni et al, 2005). Παρόλα αυτά, θεωρείται ένας νευροενδοκρινής δείκτης με χαμηλή ειδικότητα καθώς η ανοσοθετικότητα της καταγράφεται σε πολλά άλλα καρκινώματα (Hiroshima et al, 2006).

Η ανοσοχρώση για την CD56 πρωτεΐνη είναι χρήσιμη στα SCLC καρκινώματα, και ιδιαίτερα στις μικρές βιοψίες που παρουσιάζουν εκτενή κυτταρική σύνθλιψη (Kontogianni et al, 2005). Ωστόσο, θεωρείται ένας νευροενδοκρινής δείκτης με χαμηλή ειδικότητα καθώς παρουσιάζει ανοσοθετικότητα και σε πολλά άλλα καρκινώματα (Hiroshima et al, 2006).

Η συναπτοφυσίνη και η χρωμογρανίνη Α είναι νευροενδοκρινικοί δείκτες με μεγαλύτερη ειδικότητα και χρησιμοποιούνται συχνά για την διάκριση των SCLC από τα NSCLC καρκινώματα. Οι συγκεκριμένοι δείκτες παρουσιάζουν ποικίλη ανοσοϊστοχημική έκφραση, ενώ έχει παρατηρηθεί και απουσία της έκφρασής τους στα SCLC καρκινώματα. Νευροενδοκρινική έκφραση τους έχει παρατηρηθεί και σε χαμηλής κακοήθειας νευροενδοκρινικά νεοπλάσματα (τυπικά και άτυπα καρκινοειδή), σε LCNEC και εστιακά σε κάποια NSCLC (αδενοκαρκινώματα και πλακώδη καρκινώματα) (Howe et al, 2005; Zheng et al, 2013).

Οι νευροενδοκρινικοί δείκτες στα μικροκυτταρικά νεοπλάσματα μπορεί να είναι αρνητικοί σε ποσοστό από 15 έως 40%, αναλόγως του δείκτη και το είδος του

δείγματος. Σημειώνεται ότι ποσοστό της τάξης του 10% των SCLC νεοπλασμάτων μπορεί να είναι αρνητικά και στους τρεις συνηθέστερους νευροενδοκρινικούς δείκτες (συναπτοφυσίνη, χρωμογρανίνη A και CD56). Η συχνότητα των SCLCs που είναι αρνητικά στους νευροενδοκρινικούς δείκτες, αυξάνεται στις μικρές βιοψίες και τα κυτταρολογικά υλικά. (Hiroshima et al, 2006; Rekhtman, 2010).

Η TTF-1 πρωτεΐνη εκφράζεται περίπου στο 85-90% των SCLCs και χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία (Thunnissen et al, 2017). Ωστόσο, παρουσιάζει μειωμένη ειδικότητα καθώς στα NSCLCs η ανοσοϊστοχημική έκφραση του TTF-1 δείκτη παρατηρείται σε ποσοστό της τάξης του 75% των αδеноκαρκινωμάτων, ενώ σπάνια ανιχνεύεται στα πλακώδη καρκινώματα (Stenhouse et al, 2004).

Απουσία της έκφρασης της TTF1 πρωτεΐνης έχει παρατηρηθεί στα LCNEC καρκινώματα και στα καρκινοειδή (Thunnissen et al, 2017). Η μελέτη των Iida και συνεργατών, (2018), υποστηρίζει ότι η απουσία έκφρασης της TTF-1 πρωτεΐνης σε SCLC βιοψίες συσχετίζεται με μειωμένη έκφραση δεικτών νευροενδοκρινούς διαφοροποίησης (συναπτοφυσίνη, χρωμογρανίνη, ASCL1) αλλά όχι με υψηλή πολλαπλασιαστική δραστηριότητα ή χειρότερη κλινική έκβαση.

Ο TTF-1 δείκτης είναι διαγνωστικός για τη διαφορική διάγνωση των αδеноκαρκινωμάτων του πνεύμονα και των μη νευροενδοκρινικών καρκινωμάτων από μεγάλα κύτταρα, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις ασθενών με μεταστατικά καρκινώματα αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας. Σε αντίθεση με τα αδеноκαρκινώματα του πνεύμονα, ο TTF-1 στα SCLCs δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιβεβαίωση ή τον αποκλεισμό της πνευμονικής προέλευσης των SCLCs ή των LCNECs αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας, καθώς εκφράζεται σε ποσοστό της τάξης του 20-80% των SCLCs που εντοπίζονται σε διαφορετικές ανατομικές θέσεις, συμπεριλαμβανομένων του προστάτη, της ουροδόχου κύστης, του τραχήλου της μήτρας και του γαστρεντερικού συστήματος (Kaufmann & Dietel, 2000; Ordóñez, 2000). Η χρήση του TTF-1 σε συνδυασμό με την κερατίνη 20 μπορεί να είναι χρήσιμη στη διάκριση του SCLC καρκινώματος από το καρκίνωμα Merkel, καθώς δεν παρουσιάζει ανοσοέκφραση στο τελευταίο (Ordóñez, 2000).

Η κατανομή “dotlike” των κερατινών, όπως η πανκερατίνη AE1/AE3, είναι χαρακτηριστική στα SCLC συγκριτικά με την χρώση που παρουσιάζουν στα NSCLCs, αν και μπορεί να παρατηρηθεί και σε άλλα υψηλής κακοήθειας καρκινώματα και για αυτό το λόγο δεν θεωρείται ειδική για τα SCLC καρκινώματα (Rekhtman, 2010; Thunnissen et al, 2017). Όσον αφορά στην έκφραση της AE1/AE3 πανκερατίνης και

τη συσχέτιση της με την πρόγνωση των ασθενών με SCLC, πρόσφατη μελέτη (2019), υποστηρίζει ότι η υψηλή ανοσοϊστοχημική της έκφραση αποτελεί έναν ευνοϊκό προγνωστικό παράγοντα σε ασθενείς με SCLC που αντιμετωπίστηκαν χειρουργικά. Ειδικότερα, βρέθηκε ότι η μέση ολική επιβίωση των ασθενών με έντονη και ασθενή ανοσοχρώση για AE1/AE3 πανκρατίνη διέφερε σημαντικά ($p=0.019$) και ήταν 24.7 και 13.8 μήνες αντίστοιχα (Badzio, 2019).

1.3 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΠΑΘΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΩΝ SCLCs

Τα SCLCs χαρακτηρίζονται από υψηλό φορτίο μεταλλάξεων λόγω της μακροχρόνιας έκθεσης του αναπνευστικού επιθηλίου, σε περισσότερες από 60 μεταλλαξογόνες ουσίες που περιέχονται στον καπνό του τσιγάρου και προσδένονται και τροποποιούν χημικά το DNA δημιουργώντας χαρακτηριστικά πρότυπα μεταλλάξεων. Μελέτη ανάλυσης του γονιδιώματος σε κυτταροκαλλιέργειες SCLC (NCI-H209 κυτταρική σειρά), ανέδειξε 22.910 σωματικές μεταλλάξεις που οδηγούν σε νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις και οι 134 από αυτές εντοπίζονται σε κωδικοποιητικές αλληλουχίες (Pleasance et al, 2010).

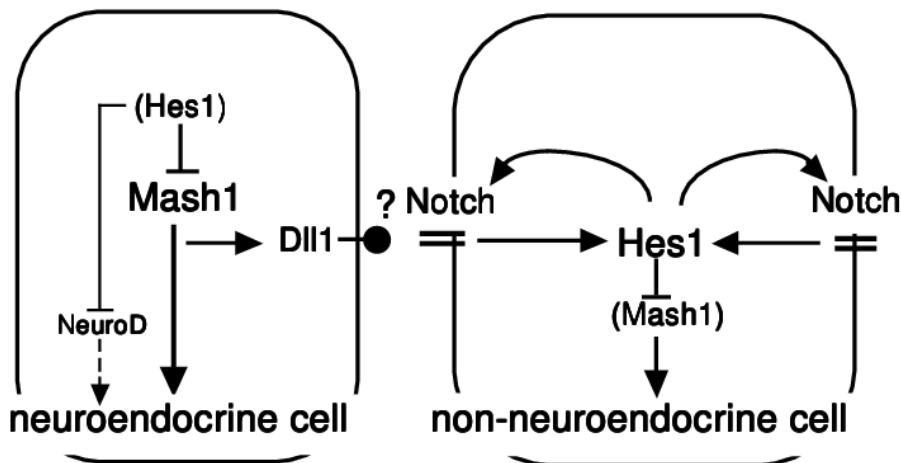
Χαρακτηριστικό των SCLCs αποτελεί επίσης η συνδυασμένη αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων της πρωτεΐνης p53 (TP53), και του μεταγραφικού παράγοντα του ρετινοβλαστώματος (RB). Η πρωτεΐνη RB εμπλέκεται στη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων του κυτταρικού κύκλου, ενώ η p53 πρωτεΐνη συμμετέχει στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA και παίζει καίριο ρόλο στους μηχανισμούς της απόπτωσης (Bunn et al, 2016). Λαμβάνοντας υπόψη τη συχνότητα των μεταλλάξεων στα γονίδια TP53 και RB1, φαίνεται ότι αυτές αποτελούν αναγκαία γενετικά γεγονότα για την ανάπτυξη SCLCs, γεγονός που επιβεβαιώνεται από μελέτες σε ζωικά μοντέλα (Meuwissen et al, 2003; Gazdar et al, 2015). Μελέτες γονιδιώματος σε SCLC καρκινώματα έχουν αναδείξει υποομάδες των SCLCs που παρουσιάζουν ενίσχυση των γονιδίων MYC (L-myc ή C-myc), SOX-2, FGFR-1, RICTOR απώλεια του PTEN γονιδίου και αδρανοποίηση του Notch σηματοδοτικού μονοπατιού (Bhateja et al, 2019).

Όσον αφορά στο σηματοδοτικό μονοπάτι Notch, πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει το πιθανό του ρόλο στην παθογένεση των SCLCs (Leonetti et al, 2019). Μελέτη αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing, WGS) ανέδειξε την παρουσία μεταλλάξεων των γονιδίων του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch σε ποσοστό της τάξης του 25% ασθενών με SCLC, που οδηγούν στην αδρανοποίηση του Notch στα SCLC καρκινώματα (George et al, 2015).

Το γονίδιο του Notch υποδοχέα ανήκει στην οικογένεια γονιδίων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα. Στα θηλαστικά, η οδός σηματοδότησης Notch ενεργοποιείται από την αλληλεπίδραση τεσσάρων υποδοχέων (NOTCH 1-4) με 5 συνδέτες, τις Delta-like-1,-3,-4 (DLL1, DLL3, DLL4) και τις Jagged 1 και 2 (JAG1 και JAG2) προσδέτες (Leonetti et al, 2019). Ειδικότερα, ο προσδέτης DLL3 αναστέλλει με την πρόσδεσή του

το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch και εκφράζεται άφθονα στην κυτταροπλασματική επιφάνεια των SCLCs και άλλων υψηλού βαθμού κακοηθείας νευροενδοκρινικών καρκινωμάτων. Η σηματοδότηση Notch ρυθμίζεται καθοδικά κατά την ανάπτυξη του νευροενδοκρινικού όγκου και αναστέλλεται από την έκφραση της DLL3 πρωτεΐνης. Η υπερέκφραση του DLL3 σχετίζεται με μειωμένα ποσοστά ολικής επιβίωσης στα SCLC καρκινώματα και ενδεχομένως μπορεί να βοηθήσει στην ταυτοποίηση των ασθενών που έχουν περισσότερες πιθανότητες να πετύχουν απόκριση σε θεραπεία με το rovalpituzumab tesirine (Rova-T) (Saunders et al, 2015; Owen et al, 2019).

Η έκφραση του DLL3 ρυθμίζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα ASCL1. Ο μεταγραφικός παράγοντας ASCL1 (ή αλλιώς Mash1 στα ποντίκια) με μοτίβο έλικα-βρόχος-έλικα (basic Helix-Loop- Helix, bHLH) προάγει τη νευρωνική διαφοροποίηση μέσω της ρύθμισης της Notch σηματοδότησης (Morimoto et al. 2012). Σε προκλινικά μοντέλα καρκινωμάτων SCLC, η έκφραση του DLL3 παράγοντα προάγει τη διήθηση και τη μετανάστευση των κυττάρων μέσω ενός μηχανισμού που εμπλέκει τον έλεγχο της πρωτεΐνης μετάβασης από την επιθηλιακή στη μεσεγχυματική μορφή Snail. Η σημασία του ASCL1 μεταγραφικού παράγοντα στη νευροενδοκρινική διαφοροποίηση του αναπνευστικού επιθηλίου κατά την εμβρυογένεση έχει αναδειχθεί στους ποντικούς. Ειδικότερα, τα νευροενδοκρινή κύτταρα του αναπνευστικού τα οποία είναι θετικά για ASCL1, είναι αρνητικά για τα Notch 1-3 και Hes1 (enhancer of split 1). Σε ποντίκια στα οποία έχει κατασταλεί η έκφραση του γονιδίου του Hes1, παρατηρείται αύξηση των νευροενδοκρινικών κυττάρων του αναπνευστικού επιθηλίου (Owen et al, 2019, Ito et al, 2000).



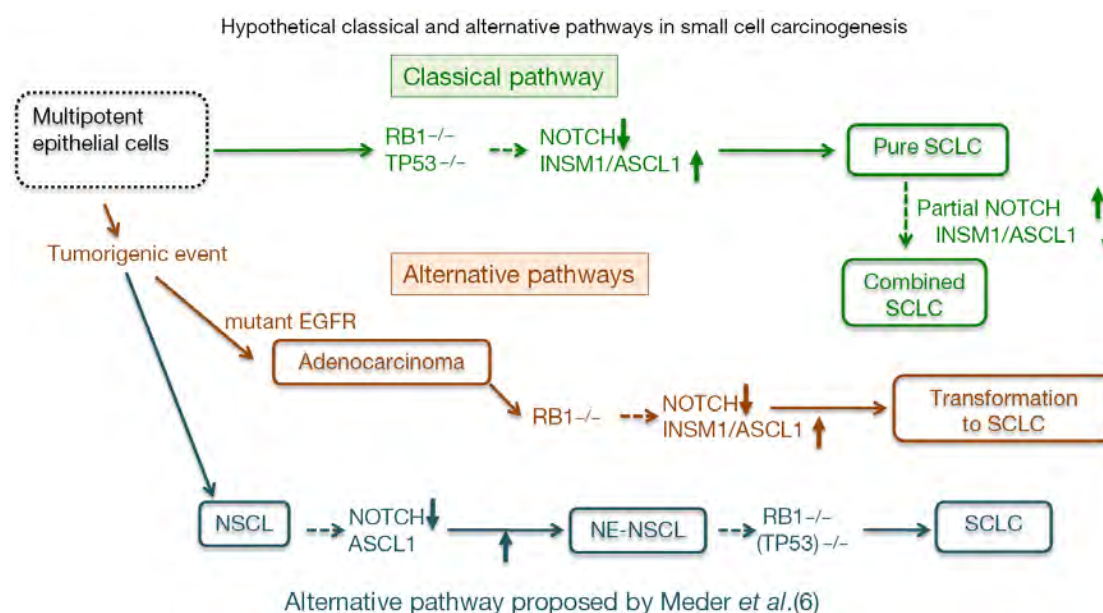
Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση των προτεινόμενων ρυθμιστικών μηχανισμών της κυτταρικής διαφοροποίησης στο αναπνευστικό επιθήλιο ποντικών κατά την εμβρυογένεση. Ο Mash1 είναι απαραίτητος για τη νευροενδοκρινική διαφοροποίηση, ενώ ο Hes1 αναστέλλει την νευροενδοκρινική διαφοροποίηση μέσω της αδρανοποίησης του Mash1 παράγοντα. Οι υποδοχείς Notch, οι οποίοι ενεργοποιούν τον Hes1, οι οποίοι εκφράζονται στα μη νευροενδοκρινικά κύτταρα ρυθμίζονται επίσης από τον παράγοντα Hes1. Στα νευροενδοκρινικά κύτταρα, ο Mash1 αυξάνει την έκφραση της Dll1 (Ito et al, 2000).

Οι μεταγραφικοί στόχοι του ASCL1 μεταγραφικού παράγοντα, που έχουν αναγνωριστεί σε μελέτες ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (Chromatin Immunoprecipitation, ChIP-seq), περιλαμβάνουν μόρια που προωθούν τη νευρική και τη νευροενδοκρινική διαφοροποίηση όπως το πεπτίδιο απελευθέρωσης γαστρίνης (Gastrin releasing peptide, GRP), τη συναπτοταγμίνη 1 (Synaptotagmin 1, SYT1) την πρωτεΐνη 25 συνδεδεμένη με το συναπτόσωμα (Synaptosome associated protein 25, SNAP25) και την συνδεόμενη με το ινσουλίωμα πρωτεΐνη 1 (Insulinoma associated protein 1, ISNM1) (Augustyn et al, 2014; Kudoh et al, 2020).

Σύμφωνα με τους Meder και συνεργάτες (2016), τα SCLC καρκινώματα μπορεί να προκύψουν από πρόδρομα νευροενδοκρινικά κύτταρα που φέρουν μεταλλάξεις στα TP53 και RB1 γονίδια και χαρακτηρίζονται από αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch και υψηλή έκφραση των ASCL1 και INSM1 μεταγραφικών παραγόντων.

Οι Niederst και συνεργάτες, (2015), αναφέρουν περιπτώσεις μετατροπής αδενοκαρκινωμάτων του πνεύμονα με μεταλλάξεις στο EGFR γονίδιο και αντοχή αναστολές τυροσινικής κινάσης (TKIs) σε SCLC καρκινώματα. Η ανάλυση των περιπτώσεων αυτών ανέδειξε την καθολική απώλεια του γονιδίου RB1 στο σύνολο των περιπτώσεων που εξετάστηκαν. Τα νεοπλάσματα αυτά παρουσίαζαν υψηλή έκφραση

νευροενδοκρινικών δεικτών και χαμηλή έκφραση του EGFR υποδοχέα. Σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει και εδώ η αδρανοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch και η έκφραση του ASCL1 παράγοντα. Ωστόσο, χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για την εξακρίβωση των μοριακών μηχανισμών που συνδέουν την αδρανοποίηση της Notch σηματοδότησης, της έκφρασης της ASCL1 και των μεταλλάξεων του RB1 γονιδίου.



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση υποθετικού μοντέλου ανάπτυξης SCLC καρκινωμάτων. Στο «κλασικό» μονοπάτι, το SCLC δημιουργείται λόγω γενετικών ανωμαλιών στα γονίδια TP53 και RB1 των κυττάρων του αναπνευστικού επιθηλίου, που ακολουθούνται από την αδρανοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch και την έκφραση των ASCL1/INSM1. Στην περίπτωση που ενεργοποιείται το Notch μονοπάτι, μπορεί να εμφανιστεί το μικτό SCLC καρκίνωμα. Στο εναλλακτικό μονοπάτι, το SCLC μπορεί να προέλθει από ένα προϋπάρχων NSCL. Ο μετασχηματισμός σε SCLC από ένα αδenoκαρκίνωμα με μεταλλαγμένο EGFR γονίδιο, μετά την χορήγηση στοχευόμενων θεραπειών με TK αναστολείς, έχει καταγραφεί με την έλλειψη (deletion) του RB1 γονιδίου να αποτελεί προαπαιτούμενη συνθήκη. Σε ένα άλλο σενάριο του εναλλακτικού μονοπατιού για το μετασχηματισμό του SCLC από NSCLC, η αδρανοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch και η αυξημένη έκφραση του ASCL1 μεταγραφικού παράγοντα ενδέχεται να προηγούνται της αδρανοποίησης του RB1 γονιδίου (Meder *et al* (2016)).

1.4 Η ΠΡΩΤΕΪΝΗ INSM1

Η ανάπτυξη στοχευμένων θεραπευτικών προσεγγίσεων καθίσταται αναγκαία και προϋποθέτει την κατανόηση των υποκείμενων μοριακών μηχανισμών παθογένεσης των SCLC καρκινωμάτων (Arcaro, 2015).

Τα SCLC καρκινώματα χαρακτηρίζονται από την υψηλή έκφραση νευροενδοκρινικών γονιδίων που παίζουν κεντρικό ρόλο στην εμβρυική ανάπτυξη. Ο νευροενδοκρινής χαρακτήρας των SCLCs μπορεί να προσφέρει το κατάλληλο υπόβαθρο για το

σχεδιασμό και την εφαρμογή γονιδιακών θεραπευτικών προσεγγίσεων με κυτταροτοξική δράση έναντι των SCLCs (Pedersen et al, 2005).

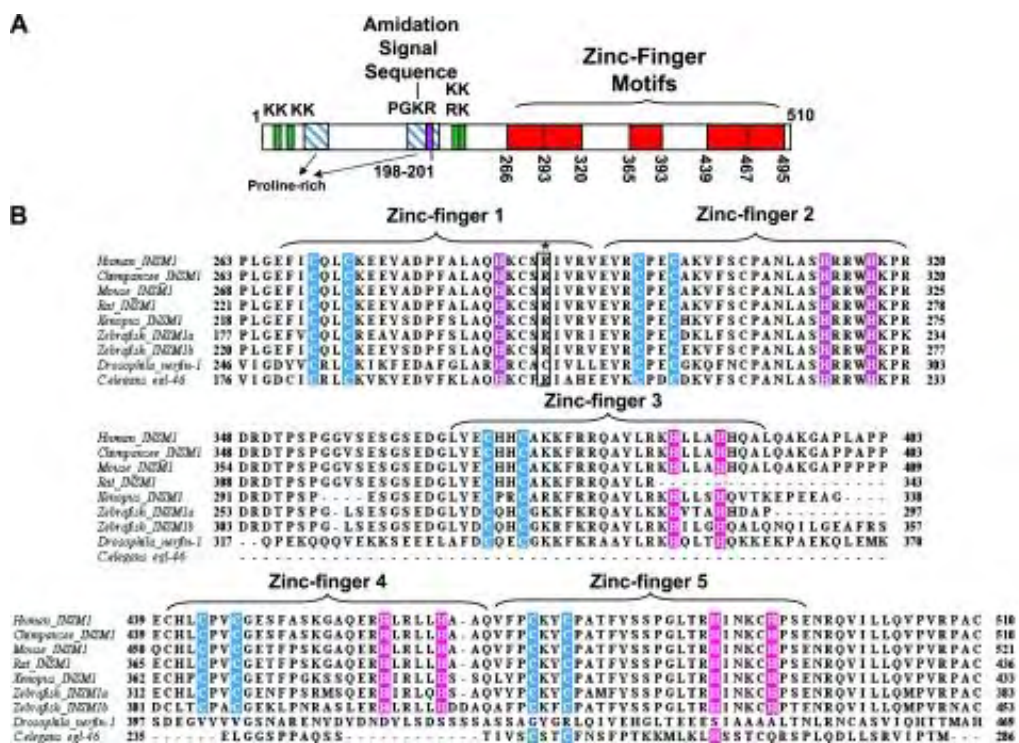
Ένας νευροενδοκρινικός δείκτης με υψηλή έκφραση σε πρωτεϊνικό επίπεδο στα SCLCs είναι ο μεταγραφικός παράγοντας INSM1. Οι INSM πρωτεΐνες αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες με δακτυλίους ψευδαργύρου, που μετέχουν σε ένα πλήθος βιολογικών διαδικασιών. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη παίζει κεντρικό ρόλο στην ενδοκρινική διαφοροποίηση κατά την εμβρυογένεση (Chen et al, 2019).

Στις αρχές του 1990, κατασκευάστηκαν cDNA βιβλιοθήκες, για τη σύγκριση φυσιολογικών ιστών παγκρέατος με ιστούς με ινσουλίνωμα και γλυκαγόνωμα, με σκοπό την ανάδειξη ειδικών αντιγόνων που σχετίζονται με νοσήματα όπως η αυτοάνοση πολυενδοκρινοπάθεια, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 και το ινσουλίνωμα. Μεταξύ των κυριότερων αντιγόνων που ταυτοποιήθηκαν ήταν η πρωτεΐνη IA-1 (Insulinoma-Associated-1), που αποτελεί σημαντικό αυτοαντιγόνο στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1. Η ανάλυση της αλληλουχίας της IA-1 πρωτεΐνης, ανέδειξε την παρουσία πέντε μοτίβων δακτύλων ψευδαργύρου στο C-καρβοξυτελικό άκρο, ενώ στο αμινοτελικό άκρο η αμινοξική αλληλουχία είναι πλούσια στα αμινοξέα προλίνη (18%), γλυκίνη (12.8%) και αλανίνη (16%). Το γονίδιο της IA-1 στη συνέχεια μετονομάστηκε σε INSM1 (INSulinoMa associated-1) (Goto et al, 1992).

Η INSM1 πρωτεΐνη, μεγέθους 58 kDa, χαρακτηρίζεται από ένα συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης στους ιστούς. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη INSM1 εκφράζεται κυρίως σε νευροενδοκρινείς ιστούς κατά την εμβρυική ανάπτυξη (εγκέφαλος, οφθαλμοί, θυρεοειδής και θύμος αδένας, στομάχι, έντερο, πάγκρεας και επινεφρίδια) και σε νευροενδοκρινικής προέλευσης νεοπλάσματα στους ενήλικες. Το γονίδιο INSM1 φαίνεται να επανενεργοποιείται στα νευροενδοκρινή νεοπλάσματα και η αποδιαφοροποίηση αυτή μιμείται τη φυσιολογική εμβρυική ανάπτυξη (Tanigawa et al, 2017; Kuji et al, 2017). Η επανέκφραση της INSM1 έχει παρατηρηθεί σε νευροενδοκρινικής προέλευσης νεοπλάσματα όπως είναι τα ινσουλινώματα, οι όγκοι της υπόφυσης, το φαιοχρωμοκύτωμα, το μυελοειδές καρκίνωμα θυρεοειδούς, το μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (SCLC), το μυελοβλάστωμα, το νευροβλάστωμα και το ρετινοβλάστωμα (Mahalakshmi et al, 2020).

Το γονίδιο *INSM1* εδράζεται στη χρωμοσωμική περιοχή 20p11.2, δεν περιέχει ιντρόνια και η αλληλουχία του cDNA κλώνου έχει μήκος 2838 ζεύγη βάσεων. Η αλληλουχία

αποτελείται από ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης μήκους 1530 νουκλεοτιδίων που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μήκους 510 αμινοξέων. Στην 3' αμετάφραστη περιοχή, υπάρχουν επτά ΑΤΤΤΑ αλληλουχίες μεταξύ των δύο σημμάτων πολυαδενυλίωσης, που φαίνεται να δρουν ως σήματα αναγνώρισης για την αποδόμηση συγκεκριμένων mRNA μορίων, όπως αναφέρεται για τις λεμφοκίνες, τις κυτοκίνες και τα πρωτο-ογκογονίδια. Η αλληλουχία είναι υψηλά διατηρημένη στα διάφορα είδη. Τα αντίστοιχα ομόλογα γονίδια *INSM1* στον χιμπαντζή, στον ποντικό, στον αρουραίο, στο *Xenopus laevis*, στο zebrafish, στη *Drosophila melanogaster* και στο *Caenorhabditis elegans* παρουσιάζουν ομοιότητα με τον άνθρωπο κατά 99.4%, 90.6%, 76.7%, 55.7%, 54.8%, 22.6%, και 18.2%, αντιστοίχως (Lan et al, 2009).



Εικόνα 3: Δομή του γονιδίου *INSM1* (Lan et al, 2009). Α) Το mRNA της *INSM1* κωδικοποιείται από ένα γονίδιο χωρίς ιντρόνια, μήκους 2838- ζεύγη βάσεων (bp) και κωδική αλληλουχία μήκους 1530 ζευγών βάσεων (bp). Η πρωτεΐνη *INSM1* μήκους 510 αμινοξέων διαιρείται σε μία N-αμινοτελική περιοχή(1-250 αμινοξέα) και στην C-καρβοξυτελική περιοχή (251-510 αμινοξέα). Η N- αμινοτελική περιοχή περιέχει δύο περιοχές πλούσιες σε προλίνη (43-58 και 183-205 αμινοξέα) (σήμανση με μπλε χρώμα), αρκετά διβασικά αμινοξέα (σήμανση με πράσινο χρώμα) και μια σηματοδοτική αλληλουχία αμιδίωσης (σήμανση με ροζ χρώμα). Η C-καρβοξυτελική περιοχή περιέχει πέντε μοτίβα δακτυλίων ψευδαργύρου εξίσου καταναμημένα (σήμανση με κόκκινο χρώμα). Β) Τα μοτίβα των δακτυλίων ψευδαργύρου της ανθρώπινης *INSM1* πρωτεΐνης βρίσκονται σε ευθυγράμμιση με τα ομόλογα μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου άλλων ειδών. Οι δακτύλιοι ψευδαργύρου Cys2-His2 σημαίνονται με μπλε και ροζ χρώμα αντίστοιχα. Το

πρώτο μοτίβο δακτυλίου ψευδαργύρου περιέχει μια υποκατάσταση της τελευταίας ιστιδίνης με αργινίνη σε όλα τα είδη εκτός της *D. melanogaster*, στο οποίο εντοπίζεται υποκατάσταση της ιστιδίνης με κυστεΐνη (επισήμανση με αστερίσκο). Στο δεύτερο και τρίτο δακτύλιο ψευδαργύρου του *C. elegans* υπάρχει μια υποκατατάσταση της τελευταίας ιστιδίνης με αργινίνη ή γλουταμίνη. Όλα και τα 27 αμινοξέα στο μοτίβο του δεύτερου δακτυλίου ψευδαργύρου είναι κατά 96% ταυτόσημα στα διαφορετικά είδη.

Το N- αμινοτελικό άκρο (~250 αμινοξέα) της INSM1 πρωτεΐνης περιέχει ένα Snail/Gfi-1 (SNAG) μοτίβο, 2 περιοχές πλούσιες σε προλίνη, μια αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signaling, NLS) (221-246 αμινοξέα), τέσσερις θέσεις διβασικών αμινοξέων (8-9, 11-12, 221-222 και 227-228 αμινοξέα) και μια σηματοδοτική αλληλουχία αμιδίωσης που διευκολύνει την προσθήκη μιας αμιδομάδας σε ποικίλα βιοενεργά νευροενδοκρινή πεπτίδια (Lan et al, 2009).

Το μοτίβο Snail/Gfi-1 (SNAG) είναι απαραίτητο για τη δράση της INSM1 πρωτεΐνης ως μεταγραφικού καταστολέα, καθώς συμμετέχει στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, στη στρατολόγηση ενζύμων που τροποποιούν τις ιστόνες και στην αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη LSD1 (Lysine-specific demethylase 1), η οποία καταλύοντας την απομάκρυνση μεθυλομάδων από ιστονικά και μη ιστονικά κατάλοιπα λυσίνης, οδηγεί στην καταστολή της έκφρασης των γονιδίων που ελέγχουν την κυτταρική διαφοροποίηση. Ειδικότερα, έχει βρεθεί ότι μέσω του μοτίβου SNAG στο N-αμινοτελικό άκρο της INSM1, επιτυγχάνεται η στρατολόγηση παραγόντων τροποποίησης των ιστονών όπως είναι η διμεθυλάση Kdm1a (lysine (K)-specific demethylase 1A) και η διακετυλάση των ιστονών 1/2 (HDAC1/2) στην πρόσθια υπόφυση (Welcker et al, 2013).

Τα διβασικά αμινοξέα αποτελούν χαρακτηριστικές περιοχές στις οποίες δρουν ειδικά ενδοπρωτεολυτικά μετατρεπτικά ένζυμα (προκομβερτάσες) για την παραγωγή πεπτιδικών ορμονών όπως είναι η ινσουλίνη, η γλουκαγόνη και η σωματοστατίνη. Ωστόσο, δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι η INSM1 παράγεται από κάποιο πρόδρομο μόριο της (Chen et al, 2019). Οι πλούσιες σε προλίνη περιοχές της INSM1 του N-αμινοτελικού άκρου της είναι απαραίτητες για την αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών. Προηγούμενες μελέτες έχουν αναδείξει ότι οι συγκεκριμένες περιοχές της INSM1 πρωτεΐνης προσδένονται στην κυκλίνη D1 και στον υποδοχέα 1 της ενεργοποιημένης κινάσης C (Receptor for Activated C Kinase 1, RACK1) (Zhang et al, 2009; Zhang et al, 2014).

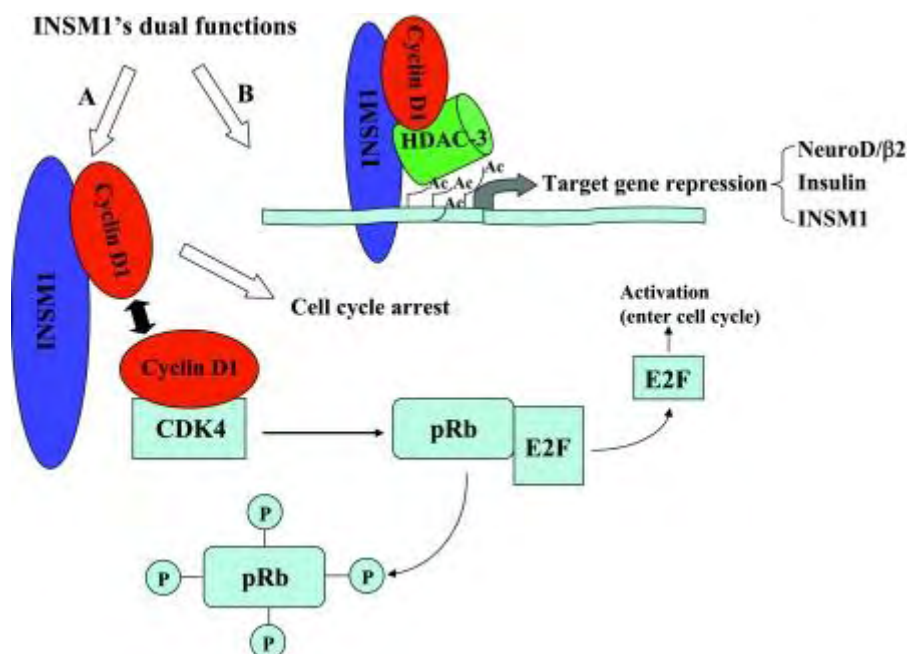
Τα μοτίβα δακτυλίων ψευδαργύρου Cys₂-His₂, (TG/TC/TC/TT/AGGGGG/TCG/A), υποδεικνύουν το λειτουργικό ρόλο της INSM1 ως μεταγραφικού παράγοντα που προσδένεται στο DNA στις θέσεις των υποκινητών των γονιδίων στόχων (Lan et al, 2009). Έχουν ταυτοποιηθεί ποικίλα μεταγενέστερα (downstream) γονίδια-στόχοι της INSM1 πρωτεΐνης, όπως ο παράγοντας 1 νευρογενούς διαφοροποίησης (Neurogenic Differentiation factor 1, NeuroD1), η ινσουλίνη, ο μεταγραφικός καταστολέας Ripply3 (rippy transcription repressor 3), η νευρογενίνη 3 (neurogenin 3, Ngn3), η Plekha7 (Pleckstrin homology domain-containing family A member 7) και η ίδια η INSM1 πρωτεΐνη (αρνητική ανατροφοδότηση) (Liu et al, 2006; Wang et al, 2008; Zhang et al, 2014; Osipovich et al, 2014; Tavano et al, 2018).

Η πρωτεΐνη INSM1 έχει ικανότητα πρόσδεσης τόσο στο DNA όσο και σε πρωτεΐνες όπως είναι η κυκλίνη D1, η αποακετυλάση ιστόνης 3 (Histone deacetylase 3, HDAC-3) και ο υποδοχέας 1 της ενεργοποιημένης κινάσης C (Receptor For Activated C Kinase 1, RACK1). Η δράση της έχει συσχετιστεί με ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια (Sonic Hedgehog, PI3K/AKT, MEK/ERK_{1/2}, ADK, p53, Wnt, histone acetylation, LSD1, cyclin D1, Ascl1, και N-myc (Mahalakshmi et al, 2020).

1.5 Ο ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ INSM1 ΣΤΗ ΝΕΥΡΟΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ

Η πρωτεΐνη INSM1 μέσω της πρόσδεσής της στην κυκλίνη D1, μπορεί να αναστείλει άμεσα την πορεία του κυτταρικού κύκλου. Ειδικότερα, στη μελέτη των Zhang και συνεργατών, (2009) φαίνεται ότι η INSM1 μπορεί να διακόψει τον φυσιολογικό κυτταρικό κύκλο, με τη πρόσδεσή της στην κυκλίνη D1, ανταγωνιζόμενη την κυκλινοεξαρτώμενη κινάση 4 (Cyclin-Dependent Kinase 4, CDK4). Η πρόσδεση αυτή οδηγεί στην υποφωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος RB. Η N-αμινοτελική περιοχή της INSM1 πρωτεΐνης, που είναι πλούσια σε προλίνη χρειάζεται για την πρόσδεση στην κυκλίνη D1. Μεταλλάξεις που οδηγούν σε αντικαταστάσεις αμινοξέων προλίνης ακυρώνουν την πρόσδεση στην κυκλίνη D1 και μειώνουν την ικανότητά της να σταματά τον κυτταρικό κύκλο. Η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού επάγει τη διαφοροποίηση (Zhang et al, 2009; Zhang et al, 2014). Η μελέτη του Lan και συνεργατών έδειξε ότι η άμεση πρόσδεση της INSM1 στην κυκλίνη

D1 διευκολύνει την στρατολόγηση της HDAC-3, η οποία τροποποιεί τις θέσεις ακετυλίωσης της ιστόνης H3/H4, εξασφαλίζοντας με τον τρόπο αυτό τη μεταγραφική καταστολή των γονιδίων της ινσουλίνης, της Neuro D/ beta2 αλλά και της ίδιας της INSM1 (Lan et al, 2009).



Εικόνα 4: Εξαρτώμενες και ανεξάρτητες από τον κυτταρικό κύκλο λειτουργίες της πρωτεΐνης INSM1 A) Η INSM1 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με την κυκλίνη D1, μέσω της περιοχής πρόσδεσης στην κυκλίνη, εμποδίζοντας την πρόσδεση της CDK4 και αναστέλλοντας επακόλουθα τη φωσφορυλίωση της Rb πρωτεΐνης. Η πρόσδεση αυτή εμποδίζει την απελευθέρωση του μεταγραφικού παράγοντα E2F, με αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων που προωθούν τον κυτταρικό κύκλο. Βασικά, η πρωτεΐνη INSM1 είναι σε θέση να επάγει τη διακοπή και την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο. Β) Η INSM1 λειτουργεί ως μεταγραφικός καταστολέας μέσω της πρόσδεσής της στους υποκινητές των γονιδίων στόχων, στρατολογώντας τις πρωτεΐνες κυκλίνη D1 και αποακετυλάση ιστόνης 3 (HDAC-3), μεταβάλλοντας τις θέσεις ακετυλίωσης των γονιδίων στόχων της NeuroD/β2, της ινσουλίνης και της ίδιας της INSM1 (Lan et al, 2009).

Η INSM1 αποτελεί ένα σημαντικό ρυθμιστή της διαφοροποίησης του ενδοκρινούς παγκρέατος, κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Στο πάγκρεας, η εξωκρινής και η ενδοκρινής μοίρα αναπτύσσονται από ένα κοινό πολυδύναμο προγονικό κύτταρο (Gu et al, 2002). Κατά την διαφοροποίηση των ενδοκρινών κυττάρων του παγκρέατος, απαιτείται ο συγχρονισμός μεγάλου αριθμού μεταγραφικών παραγόντων που θα επιτρέψει την κατάλληλη ανάπτυξη των τεσσάρων διακριτών τύπων κυττάρων που παράγουν ορμόνες. Η πρωτεΐνη INSM1, συνιστά έναν σημαντικό μεταγραφικό παράγοντα για τη διαφοροποίηση των παγκρεατικών κυττάρων, εκφράζεται στα παγκρεατικά νησίδια και λειτουργεί ως μεταγραφικός καταστολέας των γονιδίων *NeuroD1* ή αλλιώς *NeuroD/β2* (Neurogenic differentiation 1) και της ινσουλίνης. Επιπρόσθετα, η INSM1 αποτελεί γονίδιο στόχο των μεταγραφικών παραγόντων νευρογενίνη 3 (Neurogenin 3, Ngn3) και NeuroD1, οι οποίοι συμμετέχουν στην ενδοκρινική και νευρωνική διαφοροποίηση καθώς και στην επιβίωση και στην ωρίμανση των β παγκρεατικών κυττάρων (Breslin et al, 2003; 2007). Ειδικότερα, οι Ngn3 και NeuroD1 μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται και ενεργοποιούν τα E-box στοιχεία στον υποκινητή του γονιδίου *INSM1*. Κατά την διαφοροποίηση των ενδοκρινών κυττάρων του παγκρέατος, η πρωτεΐνη νευρογενίνη 3 ενεργοποιεί αρχικά την πρωτεΐνη INSM1 και στη συνέχεια την πρωτεΐνη NeuroD1. Η πρωτεΐνη INSM1 μέσω μηχανισμών αρνητικής ανατροφοδότησης, μπορεί και καταστέλλει τόσο τη δική της έκφραση όσο και την έκφραση της NeuroD1 πρωτεΐνης (Lan et al, 2009). Η αναστολή της έκφρασης της INSM1 πρωτεΐνης στο εμβρυικό πάγκρεας μειώνει κατά 40% το σχηματισμό των θετικών για ινσουλίνη και γλυκαγόνη κυττάρων, ενώ η έκτοπη δράση της ενισχύει τη νευροενδοκρινική διαφοροποίηση από τη νευρογενίνη 3 (Mellitzer et al, 2006). Η μελέτη των Mellitzer και συνεργατών, (2006), έδειξε ότι η INSM1 αποτελεί καθοδικό (downstream) γονιδιακό στόχο της νευρογενίνης 3, ενώ εντοπίζεται ανοδικά (upstream) των μεταγραφικών παραγόντων NeuroD/β2, Pax4, Arx, και Pax6 κατά τη διαφοροποίηση των ενδοκρινικών κυττάρων του παγκρέατος.

Η INSM1, μέσω της πρόσδεσής της σε διαφορετικούς κυτταρικούς ρυθμιστές όπως είναι ο υποδοχέας της ενεργοποιημένης κινάσης C (Receptor for Activated C Kinase 1, RACK1) μπορεί να διενεργεί εξωπυρηνικές δράσεις και να μετέχει σε ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες. Η αλληλεπίδραση των INSM1 και RACK1 πρωτεϊνών ενισχύει την οδό σηματοδότησης στην οποία μετέχει ο υποδοχέας της ινσουλίνης (Insulin Receptor, InR). Η πλούσια σε προλίνη περιοχή του N-αμινοτελικού άκρου της INSM1 βοηθά στην πρόσδεση με την πρωτεΐνη RACK1, διακόπτοντας την

αλληλεπίδραση της τελευταίας με τον υποδοχέα της ινσουλίνης (InR). Η σύνδεση αυτή ενισχύει τη σηματοδότηση μέσω του εν λόγω υποδοχέα με επακόλουθη ενεργοποίηση του γονιδίου *Nkx6.1*, η έκφραση του οποίου είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των β παγκρεατικών κυττάρων (Zhang et al, 2012).

Η έκφραση της πρωτεΐνης INSM1 φαίνεται να είναι σημαντική και για τη διαφοροποίηση της συμπαθητικής-επινεφριδιακής σειράς. Τα κύτταρα της συμπαθητικής-επινεφριδιακής σειράς προέρχονται από κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας, από τα οποία σχηματίζονται οι ώριμοι νευρώνες των δευτερογενών συμπαθητικών γαγγλίων, τα χρωμιόφιλα κύτταρα του μυελού των επινεφριδίων. Η διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών απαιτεί έναν συνδυασμό εξωγενών σημάτων και ενδογενούς δικτύου μεταγραφικών παραγόντων, όπως είναι οι Mash1 (Achaete-scute complex homolog-like 1), Phox2a/b (paired-like homeobox 2a/b) και Gata2/3 (GATA binding protein 2/3). Μελέτες σε ζωικά μοντέλα υποστηρίζουν ότι η INSM1 πρωτεΐνη δρα καθοδικά (downstream) των Mash1 και Phox2b μεταγραφικών παραγόντων, καταστέλλοντας την έκφραση της Mash1 πρωτεΐνης. Σε ποντικούς με μεταλλαγμένο INSM1 γονίδιο καταγράφεται θνησιμότητα των εμβρύων λόγω ανεπαρκούς σύνθεσης κατεχολαμινών, γεγονός που καταδεικνύει το σημαντικό ρόλο της INSM1 πρωτεΐνης στην ανάπτυξη της συμπαθητικής – επινεφριδιακής σειράς (Wildner et al, 2008).

Στον αναπτυσσόμενο εμβρυικό εγκέφαλο, η έκφραση της INSM1 πρωτεΐνης εντοπίζεται σε περιοχές όπου συντελείται νευρογένεση και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο ως καταστολέας στην ισορροπία μεταξύ του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης. Ζωικά μοντέλα εμβρύων ποντικών με απουσία της INSM1 πρωτεΐνης, παρουσίασαν αξιοσημείωτη μείωση του πάχους της ακτινωτής πλάκας του φλοιού (Farkas et al, 2008).

Στο φυσιολογικό πνεύμονα, τα επιθηλιακά προγονικά κύτταρα δημιουργούν όλους τους τύπους κυττάρων του αναπνευστικού επιθηλίου, μεταξύ αυτών και τα νευροενδοκρινικά κύτταρα. Η ισορροπία στον σχηματισμό μεταξύ νευροενδοκρινικών και μη κυττάρων του πνεύμονα ελέγχεται από την οδό σηματοδότησης Notch. Το γονίδιο στόχος της Notch σηματοδότησης *Hes1* εκφράζεται στα μη νευροενδοκρινικά κύτταρα, ενώ απουσιάζει στα νευροενδοκρινικά κύτταρα. Απουσία της πρωτεΐνης HES1, οδηγεί σε υπερέκφραση της ρυθμιστικής πρωτεΐνης ASCL1 και επακόλουθη αξιοσημείωτη αύξηση των νευροενδοκρινικών κυττάρων του πνεύμονα. Η πρωτεΐνη INSM1 μπορεί να προσδεθεί στον υποκινητή του γονιδίου *Hes1* (Hes Family BHLH

Transcription Factor 1) και να καταστείλει την έκφρασή του, ευνοώντας τη νευροενδοκρινή ανάπτυξη (Jia et al, 2015).

Στην μελέτη των Chen και συνεργατών, (2016), η έκτοπη υπερέκφραση της INSM1 πρωτεΐνης, έγινε σε ειδικά σχεδιασμένο διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού υπό τον έλεγχο του υποκινητή της πρωτεΐνης της κυτταρικής επιφανείας (Clara cell secretory protein, CCSP). Η έκτοπη υπερέκφραση της INSM1 φαίνεται να διακόπτει την τελευταία φάση ανάπτυξης του κυψελιδικού χώρου στον πνεύμονα του διαγονιδιακού ποντικού. Παράλληλα, στο ίδιο αναπνευστικό επιθήλιο που υπερεκφράζεται η INSM1 πρωτεΐνη, παρατηρείται καταστολή της έκφρασης της κυκλίνης D1 και διακοπή του κυτταρικού κύκλου (Chen et al, 2016).

Στη μελέτη των Fujino και συνεργατών, (2015), η προκλητή υπερέκφραση του γονιδίου της INSM1 στις κυτταρικές σειρές αδενοκαρκινώματος H358 και H1975 είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης των νευροενδοκρινικών δεικτών, χρωμογρανίνη Α, συναπτοφυσίνη και CD56 μέσω της ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων ASCL1 (achaetescute homolog-like 1) και BRN2 (Pou3f2-BRaiN-specific homeobox/POU domain, class 3, transcription factor 2), που συμμετέχουν στην νευρογένεση του εμβρυϊκού εγκεφάλου.

Η υπερέκφραση του γονιδίου *INSM1* σε NSCLC κυτταρικές σειρές, είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αντιθέτως, η γονιδιακή αποσιώπηση του γονιδίου *INSM1* μέσω siRNA (short interfering RNA) στις SCLC κυτταρικές σειρές H69 και H889 μείωσε σημαντικά την έκφραση των προαναφερθέντων παραγόντων και προώθησε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Μελέτες ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης (Chromatin Immuno-Precipitation, ChIP-seq), υποστηρίζουν ότι η *INSM1* πρωτεΐνη προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου του *ASCL1* μεταγραφικού παράγοντα. Ο άξονας *INSM1-ASCL1* παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των νευροενδοκρινικών κυττάρων του πνεύμονα. Η ίδια μελέτη, έδειξε ότι η έκφραση των μορίων Notch1-Hes1 του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch1 καταστέλλει την έκφραση των *INSM1*, *ASCL1*, και *BRN2* παραγόντων στις καρκινικές σειρές του πνεύμονα που μελετήθηκαν. Η προκλητή έκφραση των Notch1-Hes1 παραγόντων αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στις SCLC κυτταρικές σειρές. Συμπερασματικά, η *INSM1* πρωτεΐνη παίζει καίριο ρόλο στην νευροενδοκρινική διαφοροποίηση μέσω του *ASCL1* μεταγραφικού παράγοντα, ενώ παράλληλα προωθεί την έκφραση των κύριων νευροενδοκρινικών δεικτών της συναπτοφυσίνης, της χρωμογρανίνης και της CD56.

Η μελέτη των Chen και συνεργατών, (2018), έδειξε ότι η INSM1 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με την οδό σηματοδότησης Sonic hedgehog (Shh) στα νευροενδοκρινή καρκινώματα του πνεύμονα. Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη μελέτη, το Shh σηματοδοτικό μονοπάτι φαίνεται να ενεργοποιεί την έκφραση της INSM1, μέσω των N-myc και Ascl1 μεταγραφικών παραγόντων, σε SCLC κυτταρικές σειρές. Τα E-box στοιχεία στον υποκινητή του γονιδίου *INSM1* αποτελούν άμεσο στόχο των μεταγραφικών παραγόντων N-myc και Ascl1. Επιπρόσθετα, η έκφραση της INSM1 πρωτεΐνης φάνηκε ότι επάγει τη φωσφορυλίωση και επομένως την ενεργοποίηση των MEK/ERK^{1/2} κινασών. Η ενεργοποίηση των MEK/ERK^{1/2} κινασών διευκολύνει τη φωσφορυλίωση της N-myc στη στο αμινοξικό κατάλοιπο της σερίνης στη θέση 54. Ταυτόχρονα, η ενεργοποίηση της PI3K (Phosphoinositide 3-kinase) οδηγεί στην φωσφορυλίωση της AKT (Protein kinase B) και την ακόλουθη αδρανοποίηση της GSK3β (Glycogen synthase kinase 3 beta), με αποτέλεσμα τη μη φωσφορυλίωση της N-myc στο αμινοξικό κατάλοιπο της θρεονίνης στη θέση-50 (c-Myc, Thr-58). Οι προαναφερόμενες φωσφορυλιώσεις αυξάνουν τη σταθερότητα της N-myc πρωτεΐνης. Η αύξηση της σταθερότητας και η δράση της N-myc πρωτεΐνης, που επιτυγχάνεται με τη δράση της INSM1 πρωτεΐνης, οδηγεί τελικά μέσω της ενεργοποίησης του Shh σηματοδοτικού μονοπατιού στην αυξημένη έκφραση της INSM1 στα νευροενδοκρινή νεοπλάσματα του πνεύμονα.

1.6 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ INSM1 ΣΕ ΝΕΥΡΟΕΝΔΟΚΡΙΝΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της INSM1 έχει μελετηθεί σε ποικίλα νευροενδοκρινή καρκινώματα, όπως το γαστρεντερικό, το ουρογεννητικό σύστημα, τα μαλακά μόρια, το δέρμα και το κεντρικό νευρικό σύστημα. Η ανοσοϊστοχημική μελέτη των Xin συνεργατών, (2018) σε μικροκυτταρικά καρκινώματα του προστάτη έδειξε θετική ανοσοθετικότητα της INSM1 πρωτεΐνης σε ποσοστό της τάξης του 92.3% (12/13). Τα αντίστοιχα ποσοστά για την χρωμογρανίνη και τη συναπτοφυσίνη ήταν 53.8% και 84.6%. Στις καλοήθεις υπερπλασίες και στα αδenoκαρκινώματα του προστάτη η ανοσοχρώση για την INSM1 πρωτεΐνη ήταν 3.4% και 4.0% (13/326) αντίστοιχα.

Στη μελέτη των Kuji και συνεργατών, (2016), η ανοσοϊστοχημική έκφραση της INSM1 σε 37 νευροενδοκρινή καρκινώματα του τραχήλου της μήτρας εντοπίστηκε σε ποσοστό της τάξης του 95% των ιστολογικών δειγμάτων. Τα αντίστοιχα ποσοστά ανοσοθετικότητας για τους δείκτες χρωμογρανίνη, συναπτοφυσίνη και CD56 πρωτεΐνη ήταν 86%, 86% και 68%, αντίστοιχα. Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της INSM1 με την πρόγνωση των ασθενών.

Στην ανοσοϊστοχημική μελέτη των Chen και συνεργατών, (2020), διερευνήθηκε η έκφραση της INSM1, συγκριτικά με την ανοσοέκφραση της συναπτοφυσίνης, της CD56 και της χρωμογρανίνης A, σε νευροενδοκρινικά νεοπλάσματα υψηλής κακοήθειας του ουροποιητικού συστήματος (genitourinary high-grade neuroendocrine carcinomas, GU-HGNECs). Η μελέτη περιελάμβανε 31 μικροκυτταρικά καρκινώματα, 6 LCNECs και δύο μικτά καρκινώματα. Οι περιοχές εντοπισμού αφορούσαν στην ουροδόχο κύστη, στον προστάτη και στο νεφρό. Στα μικροκυτταρικά καρκινώματα, η ανοσοχρώση έναντι της INSM1 παρουσίασε ανάλογη ευαισθησία (93.9%) με τη χρωμογρανίνη (87.8%), τη συναπτοφυσίνη (93.9%) και τη CD56 (87.8%). Στα LCNECs, η ευαισθησία για INSM1, χρωμογρανίνη, συναπτοφυσίνη και CD56 ήταν 62.5%, 62.5%, 75% και 62.5% αντίστοιχα. Η ειδικότητα της INSM1 κατά την ανάλυση 273 μη νευροενδοκρινικών καρκινωμάτων του ουροποιητικού συστήματος με μικροσυστοιχίες ήταν 97,4%.

Η μελέτη των Maleki και συνεργατών σε κυτταρολογικό υλικό (cell blocks) από FNA μυελοειδών καρκινωμάτων του θυρεοειδούς αδένος (29 δείγματα πρωτοπαθών θυρεοειδικών αλλοιώσεων, 19 δείγματα δευτεροπαθών αλλοιώσεων σε λεμφαδένες ή ήπαρ), η ανοσοθετικότητα της INSM1 εκτιμήθηκε σε ποσοστό της τάξης του 93,75% των δειγμάτων. Παράλληλα, κανένα από τα 20 ιστολογικά δείγματα (θηλώδη, θυλακιώδη, αναπλαστικά καρκινώματα του θυρεοειδούς καθώς και δευτεροπαθείς κακοήθειες από καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων και μελάνωμα), που αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου δεν είχαν θετική ανοσοχρώση για την πρωτεΐνη INSM1 (Maleki et al, 2020). Στη μελέτη των Roy και συνεργατών, (2018), αξιολογήθηκε η διαγνωστική χρησιμότητα των μεταγραφικών παραγόντων INSM1 και OTP (Orthopedia Homeobox), που παίζουν κρίσιμο ρόλο στην νευροενδοκρινική και στη νευροεπιθηλιακή ανάπτυξη, σε όγκους νευροενδοκρινούς διαφοροποίησης, με σπάνιο εντοπισμό (προστάτης αδένος, μαστός και όγκοι γυναικολογικής προέλευσης). Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκαν 32 ιστικά δείγματα μονιμοποιημένα σε ουδέτερη φορμόλη 10% και εγκλεισμένα σε παραφίνη, για την κατασκευή μιας ιστικής μικροσυστοιχίας (Tissue Microarrays, TMs). Οι ανοσοχρώσεις εκτιμήθηκαν ημιποσοτικά και έδειξαν διάχυτη ανοσοχρώση της INSM1 πρωτεΐνης σε ποσοστό της τάξης του 60% των γυναικολογικών όγκων, στο 71.4% των καρκινωμάτων του μαστού και στο 25% των αδενοκαρκινωμάτων του προστάτη με νευροενδοκρινή διαφοροποίηση. Η ανοσοϊστοχημική μελέτη των Lilo και συνεργατών, (2018), που πραγματοποιήθηκε σε καρκινώματα κυττάρων Merkel (Merkel Cell Carcinoma, MCC), έδειξε ότι η INSM1 αποτελεί έναν εύκολα ερμηνεύσιμο, υψηλής ευαισθησίας δείκτη της νευροενδοκρινούς διαφοροποίησης. Ειδικότερα, βρέθηκε θετική ανοσοχρώση για την INSM1 πρωτεΐνη στο σύνολο (100%) των MCC (56/56, 47 πρωτοπαθείς όγκοι, 9 λεμφαδενικές μεταστάσεις). Οι αντίστοιχες αναλογίες των ανοσοχρώσεων για τους δείκτες συναπτοφυσίνη, κυτοκερατίνη 20 (CK20), και χρωμογρανίνη ήταν 96%, 92% και 32% αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, ενώ οι προαναφερόμενοι δείκτες παρουσίαζαν σημαντική ποικιλομορφία στην ένταση και στην κατανομή της χρώσης, η INSM1 ανοσοχρώση ήταν θετική σε ποσοστό μεγαλύτερο του 75% των νεοπλασματικών πυρήνων στο 89% των MCC και από 50% έως 75% των νεοπλασματικών πυρήνων στο 11% των MCC. Η ένταση της χρώσης ήταν έντονη στο 85% και μέτρια στο 15% των MCC. Παρόμοια αποτελέσματα καταγράφηκαν και στην ανοσοϊστοχημική μελέτη των Leblebici και συνεργατών (2019), που ανέλυσαν 24 περιπτώσεις MCC. Στη συγκεκριμένη μελέτη εξετάστηκε η

ανοσοχρώση για την πρωτεΐνη INSM1 σε σύγκριση με τους συνηθέστερους νευροενδοκρινικούς δείκτες (χρωμογρανίνη Α, συναπτοφυσίνη και CD56). Η INSM1 ανοσοχρώση ήταν θετική σε όλες τις περιπτώσεις, και η έκφραση της πρωτεΐνης παρουσίαζε υψηλή ένταση, ομοιογένεια και καθαρότητα. Παρομοίως και στην ανοσοϊστοχημική μελέτη των Rush και συνεργατών, (2018), η εκτίμηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της INSM1 πρωτεΐνης σε μικρότερο δείγμα MCC, κατέδειξε υψηλή ευαισθησία του δείκτη (14/15 περιπτώσεις, 93%), με διάχυτη πυρηνική χρώση 2+–3+ (πάνω από το 95% των καρκινικών κυττάρων) σε όλες τις θετικές περιπτώσεις. Στην ανοσοϊστοχημική μελέτη των Rooper και συνεργατών, (2018), εξετάστηκε η έκφραση της INSM1 πρωτεΐνης σε 97 νευροενδοκρινή και 626 μη νευροενδοκρινή νεοπλάσματα της κεφαλής και του τραχήλου. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ανοσοθετικότητα της INSM1 πρωτεΐνης σε όλους τους τύπους των νευροενδοκρινικών νεοπλασμάτων της κεφαλής και του τραχήλου με ευαισθησία 99%, (αδένωμα μέσου ωτός, αδένωμα υπόφυσης, παραγαγγλίωμα, μυελοειδές καρκίνωμα θυρεοειδούς, οσφρητικό νευροβλάστωμα, μικροκυτταρικό καρκίνωμα, LCNEC, τερατοκαρκινোসάρκωμα ρινός και των παραρρινίων). Η ανοσοχρώση για την πρωτεΐνη INSM1 ήταν θετική στην πλειοψηφία των υψηλού βαθμού κακοηθείας νευροενδοκρινικών νεοπλασμάτων, ενώ η ειδικότητά της στα μη νευροενδοκρινή νεοπλάσματα της κεφαλής και του τραχήλου ήταν 97.6% (Rooper et al., 2018). Οι Yoshida και συνεργάτες, (2018), μελέτησαν την έκφραση της INSM1 πρωτεΐνης και την πιθανή διαγνωστική της σημασία στο μυξοειδές χονδροσάρκωμα. Η ανοσοχρώση έναντι του παράγοντα INSM1 ήταν θετική σε 28/31 ιστολογικά δείγματα εξωσκελετικού μυξοειδούς χονδροσάρκωματος (90%), παρέχοντας ισχυρές ενδείξεις για νευροενδοκρινική διαφοροποίηση. Η χρώση ήταν διάχυτη (>50%) σε 17 περιπτώσεις με την πλειοψηφία των καρκινικών κυττάρων να δείχνουν έντονη εστιακά έκφραση της INSM1 πρωτεΐνης. Δεν καταγράφηκε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της INSM1 και της μορφολογίας των κυττάρων, της έκφρασης της συναπτοφυσίνης και της ανίχνευσης αναδιατάξεων του γονιδίου EWSR1. Η έκφραση της INSM1 ήταν αρνητική σε ποσοστό της τάξης του 94% των 187 μεσεγχυματικών νεοπλασμάτων που εξετάστηκαν. Τα θετικά στην INSM1 καρκινώματα που μιμούνται το εξωσκελετικό μυξοειδές χονδροσάρκωμα περιελάμβαναν το χόρδωμα (1/10), το μυοεπιθηλίωμα μαλακών μορίων (1/20), το Ewing σάρκωμα (3/10) και τον οστεοποιούμενο ινωδομυξοειδή όγκο (3/10). Η πλειοψηφία των περιπτώσεων αυτών παρουσίασαν

ανοσοϊστοχημική έκφραση σε ποσοστό μικρότερο από 25% του συνόλου των νεοπλασματικών κυττάρων.

Στη μελέτη των Wang και συνεργατών (2019), η ανοσοϊστοχημική έκφραση της INSM1 πρωτεΐνης ανιχνεύθηκε σε 39/50 (78%) περιφερικά νευροβλαστώματα, μ 27/32 (84%) νευροβλαστώματα, 9/9 (100%) γαγγλιονευροβλαστώματα και 3/9 (33%) γαγγλιονευρώματα. Η μελέτη ανέδειξε ποικιλόμορφη ανοσοϊστοχημική έκφραση της INSM1 στα περιφερικά νευροβλαστώματα με το 30% των περιπτώσεων να παρουσιάζει εστιακή ή στικτή πυρηνική χρώση. Απουσία έκφρασης της INSM1 πρωτεΐνης καταγράφηκε σε μια υποκατηγορία αδιαφοροποίητων ή χαμηλής διαφοροποίησης νευροβλαστωμάτων καθώς και στα ώριμα γαγγλιονευρώματα.

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη των McHugh και συνεργατών, (2020), σε 110 πρωτοπαθή νευροενδοκρινικά νεοπλάσματα του γαστρεντερικού συστήματος, της σκωληκοειδούς απόφυσης και του παγκρέατος, εκτίμησε τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις έναντι των δεικτών INSM1, χρωμογρανίνη A, συναπτοφυσίνη, CD56 και Ki-67. Η ευαισθησία της INSM1 για τα νευροενδοκρινή νεοπλάσματα ήταν 80.9% (89/110 περιπτώσεις), ποσοστό μικρότερο σε σχέση με εκείνο της συναπτοφυσίνης (99.1%, 109/110 περιπτώσεις), της χρωμογρανίνης A (87.3%), και της CD56 (94.5%). Ωστόσο, η ειδικότητά της ήταν σημαντικά υψηλότερη έναντι των υπολοίπων δεικτών (95.7% vs 86.0%, 87.3%, και 86.0%, αντίστοιχα).

Οι Tanigawa και συνεργάτες, (2017), στην εργασία τους ανέλυσαν 27 νευροενδοκρινείς όγκους του παγκρέατος. Η πυρηνική έκφραση της INSM1 πρωτεΐνης ήταν καθολική στο σύνολο των όγκων. Η ευαισθησία της INSM1 πρωτεΐνης ήταν υψηλότερη σε σχέση με εκείνη των δεικτών CD56 και χρωμογρανίνη A, ενώ δεν προέκυψαν σημαντικές στατιστικά διαφορές ως προς της ευαισθησία της συναπτοφυσίνης. Δεν παρατηρήθηκε θετική INSM1 ανοσοχρώση σε αδενοκαρκινώματα του παγκρέατος, κυστικώδεις όγκους του παγκρέατος (acinar cell tumors) και συμπαγείς ψευδοθηλώδεις όγκους.

Η σημασία της ανοσοχρώσης έναντι της INSM1 πρωτεΐνης αναδείχθηκε και στην περίπτωση ανάλυσης κυτταρολογικών δειγμάτων 14 ασθενών για τη διάγνωση των νευροενδοκρινικών νεοπλασμάτων του παγκρέατος στη μελέτη των Takase και συνεργατών (2019). Στη συγκεκριμένη μελέτη, η μέση έκφραση της INSM1 πρωτεΐνης στους grade 1 όγκους ήταν 49.8% ενώ στα grade 2 και 3 η μέση έκφραση ήταν 81.1%, χωρίς να παρατηρείται συσχέτιση με την έκφραση του δείκτη μιτωτικού πολλαπλασιασμού Ki-67 ($r = -0.15$). Σημειώνεται ότι η μέση τιμή συνολικά της INSM1 πρωτεΐνης στα νευροενδοκρινή καρκινώματα του παγκρέατος ήταν 64.3%, σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με η μέση τιμή αυτής στα αδενοκαρκινώματα του παγκρέατος.

Στη μελέτη των Kim και συνεργατών, (2020), η έκφραση της πρωτεΐνης INSM1 ανιχνεύθηκε στο σύνολο των κυτταρολογικών δειγμάτων (cell blocks) και των χειρουργικών παρασκευασμάτων νευροενδοκρινικών νεοπλασμάτων του παγκρέατος. Στη συγκεκριμένη μελέτη, βρέθηκε ότι α H scores μειώνονταν καθώς αυξάνονταν ο βαθμός κακοήθειας (grade). Συγκεκριμένα, τα χαμηλού βαθμού κακοήθειας (Grade 1, G1), τα ενδιάμεσου βαθμού κακοήθειας (Grade 2, G2), και τα υψηλού βαθμού κακοήθειας (Grade 3, G3) καρκινώματα παρουσίασαν μέσο H σκορ για την INSM1 229/253, 266/253, και 30/ 33 στα cell blocks και τα χειρουργικά παρασκευάσματα, αντίστοιχα. Αντιθέτως, στην εργασία των Takase και συνεργατών, (2019). Ειδικότερα,

Τέλος, στην ανοσοϊστοχημική μελέτη των Ames και συνεργατών, (2018), καταγράφηκε θετική πυρηνική ανοσοχρώση σε ποσοστό 87% των μυελοβλαστωμάτων (94 περιπτώσεις). Διάχυτη πυρηνική χρώση έναντι της INSM1 πρωτεΐνης σημειώθηκε σε όλα τα νευροκυττώματα του κεντρικού νευρικού συστήματος και τα αδενώματα της υπόφυσης. Εστιακή στικτή χρώση έναντι της INSM1 πρωτεΐνης ανιχνεύθηκε σε υψηλής κακοήθειας εμβρυικούς όγκους και γλοιώματα. Στο φυσιολογικό ιστό του εγκεφάλου, θετική ανοσοχρώση έναντι της INSM1 πρωτεΐνης σημειώθηκε στα πρώιμα μόνο στάδια της εμβρυικής νευρωνικής ανάπτυξης ενώ ήταν αρνητική σε όλα τα δείγματα του εγκεφαλικού ιστού ενηλίκων. Η συγκεκριμένη μελέτη ανέδειξε ότι η πυρηνική ανοσοχρώση έναντι της INSM1 πρωτεΐνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε νεοπλάσματα του εγκεφάλου νευροενδοκρινούς ή ανώριμης νευρωνικής διαφοροποίησης συνεργατικά με άλλες ανοσοχρώσεις.

1.7 ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ INSM1 ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Η μελέτη των Staaf και συνεργατών, (2020), εξέτασε τις ανοσοχρώσεις για τους δείκτες INSM1, CD56, χρωμογρανίνη Α, και συναπτοφυσίνη σε 54 νευροενδοκρινικούς όγκους του πνεύμονα (24 SCLCs, 23 LCNECs, 7 CTs) και 632 NSCLCs, με τους δείκτες, σε χειρουργικά παρασκευάσματα πνεύμονα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε θετική ανοσοχρώση έναντι της INSM1 πρωτεΐνης σε 39/54 νευροενδοκρινείς όγκους (72%) και στα 6/623 NSCLCs (1%). Τα αντίστοιχα ποσοστά θετικών ανοσοχρώσεων ήταν 47/54 (87%) και 14/626 (2%) για τη CD56, 30/54 (56%) και 6/629 (1%) για τη χρωμογρανίνη Α, και 46/54 (85%) και 49/630 (8%) για τη συναπτοφυσίνη. Ειδικότερα, για τα SCLC καρκινώματα, θετική ανοσοχρώση έναντι της INSM1 πρωτεΐνης ανιχνεύθηκε σε 22/24 (92%) περιπτώσεις, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για τους υπόλοιπους νευροενδοκρινικούς δείκτες χρωμογρανίνη Α, συναπτοφυσίνη και τη CD56 ήταν 67% (16/24), 83% (20/24) και 96% (23/24). Σε 3/24 (12.5%) SCLCs δεν υπήρχε θετική ανοσοχρώση για κανέναν από τους εξεταζόμενους νευροενδοκρινικούς δείκτες, ενώ μια περίπτωση (1/24, 4%) παρουσίασε θετική ανοσοχρώση για τους δείκτες INSM1 και CD56, μόνο. Οι υπόλοιπες SCLC περιπτώσεις, ήταν θετικές και για τους τρεις νευροενδοκρινικούς δείκτες. Σύμφωνα με τους ερευνητές, ο συνδυασμός της CD56 με την INSM1 ανοσοχρώση και/ή με τη συναπτοφυσίνη θα πρέπει να αποτελεί την πρώτη επιλογή για την επιβεβαίωση υψηλού βαθμού κακοήθειας νευροενδοκρινικών όγκων του πνεύμονα. Η έκφραση του *INSM1* γονιδίου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να προβλέψει την μορφολογία των νευροενδοκρινικών νεοπλασμάτων.

Η μελέτη των Rooper και συνεργατών, (2017), ανέλυσε την ανοσοϊστοχημική έκφραση της INSM1 πρωτεΐνης σε μια μεγάλη σειρά νευροενδοκρινικών και μη θωρακικών νεοπλασμάτων, συγκριτικά με τους νευροενδοκρινικούς δείκτες έναντι της συναπτοφυσίνης, της χρωμογρανίνης και της CD56 πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη INSM1 παρουσίασε θετική ανοσοχρώση στο 94.9% των SCLC και στο 91.3% των LCNEC καρκινωμάτων, σε σύγκριση με τα ποσοστά της τάξης των 74.4% και 78.3% του συνδυασμού των υπολοίπων νευροενδοκρινικών δεικτών, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα έδειξαν θετική ανοσοχρώση έναντι της INSM1 σε 37/39 (94.9%) SCLCs, ενώ 24/39 (61.5%) SCLCs ήταν θετικά στη συναπτοφυσίνη, 19/39 (48.7%) SCLCs ήταν θετικά στη χρωμογρανίνη και 21/30 (70%) SCLCs ήταν θετικά στη CD56 πρωτεΐνη.

Στην ίδια μελέτη, 21/23 LCNECs (91.3%) ήταν θετικά στην INSM1, συγκριτικά με τα 14/23 (60.9%), τα 11/23 (47.8%) και τα 14/23 (60.9%) που παρουσίασαν ανοσοθετικότητα στη συναπτοφυσίνη, στη χρωμογρανίνη και στη CD56 πρωτεΐνη, αντίστοιχα. Συνολικά, η χρώση έναντι της INSM1 παρουσίασε υψηλότερη ευαισθησία σε σχέση με τους λοιπούς νευροενδοκρινικούς δείκτες, τόσο στην περίπτωση των SCLCs (94.9% vs. 74.4%) όσο και στα LCNECs (91.3% vs. 78.3%). Επιπλέον, παρατηρήθηκε θετική ανοσοχρώση έναντι της INSM1 σε όλα τα τυπικά και άτυπα καρκινοειδή, ενώ μόλις το 3.3% των αδενοκαρκινωμάτων και το 4.2% των πλακώδων καρκινωμάτων παρουσίασαν θετική χρώση για την INSM1.

Οι Kriegsman και συνεργάτες (2018) κατασκεύασαν ιστικές μικροσυστοιχίες (TMs) από μια μεγάλη σειρά χειρουργικών παρασκευασμάτων καρκινωμάτων του πνεύμονα εφάρμοσαν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις έναντι των δεικτών INSM1, συναπτοφυσίνη, χρωμογρανίνη Α και CD56 πρωτεΐνη. Θετική χρώση για την INSM1 πρωτεΐνη ανιχνεύθηκε σε 305/402 (76%) των καρκινωμάτων με νευροενδοκρινή διαφοροποίηση. Η ειδικότητα της INSM1 ήταν 99% καθώς απουσία χρώσης είχαμε σε 90/91 περιπτώσεις. Η ευαισθησία και ειδικότητα των δεικτών της συναπτοφυσίνης, της χρωμογρανίνης και της CD56, ήταν 87%/91%, 79%/96% και 94%/82%, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, ανοσοθετικότητα της INSM1 πρωτεΐνης ανιχνεύθηκε στο 79%, 42%, 86%, και 97% των καρκινοειδών, των LCNECs, των SCLCs και των παραγαγγλιωμάτων, αντιστοίχως. Ο συνδυασμός των τριών συνηθέστερων ανοσοϊστοχημικών δεικτών παρουσίασε υψηλότερη ευαισθησία (97%), σε σύγκριση με την INSM1, αλλά μειωμένη ειδικότητα, 78% έναντι 99% της INSM1 πρωτεΐνης.

Στη μελέτη των Fujino και συνεργατών, (2015), για την διερεύνηση του ρόλου της INSM1 πρωτεΐνης κατά τη νευροενδοκρινική διαφοροποίηση στον καρκίνο του πνεύμονα, εξετάστηκαν ανοσοϊστοχημικά 160 χειρουργικά παρασκευάσματα που περιελάμβαναν 27 SCLCs (19 SCLCs και 8 μικτά SCLCs), 86 αδενοκαρκινώματα και 47 πλακώδη καρκινώματα. Σε υλικό από 13 κυτταρικές σειρές (7 εξ αυτών SCLCs, 3 ADCs και 3 SCCs) εφαρμόστηκαν τεχνικές Western ανοσοαποτύπωσης. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής ανέδειξαν την ειδική έκφραση της INSM1 πρωτεΐνης, στα SCLCs (27/27, 100%) ενώ από την Western ανάλυση αποτυπώθηκε η έκφραση της INSM1 σε 4/7 SCLC κυτταρικές σειρές.

Σε μεταγενέστερη μελέτη, ο Fujino και συνεργάτες, (2017), αξιολόγησαν την έκφραση της INSM1 πρωτεΐνης και τη σύγκρισή της με άλλους νευροενδοκρινικούς δείκτες (χρωμογρανίνη, συναπτοφυσίνη, CD56), σε 102 χειρουργικά παρασκευάσματα

νευροενδοκρινικών όγκων (7 αδενώματα της υπόφυσης, 7 μυελοειδή καρκινώματα του θυρεοειδούς, 7 καρκίνωμα των κυττάρων Merkel, 7 φαιοχρωμοκυττώματα, 11 νευροενδοκρινικοί όγκοι του παγκρέατος, 31 νευροενδοκρινικοί όγκοι του γαστρεντερικού συστήματος, 5 καρκινοειδή του πνεύμονα, 4 LCNECs, 19 SCLCs, καθώς και 25 δείγματα φυσιολογικών ιστών (5 φυσιολογικοί ιστοί θυρεοειδούς αδένου, 10 φυσιολογικοί ιστοί παχέος εντέρου, 5 φυσιολογικοί ιστοί παγκρέατος και 5 φυσιολογικοί ιστοί πνεύμονα. Συνολικά, η θετικότητα στο αντιγόνο INSM1 απεδείχθη στις 100/102 περιπτώσεις των νευροενδοκρινικών όγκων (98%), ενώ οι αντίστοιχες τιμές για τους δείκτες χρωμογρανίνη Α/ συναπτοφυσίνη/ CD56 ήταν 82.3%, 86.2% και 79.4%, αντίστοιχα. Δεν παρατηρήθηκε ανοσοχρώση στους μη νευροενδοκρινικούς φυσιολογικούς ιστούς και στους μη νευροενδοκρινικούς όγκους. Το μέσο H-score, το οποίο υπολογίστηκε με βάση τον τύπο $1 \times (\% \text{ των } 1+ \text{ κυττάρων}) + 2 \times (\% \text{ των } 2+ \text{ κυττάρων}) + 3 \times (\% \text{ των } 3+ \text{ κυττάρων})$, ήταν υψηλότερο για την ανοσοϊστοχημική χρώση της INSM1 συγκριτικά με τους υπόλοιπους νευροενδοκρινικούς δείκτες (INSM1/ χρωμογρανίνη/ συναπτοφυσίνη/ CD56, 211/122/191/117, $P < 0.0001$). Ειδικότερα, για τα SCLCs, θετική ανοσοχρώση της INSM1 πρωτεΐνης ανιχνεύθηκε στο σύνολο (19/19, 100%) των παρασκευασμάτων, ενώ οι αντίστοιχοι αριθμοί για τη χρωμογρανίνη Α ήταν 14/19 (74%), για τη συναπτοφυσίνη 11/19 (58%) και για την CD56 πρωτεΐνη 13/19 (68%).

Η μελέτη των Mukhopadhyay και συνεργατών, (2019), ανέλυσε 345 περιπτώσεις πρωτοπαθών νεοπλασμάτων του πνεύμονα (292 ολόκληρες τομές). Πραγματοποίησαν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις έναντι των δεικτών INSM1, CD56, συναπτοφυσίνη και χρωμογρανίνη. Στη μελέτη περιέλαβαν συγκεκριμένα 64 SCLCs (32 χειρουργικές εκτομές, 32 μικρές βιοψίες), 24 LCNECs, 64 καρκινοειδή (48 τυπικά και 16 άτυπα), 130 αδenoκαρκινώματα και 33 πλακώδη καρκινώματα. Η ευαισθησία της INSM1 για τα SCLCs (98%), ήταν παρόμοια με εκείνη της συναπτοφυσίνης (100%) και της CD56 (95%), αλλά σημαντικά υψηλότερη από εκείνη της χρωμογρανίνης (83%). Στα LCNEC καρκινώματα, η ευαισθησία της CD56 (92%) και της συναπτοφυσίνης (88%) ήταν υψηλότερες έναντι της ευαισθησίας της INSM1 (75%), ενώ η χρωμογρανίνη ήταν η λιγότερη ευαίσθητη ανοσοχρώση (46%). Όλοι οι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες ήταν θετικοί στο 100% των καρκινοειδών εκτός από ένα άτυπο καρκινοειδές, που ήταν αρνητικό ως προς την έκφραση της INSM1 πρωτεΐνης. Η ευαισθησία της INSM1 στα νευροενδοκρινή νεοπλασμάτα του πνεύμονα ως ομάδα (95%) ήταν παρόμοια με εκείνη της συναπτοφυσίνης (98%) και της CD56 (97%), αλλά υψηλότερη σε σχέση με την

ευαισθησία της χρωμογρανίνης (84%). Η ειδικότητα της INSM1 για τα νευροενδοκρινή νεοπλάσματα του πνεύμονα (97%) ήταν παρόμοια με εκείνη της χρωμογρανίνης (98%), αλλά υψηλότερη σε σχέση με της ειδικότητα της συναπτοφυσίνης (90%) και της CD56 πρωτεΐνης (87%). Στη συγκεκριμένη μελέτη, αναλύθηκαν και μεταστάσεις των πρωτοπαθών νευροενδοκρινικών νεοπλασμάτων του πνεύμονα (n=7). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκφραση της INSM1 σε αυτές διατηρείται.

Οι υπόλοιπες μελέτες για την έκφραση της INSM1 στα SCLC καρκινώματα που ανέκυσαν από την ανασκόπηση της σχετικής βιβλιογραφίας, αφορούν σε ανοσοϊστοχημικές μελέτες κυτταρολογικών δειγμάτων.

Ο Abe και συνεργάτες, (2019), εφάρμοσαν ανοσοκυτταροχημικές τεχνικές σε κυτταρολογικό υλικό ασθενών (cell blocks) με SCLC καρκινώματα που λήφθηκε με βρογχική ψήκτρα και από υπεζωκοτικές συλλογές. Η INSM1 ανοσοχρώση ήταν θετική σε 23/24 (96%) περιπτώσεις SCLC, σε σύγκριση με τις 21/24 (87.5%) περιπτώσεις που ήταν θετικές στην συναπτοφυσίνη. Η ευαισθησία και η ειδικότητα της INSM1 μεταξύ των κυτταρολογικών δειγμάτων με SCLC και NSCLC, ήταν 95.8% και 100.0%, αντίστοιχα, υποδεικνύοντας ότι η INSM1 ανοσοχρώση είναι χρήσιμη στην διάγνωση των SCLC σε κυτταρολογικά δείγματα.

Η μελέτη των Viswanathan και συνεργατών, (2019), αφορούσε στη διερεύνηση της διαγνωστικής αξίας της INSM1 πρωτεΐνης στα νευροενδοκρινή νεοπλάσματα του πνεύμονα, σε σειρά κυτταρολογικών υλικών και χειρουργικών παρασκευασμάτων. Συγκεκριμένα, τα κυτταρολογικά υλικά (cell blocks) περιελάμβαναν 11 τυπικά καρκινοειδή, 11 άτυπα καρκινοειδή, 9 SCLCs, 8 LCNECs, 9 πλακώδη και 6 αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα. Όσον αφορά στα 32 συνολικά χειρουργικά παρασκευάσματα, αυτά περιελάμβαναν 8 τυπικά καρκινοειδή, 9 άτυπα καρκινοειδή, 5 SCLC, 2 πλακώδη και 2 αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα. Όσο αφορά την INSM1 ανοσοχρώση, η ευαισθησία, η ειδικότητα, η θετική και η αρνητική προγνωστική αξία ήταν 92.3%, 100%, 78.9%, and 99% στα κυτταρολογικά υλικά (cell blocks), ενώ στα ιστολογικά δείγματα των χειρουργικών παρασκευασμάτων, οι αντίστοιχες τιμές ήταν 89.8%, 98.1%, 81.5%, και 99% αντίστοιχα, με βαθμό συμφωνίας 86.2%. Η ευαισθησία, η ειδικότητα, η θετική και η αρνητική προγνωστική αξία για τη CD56 πρωτεΐνη στα κυτταρολογικά υλικά ήταν 97.4%, 93.3%, 97.4%, και 93.3%, ενώ στα χειρουργικά παρασκευάσματα ήταν 93.9%, 93.6%, 58.2%, και 99.4% αντίστοιχα. Αντιστοίχως για τη συναπτοφυσίνη οι εν λόγω τιμές στα μεν κυτταρολογικά υλικά ήταν 89.7%, 100%,

100%, και 75%, ενώ στα χειρουργικά παρασκευάσματα ήταν 93.4%, 91.2%, 50.5% και 99.4%. Τέλος οι αντίστοιχες τιμές σε κυτταρολογικά υλικά και χειρουργικά παρασκευάσματα αντίστοιχα για τη χρωμογρανίνη Α ήταν 66.7%, 100%, 100%, και 53.6% και 75.5%, 98.6%, 84.1%, and 97.7%. Το βασικό εύρημα της συγκεκριμένης μελέτης είναι ότι ο συνδυασμός των ανοσοχρώσεων για τις πρωτεΐνες INSM1 και CD56 εξασφαλίζει στα κυτταρολογικά δείγματα 100% ευαισθησία και 93.3% ειδικότητα.

Στη μελέτη των Doxtader και συνεργατών, (2018), συμπεριλήφθησαν 74 πρωτοπαθή νεοπλάσματα του πνεύμονα (41 SCLCs, 1 LCNEC, 10 καρκινοειδή, 11 αδενοκαρκινώματα, 9 πλακώδη καρκινώματα, ένα μεσοθηλίωμα και ένα χαμηλής διαφοροποίησης μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα). Η INSM1 ήταν θετική σε 48/52 (92%) νευροενδοκρινή νεοπλάσματα του πνεύμονα. Ειδικότερα, θετική ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι της INSM1 πρωτεΐνης ανιχνεύθηκε σε 38/41 SCLCs (93%), στο μοναδικό LCNEC (100%), και σε 9/10 καρκινοειδή (90%). Αρνητική ανοσοχρώση για την INSM1 καταγράφηκε σε όλα (22/22, 100%) μη νευροενδοκρινή νεοπλάσματα του πνεύμονα. Στα SCLC καρκινώματα, η ευαισθησία της INSM1 (93%) ήταν χαμηλότερη σε σχέση με της CD56 πρωτεΐνης (100%), ίση με εκείνη της συναπτοφυσίνης (93%) και υψηλότερη σε σχέση με εκείνη της χρωμογρανίνης Α (35%). Στα καρκινοειδή νεοπλάσματα, η ευαισθησία της INSM1 (90%) ήταν χαμηλότερη σε σύγκριση με όλους τους υπόλοιπους δείκτες (100% ο καθένας). Η ειδικότητα της INSM1 για τα νευροενδοκρινή νεοπλάσματα ως ομάδα ήταν 100%.

Τέλος, η μελέτη των Rodriguez και συνεργατών (2018) αφορούσε σε 32 κυτταρολογικά υλικά (cell blocks) με επιβεβαιωμένο SCLC. Πραγματοποιήθηκαν ανοσοχρώσεις έναντι των δεικτών INSM1, CD56, συναπτοφυσίνη και χρωμογρανίνη Α. Η ευαισθησία της INSM1 ήταν 97% (31/32 περιπτώσεις). Ποσοστό της τάξης του 84% (27/32 περιπτώσεις) παρουσίαζε έντονη/διάχυτη χρώση. 4/32 περιπτώσεις (13%) παρουσίαζαν εστιακή, ασθενή ανοσοχρώση, ενώ μία περίπτωση ήταν αρνητική (3%). Σε σύγκριση με τους υπόλοιπους δείκτες, η ευαισθησία για τη CD56 πρωτεΐνη ήταν 96% (22/23), για τη συναπτοφυσίνη 82% (14/17) και για τη χρωμογρανίνη 63% (10/16).

Πίνακας 4: Ποσοστά θετικών ανοσοϊστοχημικών χρώσεων και ευαισθησία των δεικτών INSM1, συναπτοφυσίνη, CD56 και χρωμογρανίνη Α, σε ιστολογικά και κυτταρολογικά δείγματα ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, στις διαφορετικές ανοσοϊστοχημικές μελέτες.

Μελέτες	N SCLCs	Είδος δείγματος	INSM1	Συναπτοφυσίνη	CD56	Χρωμογρανίνη Α
Staaf et al, (2020)	24	Χειρουργικά παρασκευάσματα	22/24 (92%)	20/24 (83%)	23/24 (96%)	16/24 (67%)
Mukhopadhyay et al, (2019)	64	32 Χειρουργικά παρασκευάσματα / 32 μικρές βιοψίες	63/64 (98%)	64/64 (100%)	61/64 (95%)	53/64 (83%)
Kriegsmann et al, (2018)	144	Χειρουργικά παρασκευάσματα / TMs	124/144 86%	122/144 85%	132/144 92%	107/144 74%
Fujino et al, (2017)	19	Χειρουργικά παρασκευάσματα	19/19 (100%)	11/19 (58%)	13/19 (68%)	14/19 (74%)
Fujino et al, (2015)	27	Χειρουργικά παρασκευάσματα	27/27 (100%)	17/27 (63%)	17/27 (63%)	19/27 (70%)
Rooper et al, (2017)	39	Χειρουργικά παρασκευάσματα / TMs	37/39 (94.9%)	24/39 (61.5%)	21/30 (70%)	19/39 (48.7%)
Abe et al, (2019)	24	Κυτταρολογικό υλικό (cell blocks)	23/24 (96%)	21/24 (86%)	-	-
Viswanathan et al, (2019)	17	Κυτταρολογικό υλικό (cell blocks) (n=9)	8/9 (89%)	7/9 (78%)	9/9 (100%)	2/9 (22%)
		Χειρουργικά παρασκευάσματα (n=8)	8/8 (100%)	8/8 (100%)	8/8 (100%)	3/8 (37.5%)
Doxtader et al (2018)	41	Κυτταρολογικό υλικό (cell blocks)	38/41 (93%)	37/40 (93%)	40/40 (100%)	14/40 (35%)
Rodriguez et al (2018)	32	Κυτταρολογικό υλικό (cell blocks)	97% (31/32)	82% (14/17)	96% (22/23)	63% (10/16)

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της μελέτης ήταν η αξιολόγηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της INSM1 πρωτεΐνης και η προγνωστική της αξία σε βιοψίες βρόγχου **πρωτοπαθών** μικροκυτταρικών καρκινωμάτων, καθώς επίσης και η σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της INSM1 πρωτεΐνης με την αντίστοιχη των νευροενδοκρινικών δεικτών που χρησιμοποιούνται συχνότερα για την ανίχνευση των μικροκυτταρικών καρκινωμάτων, όπως η συναπτοφυσίνη και η CD56 πρωτεΐνη.

2.2 ΥΛΙΚΑ- ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Υλικό μελέτης

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε 31 περιπτώσεις μικροκυτταρικών καρκινωμάτων πνεύμονα. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από το αρχείο του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Συγκεκριμένα ανασύραμε ιστολογικό υλικό μονιμοποιημένο σε φορμόλη και εγκλεισμένο σε παραφίνη από βιοψίες βρόγχου ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα. Με τη χρήση κλασικών ανοσοϊστοχημικών μεθόδων, εκτιμήσαμε την πρωτεϊνική έκφραση των δεικτών INSM1, συναπτοφυσίνη, CD56, TTF1, MIB1 και AE1/AE3.

Για όλους τους ασθενείς συλλέξαμε τα δημογραφικά χαρακτηριστικά, όπως το φύλο και, η ηλικία, καθώς και κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά που αφορούν στον όγκο, όπως ο βαθμός διαφοροποίησης (grade), η παρουσία νέκρωσης, η παρουσία crash artifacts, η μιτωτική δραστηριότητα, η παρουσία πυρηνικής υπερχρωμασίας και λεπτοκοκκιώδους κατανομής της χρωματίνης καθώς και το πρότυπο κατανομής της κερατίνης AE1/AE3. Η συλλογή όλων των στοιχείων έγινε διασφαλίζοντας την προστασία των προσωπικών δεδομένων των ασθενών.

2.2.2 Ανοσοϊστοχημεία

Η χρήση της ανοσοϊστοχημείας έχει σημαντικό ρόλο και αξία στη διάγνωση και ιστολογική τυποποίηση του καρκίνου του πνεύμονα. Η ανοσοϊστοχημεία αποτελεί μέρος της ιστοπαθολογίας, η οποία έχει ως στόχο την αναγνώριση των φυσιολογικών ή παθολογικών συστατικών των κυττάρων και των ιστών. Συνιστά μια ομάδα

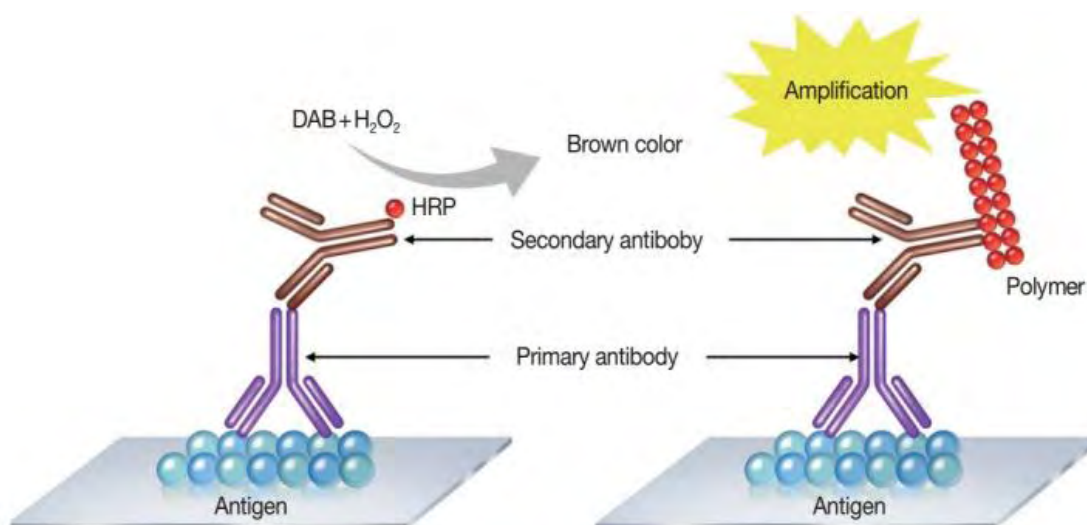
ανοσοσεσημασμένων τεχνικών που συνδυάζουν αρχές της ιστοπαθολογίας, της ανοσολογίας και της χημείας. Ειδικότερα, με την ανοσοϊστοχημεία είναι δυνατή η ανίχνευση και η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των αντιγόνων που μελετώνται *in situ*, με τη χρήση ειδικών, μονοκλωνικών ή πολυκλωνικών αντισωμάτων, συνδεδεμένων με ειδικές χρωστικές που καθιστούν ορατές τις θέσεις εντοπισμού των αντιγόνων, έναντι των αντιγόνων-στόχων (Mani & Zander, 2012).

Οι ανοσοϊστοχημικές τεχνικές περιλαμβάνουν τα εξής στάδια (Miller, 2019):

- αποπαραφίνωση των τομών,
- ενυδάτωση,
- ανάδειξη του αντιγονικού επιτόπου (antigen retrieval), για ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί σε φορμόλη,
- αναστολή της ενδογενούς υπεροξειδάσης, με τη χρήση υδατικού διαλύματος H_2O_2 συγκέντρωσης 3%
- δέσμευση του πρωτογενούς αντισώματος,
- δέσμευση του δευτερογενούς αντισώματος,
- δέσμευση του χρωμογόνου
- χρώση αιματοξυλίνης

Οι κύριες ανοσοϊστοχημικές τεχνικές περιλαμβάνουν την τεχνική της ανοσοϋπεροξειδάσης (PAP μέθοδος), της αβιδίνης-βιοτίνης και της στρεπταβιδίνης. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται κυρίως είναι η υπεροξειδάση του υδρογόνου, η αλκαλική φωσφατάση και η οξειδάση της γλυκόζης (Kim et al, 2016). Η μέθοδος της ανοσοϋπεροξειδάσης αποτελεί μια μέθοδο με υψηλή ευαισθησία. Περιλαμβάνει ως πρώτο βήμα την προσθήκη του ειδικού μη σεσημασμένου πρωτογενούς αντισώματος έναντι του αντιγόνου. Στη συνέχεια, προστίθεται το επισημασμένο με το ένζυμο της υπεροξειδάσης πολυμερές, συζευγμένο σε αντιανοσοσφαιρίνες (δευτερογενές αντίσωμα). Η αναγνώριση των αντιγόνων με το κοινό μικροσκόπιο επιτυγχάνεται τελικά με την χρήση χρωμογόνων, συνηθέστερο από τα οποία είναι η διαμινοβενζιδίνη (3'-Diaminobenzidine, DAB). Η DAB πολυμερίζεται με την παρουσία υπεροξειδάσης και H_2O_2 , σχηματίζοντας ένα αδιάλυτο πολυμερές, που εντοπίζεται στις θέσεις αντιγόνου αντισώματος προσδίδοντας ένα καφέ χρώμα ορατό στο οπτικό μικροσκόπιο. Οι μοριακές μεταβολές της DAB οδηγούν στο σχηματισμό σταθερού χρώματος, που δεν είναι διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες. Στη συνέχεια, οι τομές υπόκεινται σε χρώση

αιματοξυλίνης για να καθοριστούν τα υπόλοιπα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων (Key, 2006).



Εικόνα 5: Απεικόνιση των ανοσοαντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα κατά τις ανοσοϊστοχημικές τεχνικές (HRP, horseradish peroxidase) (Kim et al, 2016).

Για τους ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί σε φορμόλη, είναι συχνά απαραίτητη η θερμο-επαγόμενη ανάκτηση των αντιγόνων (Heat Induced Epitope Retrieval, HIER), προκειμένου να ενισχυθούν οι ανοσοαντιδράσεις. Ειδικότερα, μέσω της HIER, επιτυγχάνεται η διάσπαση των διασταυρούμενων διασυνδέσεων μεταξύ των πρωτεϊνών (cross-links). (Yamashita, 2007). Ο βασικός μηχανισμός της μονιμοποίησης με φορμαλδεΰδη περιλαμβάνει το σχηματισμό ενδιάμεσων προϊόντων μεταξύ της φορμαλίνης και των μη φορτισμένων αμινομάδων (-NH ή NH), σχηματίζοντας διασταυρούμενους δεσμούς ή συνδέσεις (cross-links). Μόλις σχηματιστούν τα ενδιάμεσα προϊόντα (ενεργό μείγμα υδροξυλίων-μεθυλίων), παρουσία ενός δεύτερου ενεργού υδρογόνου ή υδροξυμεθυλομάδας θα σχηματιστεί μια γέφυρα μεθυλενίου, η οποία προκαλεί έντονη αλλαγή στη χωροδιάταξη των μακρομορίων (τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή), καθιστώντας δύσκολη την αναγνώριση των πρωτεϊνικών αντιγόνων από τα πρωτοταγή αντισώματα (Thavarajah et al, 2012).

Η αποτελεσματικότητα της HIER, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία και από το pH του ρυθμιστικού διαλύματος. Τα περισσότερα ανοσοϊστοχημικά πρωτόκολλα χρησιμοποιούν θερμοκρασίες έως 100°C για χρονικό διάστημα 10 έως 20 λεπτά (min). Τα συχνότερα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι το κιτρικό ρυθμιστικό διάλυμα με pH 6.0 και το αλκαλικό ρυθμιστικό διάλυμα (Tris/EDTA, pH 9.0) (D'Amico et al, 2009).

2.2.3 Μονιμοποίηση ιστών και ιστολογική επεξεργασία

Όλες οι βιοψίες βρόγχου μονιμοποιήθηκαν σε έτοιμο προς χρήση ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) φορμαλίνης 10% (Merck, Germany) και εμπεδώθηκαν σε παραφίνη. Για κάθε ασθενή ελήφθησαν τομές πάχους 4μm σε μικροτόμο. Οι τομές καθηλώθηκαν σε θετικά φορτισμένες αντικειμενοφόρες πλάκες (Superfrost, Menzel, Wiesbaden, Germany) και τοποθετήθηκαν σε κλίβανο θερμοκρασίας 65⁰C overnight, εξασφαλίζοντας τη μέγιστη δυνατή προσκόλληση και σταθεροποίηση του ιστού επάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Στη συνέχεια, ακολούθησε η εμβάπτιση των τομών σε διάλυμα ξυλόλης για 30 λεπτά και η ενυδάτωσή τους σε κατιούσα σειρά αλκοολών.

2.2.4 Ανοσοϊστοχημική μελέτη

Για την ανοσοϊστοχημική μελέτη χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι των δεικτών συναπτοφυσίνη, CD56, INSM1, TTF1, KI-67 και AE1/AE3, τα τεχνικά χαρακτηριστικά των οποίων δίνονται παρακάτω (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Τεχνικά χαρακτηριστικά των αντισωμάτων της μελέτης.

Πρωτοταγές Αντίσωμα	Κλώνος	Ξενιστής	Ισότυπος ανοσοσφαιρίνης	Εταιρεία	Κωδικός Προϊόντος	Θετικός μάρτυρας	Θέση αντιγόνου
Synaptophysin	27G12	Ποντίκι	IgG1	Leica-Novocastra	NCL-L-SYNAP-299	Σκωληκοειδής απόφυση	Κυτταρόπλασμα
CD56	MRQ-42	Κουνέλι	IgG1	Cell Marque	CMC15639030	Νευροβλάστωμα, Αμυγδαλή	Κυτταρόπλασμα, Κυτταρική μεμβράνη
INSM1	A-8	Ποντίκι	IgG1	Santa Cruz	sc-271408	Πάγκρεας	Πυρήνας
TTF1	SPT-24	Ποντίκι	IgG1	Leica-Novocastra	NCL-L-TTF-1	Θυρεοειδής αδένας	Πυρήνας
KI-67	MIB1	Ποντίκι	IgG1	Dako	M7240	Αμυγδαλή	Πυρήνας
Cytokeratin Cocktail	AE1/AE3 AE1:Κυτοκερατίνες 10, 14, 15, 16, 19. AE3: Κυτοκερατίνες 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 8.	Ποντίκι	AE1: IgG1/k & AE3: IgG1 /k	Cell Marque	CMC31321050	Δέρμα	Κυτταρόπλασμα

Στην παρούσα μελέτη ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν ιστοί που δείχνουν θετικότητα για το κάθε αντίσωμα σύμφωνα με τις οδηγίες των εταιριών παρασκευής των αντισωμάτων και σύμφωνα με τον εξωτερικό φορέα ποιοτικού ελέγχου NORDIQC (Nordic Immunohistochemical Quality Control), ενώ ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές στις οποίες δεν πραγματοποιήθηκε η επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα.

Η αποκάλυψη των αντιγονικών θέσεων επιτυγχάνεται με την εμβάπτιση των ιστολογικών τομών σε υδατικό διάλυμα Tris EDTA (pH9), το οποίο βρίσκεται σε θερμοκρασία 98⁰C για 25 λεπτά σε υδατόλουτρο (PT module, Dako). Η δέσμευση των ειδικών αντισωμάτων ανιχνεύθηκε σε κάθε περίπτωση με το σύστημα EnVision™ FLEX System, Peroxidase/DAB+ Rabbit/Mouse (Dako, K8000). Το σύστημα ανίχνευσης Envision βασίζεται στη χρήση πολυμερών δεξτράνης, που επιτρέπουν την πρόσδεση μεγάλου αριθμού ενζυμικών μορίων υπεροξειδάσης στο δευτερογενές αντίσωμα, με αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία, την ελαχιστοποίηση της μη ειδικής χρώσης (background) και την εξοικονόμηση χρόνου.

Ειδικότερα, μετά την προσθήκη του πρωτοταγούς αντισώματος, ακολουθεί η επώαση των τομών με το αντιδραστήριο «Linker» για 20 λεπτά. Στην συνέχεια, οι

τομές επωάζονται για 30 λεπτά με το αντιδραστήριο «Polymer HRP». Η χρώση ολοκληρώνεται με τη χρήση του χρωμογόνου DAB (10 λεπτά) ενώ η αντίχρωση γίνεται με αιματοξυλίνη (3 λεπτά). Για τις εκπλύσεις, χρησιμοποιείται διάλυμα 10X TBS-Tween 20 (0.5M Tris Base, 9% NaCl, 0.5% Tween 20, pH 8.4). Όλες οι επωάσεις με τα διαφορετικά αντιδραστήρια, πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε αφυδάτωση σε ανιούσα αλκοολών, διαύγαση με εμβάπτιση σε ξυλόλη και επικόλληση καλυπτρίδων για την μικροσκοπική παρατήρηση. Ειδικότερα, για την ανοσοϊστοχημική μελέτη εφαρμόστηκαν τα παρακάτω πρωτόκολλα για το κάθε αντίσωμα:

Πρωτοπαγές Αντίσωμα	Κλώνος	Αραίωση	Επώαση με H ₂ O ₂	Χρόνος & Θερμοκρασία Επώασης	Ανάκτηση Αντιγονικότητας	
Συναπτοφουσίνη	27G12	1/100	5 λεπτά	30 λεπτά/RT	HIER pH9	98°C για 25 λεπτά
CD56	MRQ-42	1/100	5 λεπτά	30 λεπτά/RT	HIER pH9	98°C για 25 λεπτά
INSM1	A-8	1/100	15 λεπτά	60 λεπτά/RT	HIER pH9	98°C για 40 λεπτά
TTF1	SPT-24	1/100	5 λεπτά	30 λεπτά/RT	HIER pH9	98°C για 25 λεπτά
KI-67	MIB1	1/100	5 λεπτά	30 λεπτά/RT	HIER pH9	98°C για 25 λεπτά
Κοκτέιλ κυτοκερατινών	AE1/AE3	1/300	5 λεπτά	30 λεπτά/RT	HIER pH9	98°C για 25 λεπτά
RT: θερμοκρασία δωματίου						

2.2.5 Αξιολόγηση ιστολογικών και ανοσοϊστοχημικών χρώσεων

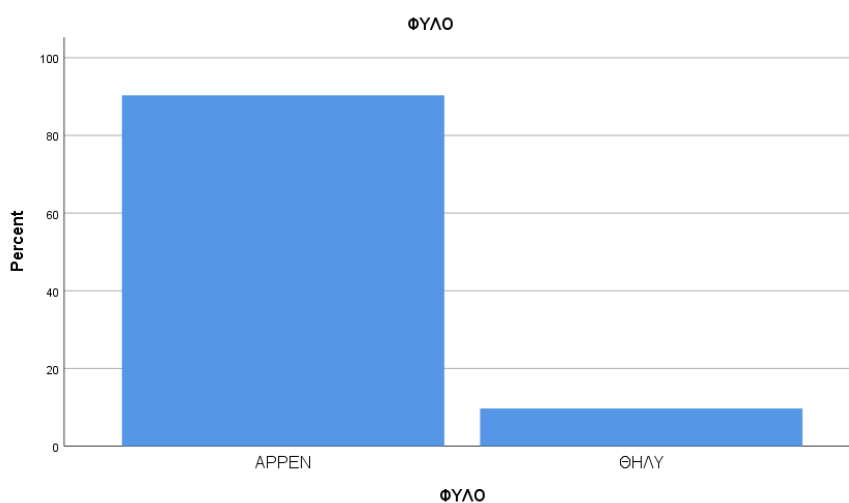
Για κάθε ασθενή, πραγματοποιήθηκε χρώση αιματοξυλίνης/ ηωσίνης σε όλα τα ιστολογικά δείγματα των ενδοσκοπικών βιοψιών. Η αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χαρακτηριστικών έγινε ποιοτικά λαμβάνοντας υπόψιν την έκταση και την ένταση της χρώσης, για καθένα από τα αντισώματα, ανεξάρτητα. Η εκτίμηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων έγινε από έμπειρο Παθολογοανατόμο του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής, του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ειδικότερα, με τη χρήση οπτικού μικροσκοπίου, έγινε ποιοτική εκτίμηση της έντασης της κάθε χρώσης και ορίστηκε ως αρνητική η απουσία χρώσης και ως θετική η παρουσία χρώσης οιασδήποτε έντασης (ασθενής, μέτρια ή έντονη). Όσον αφορά την ερμηνεία των ανοσοϊστοχημικών

ευρημάτων, πυρηνική χρώση για την INSM1 πρωτεΐνη και τον TTF1 μεταγραφικό παράγοντα θεωρούνταν θετική. Για τη συναπτοφυσίνη και την AE1/AE3, ως θετική χρώση θεωρούνταν οποιαδήποτε κυτταροπλασματική χρώση, ενώ για τη CD56 πρωτεΐνη, οποιαδήποτε κυτταροπλασματική ή μεμβρανική χρώση. Η αξιολόγηση έγινε σε όλη την έκταση του ιστού σε διαφορετικές μεγεθύνσεις, και παρελήφθησαν περιοχές όπου δεν υπήρχαν ιστοτεχνικά σφάλματα.

Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS 17 (Statistical Package for Social Science, SPSS Inc, Chicago, U.S.A.), εφαρμόζοντας το Chi square test για τη σύγκριση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των διαφορετικών δεικτών στα καρκινικά κύτταρα. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε ως $p < 0.05$.

3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

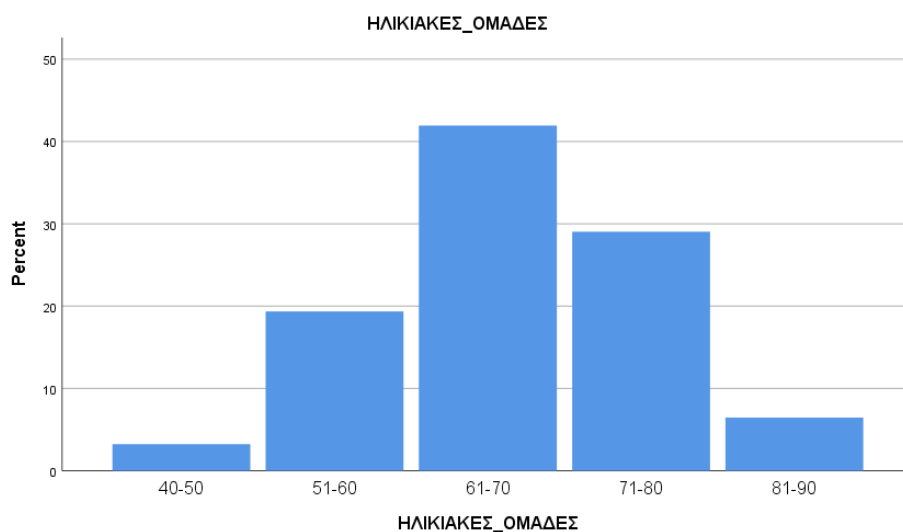
Μελετήσαμε 31 ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Οι 28/31 ασθενείς ήταν άρρενα άτομα (90,3%) και 3/31 ασθενείς (10%) ήταν θήλεα άτομα.



Γράφημα 1: Ποσοστό των δειγμάτων, με μικροκυτταρικό καρκίνωμα ανά φύλο.

Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνωμα του δείγματος της παρούσας μελέτης ήταν τα $67,32 \pm 8,688$ έτη με ελάχιστη τιμή τα 51 έτη και μέγιστη τιμή τα 81 έτη. Το 41,9% του δείγματος (13/31) ανήκε στην ηλικιακή ομάδα των 61-70 ετών, ενώ το 29% (9/31) και το 19,4% (6/31) ανήκε στις ηλικιακές ομάδες των 71-

80 ετών και 51-60 ετών, αντιστοίχως. Επίσης, το 6,5% (2/31) ανήκε στην ηλικιακή ομάδα των 81-90 ετών ενώ ένας ασθενής (3,2%) ήταν ηλικίας από 40 έως 50 ετών.



Γράφημα 2: Ποσοστό των διαφορετικών ηλικιακών ομάδων του δείγματος μελέτης.

Όσον αφορά στα ιστοπαθολογικά ευρήματα, τα εξεταζόμενα δείγματα είχαν τυπικά μορφολογικά χαρακτηριστικά του SCLC. Ειδικότερα, τα νεοπλασματικά κύτταρα ήταν μικρά, παρουσίαζαν πυρηνική υπερχρωμασία και λεπτοκοκκιώδη κατανομή της χρωματίνης. Παρατηρήθηκε πυρηνικό molding, περιοχές με έντονη νέκρωση και εκτεταμένο συνθλιπτικό artifact. Σημειώνεται ότι στο δείγμα της μελέτης δεν περιλαμβάνεται περιστατικό με μικτό μικροκυτταρικό καρκίνωμα.

Επίσης, παρατηρήθηκε έντονος κυτταρικός πολλαπλασιασμός, με δείκτη MIB1 από 80% και άνω, στα νεοπλασματικά κύτταρα. Η πυρηνική χρώση του MIB1 ήταν έντονη στα δείγματα με SCLC, που αξιολογήθηκαν. Ειδικότερα, ο δείκτης MIB1 ήταν 80-90% στο 46,6% των δειγμάτων ενώ 9/31 (30%) δείγματα παρουσίασαν καθολική πυρηνική ανοσοέκφραση του δείκτη MIB1 στα νεοπλασματικά κύτταρα. Σημειώνεται ότι ανοσοχρώση έναντι του συγκεκριμένου δείκτη στερείται ειδικότητας καθώς παρατηρείται και μια ποικιλία άλλων καρκινωμάτων.

Η ανοσοθετικότητα στην πανκρεατίνη AE1/AE3 παρουσίασε το χαρακτηριστικό dot like πρότυπο κατανομής, με την κατανομή της ελάχιστης χρώσης να εντοπίζεται κοντά στον πυρήνα, με τη μορφή κουκίδας ή μικρής γραμμοειδούς στίξης.

Θετική ανοσοχρώση έναντι του TTF-1 εντοπίστηκε στο 80,6% (25/31) των δειγμάτων που εξετάστηκαν ενώ 6/31 (19,35%) ήταν αρνητικά. Ειδικότερα, στα

δείγματα των ασθενών με SCLC που αξιολογήθηκαν, ανιχνεύθηκε έντονη πυρηνική χρώση έναντι του TTF-1, η οποία όμως δεν παρατηρείται στο σύνολο των μικροκυτταρικών καρκινωμάτων. Επιπρόσθετα, ο TTF-1 παράγοντας εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό και σε άλλα καρκινώματα, όπως παραδείγματος χάριν στα αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα και επομένως στερείται ειδικότητας.

Η INSM1 βρέθηκε θετική στο σύνολο των βιοψιών βρόγχου με μικροκυτταρικό καρκίνωμα. Το 93,5% των περιστατικών SCLCs του δείγματος παρουσίασαν θετική ανοσοχρώση έναντι και των τριών νευροενδοκρινικών δεικτών. Ειδικότερα, 31/31 (100%) των SCLCs ήταν θετικά στην INSM1 ανοσοχρώση, ενώ 29/31 (93,5%) των SCLCs που παρουσίασαν ανοσοθετικότητα για τη συναπτοφυσίνη και για τη CD56. Η INSM1 είχε την τάση να δίνει έντονη θετική χρώση στην πλειοψηφία των καρκινικών κυττάρων. Η πυρηνική κατανομή της χρώσης της INSM1 ήταν έντονη και διάχυτη, ενώ η δραστηριότητα και η ένταση της ανοσοχρώσης ήταν συστηματικά υψηλή, στις 22 από τις 31 περιπτώσεις των SCLCs της μελέτης. Σημειώνεται ότι χρώση της INSM1 δεν παρατηρήθηκε στις περιοχές των ιστολογικών τομών με εκτεταμένη νέκρωση. Συγκριτικά με την συναπτοφυσίνη, η ποιότητα και η ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης της INSM1 ήταν καλύτερη στις 24 από τις 31 περιπτώσεις των SCLCs του δείγματος ($p=0.02<0.05$)

Στα δείγματα με SCLC που αξιολογήθηκαν παρατηρήσαμε ότι η κυτταροπλασματική ανοσοχρώση έναντι της συναπτοφυσίνης μπορεί να είναι προβληματική, εξαιτίας της ανομοιομορφίας και της περιορισμένης έκτασης που παρουσιάζει στα νεοπλασματικά κύτταρα, με αποτέλεσμα τη δυσχερή διάκρισή της από τη μη ειδική εναπόθεση του χρωμογόνου (χρώση υποβάθρου, background). Προβλήματα στην εκτίμηση της χρώσης έναντι της INSM1 πρωτεΐνης, εντοπίστηκαν σε περιοχές των ιστολογικών τομών με εκτεταμένη σύνθλιψη των κυττάρων και των αντιστοίχων πυρήνων, το οποίο αποτελεί συχνό artifact στις μικρές ενδοσκοπικές βιοψίες ασθενών με SCLC. Ωστόσο, παρά τα προβλήματα, μπορούσαν να εντοπιστούν αρκετοί πυρήνες νεοπλασματικών κυττάρων με σαφή πυρηνική χρώση έναντι της INSM1 και με τον τρόπο αυτό συνάγεται ότι και η υπόλοιπη εναπόθεση του χρωμογόνου αφορά σε πυρήνες που έχουν υποστεί “ομογενοποίηση” λόγω της εκτεταμένης σύνθλιψης. Στις ίδιες περιοχές με την εκτεταμένη σύνθλιψη των κυττάρων η αξιολόγηση της χρώσης έναντι της συναπτοφυσίνης ήταν πρακτικά αδύνατη, με αποτελέσματα να εκλαμβάνεται ως «αρνητική».

Συγκριτικά με την CD56, η ποιότητα και η ένταση της ανοσοϊστοχημική χρώσης της INSM1 ήταν καλύτερη στις 6 από τις 31 περιπτώσεις των SCLCs του δείγματος. ($p \Rightarrow 0.05$). Η έκφραση της χρώσης έναντι της CD56 πρωτεΐνης, παρουσίασε έντονη ανοσοθετικότητα στη μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων, στην πλειοψηφία των βιοψιών βρόγχου με SCLC. Θα πρέπει να σημειωθεί όμως ότι και η ανοσοχρώση έναντι της CD56 δεν είναι ειδική, καθώς εντοπίζεται σε ποικιλία νεοπλασμάτων.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικών χρώσεων στις μικρές ενδοσκοπικές βιοψίες βρόχου ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.

α/α	Ηλικία	Φύλο	INSM 1	Συναπτοφυσίνη	CD56	ΑΕ1/ΑΕ3	KI-67	TTF1
1	81	A	++	+	++	dot like πρότυπο	80-90%	+
2	73	A	+	+(εστιακά)	+	dot like πρότυπο	100%	+
3	70	A	++	+	++	dot like πρότυπο	100%	+
4	62	A	++	++	++	dot like πρότυπο	80-90%	+
5	75	A	++	+	++	dot like πρότυπο	80-90%	+
6	52	A	+++	+++	+++	dot like πρότυπο	>90%	-
7	76	A	+	+	+	dot like πρότυπο	>90%	-
8	79	A	+	+	+	dot like πρότυπο	80-90%	+
9	70	A	++	+	++	dot like πρότυπο	>90%	+
10	69	A	++	+	+	dot like πρότυπο	80-90%	+
11	73	A	++	+	+	dot like πρότυπο	80-90%	+
12	80	A	+++	+	++	dot like πρότυπο	100%	+
13	63	A	+	-	-	dot like πρότυπο	80-90%	-
14	68	Θ	+	+	+	dot like πρότυπο	>90%	+
15	69	Θ	+	+	+	dot like πρότυπο	80-90%	+
16	61	A	++	+	++	dot like πρότυπο	100%	+
17	63	A	++	+	++	dot like πρότυπο	100%	+
18	57	A	++	+	++	dot like πρότυπο	100%	+(εστιακά)
19	51	A	++	+	++	dot like πρότυπο	100%	+
20	56	A	++	+	++	dot like πρότυπο	80-90%	+
21	69	A	++	+	++	dot like πρότυπο	80-90%	+
22	70	Θ	++	+	++	dot like πρότυπο	100%	+
23	59	A	++	+	++	dot like πρότυπο	100%	+
24	64	A	++	+	++	dot like πρότυπο	90%	+
25	73	A	++	+	++	dot like πρότυπο	80-90%	+

26	75	A	++	+	++	dot like πρότυπο	90%	-
27	81	A	++	+	++	dot like πρότυπο	90%	+
28	72	A	+	+	+	dot like πρότυπο	80%	+
29	55	A	++	+	++	dot like πρότυπο	80-90%	-
30	54	A	++	+	++	dot like πρότυπο	80-90%	+
31	67	A	+	-	-	dot like πρότυπο	90%	-
*Α: άρρην *Θ: θήλυ								

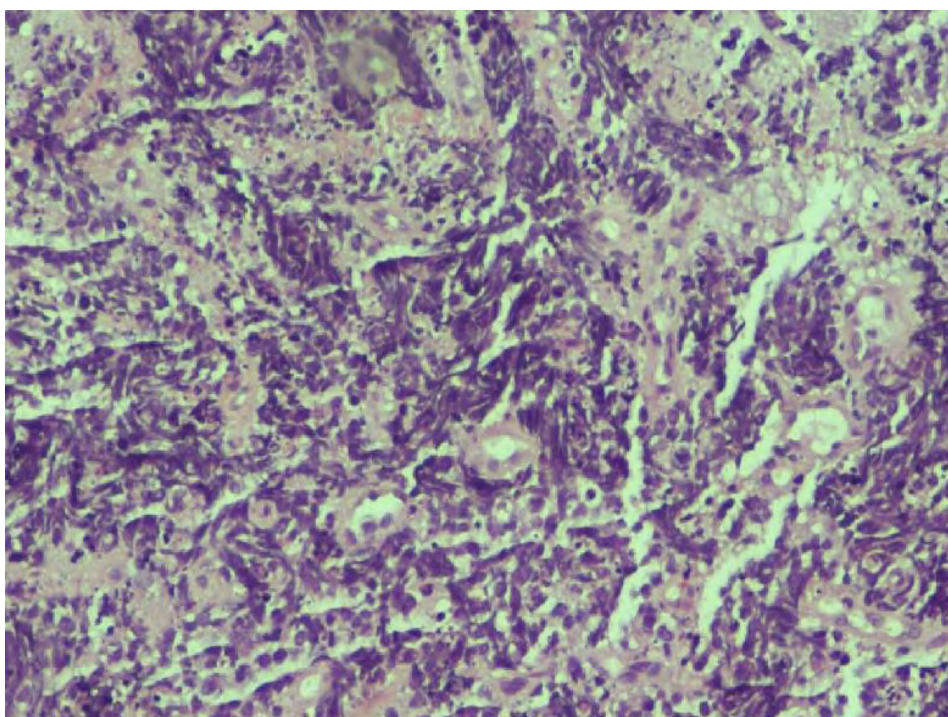
Πίνακας 6: Αποτελέσματα ανοσοϊστοχημικών χρώσεων των δεικτών INSM1, συναπτοφυσίνης, CD56 και TTF-1 στις μικρές ενδοσκοπικές βιοψίες βρόχου ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.

Δείκτης	Αποτέλεσμα	Αριθμός περιπτώσεων (N)	Ποσοστό (%)
INSM1	+	31/31	100%
	-	0/31	0%
Synaptophysin	+	29/31	93,5%
	-	2/31	6,45%
CD56	+	29/31	93,5%
	-	2/31	6,45%
TTF-1	+	25/31	80,6%
	-	6/31	19,35%

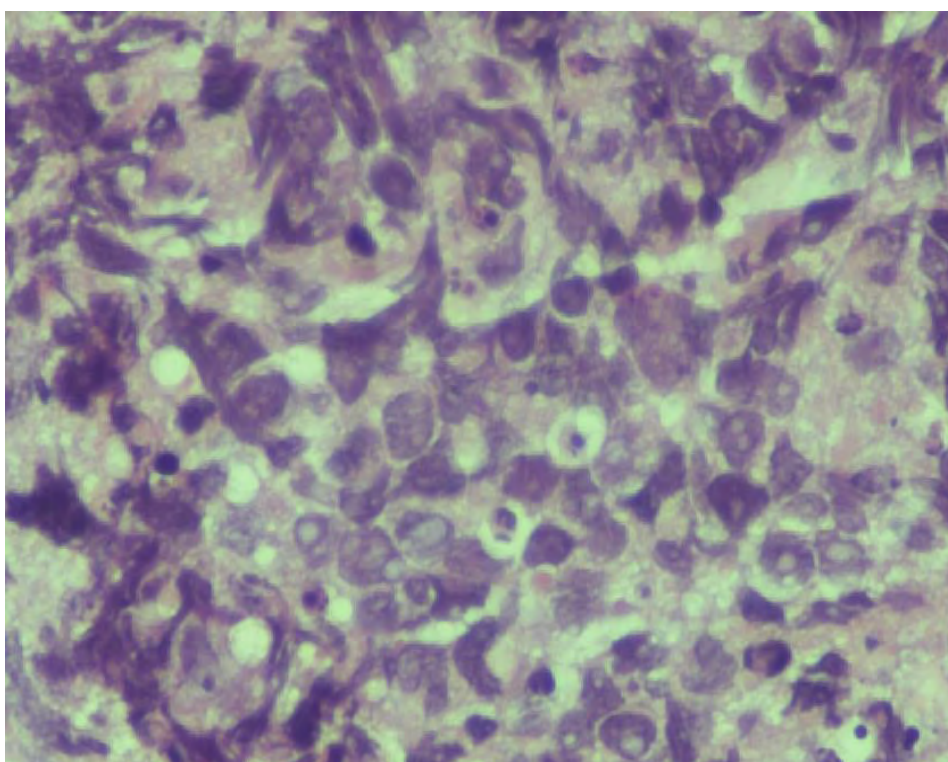
Πίνακας 7: Ευαισθησία των ανοσοϊστοχημικών δεικτών INSM1, synaptophysin, CD56 και TTF-1 σε μικροκυτταρικά καρκινώματα πνεύμονα.

	INSM1	Synaptophysin	CD56	TTF-1
Ποσοστό θετικών δειγμάτων-Ευαισθησία	100%	93,5%	93,5%	80,6%
<i>Ευαισθησία= αληθώς θετικά/ αληθώς θετικά+ ψευδώς αρνητικά</i>				

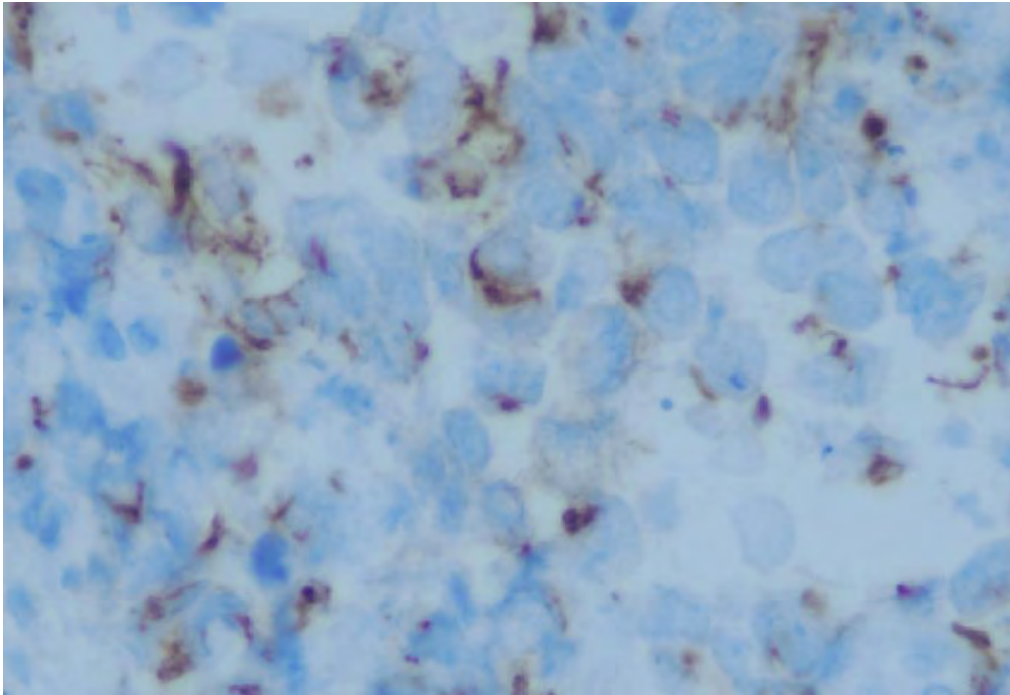
Στην παρούσα μελέτη, εντοπίστηκε δύο περιστατικά αρρένων ασθενών ασθενή, το που δεν παρουσίασαν ανοσοθετικότητα έναντι των συνηθέστερων νευροενδοκρινικών δεικτών της συναπτοφυσίνης και της CD56, ενώ έδειξαν ανοσοθετικότητα έναντι της INSM1 πρωτεΐνης. Ειδικότερα, πρόκειται για καρκινώματα χαμηλής διαφοροποίησης με εικόνα που παραπέμπει σε νευροενδοκρινικό καρκίνωμα, εστιακά μικροκυτταρικό. Η ιστοπαθολογική αξιολόγηση έδειξε κύτταρα μικρού ως μετρίου μεγέθους με υπερχρωμασία, λεπτή κατανομή της χρωματίνης, όχι εμφανή ή διακριτά πυρήνια, ελάχιστο κυτταρόπλασμα, πυρηνικό molding, και "συνθλιπτικό" artifact. Ο ανοσοϊστοχημικός έλεγχος έδειξε ανοσοχρώση για CKAE1/AE3 με κατανομή που συνήθως παρατηρείται στα νευροενδοκρινικά καρκινώματα, ενώ δεν παρατηρήθηκε έκφραση του TTF1 παράγοντα..



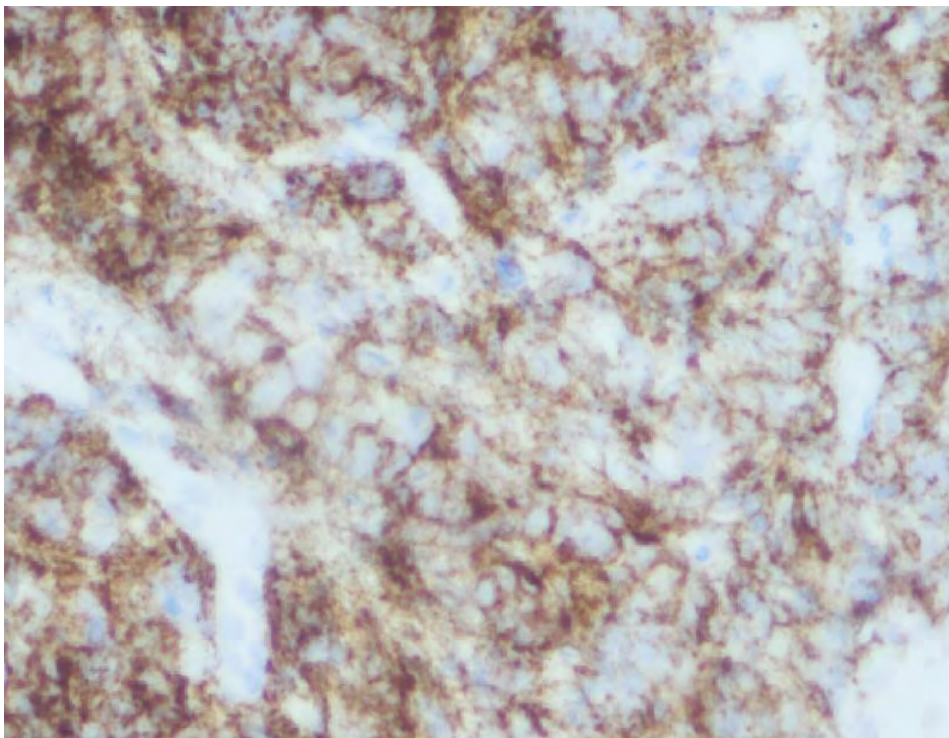
Εικόνα 6: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, σε ενδιάμεση μεγέθυνση 100x.



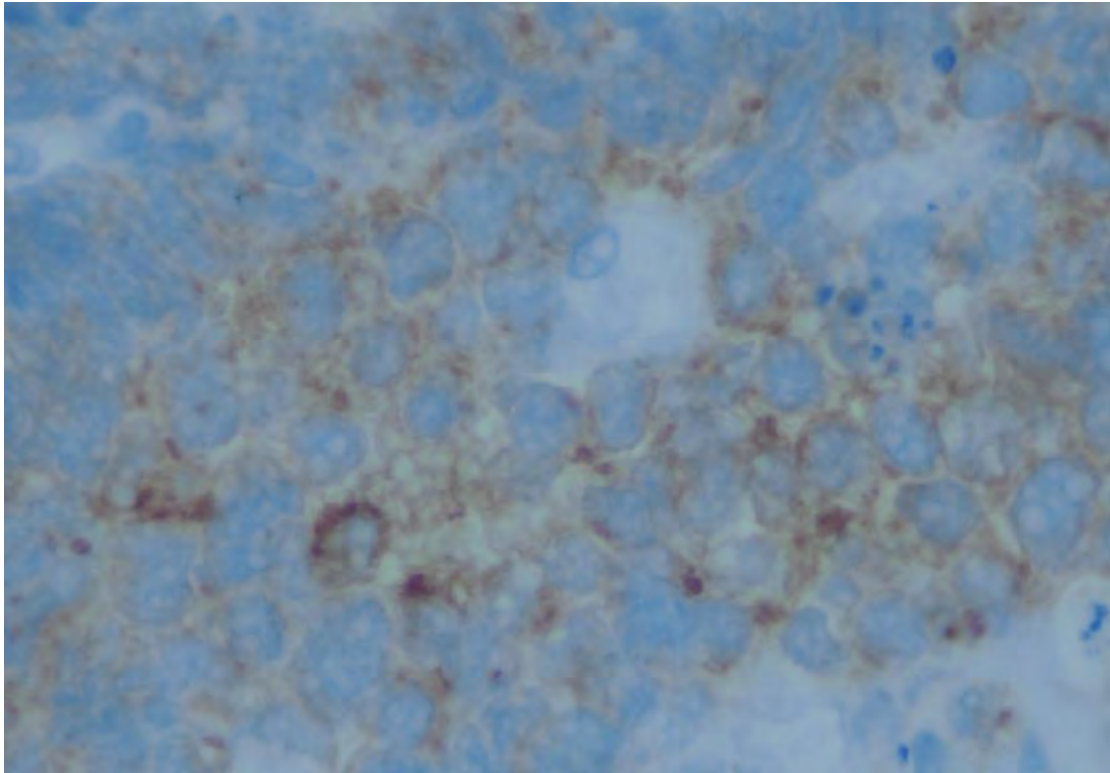
Εικόνα 7: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, σε μεγάλη μεγέθυνση (400x). Παρατηρούμε τη χαρακτηριστική μορφολογία των νεοπλασματικών κυττάρων.



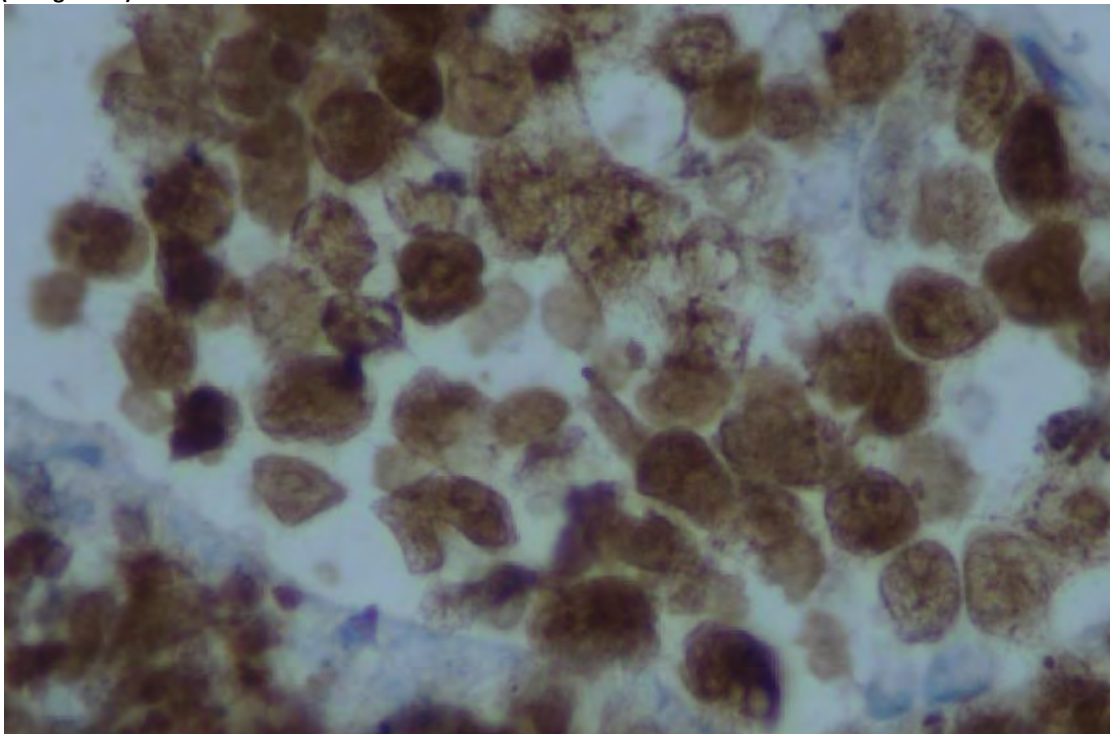
Εικόνα 8: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, ανοσοχρώση CKAE1/AE3 (400x). Παρατηρείται η χαρακτηριστική κατανομή της ελάχιστης χρώσης κοντά στον πυρήνα, συνήθως με τη μορφή κουκίδας ή μικρής γραμμοειδούς στίξης.



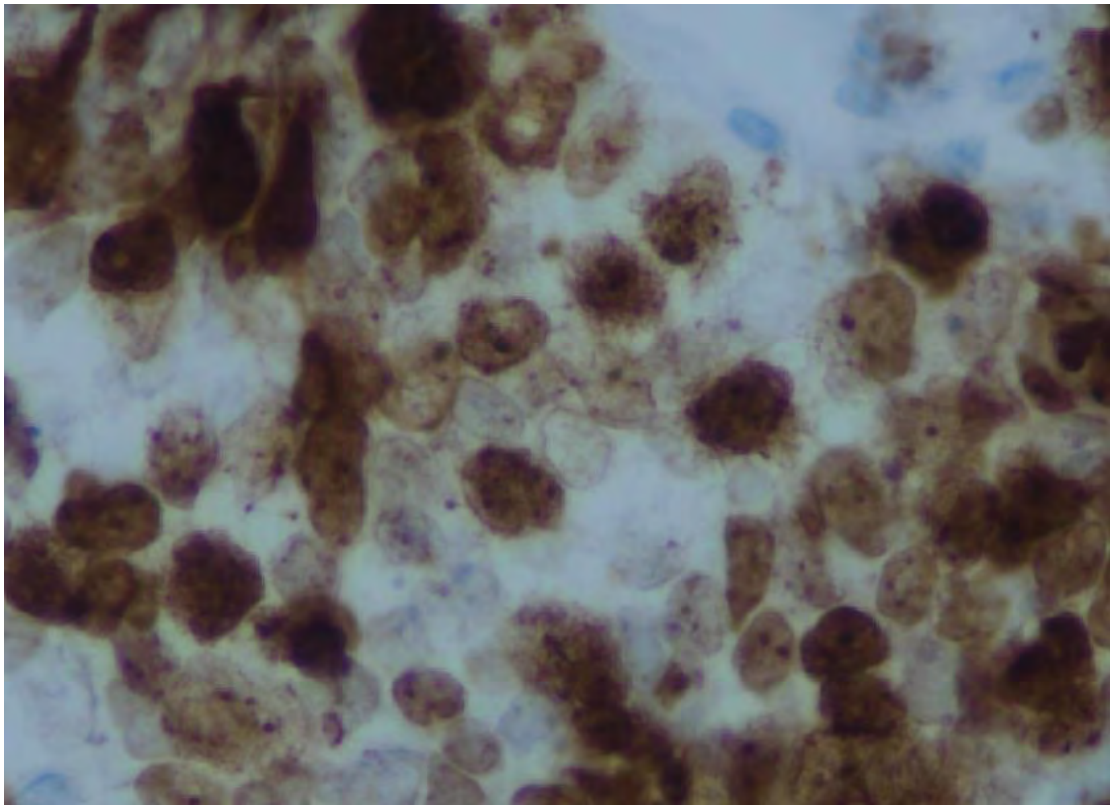
Εικόνα 9: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, ανοσοχρώση για CD56 (200x). Παρατηρείται έντονη ανοσοχρώση στη μεμβράνη και στο κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων, η οποία όμως δεν είναι ειδική.



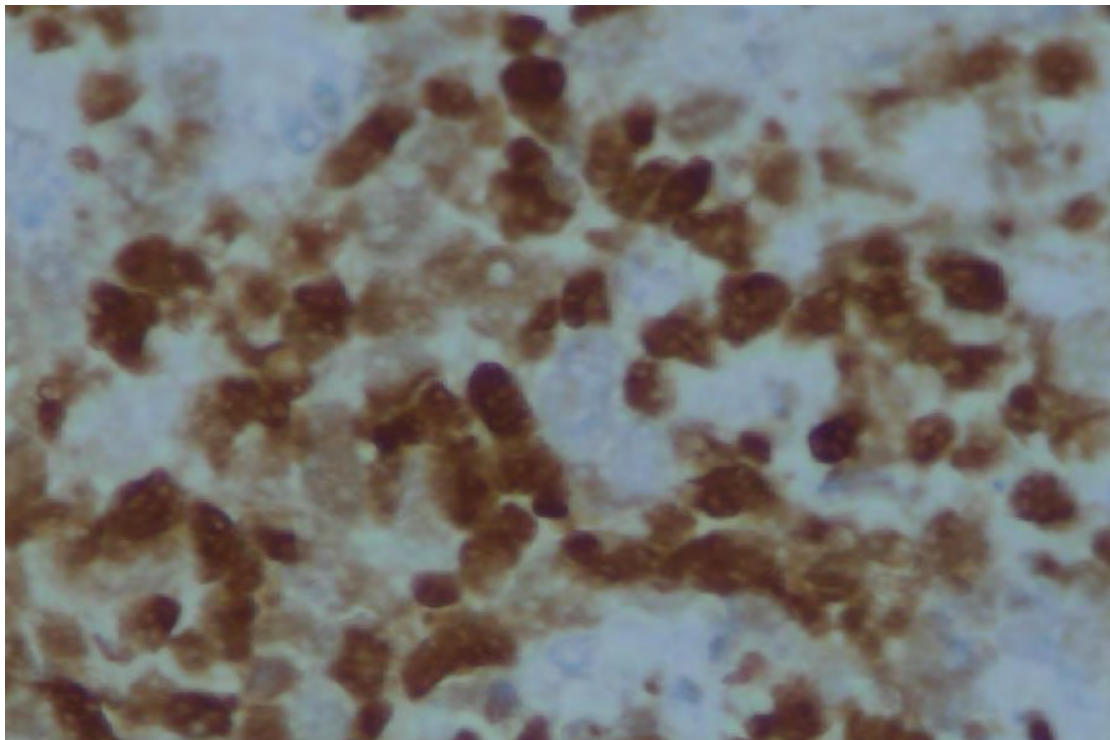
Εικόνα 10: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, ανοσοχρώση για συναπτοφυσίνη(400x). Παρατηρείται ανοσοχρώση στο κυτταρόπλασμα των νεοπλασματικών κυττάρων, η οποία όμως είναι σχετικά περιορισμένη και όχι ομοιόμορφη. Σε ορισμένα κύτταρα μόλις διακρίνεται και μπορεί να θεωρηθεί ως μη ειδική χρώση (background).



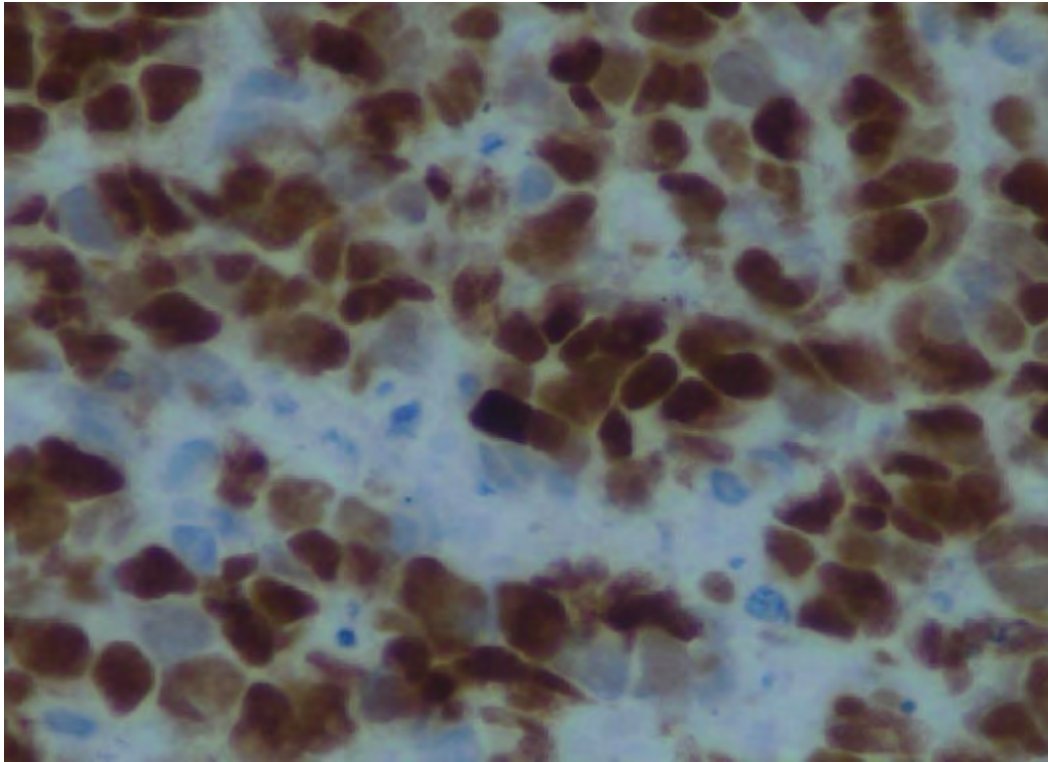
Εικόνα 11: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, ανοσοχρώση TTF1 (400x). Παρατηρείται έντονη πυρηνική χρώση, η οποία όμως δεν παρατηρείται σε όλα τα μικροκυτταρικά καρκινώματα και επίσης παρατηρείται και σε άλλα καρκινώματα, όπως παραδείγματος χάριν τα αδενοκαρκινώματα, επομένως στερείται ειδικότητας.



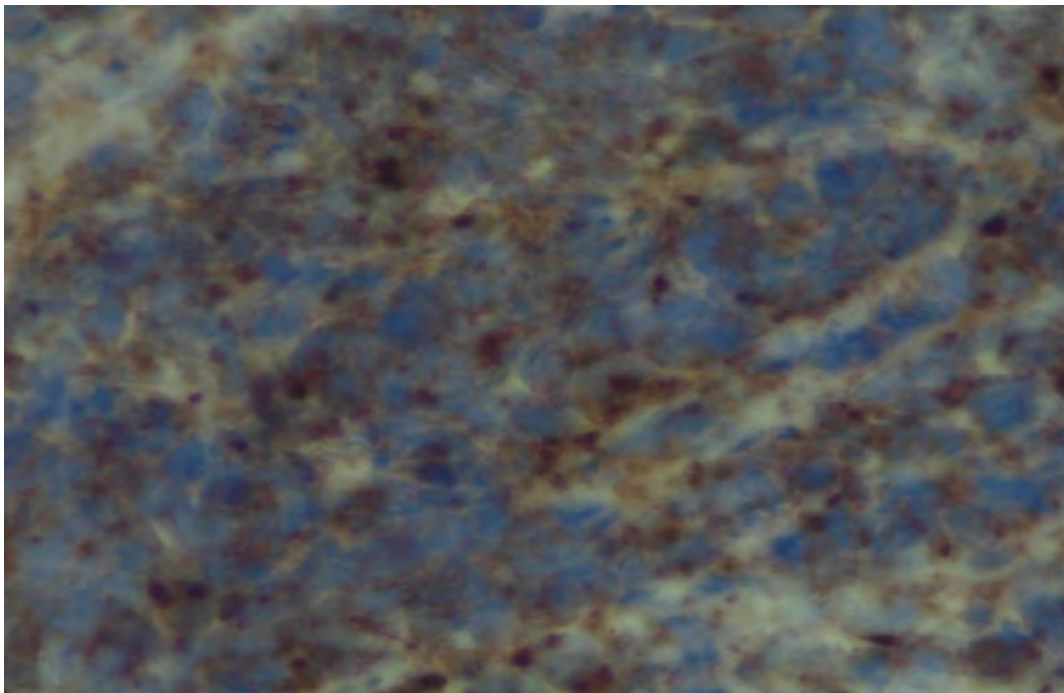
Εικόνα 12: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, ανοσοχρώση MIB1 (400x). Παρατηρείται έντονη πυρηνική χρώση, η οποία όμως παρατηρείται και σε άλλα καρκινώματα και επομένως στερείται ειδικότητας.



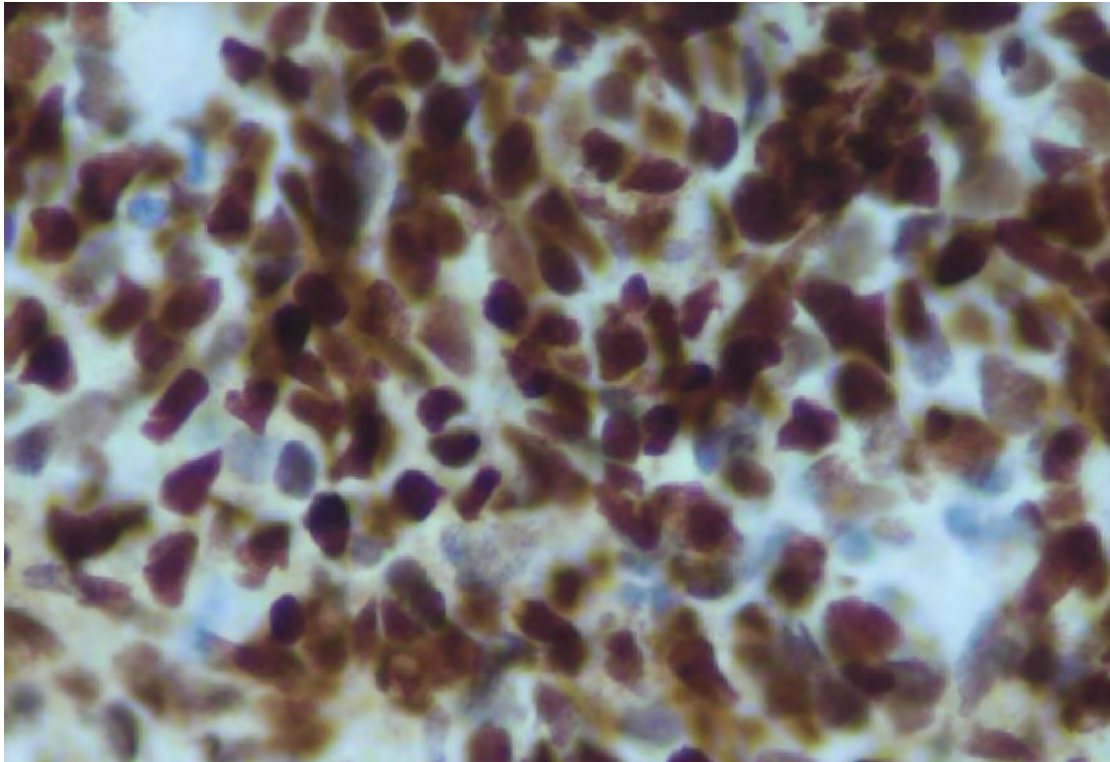
Εικόνα 13: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, ανοσοχρώση INSM1 (400x). Παρατηρείται έντονη πυρηνική χρώση, η οποία δεν παρατηρείται σε άλλα καρκινώματα, πλην του μεγαλοκυτταρικού νευροενδοκρινικού, και επομένως έχει υψηλή ειδικότητα όπως προκύπτει και από τη σχετική βιβλιογραφία.



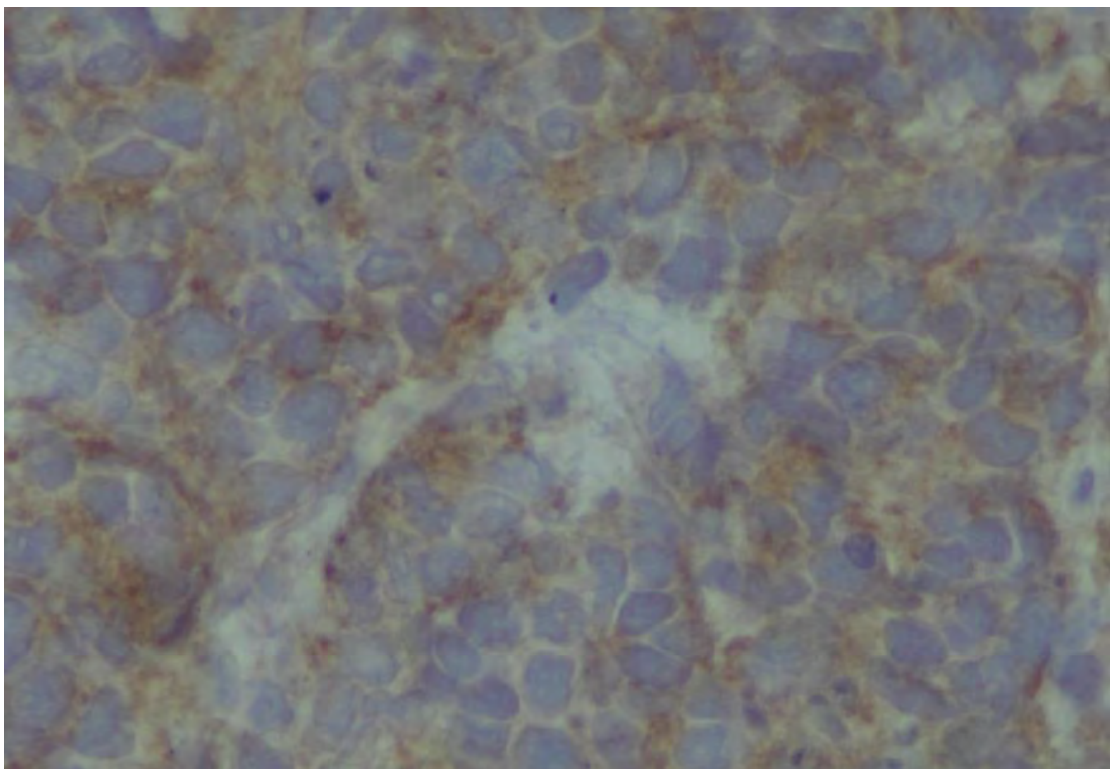
Εικόνα 14: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, ανοσοχρώση INSM1 (400x). Παρατηρείται έντονη πυρηνική χρώση, η οποία δεν παρατηρείται σε άλλα καρκινώματα, πλην του μεγαλοκυτταρικού νευροενδοκρινικού, και επομένως έχει υψηλή ειδικότητα όπως προκύπτει και από τη σχετική βιβλιογραφία.



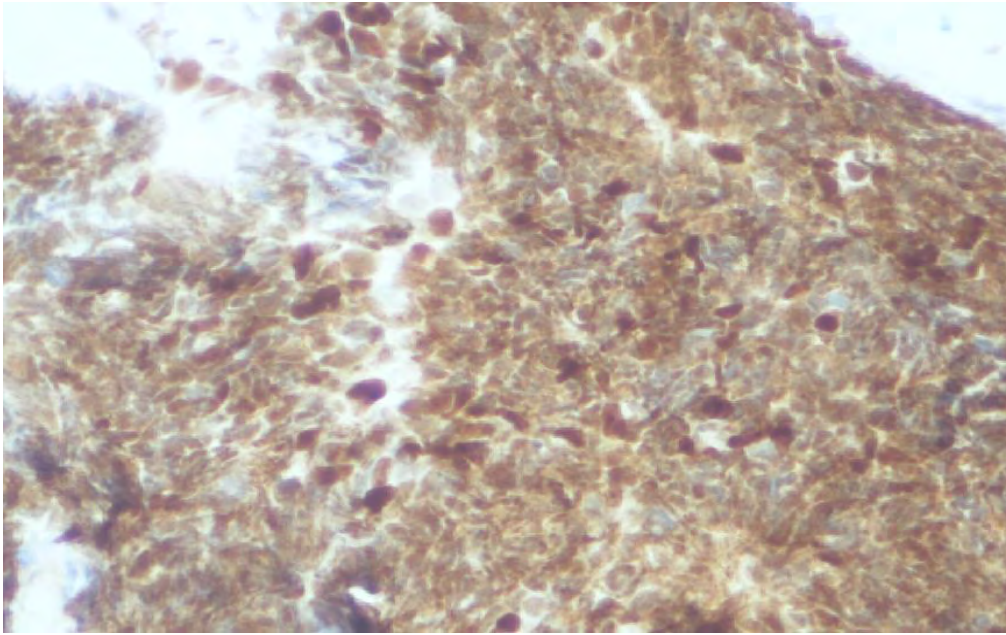
Εικόνα 15: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, ανοσοχρώση συναπτοφυσίνη (400x). Αυτή η χρώση προέρχεται από το ίδιο νεόπλασμα το οποίο απεικονίζεται στην εικόνα 14. Βλέπουμε ότι η εκτίμηση της χρώσης για συναπτοφυσίνη μπορεί να είναι προβληματική, διότι η χρώση είναι κυτταροπλασματική και ανομοιόμορφη με τέτοιο τρόπο ώστε να καθίσταται δυσχερής η διάκριση της από μια μη ειδική εναπόθεση χρωμογόνου στο background.



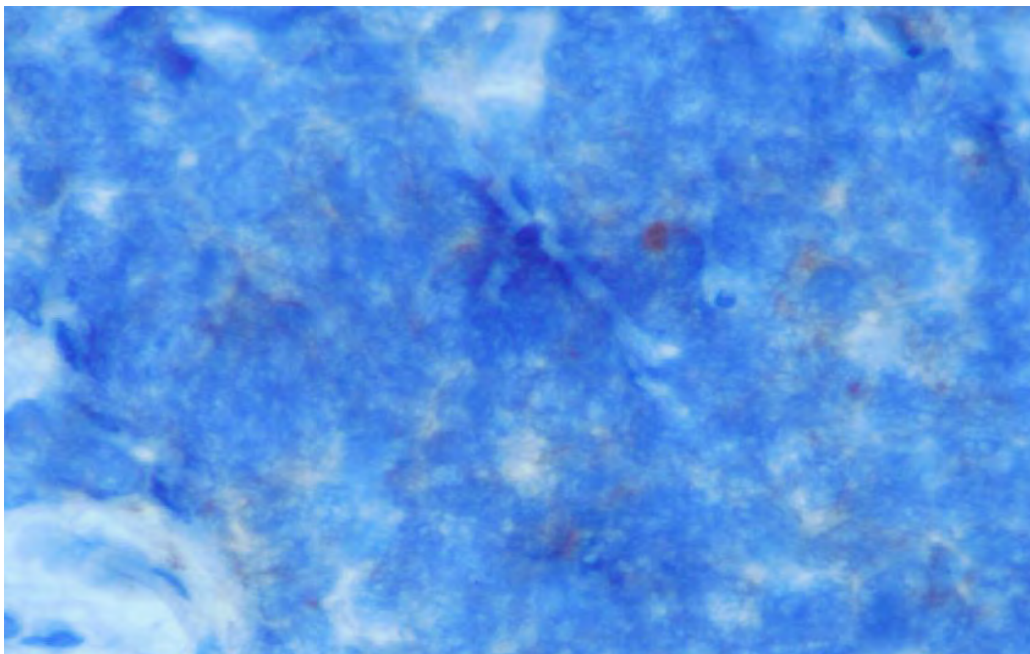
Εικόνα 16: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, ανοσοχρώση INSM1 (400x). Παρατηρείται έντονη πυρηνική χρώση, η οποία δεν παρατηρείται σε άλλα καρκινώματα, πλην του μεγαλοκυτταρικού νευροενδοκρινικού, και επομένως έχει υψηλή ειδικότητα όπως προκύπτει και από τη σχετική βιβλιογραφία.



Εικόνα 17: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, Συναπτοφυσίνη (400x). Αυτή η χρώση προέρχεται από το ίδιο νεόπλασμα το οποίο απεικονίζεται στην εικόνα 16. Βλέπουμε ότι η εκτίμηση της χρώσης για συναπτοφυσίνη μπορεί να είναι προβληματική, διότι η χρώση είναι κυτταροπλασματική και πολύ “ασθενής” με τέτοιο τρόπο ώστε να καθίσταται δυσχερής η διάκριση της από μια background μη ειδική χρώση.



Εικόνα 18: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, INSM1 (400x). Παρατηρείται πυρηνική χρώση, η οποία δεν παρατηρείται σε άλλα καρκινώματα, πλην του μεγαλοκυτταρικού νευροενδοκρινικού, και επομένως έχει υψηλή ειδικότητα όπως προκύπτει και από τη σχετική βιβλιογραφία. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα η χρώση παρουσιάζει προβλήματα στην εκτίμηση διότι προέρχεται από μία περιοχή με εκτεταμένη σύνθλιψη των κυττάρων και των αντιστοιχών πυρήνων. Πάντως παρατηρούνται ορισμένοι πυρήνες με σαφή πυρηνική χρώση, και με τον τρόπο αυτό συνάγεται ότι και η υπόλοιπη εναπόθεση χρωμογόνου είναι σε πυρήνες οι οποίοι έχουν υποστεί “ομογενοποίηση” λόγω εκτεταμένης σύνθλιψης. Αυτό είναι ένα artifact το οποίο είναι συχνό σε μικρές ενδοσκοπικές βιοψίες ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνωμα.



Εικόνα 19: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονος, Συναπτοφυσίνη (400x). Αυτή η χρώση προέρχεται από το ίδιο νεόπλασμα το οποίο απεικονίζεται στην εικόνα 18. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα η χρώση παρουσιάζει προβλήματα στην εκτίμηση διότι προέρχεται από μία περιοχή με εκτεταμένη σύνθλιψη των κυττάρων. Αυτό είναι ένα artifact το οποίο είναι συχνό σε μικρές ενδοσκοπικές βιοψίες ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνωμα. Σε αυτές τις μικροσκοπικές εστίες γενικά, όπως και στο συγκεκριμένο παράδειγμα, είναι πρακτικά αδύνατη η αξιολόγηση της χρώσης για συναπτοφυσίνη, η οποία τις περισσότερες φορές εκλαμβάνεται ως «αρνητική» με αποτέλεσμα να υπάρχουν προβλήματα στην καθημερινή διαγνωστική εργασία.

4.1 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με την πρόσφατη ταξινόμηση των όγκων του πνεύμονα κατά WHO (2015), η διάγνωση των SCLCs σε ιστολογικά και κυτταρολογικά παρασκευάσματα μπορεί να γίνει αξιόπιστα βασιζόμενη μόνο στη μορφολογία των κυττάρων, χωρίς την διενέργεια ανοσοϊστοχημικών χρώσεων. Ωστόσο, η χρήση της ανοσοϊστοχημείας είναι απαραίτητη σε αρκετές περιπτώσεις, με σκοπό την επιβεβαίωση της επιθηλιακής φύσης και του νευροενδοκρινούς φαινοτύπου των νεοπλασματικών κυττάρων, ειδικά σε περιπτώσεις μικρών ενδοσκοπικών βιοψιών του πνεύμονα, της παρουσίας εκτεταμένης κυτταρικής σύνθλιψης και του ανεπαρκούς κυτταρολογικού υλικού (Travis et al, 2015). Στην πρόσφατη μελέτη των Thunnissen et al, (2017), φάνηκε ότι η διάγνωση που βασίζεται μόνο στην χρώση αιματοξυλίνης/ηωσίνης για όγκους με νευροενδοκρινική μορφολογία οδηγεί σε μετρίου βαθμού συμφωνία μεταξύ των παθολογοανατόμων. Ωστόσο, αυτή βελτιώνεται σημαντικά με τη χρήση της ανοσοϊστοχημείας.

Οι πιο συχνοί ανοσοϊστοχημικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται στη διάγνωση των SCLCs είναι η ευρέως φάσματος κερατίνη AE1/AE3, ο μεταγραφικός παράγοντας TTF1, ο δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 και οι νευροενδοκρινικοί δείκτες συναπτοφυσίνη, χρωμογρανίνη A και CD56. Η συναπτοφυσίνη, ο TTF1 παράγοντας και η CD56 πρωτεΐνη αποτελούν τους χρησιμότερους και τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους ανοσοϊστοχημικούς δείκτες για το SCLC (Ordóñez et al, 2000; Nicholson et al, 2002; La Rosa et al, 2010; Thunnissen et al, 2017). Ένα σημαντικό ποσοστό των περιπτώσεων SCLCs (10-15%) είναι αρνητικό ή εστιακά θετικό στους προαναφερθέντες ανοσοϊστοχημικούς δείκτες (Thunnissen et al, 2017).

Η χρώση έναντι της CD56 πρωτεΐνης είναι χρήσιμη στην περίπτωση των βιοπτικών υλικών με εκτεταμένη σύνθλιψη των κυττάρων, καθώς παρατηρείται, σχεδόν πάντα, έντονη μεμβρανική ανοσοθετικότητα στα SCLC καρκινώματα. Ωστόσο, αν και η CD56 ανοσοχρώση παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία στην περίπτωση των SCLCs, σε σύγκριση με άλλους νευροενδοκρινικούς δείκτες, παρουσιάζει θετικότητα και σε άλλους καρκινικούς τύπους και για το λόγο αυτό δε θα πρέπει να θεωρείται ειδική (Kontogianni et al, 2005).

Με εξαίρεση τη χρώση για συναπτοφυσίνη, οι συγκεκριμένοι δείκτες δεν θεωρούνται ειδικοί για το SCLC ή για τη νευροενδοκρινική διαφοροποίηση, ενώ θετική ανοσοχρώση για συναπτοφυσίνη έχει καταγραφεί και σε ορισμένες περιπτώσεις NSCLC, όπως σε αδenoκαρκινώματα και σε πλακώδη καρκινώματα (Gonzalez-

Aragoneses et al, 2007). Η χρωμογρανίνη Α θεωρείται ότι παρουσιάζει την υψηλότερη ειδικότητα ως προς την νευροενδοκρινή διαφοροποίηση, αλλά χαρακτηρίζεται από χαμηλή ευαισθησία, καθώς η έκφρασή της ποικίλει ανάλογα με το βαθμό διαφοροποίησης του όγκου και εστιακή, ασθενής ή απουσία χρώσης μπορεί να παρατηρηθεί και σε χαμηλής διαφοροποίησης νευροενδοκρινή καρκινώματα του πνεύμονα (Nicholson et al, 2002; Yeh & Chou, 2014). Επιπλέον, στις ανοσοχρώσεις για τους προαναφερθέντες νευροενδοκρινικούς δείκτες, συνήθως παρατηρείται μη ειδική χρώση (background), ιδιαίτερα σε περιοχές με νέκρωση, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται προβλήματα στην ερμηνεία των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων, με εστιακή ή ασθενή ανοσοθετικότητα (Viswanathan et al, 2019).

Λαμβάνοντας υπόψη τους προηγούμενες περιορισμούς των νευροενδοκρινικών δεικτών, αναδεικνύεται η ανάγκη ανάπτυξης νέων διαγνωστικών δεικτών για το SCLC. Ένας νευροενδοκρινικός δείκτης με υψηλή έκφραση σε πρωτεϊνικό και μοριακό επίπεδο στα SCLCs, είναι ο μεταγραφικός παράγοντας INSM1 (INSulinoMa associated 1). Η έκφραση της πρωτεΐνης INSM1 έχει καταγραφεί σε νευροενδοκρινικά νεοπλάσματα ποικίλης ανατομικής εντόπισης, σε κυτταρολογικό και ιστολογικό υλικό (Kuji et al, 2017; Xin et al, 2018; Tanigawa et al, 2017; Takase et al, 2019). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη παίζει κεντρικό ρόλο στην ενδοκρινική διαφοροποίηση κατά την εμβρυογένεση. Ο ακριβής βιολογικός της ρόλος στα SCLCs παραμένει άγνωστος (Rooper et al, 2017).

Στη παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική διερεύνηση της έκφρασης της INSM1 πρωτεΐνης σε βιοψίες βρόγχου με διάγνωση μικροκυτταρικού καρκινώματος, με σκοπό τη σύγκρισή της με άλλους νευροενδοκρινικούς δείκτες, όπως η συναπτοφυσίνη και η CD56 που εφαρμόζονται συχνότερα. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν υψηλή ευαισθησία της ανοσοχρώσης έναντι της INSM1, καθώς ήταν θετικά 30/30 περιστατικά SCLC (100%). Επιπρόσθετα, η INSM1 παρουσίασε εντονότερη και καλύτερης ποιότητας χρώση συγκριτικά με τη συναπτοφυσίνη, σε 23 από τα 30 δείγματα SCLC (77%). Η συγκριτική αξιολόγηση μεταξύ των χρώσεων για τις πρωτεΐνες INSM1 και CD56, έδειξε ότι τα δύο αντισώματα είναι ισοδύναμα αφού μόνο 5 στις 30 περιπτώσεις (17%) παρουσίασαν καλύτερη ένταση και ποιότητα χρώσης για την INSM1 έναντι της CD56 πρωτεΐνης.

Η ανοσοϊστοχημική χρώση της INSM1 είναι ευκολότερο να ερμηνευθεί. Η ένταση και η κατανομή της χρώσης για την INSM1 πρωτεΐνη είναι καλύτερη σε σχέση με άλλους νευροενδοκρινικούς δείκτες, όπως η συναπτοφυσίνη. Η πυρηνική έκφραση της

INSM1 δίνει τη δυνατότητα σαφούς προσδιορισμού των νεοπλασματικών κυττάρων, σε σύγκριση με την κυτταροπλασματική και μεμβρανική έκφραση άλλων δεικτών όπως της συναπτοφυσίνης και της CD56 πρωτεΐνης. Επιπλέον, η πυρηνική εντόπιση της INSM1 καθιστά ευκολότερη την μικροσκοπική παρατήρηση της χρώσης, σε δείγματα με ασθενή ή εστιακή ανοσοθετικότητα. Τα προαναφερθέντα πλεονεκτήματα της INSM1 είναι ιδιαίτερα χρήσιμα στην περίπτωση των μικρών ενδοσκοπικών βιοψιών.

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη της INSM1 πραγματοποιήθηκε με το μονοκλωνικό anti-INSM1 αντίσωμα της εταιρείας Santa Cruz (κλώνος A8). Το συγκεκριμένο αντίσωμα έχει χρησιμοποιηθεί στην πλειοψηφία των ανοσοϊστοχημικών μελετών για την ανάδειξη του INSM1 ως δείκτη νευροενδοκρινούς διαφοροποίησης με υψηλή ευαισθησία, σε ποικίλες ανατομικές θέσεις, όπως είναι η θωρακική κοιλότητα, το γαστρεντερικό σύστημα, η ουροποιογεννητική οδός και το κεντρικό νευρικό σύστημα (Fujino et al, 2015; Rooper et al, 2017; Tanigawa et al, 2017; Kuji et al, 2017; Ames et al, 2018).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα ανοσοϊστοχημικά πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν στις μελέτες έκφρασης της INSM1 σε νευροενδοκρινή καρκινώματα του πνεύμονα αφορούσαν στη χρήση κλειστών αυτόματων συστημάτων ανοσοϊστοχημείας (Ventana, kit Ultraview ή Optiview) (Staaf et al, 2020; Mukhopadhyay et al, 2019; Viswanathan et al, 2019; Kriegsmann et al, 2018; Rooper et al, 2017). Στην παρούσα μελέτη το ανοσοϊστοχημικό πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε μπορεί να εφαρμοστεί και στο χέρι (manually), χωρίς την ανάγκη χρήσης κλειστών αυτόματων συστημάτων ανοσοϊστοχημείας.

Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη την ανάγκη διατήρησης υλικού για τη διενέργεια κρίσιμων εξετάσεων, είναι επιθυμητή η εφαρμογή όσο το δυνατόν μικρότερων πάνελ ανοσοϊστοχημικών δεικτών για την ακριβή διάγνωση και ταξινόμηση των καρκινωμάτων του πνεύμονα. Για αυτό το λόγο, η INSM1 μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για την εξοικονόμηση ιστού. Εκτός από την εξοικονόμηση του ιστού, η εφαρμογή της INSM1 ως μοναδικού νευροενδοκρινικού δείκτη, μπορεί να συμβάλλει και στη μείωση του κόστους (Rooper et al, 2017).

Στη βιβλιογραφία έχει καταγραφεί ένα ποσοστό νευροενδοκρινικών καρκινωμάτων της τάξης 10% έως 25% που δεν παρουσιάζει θετική χρώση σε συνδυασμό των τριών συνηθέστερων νευροενδοκρινικών δεικτών (χρωμογρανίνη, συναπτοφυσίνη, CD56) (Nicholson et al, 2002; Hamanaka et al, 2014; Travis et al, 2015). Η INSM1 μπορεί να βοηθήσει σημαντικά στην ανίχνευση των SCLCs, που ενδέχεται να παρουσιάζουν

αρνητική χρώση για τους συνήθεις νευροενδοκρινικούς δείκτες συναπτοφυσίνη και CD56. Στην παρούσα μελέτη, εντοπίστηκε μία περίπτωση με θετική ανοσοχρώση για την INSM1, η οποία ήταν αρνητική στις ανοσοχρώσεις έναντι της συναπτοφυσίνης και της CD56 πρωτεΐνης.

Όσο αφορά στη συσχέτιση της έκφρασης των νευροενδοκρινικών δεικτών με την πρόγνωση των ασθενών με SCLC, στη μελέτη των Hamanaka και συνεργατών, (2014), η οποία περιελάμβανε τη διενέργεια ανοσοϊστοχημικών χρώσεων (συναπτοφυσίνη, χρωμογρανίνη Α, CD56, p63 και CK34βΕ12) σε 51 βιοψίες και 43 χειρουργικά παρασκευάσματα με SCLC, βρέθηκε μια υποκατηγορία χειρουργικών παρασκευασμάτων με SCLC και καλή πρόγνωση, η οποία χαρακτηριζόταν από χαμηλή έκφραση νευροενδοκρινικών δεικτών. Στη μελέτη των McColI και συνεργατών, (2017), βρέθηκε ότι οι ασθενείς με υψηλότερη έκφραση της INSM1 πρωτεΐνης είχαν περισσότερες πιθανότητες να παρουσιάσουν ευαισθησία σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες με βάση την πλατίνα, καθώς και υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης.

Στην πρόσφατη μελέτη των Sakakibara και συνεργατών, (2020), στην οποία διερευνήθηκε η προγνωστική αξία της ανοσοϊστοχημικής χρώσης έναντι της INSM1 σε χειρουργικά παρασκευάσματα με διάγνωση SCLC, βρέθηκε ότι η ομάδα των ασθενών με χαμηλή έκφραση της INSM1 (n=28) είχε καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με την ομάδα που παρουσίαζε υψηλή έκφραση της INSM1 πρωτεΐνης (n=50) (P=0.040). Αξίζει να σημειωθεί ότι εξαιτίας της έλλειψης χειρουργικών παρασκευασμάτων με διάγνωση SCLC, στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν και ασθενείς που είχαν λάβει προεγχειρητικά χημειοθεραπεία. Είναι αναγκαία η διενέργεια περαιτέρω μελετών σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, ώστε να διερευνηθεί πλήρως η σχέση μεταξύ της έκφρασης των νευροενδοκρινικών δεικτών και της πρόγνωσης των ασθενών με SCLC.

Η έκφραση της INSM1 σε μεγάλο βαθμό στα SCLC και η μη ανίχνευσή της, στον φυσιολογικό ενήλικο πνευμονικό ιστό, υποδεικνύει ότι η έκφραση της INSM1 πρωτεΐνης μπορεί να συνεισφέρει στην εμφάνιση των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών των SCLC καρκινωμάτων. Μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες νεοπλασματικών κυττάρων του πνεύμονα, έδειξαν ότι η INSM1 πρωτεΐνη ρυθμίζει την έκφραση των ASCL1, BRN2 μεταγραφικών παραγόντων και των νευροενδοκρινικών μορίων της χρωμογρανίνης Α, της συναπτοφυσίνης και της CD56, ενώ καταστέλλεται μέσω ενεργοποίησης του Notch σηματοδοτικού μονοπατιού. Αν και η INSM1 συνιστά ένα

νευροενδοκρινικό δείκτη των SCLC με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, οι υποκείμενοι μοριακοί μηχανισμοί παραμένουν άγνωστοι (Fujino et al, (2015).

Για τα καρκινώματα του πνεύμονα, οι Rooper και συνεργάτες, (2018), αναφέρουν ότι η χρώση για την πρωτεΐνη INSM1 ήταν θετική στο 94.9% των περιπτώσεων μικροκυτταρικού καρκίνου που εξετάστηκαν, με ευαισθησία 94.6%, υψηλότερη σε σχέση με εκείνη της συναπτοφυσίνης (78.4%), στους θωρακικούς νευροενδοκρινείς όγκους.

Στη μελέτη των Doxtader και συνεργατών, (2018), η ανοσοχρώση για INSM1 ήταν θετική σε ποσοστό της τάξης του 92% των κυτταρολογικών δειγμάτων με διάγνωση SCLC, ενώ η ευαισθησία της (93%) ήταν ισοδύναμη με εκείνη της συναπτοφυσίνης. Στη μελέτη των Abe και συνεργατών, (2019), στην οποία αναλύθηκαν κυτταρολογικά δείγματα επίσης, η ανοσοχρώση για την πρωτεΐνη INSM1 ήταν θετική σε 23/24 περιπτώσεις (96%)έναντι 21/24 περιπτώσεις (87.5%) που ήταν θετικές στη συναπτοφυσίνη. Η ευαισθησία και η ειδικότητα μεταξύ των κυτταρολογικών δειγμάτων με SCLC και NSCLC ήταν 95.8% και 100.0%, αντίστοιχα, υποδεικνύοντας ότι η INSM1 είναι χρήσιμη στην διάγνωση των SCLC από κυτταρολογικό υλικό. Η αντι-INSM1 ανοσοχρώση μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε κυτταρολογικά δείγματα (cell blocks), παρουσιάζοντας υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα όσον αφορά στα νευροενδοκρινή νεοπλάσματα του πνεύμονα (Doxtader et al, 2018; Abe et al, 2019; Viswanathan et al, 2019).

Στη παρούσα μελέτη και σε συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, οι INSM1 και CD56 ήταν οι καλύτεροι δείκτες για την ταυτοποίηση των υψηλού βαθμού κακοηθείας SCLCs, λαμβάνοντας υπόψη την ευαισθησία και την ποιότητα των χρώσεων, ενώ η συναπτοφυσίνη έδειξε επίσης καλή ευαισθησία. Η INSM1 μπορεί να θεωρηθεί ως αποτελεσματικός νευροενδοκρινικός δείκτης, στις μικρές ενδοσκοπικές βιοψίες. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η ανοσοχρώση για την INSM1 έχει πολύ καλή διαγνωστική απόδοση στις μικρές ενδοσκοπικές βιοψίες, με χρήση ειδικών ανοσοϊστοχημικών μεθόδων, που δεν απαιτούν τη χρησιμοποίηση κλειστών συστημάτων ανοσοϊστοχημείας. Σημειώνεται στην πλειοψηφία των ανοσοϊστοχημικών μελετών για την διερεύνηση της έκφρασης της INSM1, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από χειρουργικά παρασκευάσματα (Staaf et al, 2020; Kriegsmann et al, 2018; Fujino et al, 2017, 2015; Rooper et al, 2017) και κυτταρολογικού υλικού (Abe et al, 2019; Viswanathan et al, 2019; Doxtader et al, 2018;

Rodriguez et al, 2018). Η παρούσα μελέτη περιέλαβε βιοψίες βρόγχου ασθενών με διάγνωση SCLC.

Συμπερασματικά, η ανοσοϊστοχημική χρώση έναντι της INSM1 πρωτεΐνης μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο υψηλής ευαισθησίας για την ταυτοποίηση ασθενών με SCLC, ακόμη και στις περιπτώσεις που δεν ταυτοποιείται η έκφραση των λοιπών ανοσοϊστοχημικών δεικτών νευροενδοκρινούς φύσης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abe, H., Takase, Y., Sadashima, E., Fukumitsu, C., Murata, K., Ito, T., ... Akiba, J. (2019). Insulinoma-associated protein 1 is a novel diagnostic marker of small cell lung cancer in bronchial brushing and cell block cytology from pleural effusions: Validity and reliability with cutoff value. *Cancer Cytopathology*, 127(9), 598–605. <https://doi.org/10.1002/cncy.22177>
2. Ames, H. M., Rooper, L. M., Laterra, J. J., Eberhart, C. G., & Rodriguez, F. J. (2018). INSM1 Expression Is Frequent in Primary Central Nervous System Neoplasms but Not in the Adult Brain Parenchyma. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 77(5), 374–382. <https://doi.org/10.1093/jnen/nly014>
3. Arcaro, A. (2015) Targeted therapies for small cell lung cancer: Where do we stand? *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 95:154–164
4. Augustyn, A., Borromeo, M., Wang, T., Fujimoto, J., Shao, C., Dospoy, P. D., Lee, V., Tan, C., Sullivan, J. P., Larsen, J. E., Girard, L., Behrens, C., Wistuba, I. I., Xie, Y., Cobb, M. H., Gazdar, A. F., Johnson, J. E., & Minna, J. D. (2014). ASCL1 is a lineage oncogene providing therapeutic targets for high-grade neuroendocrine lung cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(41), 14788–14793. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410419111>
5. Badzio, A. (2019). Prognostic value of broad-spectrum keratin clones AE1/AE3 and CAM5.2 in small cell lung cancer patients undergoing pulmonary resection. *Acta Biochimica Polonica*. https://doi.org/10.18388/abp.2018_2773
6. Barta, J. A., Powell, C. A., & Wisnivesky, J. P. (2019). Global Epidemiology of Lung Cancer. *Annals of global health*, 85(1), 8. <https://doi.org/10.5334/aogh.2419>
7. Bernhardt, E. B., & Jalal, S. I. (2016). Small Cell Lung Cancer. In *Cancer Treatment and Research*, 301–322. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40389-2_14
8. Bhateja, P., Chiu, M., Wildey, G., Lipka, M. B., Fu, P., Yang, M., Ardeshir-Larijani, F., Sharma, N., & Dowlati, A. (2019). Retinoblastoma mutation predicts poor outcomes in advanced non small cell lung cancer. *Cancer medicine*, 8(4), 1459–1466. <https://doi.org/10.1002/cam4.2023>
9. Breslin, M. B., Wang, H. W., Pierce, A., Aucoin, R., & Lan, M. S. (2007). Neurogenin 3 recruits CBP co-activator to facilitate histone H3/H4 acetylation in the

- target gene INSM1. *FEBS letters*, 581(5), 949–954.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.01.087>
10. Breslin, M. B., Zhu, M., & Lan, M. S. (2003). NeuroD1/E47 regulates the E-box element of a novel zinc finger transcription factor, IA-1, in developing nervous system. *The Journal of biological chemistry*, 278(40), 38991–38997.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M306795200>
11. Bunn, P. A., Jr, Minna, J. D., Augustyn, A., Gazdar, A. F., Ouadah, Y., Krasnow, M. A., Berns, A., Brambilla, E., Rekhman, N., Massion, P. P., Niederst, M., Peifer, M., Yokota, J., Govindan, R., Poirier, J. T., Byers, L. A., Wynes, M. W., McFadden, D. G., MacPherson, D., Hann, C. L., ... Hirsch, F. R. (2016). Small Cell Lung Cancer: Can Recent Advances in Biology and Molecular Biology Be Translated into Improved Outcomes?. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 11(4), 453–474.
<https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.01.012>
12. Chen, C., Breslin, M. B., & Lan, M. S. (2018). Sonic hedgehog signaling pathway promotes INSM1 transcription factor in neuroendocrine lung cancer. *Cellular Signalling*, 46, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.02.014>
13. Chen, C., Breslin, M. B., and Lan, M. S. (2016) Ectopic expression of a small cell lung cancer transcription factor, INSM1 impairs alveologenesis in lung development. *BMC. Pulm.Med.* 16, 49
14. Chen, C., Notkins, A. L., & Lan, M. S. (2019). Insulinoma-Associated-1: From Neuroendocrine Tumor Marker to Cancer Therapeutics. *Molecular Cancer Research*, 17(8), 1597–1604. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-19-0286>
15. Chen, H. J., Poran, A., Unni, A. M., Huang, S. X., Elemento, O., Snoeck, H. W., & Varmus, H. (2019). Generation of pulmonary neuroendocrine cells and SCLC-like tumors from human embryonic stem cells. *The Journal of experimental medicine*, 216(3), 674–687. <https://doi.org/10.1084/jem.20181155>
16. Chen, J. F., Yang, C., Sun, Y., & Cao, D. (2020). Expression of novel neuroendocrine marker insulinoma-associated protein 1 (INSM1) in genitourinary high-grade neuroendocrine carcinomas: An immunohistochemical study with specificity analysis and comparison to chromogranin, synaptophysin, and CD56. *Pathology, research and practice*, 216(6), 152993.
<https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.152993>

17. Chirieac, L. R. (2016). Ki-67 expression in pulmonary tumors. *Translational lung cancer research*, 5(5), 547–551. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.10.13>
18. Chu, P., Wu, E., Weiss, L.M. (2000). Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases. *Modern Pathology*, 13:962-72
19. D'Amico, F., Skarmoutsou, E., & Stivala, F. (2009). State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. *Journal of Immunological Methods*, 341(1–2), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.11.007>
20. Dayen, C., Debieuvre, D., Molinier, O., Raffy, O., Paganin, F., Virally, J., Larive, S., Desurmont-Salasc, B., Perrichon, M., Martin, F., & Grivaux, M. (2017). New insights into stage and prognosis in small cell lung cancer: an analysis of 968 cases. *Journal of thoracic disease*, 9(12), 5101–5111. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.11.52>.
21. Doxtader, E. E., & Mukhopadhyay, S. (2018). Insulinoma-associated protein 1 is a sensitive and specific marker of neuroendocrine lung neoplasms in cytology specimens. *Cancer cytopathology*, 126(4), 243–252. <https://doi.org/10.1002/cncy.21972>.
22. Du, E. (2004). TTF-1 expression is specific for lung primary in typical and atypical carcinoids: TTF-1-positive carcinoids are predominantly in peripheral location. *Human Pathology*, 35(7), 825–840.
23. Farkas, L. M., Haffner, C., Giger, T., Khaitovich, P., Nowick, K., Birchmeier, C., Paabo, S., and Huttner, W. B. (2008) Insulinoma-associated 1 has a panneurogenic role and promotes the generation and expansion of basal progenitors in the developing mouse neocortex. *Neuron* 60, 40-55
24. Feng, J., Sheng, H., Zhu, C., Qian, X., Wan, D., Su, D., Chen, X., & Zhu, L. (2016). Correlation of neuroendocrine features with prognosis of non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 7(44), 71727–71736. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12327>
25. Filosso, P. L., Falcoz, P. E., Solidoro, P., Pellicano, D., Passani, S., Guerrero, F., Ruffini, E., & ESTS Lung Neuroendocrine Working-Group Participating Centers* (2018). The European Society of Thoracic Surgeons (ESTS) lung neuroendocrine tumors (NETs) database. *Journal of thoracic disease*, 10(Suppl 29), S3528–S3532. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.04.104>

26. Fujino, K., Motooka, Y., Hassan, W. A., Ali Abdalla, M. O., Sato, Y., Kudoh, S., Hasegawa, K., Niimori-Kita, K., Kobayashi, H., Kubota, I., Wakimoto, J., Suzuki, M., & Ito, T. (2015). Insulinoma-Associated Protein 1 Is a Crucial Regulator of Neuroendocrine Differentiation in Lung Cancer. *The American Journal of Pathology*, 185(12), 3164–3177. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.08.018>
27. Gattenlöhner, S., Stühmer, T., Leich, E., Reinhard, M., Etschmann, B., Völker, H. U., Rosenwald, A., Serfling, E., Bargou, R. C., Ertl, G., Einsele, H., & Müller-Hermelink, H. K. (2009). Specific detection of CD56 (NCAM) isoforms for the identification of aggressive malignant neoplasms with progressive development. *The American journal of pathology*, 174(4), 1160–1171. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080647>
28. Gazdar, A. F., Bunn, P. A., & Minna, J. D. (2017). Small-cell lung cancer: what we know, what we need to know and the path forward. *Nature reviews. Cancer*, 17(12), 765. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.106>
29. Gazdar, A. F., Savage, T. K., Johnson, J. E., Berns, A., Sage, J., Linnoila, R. I., MacPherson, D., McFadden, D. G., Farago, A., Jacks, T., Travis, W. D., & Brambilla, E. (2015). The comparative pathology of genetically engineered mouse models for neuroendocrine carcinomas of the lung. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 10(4), 553–564. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000459>
30. George, J., Lim, J. S., Jang, S. J., Cun, Y., Ozretić, L., Kong, G., Leenders, F., Lu, X., Fernández-Cuesta, L., Bosco, G., Müller, C., Dahmen, I., Jahchan, N. S., Park, K. S., Yang, D., Karnezis, A. N., Vaka, D., Torres, A., Wang, M. S., Korbel, J. O., ... Thomas, R. K. (2015). Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*, 524(7563), 47–53. <https://doi.org/10.1038/nature14664>
31. González-Aragoneses, F., Moreno-Mata, N., Cebollero-Presmanes, M., García-Yuste, M., Cañizares-Carretero, M. A., Molins-López-Rodó, L., Quevedo-Losada, S., Torres-Lanzas, J., Alvarez-Fernández, E., & Spanish Multicenter Study of Neuroendocrine Tumours of the Lung of the Spanish Society of Pneumology, ThoracicSurgery (EMETNE-SEPAR) (2007). Prognostic significance of synaptophysin in stage I of squamous carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Cancer*, 110(8), 1776–1781. <https://doi.org/10.1002/cncr.22985>
32. Goto, Y., De Silva, M. G., Toscani, A., Prabhakar, B. S., Notkins, A. L., & Lan, M. S. (1992). A novel human insulinoma-associated cDNA, IA-1, encodes a protein

with "zinc-finger" DNA-binding motifs. *The Journal of biological chemistry*, 267(21), 15252–15257.

33. Gu, G., Dubauskaite, J., & Melton, D. A. (2002). Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development (Cambridge, England)*, 129(10), 2447–2457.

34. Gut, P., Czarnywojtek, A., Fischbach, J., Bączyk, M., Ziemnicka, K., Wrotkowska, E., Gryczyńska, M., & Ruchała, M. (2016). Chromogranin A – unspecific neuroendocrine marker. Clinical utility and potential diagnostic pitfalls. *Archives of Medical Science*, 1, 1–9. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.57577>

35. Hamanaka, W., Motoi, N., Ishikawa, S., Ushijima, M., Inamura, K., Hatano, S., Uehara, H., Okumura, S., Nakagawa, K., Nishio, M., Horai, T., Aburatani, H., Matsuura, M., Iwasaki, A., & Ishikawa, Y. (2014). A subset of small cell lung cancer with low neuroendocrine expression and good prognosis: a comparison study of surgical and inoperable cases with biopsy. *Human pathology*, 45(5), 1045–1056. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.01.001>

36. Hiroshima, K., Iyoda, A., Shida, T., Shibuya, K., Iizasa, T., Kishi, H., Tanizawa, T., Fujisawa, T., & Nakatani, Y. (2006). Distinction of pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma from small cell lung carcinoma: a morphological, immunohistochemical, and molecular analysis. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 19(10), 1358–1368. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800659>

37. Horita, N., Yamamoto, M., Sato, T. et al. Topotecan for Relapsed Small-cell Lung Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis of 1347 Patients. *Sci Rep* 5, 15437 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep15437>

38. Horn, L., Mansfield, A. S., Szczesna, A., Havel, L., Krzakowski, M., Hochmair, M. J., Huemer, F., Losonczy, G., Johnson, M. L., Nishio, M., Reck, M., Mok, T., Lam, S., Shames, D. S., Liu, J., Ding, B., Lopez-Chavez, A., Kabbinar, F., Lin, W., ... Liu, S. V. (2018). First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 379(23), 2220–2229. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1809064>

39. Howe, M. C., Chapman, A., Kerr, K., Dougal, M., Anderson, H., & Hasleton, P. S. (2005). Neuroendocrine differentiation in non-small cell lung cancer and its

relation to prognosis and therapy. *Histopathology*, 46(2), 195–201. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2005.02047.x>

40. Huang, T. W., Lin, K. F., Lee, C. H., Chang, H., Lee, S. C., & Shieh, Y. S. (2017). The role of Thyroid Transcription Factor-1 and Tumor differentiation in Resected Lung Adenocarcinoma. *Scientific reports*, 7(1), 14222. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14651-y>

41. Iida, Y., Masuda, S., Nakanishi, Y., Shimizu, T., Nishimaki, H., Takahashi, M., Hikichi, M., Maruoka, S., Gon, Y., Takahashi, N., & Hashimoto, S. (2018). Clinicopathological characteristics of thyroid transcription factor 1-negative small cell lung cancers. *Human pathology*, 79, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.05.009>

42. Inoue, M., Sawabata, N., & Okumura, M. (2012). Surgical intervention for small-cell lung cancer: what is the surgical role?. *General thoracic and cardiovascular surgery*, 60(7), 401–405. <https://doi.org/10.1007/s11748-012-0072-9>

43. Ito, T., Kudoh, S., Ichimura, T., Fujino, K., Hassan, W. A., & Udaka, N. (2017). Small cell lung cancer, an epithelial to mesenchymal transition (EMT)-like cancer: significance of inactive Notch signaling and expression of achaete-scute complex homologue 1. *Human cell*, 30(1), 1–10.

44. Ito, Takaaki & Udaka, Naoko & Yazawa, Takuya & Okudela, Koji & Hayashi, H & Sudo, T & Guillemot, F & Kageyama, R & Kitamura, Hideo. (2000). Basic helix-loop-helix transcription factors regulate the neuroendocrine differentiation of fetal mouse pulmonary epithelium. *Development (Cambridge, England)*. 127. 3913-21.

45. Jia, S., Wildner, H., & Birchmeier, C. (2015). Insm1 controls the differentiation of pulmonary neuroendocrine cells by repressing Hes1. *Developmental biology*, 408(1), 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.10.009>

46. Kalemkerian, G. P. (2012). Staging and imaging of small cell lung cancer. *Cancer imaging : the official publication of the International Cancer Imaging Society*, 11(1), 253–258. <https://doi.org/10.1102/1470-7330.2011.0036>

47. Kaltsas, G. A., Besser, G. M., & Grossman, A. B. (2004). The diagnosis and medical management of advanced neuroendocrine tumors. *Endocrine reviews*, 25(3), 458–511. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0014>

48. Kanaji, N., Watanabe, N., Kita, N., Bandoh, S., Tadokoro, A., Ishii, T., Dobashi, H., & Matsunaga, T. (2014). Paraneoplastic syndromes associated with lung cancer.

World journal of clinical oncology, 5(3), 197–223.
<https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.197>

49. Karachaliou, N., Pilotto, S., Lazzari, C., Bria, E., de Marinis, F., & Rosell, R. (2016). Cellular and molecular biology of small cell lung cancer: an overview. *Translational lung cancer research*, 5(1), 2–15. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2016.01.02>

50. Kaufmann, O., & Dietel, M. (2000). Expression of thyroid transcription factor-1 in pulmonary and extrapulmonary small cell carcinomas and other neuroendocrine carcinomas of various primary sites. *Histopathology*, 36(5), 415–420. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2000.00890.x>

51. Key, M. (2006) Immunohistochemistry Staining Methods. In *Immunohistochemical Staining Methods Fourth Edition* (pp. 57-60) Dako, Carpinteria, California

52. Kim, D., Viswanathan, K., Goyal, A., & Rao, R. (2020). Insulinoma-associated protein 1 (INSM1) is a robust marker for identifying and grading pancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer cytopathology*, 128(4), 269–277. <https://doi.org/10.1002/cncy.22242>

53. Kim, S. W., Roh, J., & Park, C. S. (2016). Immunohistochemistry for Pathologists: Protocols, Pitfalls, and Tips. *Journal of pathology and translational medicine*, 50(6), 411–418. <https://doi.org/10.4132/jptm.2016.08.08>

54. Kontogianni, K., Nicholson, A. G., Butcher, D., & Sheppard, M. N. (2005). CD56: a useful tool for the diagnosis of small cell lung carcinomas on biopsies with extensive crush artefact. *Journal of clinical pathology*, 58(9), 978–980. <https://doi.org/10.1136/jcp.2004.023044>

55. Kriegsmann, K., Zgorzelski, C., Kazdal, D., Cremer, M., Muley, T., Winter, H., Longuespée, R., Kriegsmann, J., Warth, A., & Kriegsmann, M. (2020). Insulinoma-associated Protein 1 (INSM1) in Thoracic Tumors is Less Sensitive but More Specific Compared With Synaptophysin, Chromogranin A, and CD56. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM*, 28(3), 237–242. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000715>

56. Kudoh, S., Tenjin, Y., Kameyama, H. *et al.* Significance of *achaete-scute complex homologue 1 (ASCL1)* in pulmonary neuroendocrine carcinomas; RNA sequence analyses using small cell lung cancer cells and *Ascl1*-induced pulmonary

- neuroendocrine carcinoma cells. *Histochem Cell Biol* **153**, 443–456 (2020). <https://doi.org/10.1007/s00418-020-01863-z>
57. Kuji, S., Watanabe, R., Sato, Y., Iwata, T., Hirashima, Y., Takekuma, M., Ito, I., Abe, M., Nagashio, R., Omae, K., Aoki, D., & Kameya, T. (2017). A new marker, insulinoma-associated protein 1 (INSM1), for high-grade neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix: Analysis of 37 cases. *Gynecologic oncology*, *144*(2), 384–390. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2016.11.020>
58. La Rosa, S., Chiaravalli, A. M., Placidi, C., Papanikolaou, N., Cerati, M., & Capella, C. (2010). TTF1 expression in normal lung neuroendocrine cells and related tumors: immunohistochemical study comparing two different monoclonal antibodies. *Virchows Archiv*, *457*(4), 497–507. <https://doi.org/10.1007/s00428-010-0954-0>
59. Lan, M. S., & Breslin, M. B. (2009). Structure, expression, and biological function of INSM1 transcription factor in neuroendocrine differentiation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *23*(7), 2024–2033. <https://doi.org/10.1096/fj.08-125971>
60. Leblebici, C., Yeni, B., Savli, T.C., Aydın, Ö., Güneş, P., Cinel, L., Şimşek, B.Ç., Yıldız, P., Tuncel, D., Kayahan, S., 2019. A new immunohistochemical marker, insulinoma-associated protein 1 (INSM1), for Merkel cell carcinoma: Evaluation of 24 cases. *Annals of Diagnostic Pathology* *40*, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2019.04.002>
61. Leonetti, A., Facchinetti, F., Minari, R., Cortellini, A., Rolfo, C. D., Giovannetti, E., & Tiseo, M. (2019). Notch pathway in small-cell lung cancer: from preclinical evidence to therapeutic challenges. *Cellular Oncology*, *42*(3), 261–273. <https://doi.org/10.1007/s13402-019-00441-3>
62. Lilo, M. T., Chen, Y., & LeBlanc, R. E. (2018). INSM1 Is More Sensitive and Interpretable than Conventional Immunohistochemical Stains Used to Diagnose Merkel Cell Carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*, *42*(11), 1541–1548. <https://doi.org/10.1097/pas.0000000000001136>
63. Liu, W. D., Wang, H. W., Muguira, M., Breslin, M. B., & Lan, M. S. (2006). INSM1 functions as a transcriptional repressor of the neuroD/beta2 gene through the recruitment of cyclin D1 and histone deacetylases. *The Biochemical journal*, *397*(1), 169–177. <https://doi.org/10.1042/BJ20051669>
64. Luo, Y., Hui, Z., Yang, L., Li, J. (2015). Clinical analysis of 80 patients with combined small-cell lung cancer. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, *18*(3):161–166.

65. Mahalakshmi, B., Baskaran, R., Shanmugavadivu, M., Nguyen, N. T., & Velmurugan, B. K. (2020). Insulinoma-associated protein 1 (INSM1): a potential biomarker and therapeutic target for neuroendocrine tumors. *Cellular Oncology*, 43(3), 367–376. <https://doi.org/10.1007/s13402-020-00505-9>
66. Maleki, Z., Abram, M., Dell'Aquila, M., Kilic, I., Lu, R., Musarra, T., Barkan, G., Rajakorpi, E., Rossi, E. D., & Kholová, I. (2020). Insulinoma-associated protein 1 (INSM-1) expression in medullary thyroid carcinoma FNA: a multi-institutional study. *Journal of the American Society of Cytopathology*, 9(3), 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.jasc.2020.01.005>
67. Mani, H., & Zander, D. S. (2012). Immunohistochemistry. Applications to the Evaluation of Lung and Pleural Neoplasms: Part 2 *Chest*, 142(5), 1324–1333. doi:10.1378/chest.12-0123
68. McColl, K., Wildey, G., Sakre, N., Lipka, M. B., Behtaj, M., Kresak, A., Chen, Y., Yang, M., Velcheti, V., Fu, P., & Dowlati, A. (2017). Reciprocal expression of INSM1 and YAP1 defines subgroups in small cell lung cancer. *Oncotarget*, 8(43), 73745–73756. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20572>
69. McHugh, K. E., Mukhopadhyay, S., Doxtader, E. E., Lanigan, C., & Allende, D. S. (2020). INSM1 Is a Highly Specific Marker of Neuroendocrine Differentiation in Primary Neoplasms of the Gastrointestinal Tract, Appendix, and Pancreas. *American Journal of Clinical Pathology*, 153(6), 811–820. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa014>
70. Mellitzer, G., Bonn e, S., Luco, R. F., Van De Casteele, M., Lenne-Samuel, N., Collombat, P., Mansouri, A., Lee, J., Lan, M., Pipeleers, D., Nielsen, F. C., Ferrer, J., Gradwohl, G., & Heimberg, H. (2006). IA1 is NGN3-dependent and essential for differentiation of the endocrine pancreas. *The EMBO journal*, 25(6), 1344–1352. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601011>
71. Meuwissen, R., Linn, S. C., Linnoila, R. I., Zevenhoven, J., Mooi, W. J., & Berns, A. (2003). Induction of small cell lung cancer by somatic inactivation of both Trp53 and Rb1 in a conditional mouse model. *Cancer Cell*, 4(3), 181–189. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00220-4](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00220-4)
72. Miller, R. T. (2019). Avoiding pitfalls in Diagnostic Immunohistochemistry – Important Technical Aspects that Every Pathologist Should Know. *Seminars in Diagnostic Pathology*. doi:10.1053/j.semdp.2019.05.002

73. Mlika, M., Zendah, I., Braham, E., & El Mezni, F. (2014). CD56 Antibody: Old-Fashioned or Still Trendy in Endocrine Lung Tumors. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 36(4), 414–419. doi:10.1080/15321819.2014.952444
74. Mukhopadhyay, S., Dermawan, J. K., Lanigan, C. P., & Farver, C. F. (2019). Insulinoma-associated protein 1 (INSM1) is a sensitive and highly specific marker of neuroendocrine differentiation in primary lung neoplasms: an immunohistochemical study of 345 cases, including 292 whole-tissue sections. *Modern Pathology*, 32(1), 100–109. <https://doi.org/10.1038/s41379-018-0122-7>
75. Nakra, T., Nambirajan, A., Guleria, P., Phulware, R. H., & Jain, D. (2019). Insulinoma-associated protein 1 is a robust nuclear immunostain for the diagnosis of small cell lung carcinoma in cytology smears. *Cancer Cytopathology*, 127(8), 539–548. <https://doi.org/10.1002/cncy.22164>
76. Nicholson, S. A., Beasley, M. B., Brambilla, E., Hasleton, P. S., Colby, T. V., Sheppard, M. N., Falk, R., & Travis, W. D. (2002). Small cell lung carcinoma (SCLC): a clinicopathologic study of 100 cases with surgical specimens. *The American journal of surgical pathology*, 26(9), 1184–1197. <https://doi.org/10.1097/00000478-200209000-00009>
77. Niederst, M. J., Sequist, L. V., Poirier, J. T., Mermel, C. H., Lockerman, E. L., Garcia, A. R., Katayama, R., Costa, C., Ross, K. N., Moran, T., Howe, E., Fulton, L. E., Mulvey, H. E., Bernardo, L. A., Mohamoud, F., Miyoshi, N., VanderLaan, P. A., Costa, D. B., Jänne, P. A., Borger, D. R., ... Engelman, J. A. (2015). RB loss in resistant EGFR mutant lung adenocarcinomas that transform to small-cell lung cancer. *Nature communications*, 6, 6377. <https://doi.org/10.1038/ncomms7377>
78. Ordóñez, N. G. (2000). Value of Thyroid Transcription Factor-1 Immunostaining in Distinguishing Small Cell Lung Carcinomas From Other Small Cell Carcinomas. *The American Journal of Surgical Pathology*, 24(9), 1217–1223. <https://doi.org/10.1097/00000478-200009000-00004>
79. Oser, M. G., Niederst, M. J., Sequist, L. V., & Engelman, J. A. (2015). Transformation from non-small-cell lung cancer to small-cell lung cancer: molecular drivers and cells of origin. *The Lancet. Oncology*, 16(4), e165–e172. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71180-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71180-5)
80. Osipovich, A. B., Long, Q., Manduchi, E., Gangula, R., Hipkens, S. B., Schneider, J., Okubo, T., Stoeckert, C. J., Jr., Takada, S., and Magnuson, M. A. (2014)

Insm1 promotes endocrine cell differentiation by modulating the expression of a network of genes that includes Neurog3 and Ripply3. *Development* 141, 2939-2949

81. Owen, D. H., Giffin, M. J., Bailis, J. M., Smit, M.-A. D., Carbone, D. P., & He, K. (2019). DLL3: an emerging target in small cell lung cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0745-2>

82. Park, J.Y., Jang, S.H., Kim, H.I. et al. Thyroid transcription factor-1 as a prognostic indicator for stage IV lung adenocarcinoma with and without EGFR-sensitizing mutations. *BMC Cancer* 19, 574 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5792-0>

83. Pedersen, N., Pedersen, M.W., Lan, M.S., Breslin, M.B. and Poulsen, H.S. (2005). The insulinoma-associated 1: a novel promoter for targeted cancer gene therapy for small-cell lung cancer. *Cancer Gene Therapy* 13(4):375–384. doi: <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700887>.

84. Pelosi, G., Rindi, G., Travis, W. D., & Papotti, M. (2014). Ki-67 Antigen in Lung Neuroendocrine Tumors: Unraveling a Role in Clinical Practice. *Journal of Thoracic Oncology*, 9(3), 273–284. <https://doi.org/10.1097/jto.0000000000000092>

85. Pelosi, G., Sonzogni, A., Harari, S., Albini, A., Bresaola, E., Marchiò, C., Massa, F., Righi, L., Gatti, G., Papanikolaou, N., Vijayvergia, N., Calabrese, F., & Papotti, M. (2017). Classification of pulmonary neuroendocrine tumors: new insights. *Translational lung cancer research*, 6(5), 513–529. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2017.09.04>

86. Phelps, C. A., Lai, S.-C., & Mu, D. (2018). Roles of Thyroid Transcription Factor 1 in Lung Cancer Biology. In *Vitamins and Hormones* (pp. 517–544). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2017.05.007>

87. Pleasance, E. D., Stephens, P. J., O'Meara, S., McBride, D. J., Meynert, A., Jones, D., Lin, M. L., Beare, D., Lau, K. W., Greenman, C., Varela, I., Nik-Zainal, S., Davies, H. R., Ordoñez, G. R., Mudie, L. J., Latimer, C., Edkins, S., Stebbings, L., Chen, L., Jia, M., ... Campbell, P. J. (2010). A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure. *Nature*, 463(7278), 184–190. <https://doi.org/10.1038/nature08629>

88. Qin, J., & Lu, H. (2018). Combined small-cell lung carcinoma. *OncoTargets and therapy*, 11, 3505–3511. <https://doi.org/10.2147/OTT.S159057>

89. Ready, N., Farago, A. F., de Braud, F., Atmaca, A., Hellmann, M. D., Schneider, J. G., Antonia, S. J. (2019). Third-Line Nivolumab Monotherapy in Recurrent SCLC:

- CheckMate 032. *Journal of Thoracic Oncology*, 14(2), 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.10.003>
90. Rekhman N. (2010). Neuroendocrine tumors of the lung: an update. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 134(11), 1628–1638. <https://doi.org/10.1043/2009-0583-RAR.1>
91. Rodriguez, E. F., Chowsilpa, S., & Maleki, Z. (2018). Insulinoma-Associated Protein 1 Immunostain: A Diagnostic Tool for Pulmonary Small Cell Carcinoma in Cytology. *Acta cytologica*, 62(5-6), 333–338. <https://doi.org/10.1159/000490091>
92. Rooper, L. M., Bishop, J. A., & Westra, W. H. (2018). INSM1 is a Sensitive and Specific Marker of Neuroendocrine Differentiation in Head and Neck Tumors. *The American journal of surgical pathology*, 42(5), 665–671. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001037>
93. Rooper, L. M., Sharma, R., Li, Q. K., Illei, P. B., & Westra, W. H. (2017). INSM1 Demonstrates Superior Performance to the Individual and Combined Use of Synaptophysin, Chromogranin and CD56 for Diagnosing Neuroendocrine Tumors of the Thoracic Cavity. *The American journal of surgical pathology*, 41(11), 1561–1569. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000916>
94. Roy, M., Buehler, D. G., Zhang, R., Schwalbe, M. L., Baus, R. M., Salamat, M. S., Lloyd, R. V., & Rosenbaum, J. N. (2018). Expression of Insulinoma-Associated Protein 1 (INSM1) and Orthopedia Homeobox (OTP) in Tumors with Neuroendocrine Differentiation at Rare Sites. *Endocrine Pathology*, 30(1), 35–42. <https://doi.org/10.1007/s12022-018-9559-y>
95. Rush, P.S., Rosenbaum, J.N., Roy, M., Baus, R.M., Bennett, D.D., Lloyd, R.V., 2018. Insulinoma-associated 1: A novel nuclear marker in Merkel cell carcinoma (cutaneous neuroendocrine carcinoma). *Journal of Cutaneous Pathology* 45(2), 129–135. <https://doi.org/10.1111/cup.13079>
96. Sakakibara, R., Kobayashi, M., Takahashi, N., Inamura, K., Ninomiya, H., Wakejima, R., Ishikawa, Y. (2020). Insulinoma-associated Protein 1 (INSM1) Is a Better Marker for the Diagnosis and Prognosis Estimation of Small Cell Lung Carcinoma Than Neuroendocrine Phenotype Markers Such as Χρωμογραφίνη Α, Synaptophysin, and CD56. *The American Journal of Surgical Pathology*, 44(6), 757–764.
97. Saunders, L. R., Bankovich, A. J., Anderson, W. C., Aujay, M. A., Bheddah, S., Black, K., Desai, R., Escarpe, P. A., Hampl, J., Laysang, A., Liu, D., Lopez-Molina, J.,

- Milton, M., Park, A., Pysz, M. A., Shao, H., Slingerland, B., Torgov, M., Williams, S. A., Foord, O., ... Dylla, S. J. (2015). A DLL3-targeted antibody-drug conjugate eradicates high-grade pulmonary neuroendocrine tumor-initiating cells in vivo. *Science translational medicine*, 7(302), 302ra136. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac9459>
98. Song, H., Yao, E., Lin, C., Gacayan, R., Chen, M. H., & Chuang, P. T. (2012). Functional characterization of pulmonary neuroendocrine cells in lung development, injury, and tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(43), 17531–17536. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207238109>
99. Stenhouse, G., Fyfe, N., King, G., Chapman, A., & Kerr, K. M. (2004). Thyroid transcription factor 1 in pulmonary adenocarcinoma. *Journal of clinical pathology*, 57(4), 383–387. <https://doi.org/10.1136/jcp.2003.007138>
100. Takase, Y., Naito, Y., Okabe, Y., Ishida, Y., Yamaguchi, T., Abe, H., Murata, K., Ito, T., Tanigawa, M., Kawahara, A., Yano, H., & Akiba, J. (2019). Insulinoma-associated protein 1 expression in pancreatic neuroendocrine tumours in endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology: An analysis of 14 patients. *Cytopathology : official journal of the British Society for Clinical Cytology*, 30(2), 194–200. <https://doi.org/10.1111/cyt.12640>
101. Takenaka, T., Takenoyama, M., Inamasu, E., Yoshida, T., Toyokawa, G., Nosaki, K., Hirai, F., Yamaguchi, M., Shimokawa, M., Seto, T., & Ichinose, Y. (2015). Role of surgical resection for patients with limited disease-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 88(1), 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.01.010>
102. Tanigawa, M., Nakayama, M., Taira, T., Hattori, S., Mihara, Y., Kondo, R., Kusano, H., Nakamura, K., Abe, Y., Ishida, Y., Okabe, Y., Hisaka, T., Okuda, K., Fujino, K., Ito, T., Kawahara, A., Naito, Y., Yamaguchi, R., Akiba, J., ... Yano, H. (2017). Insulinoma-associated protein 1 (INSM1) is a useful marker for pancreatic neuroendocrine tumor. *Medical Molecular Morphology*, 51(1), 32–40. <https://doi.org/10.1007/s00795-017-0167-6>
103. Tavano, S., Taverna, E., Kalebic, N., Haffner, C., Namba, T., Dahl, A., Wilsch-Bräuninger, M., Paridaen, J. T. M. L., & Huttner, W. B. (2018). Insm1 Induces Neural Progenitor Delamination in Developing Neocortex via Downregulation of the Adherens Junction Belt-Specific Protein Plekha7. *Neuron*, 97(6), 1299–1314.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.052>

104. Thavarajah, R., Mudimbaimannar, V. K., Elizabeth, J., Rao, U. K., & Ranganathan, K. (2012). Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*, 16(3), 400–405. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.102496>
105. Thunnissen, E., Borczuk, A. C., Flieder, D. B., Witte, B., Beasley, M. B., Chung, J.-H., ... Noguchi, M. (2017). The Use of Immunohistochemistry Improves the Diagnosis of Small Cell Lung Cancer and Its Differential Diagnosis. An International Reproducibility Study in a Demanding Set of Cases. *Journal of Thoracic Oncology*, 12(2), 334–346. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.12.00>
106. Travis, W. D., Rush, W., Flieder, D. B., Falk, R., Fleming, M. V., Gal, A. A., & Koss, M. N. (1998). Survival Analysis of 200 Pulmonary Neuroendocrine Tumors With Clarification of Criteria for Atypical Carcinoid and Its Separation From Typical Carcinoid. *The American Journal of Surgical Pathology*, 22(8), 934–944. <https://doi.org/10.1097/00000478-199808000-00003>
107. Travis, W. D. (2010). Advances in neuroendocrine lung tumors. *Annals of Oncology*, 21, vii65-vii71. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq380>
108. Travis, W. D. (2012). Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. *Modern Pathology*, 25(S1), S18–S30.
109. Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., Chirieac, L. R., Dacic, S., Duhig, E., Flieder, D. B., Geisinger, K., Hirsch, F. R., Ishikawa, Y., Kerr, K. M., Noguchi, M., Pelosi, G., Powell, C. A., Tsao, M. S., & Wistuba, I. (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(9), 1243–1260. <https://doi.org/10.1097/jto.0000000000000630>
110. Valtorta, F., Pennuto, M., Bonanomi, D., & Benfenati, F. (2004). Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis?. *Bioessays*, 26(4), 445-453.
111. Viswanathan, K., Siddiqui, M. T., & Borczuk, A. C. (2019). Insulinoma-associated protein 1 is a sensitive and specific marker for lung neuroendocrine tumors in cytologic and surgical specimens. *Journal of the American Society of Cytopathology*, 8(6), 299–308. <https://doi.org/10.1016/j.jasc.2019.06.002>
112. Wang, H. W., Muguira, M., Liu, W. D., Zhang, T., Chen, C., Aucoin, R., Breslin, M. B., and Lan, M. S. (2008) Identification of an INSM1 binding site in the

insulin promoter: Negative regulation of the insulin gene transcription. *Journal of Endocrinology*, 198, 29-39

113. Wang, H., Krishnan, C., & Charville, G. W. (2019). INSM1 Expression in Peripheral Neuroblastic Tumors and Other Embryonal Neoplasms. *Pediatric and Developmental Pathology*, 22(5), 440–448. <https://doi.org/10.1177/1093526619843725>

114. Welcker, J. E., Hernandez-Miranda, L. R., Paul, F. E., Jia, S., Ivanov, A., Selbach, M., and Birchmeier, C. (2013) Insm1 controls development of pituitary endocrine cells and requires a SNAG domain for function and for recruitment of histone modifying factors. *Development* **140**, 4947-4958

115. Wildner, H., Gierl, M. S., Strehle, M., Pla, P., & Birchmeier, C. (2008). Insm1 (IA-1) is a crucial component of the transcriptional network that controls differentiation of the sympatho-adrenal lineage. *Development*, 135(3), 473–481. <https://doi.org/10.1242/dev.011783>

116. Woo, J. S., Reddy, O. L., Koo, M., Xiong, Y., Li, F., & Xu, H. (2017). Application of Immunohistochemistry in the Diagnosis of Pulmonary and Pleural Neoplasms. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 141(9), 1195–1213. <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0550-ra>

117. Xin, Z., Zhang, Y., Jiang, Z., Zhao, L., Fan, L., Wang, Y., Xie, S., Shangguan, X., Zhu, Y., Pan, J., Liu, Q., Huang, Y., Dong, B., & Xue, W. (2018). Insulinoma-associated protein 1 is a novel sensitive and specific marker for small cell carcinoma of the prostate. *Human pathology*, 79, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.05.014>

118. Yamashita, S. (2007). Heat-induced antigen retrieval: Mechanisms and application to histochemistry. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 41(3), 141–200. <https://doi.org/10.1016/j.proghi.2006.09.001>

119. Yeh, Y.-C., & Chou, T.-Y. (2014). Pulmonary neuroendocrine tumors: Study of 90 cases focusing on clinicopathological characteristics, immunophenotype, preoperative biopsy, and frozen section diagnoses. *Journal of Surgical Oncology*, 109(3), 280–286. <https://doi.org/10.1002/jso.23497>

120. Yoshida, A., Makise, N., Wakai, S., Kawai, A., & Hiraoka, N. (2018). INSM1 expression and its diagnostic significance in extraskeletal myxoid chondrosarcoma. *Modern Pathology*, 31(5), 744–752. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.189>

121. Zamecnik, J., & Kodet, R. (2002). Value of thyroid transcription factor-1 and surfactant apoprotein A in the differential diagnosis of pulmonary carcinomas: a study of 109 cases. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 440(4), 353–361. <https://doi.org/10.1007/s00428-001-0552-2>
122. Zappa, C., & Mousa, S. A. (2016). Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Translational lung cancer research*, 5(3), 288–300. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.06.07>
123. Zhang, C., Yang, H., Zhao, H., Lang, B., Yu, X., Xiao, P., & Zhang, X. (2017). Clinical outcomes of surgically resected combined small cell lung cancer: a two-institutional experience. *Journal of thoracic disease*, 9(1), 151–158. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.01.07>
124. Zhang, C., Schmidt, L. A., Hatanaka, K., Thomas, D., Lagstein, A., & Myers, J. L. (2014). Evaluation of Napsin A, TTF-1, p63, p40, and CK5/6 Immunohistochemical Stains in Pulmonary Neuroendocrine Tumors. *American Journal of Clinical Pathology*, 142(3), 320–324. <https://doi.org/10.1309/ajcpga0iua8bhqez>
125. Zhang, T., Chen, C., Breslin, M. B., Song, K., & Lan, M. S. (2014). Extra-nuclear activity of INSM1 transcription factor enhances insulin receptor signaling pathway and Nkx6.1 expression through RACK1 interaction. *Cellular signalling*, 26(4), 740–747. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.12.014>
126. Zhang, T., Liu, W. D., Saunee, N. A., Breslin, M. B., & Lan, M. S. (2009). Zinc finger transcription factor INSM1 interrupts cyclin D1 and CDK4 binding and induces cell cycle arrest. *The Journal of biological chemistry*, 284(9), 5574–5581. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808843200>
127. Zhang, T., Saunee, N. A., Breslin, M. B., Song, K., & Lan, M. S. (2012). Functional role of an islet transcription factor, INSM1/IA-1, on pancreatic acinar cell trans-differentiation. *Journal of cellular physiology*, 227(6), 2470–2479. <https://doi.org/10.1002/jcp.22982>
128. Zheng, G., Ettinger, D. S., & Maleki, Z. (2013). Utility of the Quantitative Ki-67 Proliferation Index and CD56 Together in the Cytologic Diagnosis of Small Cell Lung Carcinoma and Other Lung Neuroendocrine Tumors. *Acta Cytologica*, 57(3), 281–290. doi:10.1159/000346394
129. Zhou, H., Morotti, R. A., Profitt, S. A., Langston, C., Wert, S. E., Whitsett, J. A., & Greco, M. A. (2001). Expression of thyroid transcription factor-1, surfactant

proteins, type I cell-associated antigen, and Clara cell secretory protein in pulmonary hypoplasia. *Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society*, 4(4), 364–371.

<https://doi.org/10.1007/s10024001-0002-9>

130. Ιωάννου, Μ. (2009). Καρκίνος του πνεύμονος. Παθολογική Ανατομική. Συμβολή του εργαστηρίου στην εκτίμηση του πνευμονολογικού ασθενούς. Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρεία, Αθήνα. Ανακτήθηκε στις 10/3/2020 από:

http://www.hts.org.gr/assets/files/biblia_epe/symboli_ergasthriou_pneumonologikos_asthenis.pdf