

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ - ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: *Καθηγητής* Κ. ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ

---

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Διαγνωστική και προγνωστική αξία της μέτρησης  
βιοχημικών δεικτών στον εκπνεόμενο αέρα και στον  
ορό ασθενών με πρωτοπαθή καρκίνο πνεύμονα**

**ΔΑΛΛΑΒΕΡΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ**

*Γενικός Ιατρός*

ΛΑΡΙΣΑ 2009

## **Τριμελής Επιτροπή**

**Κ. ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ** (επιβλέπων)

Καθηγητής Πνευμονολογίας

**Α. ΓΕΡΜΕΝΗΣ**

Καθηγητής Ανοσολογίας

**Ζ. ΔΑΝΙΗΛ**

Επίκουρος Καθηγήτρια Πνευμονολογίας

## **Επταμελής Επιτροπή**

**Κ. ΓΟΥΡΓΟΥΛΙΑΝΗΣ** (επιβλέπων)

Καθηγητής Πνευμονολογίας

**Α. ΓΕΡΜΕΝΗΣ**

Καθηγητής Ανοσολογίας

**Π-Α. ΜΟΥΒΔΑΣ**

Καθηγητής Φυσιολογίας

**Χ. ΠΑΠΑΝΔΡΕΟΥ**

Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας

**Ζ. ΔΑΝΙΗΛ**

Επίκουρος Καθηγήτρια Πνευμονολογίας

**Π. ΛΙΑΚΟΣ**

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας

**Α. ΤΣΑΚΑΛΩΦ**

Επίκουρος Καθηγητής Χημείας

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....</b>	<b>3</b>
<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ .....</b>	<b>9</b>
<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ .....</b>	<b>10</b>
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>14</b>
<b>1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ .....</b>	<b>15</b>
1.1 Ο ρόλος των βιολογικών δεικτών στον καρκίνο του πνεύμονα .....	17
1.2 Μέτρηση των βιολογικών δεικτών σε διάφορα υλικά .....	19
<b>2 ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΣ ΑΕΡΑΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ .....</b>	<b>20</b>
2.1 ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΑ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΥ ΑΕΡΑ (EBC).....	22
2.2 EBC ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ .....	25
<b>3 TNF-α, VEGF ΚΑΙ 8-ΙΣΟΠΡΟΣΤΑΝΙΟ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ .....</b>	<b>29</b>
3.1 Παράγοντας νέκρωσης των όγκων άλφα (TNF-α).....	29
3.1.1 Δομή και λειτουργία .....	29
3.1.2 Ο ρόλος του TNF-α στην καρκινογένεση .....	31
3.1.3 Η κλινική σημασία του TNF-α στον καρκίνο του πνεύμονα .....	33
3.2 Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF).....	36
3.2.1 Δομή και λειτουργία .....	36
3.2.2 Ο ρόλος του VEGF στην καρκινογένεση .....	38
3.2.3 Η κλινική σημασία του VEGF στον καρκίνο του πνεύμονα .....	41
3.3 8-ΙΣΟΠΡΟΣΤΑΝΙΟ .....	45
3.3.1 Δομή και λειτουργία .....	45
3.3.2 Ο ρόλος του 8-ισοπροστανίου στην καρκινογένεση.....	48
3.3.3 Η κλινική σημασία του 8-ισοπροστανίου στον καρκίνο του πνεύμονα ....	49
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>53</b>
<b>4 ΥΛΙΚΟ.....</b>	<b>54</b>
<b>5 ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>56</b>
5.1 Τεχνική συλλογής EBC.....	56
5.2 Αναπαραγωγικότητα των μετρήσεων στο EBC .....	56
5.3 Προσδιορισμός των βιοχημικών δεικτών στο EBC και στον ορό .....	57
5.4 Στατιστική ανάλυση.....	57
<b>6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>58</b>
6.1 Οι τιμές του TNF-α στο EBC και στον ορό .....	58
6.2 Οι τιμές του VEGF στο EBC και στον ορό .....	60
6.3 Οι τιμές του 8-ισοπροστανίου στο EBC και στον ορό.....	62
6.4 Συσχέτιση του TNF-α, του VEGF και του 8-ισοπροστανίου με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους στο EBC .....	64
6.5 Συσχέτιση του TNF-α, του VEGF και του 8-ισοπροστανίου με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους στον ορό .....	66
6.6 Συσχέτιση των επιπέδων του TNF-α, του VEGF και του 8-ισοπροστανίου στο EBC και στον ορό πριν και μετά τη ΧΜΘ.....	68
6.7 Σχέση των βιοχημικών δεικτών με την επιβίωση των ασθενών.....	70
6.8 Αναπαραγωγικότητα των μετρήσεων των βιοχημικών δεικτών στο EBC.....	71
<b>7 ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>73</b>
7.1 Επίπεδα του TNF-α στον ΚΠ στο EBC και στον ορό.....	75
7.2 Επίπεδα του VEGF στον ΚΠ στο EBC και στον ορό.....	77
7.3 Επίπεδα του 8-ισοπροστανίου στον ΚΠ στο EBC και στον ορό .....	81
7.4 Συμπεράσματα και προοπτικές .....	84
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....</b>	<b>90</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>92</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>94</b>

## **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

**Όνοματεπώνυμο:** ΔΑΛΑΒΕΡΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ

**Ημερομηνία γεννήσεως:** 12 - 12 - 1979

**Τόπος γεννήσεως:** Βόλος

**Οικογενειακή κατάσταση:** Έγγαμος

**Διεύθυνση κατοικίας:** Μαγνητών 69, Βόλος 38333.

Τηλ.: 2421047001 / 6937046715.

**Διεύθυνση εργασίας:**.....Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας, 411 10

.....Λάρισα Τηλ.: 2413502896

**e-mail :** dalaveris@yahoo.com

**Μέση εκπαίδευση:** 1<sup>ο</sup> Γενικό Λύκειο Βόλου 1997

Βαθμός απολυτηρίου: Άριστα (19<sup>3/11</sup>)

**Ξένες Γλώσσες:** Αγγλικά, Γαλλικά, Ιταλικά

### **ΔΙΠΛΩΜΑΤΑ**

Πτυχίο Ιατρικής Σχολής Σιένα Ιταλίας, 2004. Βαθμός Πτυχίου: Λίαν καλώς (7,88)

### **Ι. ΙΑΤΡΙΚΗ ΠΡΟΥΠΗΡΕΣΙΑ**

**24/12/2008 – :** Ειδικευόμενος (συνέχιση ειδικότητας) Γενικής Ιατρικής Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας

## II. ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ

### A. ΒΡΑΒΕΙΑ

1. 2<sup>ο</sup> βραβείο καλύτερης επιστημονικής ανακοίνωσης με τίτλο: Προσδιορισμός του VEGF και του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα (EBC) και στον ορό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. **Δαλαβέρης Ε**, Κερενίδη Θ, Κατσαμπέκη Α, Τανού Κ, Κυρόπουλος Θ, Γώγου Ε, Γουργουλιάνης ΚΙ, Κωστίκας Κ, 16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, 6-9/12/2007 Αθήνα.
2. Βραβείο ογκολογικού ενδιαφέροντος για την εργασία με τίτλο: Η κλινική σημασία των αυξημένων επιπέδων του VEGF και του οξειδωτικού stress στον ορό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα Κερενίδη Θ, Κατσαμπέκη Α, **Δαλαβέρης Ε**, Κυρόπουλος Θ, Γουργουλιάνης ΚΙ, 18<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 26-29/11/2009 Θεσσαλονίκη.

### B. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΙΑΤΡΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. Katsabeki-Katsafli A, Kerenidi T, Kostikas K, **Dalaveris E**, Kiropoulos TS, Gogou E, Papaioannou AI, Gourgoulisanis KI. Vascular endothelial growth factor is related to systemic oxidative stress in patients with lung cancer. *Lung Cancer* 2008, 60:271-6.
2. **Dalaveris E**, Kerenidi T, Katsabeki-Katsafli A, Kiropoulos T, Lada M, Tanou K, Gourgoulisanis KI, Kostikas K. VEGF, TNF- $\alpha$  and 8-isoprostane levels in exhaled breath condensate and serum of patients with lung cancer. *Lung Cancer* 2009, 64(2):219-25

### Γ. ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

#### ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΩΝ

1. Katsabeki A, Kerenidi T, Kostikas K, Kiropoulos T, **Dalaveris E**, Gourgoulisanis K. Vascular endothelial growth factor and oxidative stress in patients with primary lung cancer (e-poster discussion). *European Respiratory Journal* 2007, 30:51(Suppl.), 291-291

2. **Dalaveris E**, Kerenidi T, Kostikas K, Kiropoulos T, Katsabeki A, Gourgoulisianis K Pretreatment levels of TNF- $\alpha$  in serum and exhaled breath condensate in patients with lung cancer (e-poster discussion). *European Respiratory Journal* 2007, 30:51(Suppl.), 292-292
3. Katsabeki-Katsafli A, Kerenidi T, Kostikas K, Kiropoulos T, **Dalaveris E**, Gourgoulisianis KI. High pre-treatment serum levels of VEGF and oxidative stress in lung cancer patients and their clinical implications. (poster discussion). *Journal of Thoracic Oncology* 2008, 3:4(Suppl.1):43-43.
4. **Dalaveris E**, Kerenidi T, Kiropoulos T, Katsabeki A, Gourgoulisianis K, Kostikas K. Pretreatment levels of VEGF and 8-isoprostane in exhaled breath condensate (EBC) and serum of lung cancer patients. *European Respiratory Journal* 2008, 32:52(Suppl.), 464-465.
5. Gogou E, Hatzoglou C, Chamos V, Kerenidi T, Katsabeki A, **Dalaveris E**, Gourgoulisianis K, Molyvdas P A. Vitamin C decreases the permeability of sheep pleura. *European Respiratory Journal* 2008, 32:52(Suppl.), 531-531.

#### **Δ. ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

1. Kerenidi T, Katsampeki-Katsafli A, Kostikas K, Kiropoulos T, **Dalaveris E**, Gourgoulisianis KI. High pre-treatment serum levels of VEGF and oxidative stress in lung cancer patients. Postgraduate seminar on Lung cancer, 1-4/5/2008 Santorini

#### **Ε. ΠΡΟΦΟΡΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ**

1. **Δαλαβέρης Ε**, Κερενίδη Θ, Κατσαμπέκη Α, Τανού Κ, Κυρόπουλος Θ, Γώγου Ε, Γουργουλιάνης ΚΙ, Κωστίκας Κ. Προσδιορισμός του VEGF και του 8-ισοπροστανίου στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα (EBC) και στον ορό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. 16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, 6-9/12/2007 Αθήνα

2. Γώγου Ε, Κερενίδη Θ, Χάμος Β, Κατσαμπέκη Α, **Δαλαβέρης Ε**, Γουργουλιάνης Κ.Ι. Περιπτώσεις ασθενών με μεσοθηλίωμα στην πνευμονολογική κλινική του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από το 2001 ως το 2005. 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, 2-5/11/2006 Κρήτη.
3. Γώγου Ε, Κερενίδη Θ, Χάμος Β, Κατσαμπέκη Α, **Δαλαβέρης Ε**, Ζιντζαράς Η, Γουργουλιάνης Κ.Ι. Επιδημιολογία του μεσοθηλιώματος στην Ελλάδα κατά την περίοδο 1983-2003. 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, 2-5/11/2006 Κρήτη.
4. Κατσαμπέκη Α, Κερενίδη Θ, Κωστίκας Κ, **Δαλαβέρης Ε**, Παπαιωάννου Α, Γώγου Ε, Κυρόπουλος Θ, Γουργουλιάνης Κ.Ι. Το οξειδωτικό στρες σε ασθενείς με πρωτοπαθή καρκινό πνεύμονα: Συσχέτιση με κλινικές παραμέτρους. 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, 2-5/11/2006 Κρήτη.
5. **Δαλαβέρης Ε**, Κερενίδη Θ, Κατσαμπέκη Α, Γώγου Ε, Γουργουλιάνης Κ.Ι. Διαμόρφωση της καπνιστικής συνήθειας ασθενών με καρκίνο πνεύμονα κατά την διάγνωση της νόσου. 1<sup>ο</sup> Συνέδριο Επιστημόνων Φροντίδας Χρόνιων Πασχόντων, 16-19/11/2006 Λάρισα.
6. Κατσαμπέκη Α, Κερενίδη Θ, Κωστίκας Κ, Κυρόπουλος Θ, **Δαλαβέρης Ε**, Γουργουλιάνης Κ.Ι. Ο αγγειογενετικός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και το οξειδωτικό stress σε ασθενείς με καρκίνο πνεύμονα. 4<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο «Νέοι ορίζοντες στην αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα: Προσδοκίες και Πραγματικότητα », 10-13 /05/2007 Κως.
7. **Δαλαβέρης Ε**, Κερενίδη Θ, Κωστίκας Κ, Κυρόπουλος Θ, Κατσαμπέκη Α, Γουργουλιάνης Κ.Ι. Μέτρηση TNF-α και VEGF στον εκπνεόμενο αέρα και στον ορό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. 4<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο «Νέοι ορίζοντες στην αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα: Προσδοκίες και Πραγματικότητα», 10-13 /05/2007 Κως.

8. Γώγου Ε, Χατζόγλου Χ, Χάμος Β, Κερενίδη Θ, Κατσαμπέκη Α, **Δαλαβέρης Ε**, Γουργουλιάνης ΚΙ, Μολυβδάς ΠΑ. Μεταβολή της διαπερατότητας υπεζωκότα προβάτου με τη δράση του ασκορβικού οξέως και της κουερσετίνης. 16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Πνευμονολογικό Συνέδριο, 6-9/12/2007 Αθήνα.
9. Κατσαμπέκη Α, Κερενίδη Θ, Τσαρούχα Α, **Δαλαβέρης Ε**, Κωστίκας Κ, Γουργουλιάνης Κ. Η προγνωστική αξία του οξειδωτικού στρες στον καρκίνο του πνεύμονα. 17<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 20-23/11/2008 Αλεξανδρούπολη.

### **ΙΙΙ. ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ**

1. «Ημέρες Πνευμονολογίας 2005» Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, 2-4/09/2005, Λίμνη Πλαστήρα, Καρδίτσα.
2. 18<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Γενικής Ιατρικής, 26-30/04/2006, Κέρκυρα.
3. «Ημέρες Πνευμονολογίας 2006» Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, 22-24/09/2006, Λάρισα.
4. 14<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 1-4/12/2006, Θεσσαλονίκη.
5. 15<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 2-5/11/2006, Κρήτη.
6. 1<sup>ο</sup> Συνέδριο Επιστημών Φροντίδας Χρονίων Πασχόντων, 16-19/10/2006, Λάρισα.
7. 5<sup>th</sup> International Symposium on Targeted Anticancer Therapies Amsterdam, The Netherlands , 08-10/3/2007
8. 16<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Νοσημάτων Θώρακος, 6-9/12/2007, Αθήνα.
9. 4<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο «Νέοι ορίζοντες στην αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα: Προσδοκίες και Πραγματικότητα» Ελληνική Πνευμονολογική Εταιρία-ERS, 10-13/05/2007, Κώς.
10. 18<sup>th</sup> ERS Annual Congress 4-8/10/2008, Berlin
11. Συνέδριο Παθολογίας Κεντρικής Ελλάδος 19-21/3/2009, Λάρισα



- 12.«Ημέρες Πνευμονολογίας 2009» Πνευμονολογική Κλινική Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, 18-19/09/2009, Λάρισα.
- 13.1<sup>0</sup> Πανθεσσαλικό Συμπόσιο Γενικής Ιατρικής 9-11/10/2009, Λάρισα
- 14.Εκπαιδευτικό σεμινάριο στο πλαίσιο της συνεχιζόμενης εκπαίδευσης επαγγελματιών υγείας για την οργάνωση ιατρείων διακοπής καπνίσματος , 12-14 Μαρτίου 2010 , Λάρισα

#### **IV. ΑΛΛΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ**

##### **Συμμετοχή στο πρόγραμμα έγκαιρης διάγνωσης χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας:**

1. 16-18/5/2006 Κέντρο Υγείας Βελεστίνου
2. 27-29/9/2006 Κέντρο Υγείας Ελασσόνας
3. 18-20/10/2006 Κέντρο Υγείας Αμπελώνα
4. 22/11/2006 Περιφερειακό Ιατρείο Αρμενίου
5. 23-24/11/2006 Κέντρο Υγείας Αγιάς
6. 28/2/2007 Περιφερειακό Ιατρείο Συκουρίου
7. 1-2/3/2007 Κέντρο Υγείας Γόννων
8. 21/3/2007 Περιφερειακό Ιατρείο Λεονταρίου
9. 22-23/3/2007 Κέντρο Υγείας Σοφάδων
10. 30-1/6/2007 Περιφερειακό Ιατρείο Σούρπης
11. 12-14/7/2007 Κέντρο Υγείας Ζαγοράς
12. 12-15/2/2008 304 ΠΕΒ

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

**ΑΚΘ:** ακτινοθεραπεία

**ΑΡ-1:** μεταγραφικός παράγοντας, σύμπλεγμα πρωτεϊνών (πρωτοογκογονίδια) c-fos, jun-c, jun-B, jun-D

**BAL** (bronchoalveolar lavage): βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα

**EBC** (exhaled breath condensate): συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα

**EGFR** (epidermal growth factor receptor): υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα

**ET-1** (endothelin-1): ενδοθηλίνη 1

**FGF-2** (fibroblast growth factor-2): ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας-2

**HIF-1** (Hypoxia inducible factor): παράγοντας επαγόμενος της υποξίας

**ICAM-1** (Intercellular adhesion molecule 1): ενδοκυττάριο μόριο προσκόλλησης 1

**IL-1** (interleukin 1): ιντερλευκίνη 1

**IL-2** (interleukin 2): ιντερλευκίνη 2

**IL-6** (interleukin 6): ιντερλευκίνη 6

**IL-8** (interleukin 8): ιντερλευκίνη 8

**JNK** (transcriptional factor c-jun N-Terminal K kinase): μεταγραφικός παράγοντας c-jun

**ΚΠ:** καρκίνος πνεύμονα

**M:** απομακρυσμένες μεταστάσεις.

**MDA** (malondialdehyde): μαλονδιαλδεύδη

**ΜΚΠ:** μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα

**ΜΜΚΠ:** μή-μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα

**N:** λεμφαδενικές μεταστάσεις

**NO:** μονοξείδιο του αζώτου.

**ΟΣ:** οξειδωτικό στρες

**PCR:** (polymerase chain reaction): Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

**PDGF** (platelet derived growth factor): αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από τα αιμοπετάλια

**PS** (performance status): βιολογική κατάσταση

**ROS** (Reactive Oxygen Species): ενεργά προϊόντα οξειδίου

**T:** χαρακτηρισμός του όγκου

**TNF-α** (tumor necrosis factor alpha): Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων-άλφα

**TNF-R1/TNF-R2** (tumor necrosis factor receptor 1/2): Υποδοχείς του Παράγοντα Νέκρωσης Όγκων

**TBARS** (Thiobarbituric acid reactive substances): ενεργά προϊόντα θειοβαρβιτουρικού οξέος

**TGF-α/TGF-β** (Transforming growth factor α/β): Παράγοντες μετασχηματισμού α/β

**TK** (tyrosine kinase): θυροσίνη κινάση

**TRAPS** (Total Peroxyl Radical-Trapping Potential): Συνολικό Δυναμικό Παγίδευσης Ριζών Υπεροξειδίου

**VEGF** (vascular endothelial growth factor): αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας.

**VEGFR-1/VEGFR-2/VEGFR-3** (vascular endothelial growth factor receptor-1,2,3): υποδοχέας (1,2,3) του ενδοθηλιακού αγγειακού αυξητικού παράγοντα.

**VOC** (Volatile organic compounds): πτητικά οργανικά στοιχεία

**ΧΜΘ:** χημειοθεραπεία

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο σε άντρες και γυναίκες. Σύμφωνα με τις τελευταίες εκτιμήσεις για την παγκόσμια θνησιμότητα μέχρι το 2030 ο καρκίνος του πνεύμονα θα αποτελεί την τρίτη συχνότερη αιτία θανάτου στις αναπτυγμένες χώρες. Τα αποτελέσματα από τελευταίες μελέτες σχετικά με το προσδόκιμο επιβίωσης από τη νόσο είναι απογοητευτικά, καθώς ακόμη και με τις πιο εξελιγμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις το 86% των ασθενών απεβιώνει σε 5 έτη από τη διάγνωση. Οι ερευνητές επιδίδονται στην ανάπτυξη μεθόδων για την διάγνωση του καρκίνου σε πρώιμο στάδιο, όπως η αξονική τομογραφία χαμηλής δόσης ακτινοβολίας, η αυτοφθορίζουσα βρογχοσκόπηση, η μελέτη των προκλητών πτυέλων, η ανίχνευση πτητικών οργανικών μορίων στον εκπνεόμενο αέρα κ.ά.

Μία από τις προσεγγίσεις των μελετητών για την εύρεση πιο ειδικής μεθόδου πρώιμης διάγνωσης του καρκίνου περιλαμβάνει την ανίχνευση και αξιολόγηση βιολογικών δεικτών. Η σύγχρονη πρόοδος στην κατανόηση της καρκινικής βιολογίας διευκόλυνε την αναζήτηση νέων βιολογικών δεικτών. Έτσι, πολλοί μελετητές αναδεικνύουν τη συμμετοχή πολλών προφλεγμονωδών κυτταροκινών στην καρκινογένεση, υποστηρίζοντας τη θεωρία ότι η χρόνια φλεγμονή προάγει την ανάπτυξη των όγκων. Πολλές από αυτές, όπως ο TNF- $\alpha$ , ασκούν τη βιολογική τους δράση με τη συμμετοχή τους σε μονοπάτια που ενεργοποιούν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, στον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση του όγκου. Ο TNF- $\alpha$  θα μπορούσε να αποτελέσει μοριακό στόχο για την πρόληψη του καρκίνου. Οι αντικαρκινικές ανοσορυθμιστικές ιδιότητες του TNF- $\alpha$ , καθιστούν πιθανή την χρησιμοποίησή του για τη θεραπεία του καρκίνου, ωστόσο χρειάζονται νέες μελέτες που θα αναδείξουν την αντικαρκινική του δράση.

Η αγγειογένεση αποτελεί μία διαδικασία πρωταρχικής σημασίας στην πορεία της ογκογένεσης. Η παραγωγή αγγειογενετικών παραγόντων από τα καρκινικά κύτταρα είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη συμπαγών όγκων. Ο VEGF αποτελεί τον κυριότερο αγγειογενετικό παράγοντα ο οποίος προάγει τον

πολλαπλασιασμό, τη μετακίνηση, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Στις μέρες μας ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον έχει αποκτήσει η αναγνώριση της προβλεπτικής αξίας του VEGF, καθώς ένας αντι VEGF παράγοντας (Bevacizumab) ήδη χρησιμοποιείται ως πρώτης γραμμής ΧΜΘ σε συγκεκριμένες ομάδες ασθενών με ΜΜΚΠ, ενώ πολλοί άλλοι παράγοντες με αντιαγγειογενετική δράση βρίσκονται υπό μελέτη. Είναι σημαντικό αν μπορούμε να γνωρίζουμε ποιοι ασθενείς θα έχουν όφελος από τη χορήγηση των συγκεκριμένων φαρμάκων, αφενός μεν για την επίτευξη της βέλτιστης ανταπόκρισης στη θεραπεία και αφετέρου για την αύξηση της επιβίωσής τους. Απαιτείται όμως αρκετή μελλοντική έρευνα προς αυτή τη κατεύθυνση.

Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες (ΟΣ) και τα προϊόντα του μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη της καρκινογένεσης ως αποτέλεσμα γενετικών δομικών αλλαγών που επιφέρουν αλλά και να συμβάλλουν στην περαιτέρω ανάπτυξη, διήθηση και μετάσταση του όγκου. Η δράση των ΧΜΘ φαρμάκων και η δυνατότητα να οδηγήσουν σε απόπτωση εξαρτάται από το ΟΣ. Η δυνατότητα όμως το ΟΣ να χρησιμοποιηθεί ως μελλοντικός δείκτης πρόβλεψης της ανταπόκρισης στη θεραπεία βρίσκεται ακόμη σε πρώιμο ερευνητικό στάδιο.

Οι διάφοροι βιολογικοί δείκτες, τόσο στον καρκίνο του πνεύμονα όσο και στις άλλες πνευμονικές παθήσεις έχουν προσδιοριστεί κυρίως στον ορό, στα πτύελα και στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα των ασθενών. Τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει επικεντρωθεί σε λιγότερο επεμβατικές τεχνικές για την έγκαιρη διάγνωση και πρόγνωση του ΚΠ. Μία από αυτές είναι και το συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα (EBC:exhaled breath condensate). Η συλλογή του EBC στοχεύει στη μελέτη τόσο των πτητικών όσο και των μη πτητικών μορίων, τα οποία προσφέρουν πληροφορίες για το κατώτερο αναπνευστικό. Σύμφωνα με την σύγχρονη βιβλιογραφία έχουν διατυπωθεί κάποιες υποθέσεις για τη κλινική χρησιμότητα μερικών δεικτών, σε βιολογικό υλικό που συλλέγεται από το κατώτερο αναπνευστικό σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα.

Στην παρούσα μελέτη συμπεριλάβαμε στις μετρήσεις μας τον TNF-α που αντιπροσωπεύει τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, τον VEGF που είναι πρωταρχικός αγγειογενετικός παράγοντας και το 8-ισοπροστάδιο που αποτελεί ένα από τα προϊόντα του οξειδωτικού στρες.

Ο σκοπός της μελέτης μας ήταν η ανίχνευση των παραπάνω βιολογικών δεικτών με τη μη επεμβατική μέθοδο του EBC και η αξιολόγηση της διαγνωστικής και προγνωστικής τους αξίας. Επιπλέον, η αξιολόγηση της συμβολής τους στην εκτίμηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία και στην παρακολούθηση των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας και σε υλικό ασθενών της Πνευμονολογικής Κλινικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα πρέπει τυπικά να ακολουθήσουν οι ευχαριστίες, οι οποίες όμως για μένα είναι ουσιαστικές. Στον επιβλέποντα τη διδακτορική μου διατριβή, σεβαστό μου Καθηγητή Πνευμονολογίας, Διευθυντή της Πνευμονολογικής Κλινικής και Πρύτανη του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Κωνσταντίνο Γουργουλιάνη εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε προτείνοντάς μου την παρούσα διατριβή και για την πολύτιμη βοήθεια του σε όλη την πορεία της μελέτης. Ο καθηγητής μου αποτελεί λαμπρό παράδειγμα, όχι μόνο στο τρόπο ιατρικής σκέψης και άσκησης της ιατρικής αλλά και στην στάση του ως άνθρωπος και επιστήμονας. Τις θερμές ευχαριστίες μου για τη συμβολή τους εκφράζω επίσης, στα άλλα δύο μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, τον Καθηγητή Ανοσολογίας Α. Γερμενή και την Επίκουρο Καθηγήτρια Πνευμονολογίας Ζ. Δανιήλ.

Η διδακτορική μου διατριβή έγινε η αφορμή να συνεργαστώ με την επιμελήτρια Πνευμονολογίας κ. Θεοδώρα Κερενίδη. Ένα μεγάλο ευχαριστώ από καρδιάς, όχι μόνο για τον καθοριστικό ρόλο της στη διεξαγωγή της μελέτης, αλλά και για την πραγματική της φιλία. Η στάση της ως επιστήμονα και ως ανθρώπου θα με ακολουθούν για πάντα.

Τις θερμές ευχαριστίες μου εκφράζω επίσης και στους συναδέλφους που συνεργάστηκαν σε αυτή τη μελέτη: τον κ. Κ. Κωστίκα για την πολύτιμη

βοήθειά του, τον κ. Θ. Κυρόπουλο και τις κκ. Ε. Τσιλιώνη και Σ. Οικονομίδη από το Βιοχημικό τμήμα της Πανεπιστημιακής Πνευμονολογικής Κλινικής και τους συνεργάτες της Πνευμονολογικής Κλινικής Α. Κατσαμπέκη, κ. Κ. Τανού, κ. Α. Κουτσοκέρα, κ. Ε. Γώγου και κ. Α. Παπαϊωάννου.

Ειλικρινές ευχαριστίες θέλω να εκφράσω και στους ασθενείς που έλαβαν μέρος στη μελέτη, οι οποίοι παρά τις δυσκολίες που αντιμετώπιζαν καθημερινά λόγω της νόσου συμμετείχαν στη διεκπεραίωση της μελέτης.

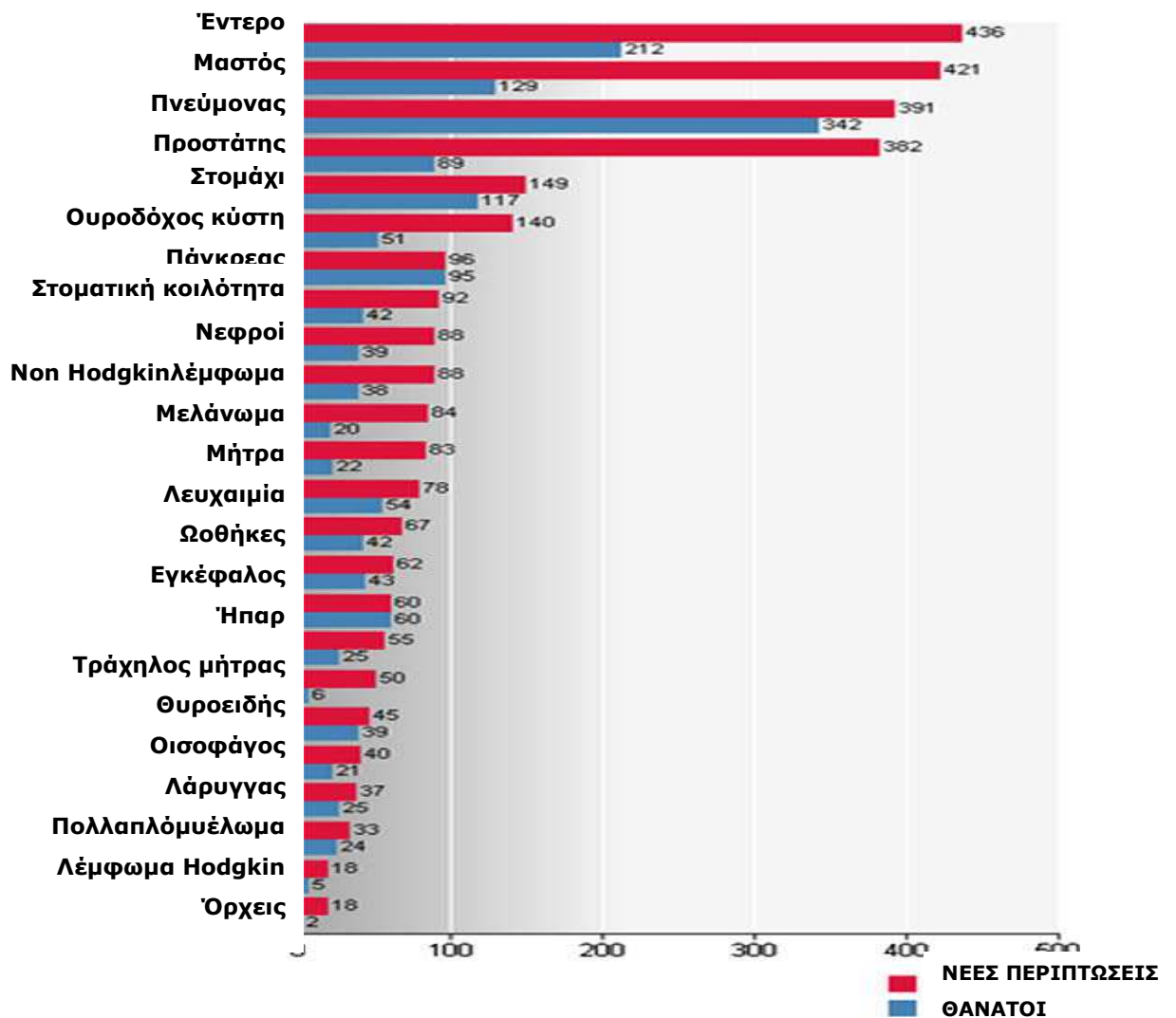
Τελειώνοντας θέλω να ευχαριστήσω τη σύζυγό μου, τους γονείς μου, την αδερφή μου για την υποστήριξη και την κατανόηση τους όλα αυτά τα χρόνια.

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

# 1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Ο καρκίνος του πνεύμονα, αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο στην Ευρώπη, ενώ βρίσκεται στη τρίτη θέση από άποψη συχνότητας. Στην Ευρώπη, το 2008 παρουσιάστηκαν 391.000 νέες περιπτώσεις ΚΠ, ενώ αναφέρθηκαν 342.000 θάνατοι από ΚΠ (Εικόνα 1) (1).



Εικόνα 1. Αριθμός θανάτων και νέων περιπτώσεων σε χιλιάδες από διάφορους τύπους καρκίνου στην Ευρώπη το 2008. Ο καρκίνος του πνεύμονα βρίσκεται στην πρώτη θέση ως αιτία θανάτου από καρκίνο με 342.000 και στην τρίτη θέση από άποψη συχνότητας με 391.000 νέες περιπτώσεις κάθε χρόνο



Το 90% του ΚΠ αποδίδεται στο κάπνισμα κι ο κίνδυνος ανάπτυξής του σε έναν καπνιστή είναι 10-30 φορές μεγαλύτερος από έναν μη καπνιστή. Άλλοι σημαντικοί αιτιολογικοί παράγοντες ανάπτυξης ΚΠ είναι το παθητικό κάπνισμα, η περιβαλλοντική ρύπανση, η έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες κ.ά (2). Οι ιστολογικοί τύποι του ΚΠ διακρίνονται στο μικροκυτταρικό (~15%) και στο μη μικροκυτταρικό που αποτελεί το 80-85% των περιπτώσεων και περιλαμβάνει το πλακώδες, το αδενοκαρκίνωμα και το μεγαλοκυτταρικό (3). Η διάγνωση του ΚΠ συνίσταται στην έγκαιρη κυτταρολογική ή και ιστολογική επιβεβαίωση, ενώ η σταδιοποίηση της νόσου βάσει του TNM (4) με τη βοήθεια των νέων απεικονιστικών κι επεμβατικών μεθόδων καθορίζει την θεραπευτική αντιμετώπισή του.

Το 75% περίπου των ασθενών βρίσκονται κατά τη διάγνωση σε προχωρημένο στάδιο νόσου. Η πενταετής επιβίωση των ασθενών με ΚΠ κυμαίνεται συνολικά στο 15% (5). Η φτωχή πρόγνωση του ΚΠ μπορεί να αποδοθεί στην επιθετική του βιολογική συμπεριφορά, στην μη έγκαιρη διάγνωσή του καθώς και στα περιορισμένα σε αποτελεσματικότητα μέσα αντιμετώπισής του. Το γεγονός ότι τα τελευταία 30 έτη η επιβίωση για το συγκεκριμένο καρκίνο δεν έχει αυξηθεί ικανοποιητικά, παρά τη συνεχή έρευνα, κάνει επιτακτική την ανάγκη για σχεδιασμό νέων στρατηγικών πρώιμης διάγνωσης και θεραπευτικής προσέγγισής του.

Μία από τις προσπάθειες ανίχνευσης του ΚΠ θα μπορούσε στο μέλλον να περιλαμβάνει τη μελέτη βιολογικών δεικτών (6). Η σύγχρονη κατανόηση της βιολογίας του καρκίνου διευκολύνει την αναζήτηση νέων δεικτών. Αρκετοί δείκτες που σχετίζονται με τον καρκίνο έχουν ταυτοποιηθεί και μερικοί από αυτούς μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμοι για την πρώιμη διάγνωση. Πρόσφατα, έχουν ανιχνευθεί μοριακές ανωμαλίες όπως για παράδειγμα μεταλλάξεις σε ογκογονίδια όπως το p53 και το Rb που μπορούν να συμβάλλουν στην διάγνωση του ΚΠ (7, 8).

## 1.1 Ο ρόλος των βιολογικών δεικτών στον καρκίνο του πνεύμονα

Η σύγχρονη πρόοδος στην κατανόηση της καρκινικής βιολογίας ανέδειξε μια πληθώρα βιολογικών δεικτών που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση και την μετέπειτα εξέλιξη των όγκων. Έτσι, σε πολλές μελέτες καταδείχθηκε η συμμετοχή πολλών προφλεγμονωδών κυτταροκινών στην καρκινογένεση υποστηρίζοντας τη θεωρία ότι η χρόνια φλεγμονή προάγει την ανάπτυξη των όγκων. Αξίζει να σημειωθεί, ότι πολλές κυτταροκίνες με ανοσορυθμιστική δράση όπως η IL-6, η IL-1β και ο TNF-α μεταβάλλουν τις τιμές τους στον ορό των ασθενών με ΚΠ (9). Τα καρκινικά κύτταρα παράγουν IL-6 ως απάντηση σε καθορισμένα ερεθίσματα (10). Τα αυξημένα επίπεδα της IL-6 είναι όμως και συνέπεια της παραγωγής της από τα λεμφοκύτταρα κυρίως CD4+ που εκκρίνουν Th2 κυτταροκίνες (11). Η συνεργική δράση των κυτταροκινών είναι χαρακτηριστική της άμυνας του οργανισμού ενάντια στον καρκίνο. Ο παράγοντας TNF-α έχει συσχετιστεί με την παρακρινή ενεργοποίηση κι άλλων κυτταροκινών στα καρκινικά κύτταρα όπως της IL-6, η οποία με τη σειρά της προάγει την παραγωγή πρωτεϊνών της οξείας φάσης (12) και της IL-2 που ενεργοποιεί τα NK κύτταρα (κύτταρα φονείς) (13). Μερικές κυτταροκίνες όπως ο TNF-α ασκούν τη βιολογική τους δράση ενεργοποιώντας μοριακά μονοπάτια όπως του NF-κβ και του JNK τα οποία συμμετέχουν αντίστοιχα στην κυτταρική επιβίωση και την απόπτωση (14). Η IL-8 δρα στο καρκινικό μικροπεριβάλλον προάγοντας την αγγειογένεση. Η έκκρισή της από τα καρκινικά κύτταρα προάγει τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων μέσω αυτοκρινών μοριακών μονοπατιών όπως του NF-κβ, του AP-1 και του HIF-1 (15). Η IL-8 ενεργοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα του αγγειακού καρκινικού δικτύου προάγοντας την αγγειογένεση και τη διείσδυση των ουδετερόφιλων στην περιοχή του όγκου (15).

Έτσι στους βιολογικούς δείκτες που παίζουν ενεργό ρόλο στην καρκινογένεση, συμπεριλαμβάνονται και οι αγγειογενετικοί παράγοντες. Η αγγειογένεση είναι μια κεφαλαιώδους σημασίας διεργασία στην πορεία της

ογκογένεσης. Η νεοπλασματική αγγειογένεση είναι η διαδικασία σχηματισμού νεόπλαστων αγγείων από ήδη υπάρχοντα αγγεία, ως απάντηση σε διάφορα ερεθίσματα (16). Ο κυριότερος παράγοντας που επάγει την αγγειογένεση είναι η υποξία. Μέσω ενός μηχανισμού γονιδιακής έκφρασης που σημαντικό ρόλο παίζει η πρωτεΐνη Von-Hippel Lindau (VHL), στα υποξικά καρκινικά κύτταρα αυξάνονται τα επίπεδα του HIF-1 που οδηγεί σε μεταγραφική υπερέκφραση πολλών γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων επάγουν την αγγειογένεση. Ο σημαντικότερος και καλύτερα μελετημένος είναι ο VEGF-A, ενώ δεν μπορεί να αγνοηθεί ο ρόλος δεκάδων άλλων, ανάμεσά τους ο PDGF και η ενδοθηλίνη-1.

Επίσης, σύμφωνα με τελευταίες μελέτες το οξειδωτικό stress και πολλά από τα προϊόντα του αποτελούν παράγοντες καρκινογένεσης (17, 18). Σε πολλούς τύπους καρκίνου, μεταξύ των οποίων και ο ΚΠ, έχει παρατηρηθεί διαταραχή του ισοζυγίου οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων. Ο μηχανισμός που οδηγεί στην καρκινογένεση είναι τόσο συνέπεια των μεταλλάξεων του DNA από την επίδραση των ROS, όσο και της αλλαγής στην έκφραση γονιδίων (19). Βρέθηκε ότι η δράση των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και η ικανότητά τους να οδηγήσουν σε απόπτωση, εξαρτάται από το ΟΣ (20). Οι γενετικές δομικές αλλαγές που προκαλούνται από τα υψηλά επίπεδα ΟΣ οδηγούν σε ανώμαλη έκφραση των γονιδίων μεταγραφής. Επιπλέον το ΟΣ προάγει την απόπτωση και τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, επάγοντας τους μεταγραφικούς παράγοντες NFκβ και AP-1 και αναστέλλοντας τους μεταγραφικούς παράγοντες bcl-2 και p53. Ο μεταγραφικός παράγοντας AP-1 αποτελεί σύμπλεγμα πρωτεϊνών (πρωτοογκογονίδια), τα οποία επάγονται από τα υψηλά επίπεδα ΟΣ. Τέλος, το ΟΣ διαταράσσει την ομαλή λειτουργία των συστημάτων μεταγωγής σήματος μέσω της οξειδωτικής βλάβης της κυτταρικής μεμβράνης (λιπιδική υπεροξειδωση), την διαταραχή της ενζυματικής δραστηριότητας (οξειδωση πρωτεϊνών) και την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων (21).

Την τελευταία δεκαετία παρόλο που έχουν ταυτοποιηθεί πολλοί νέοι βιολογικοί δείκτες, η κλινική τους σημασία παραμένει περιορισμένη. Αν και το μεγαλύτερο ενδιαφέρον είχε προσελκύσει η μελέτη του γονιδιώματος (genomics-γονιδιωματική), στην παρούσα περίοδο φαίνεται ότι η μελέτη του

πρωτεϊνώματος (proteomics-πρωτεωμική) είναι αυτή που λειτουργεί σαν βάση για την καλύτερη κατανόηση της καρκινογένεσης (22). Η μελέτη του πρωτεϊνώματος, δηλαδή του συνόλου των κυτταρικών πρωτεϊνών μίας βιολογικής οντότητας, επιτρέπει μία συστηματική μελέτη των πρωτεϊνικού προφίλ που στην περίπτωση της νεοπλασίας αποκαλύπτει την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών που συμβάλλουν στην εξάπλωση του όγκου (23). Επίσης, μία άλλη κατηγορία βιολογικών δεικτών που τα τελευταία χρόνια έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των επιστημόνων είναι η οικογένεια των υποδοχέων EGFR που συμμετέχουν σε πολλές κυτταρικές διεργασίες που περιλαμβάνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, την κινητικότητα και την αγγειογένεση. Μάλιστα, έχει αναφερθεί σε πρόσφατες μελέτες ότι ο EGFR υπερεκφράζεται σε προκαρκινικές αλλοιώσεις των βρόγχων παίζοντας καθοριστικό ρόλο στην ογκογένεση (24).

## **1.2 Μέτρηση των βιολογικών δεικτών σε διάφορα υλικά**

Οι βιολογικοί δείκτες έχουν προσδιοριστεί σε διάφορα βιολογικά υλικά τόσο στον ΚΠ όσο και σε άλλες πνευμονικές παθήσεις. Ο ορός αποτελεί το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο βιολογικό υλικό για τη μελέτη βιολογικών δεικτών στον ΚΠ. Στον ορό έχουν μετρηθεί κυτταροκίνες, αγγειογενετικοί παράγοντες, ROS και αρκετές άλλες πρωτεΐνες (25-27). Τελευταία έχει διαπιστωθεί από μελέτες ότι οι ασθενείς με ΚΠ παρουσιάζουν γενετικές και επιγενετικές αλλαγές, όπως απώλειες τμημάτων των χρωμοσωμάτων, ενεργοποιήσεις ογκογονιδίων, μεθυλιώσεις ογκοκατασταλτικών γονιδίων (28). Έτσι, οι συγκεντρώσεις του DNA στην κυκλοφορία του αίματος οδήγησε στην ανάπτυξη νέων βιολογικών δεικτών όπως η ανίχνευση μεταλλάξεων του K-ras και του p53 (28, 29). Ο μηχανισμός απελευθέρωσης του DNA στην κυκλοφορία οφείλεται στην απόπτωση και στη νέκρωση των καρκινικών κυττάρων (30).

Επιπλέον, μετρήσεις βιολογικών δεικτών έχουν πραγματοποιηθεί σε υλικά που συγκεντρώθηκαν με πιο επεμβατικές μεθόδους (βρογχοσκόπηση,

χειρουργική εκτομή) όπως είναι το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL), ιστός μετά από ενδοβρογχική ή διαβρογχική βιοψία και ιστός μετά από χειρουργείο (31-34). Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι σε κύτταρα από βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα έχουν ανιχνευτεί μεταλλάξεις ογκογονιδίων όπως του K-ras που σχετίζεται με τον ΚΠ αλλά και άλλοι βιολογικοί δείκτες όπως κυτταροκίνες, αγγειογενετικοί παράγοντες και διάφορες πρωτεΐνες (35-37). Επίσης, σε κύτταρα καρκινικού ιστού από ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε πνευμονεκτομή έχουν ανιχνευτεί προϊόντα υπεροξειδωσής των λιπών, ενώ σε ιστούς ασθενών με ΜΜΚΠ που έχουν ληφθεί με βιοψία έχουν ανιχνευτεί κύτταρα που εκφράζουν κυτταροκίνες και αγγειογενετικούς παράγοντες (17, 32, 34). Ωστόσο, δεν είναι εφικτή η λήψη ιστού σε όλους τους ασθενείς, ενώ παράλληλα τέτοιες τεχνικές έχουν αυξημένους κινδύνους επιπλοκών και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διαδοχικές μετρήσεις στον ίδιο ασθενή. Τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει επικεντρωθεί στη μέτρηση βιολογικών δεικτών σε υλικά που μπορούν να ληφθούν με λιγότερο επεμβατικές τεχνικές όπως είναι η προκλητή απόχρεμψη και ο εκπνεόμενος αέρας.

Παρόλο που με τη χρήση προκλητών πτυέλων ανιχνεύτηκαν πολλά βιολογικά μόρια, αυτή η μέθοδος δεν υποστηρίζεται από πολλούς μελετητές (38, 39). Η κυτταρολογική ανάλυση των πτυέλων έχει τον περιορισμό ότι η πλειονότητα των κυττάρων που εξετάζονται είναι πλακώδη κι έτσι η εξέταση γίνεται πιο ειδική για κεντρικές κι όχι για περιφερικές βλάβες (40). Αντιθέτως, ολοένα και περισσότερες μελέτες ενισχύουν τη χρησιμοποίηση των VOC (volatile organic compounds) ως μέσο για την έγκαιρη διάγνωση και πρόγνωση του ΚΠ.

## **2 ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΣ ΑΕΡΑΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ**

Η ανάλυση της αναπνοής αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη μέθοδο προκειμένου να ταυτοποιηθούν νέοι βιολογικοί δείκτες για τον ΚΠ (41). Η συλλογή της αναπνοής είναι μια μη επεμβατική διαδικασία, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί και να επαναληφθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα. Το 1971 οι Pauling et al., περιγράφουν μία νέα μέθοδο για τη μικροανάλυση της

αναπνοής που αποκάλυψε την παρουσία περίπου 200 πτητικών οργανικών μορίων στη φυσιολογική ανθρώπινη αναπνοή (42). Στις μέρες μας γνωρίζουμε ότι στην αναπνοή μπορούν να ανιχνευθούν πάνω από 3000 οργανικά μόρια, εκ των οποίων μόνο 20-30 ανιχνεύονται σε όλους τους ανθρώπους και αυτά είναι κυρίως αλκάνια, μεθυλαλκάνια και προϊόντα του βενζόλιου (41). Τα εκπνεόμενα οργανικά μόρια μπορούν να προέλθουν με δύο τρόπους: α) εξωγενώς και αφορά μόρια τα οποία εισπνέονται από το περιβάλλον και μετά εκπνέονται β) ενδογενώς και αφορά μόρια τα οποία παράγονται από διάφορες βιοχημικές διαδικασίες των κυττάρων (41). Βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως η ομοιόσταση των κυτταρικών μεμβρανών, ο κυτταρικός μεταβολισμός και οι οξειδωτικές διαδικασίες συνδέονται με το σχηματισμό πτητικών οργανικών μορίων (VOCs). Έτσι, τα αλκάνια που παράγονται κατά την υπεροξειδωση των λιπών από τα πολυακόρεστα λίπη με την επίδραση των προϊόντων οξειδωτικού στρες έχουν χαρακτηριστεί ως ένας δείκτης οξειδωτικού στρες (43). Επιπλέον η παραγωγή των ισοπροστανίων από το ακετυλσυνένζυμο Α είναι συνδεδεμένη με την βιοσύνθεση της χοληστερόλης (44).

Πρέπει να σημειωθεί ότι στη μελέτη της αναπνοής ασθενών με ΚΠ δεν περιλαμβάνονται μόνο τα VOC αλλά και κάποια άλλα αέρια, όπως το υπεροξειδιο του αζώτου (NO). Στη βιβλιογραφία υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν τη συμμετοχή του NO στη διαδικασία της καρκινογένεσης (45). Το NO και οι μεταβολίτες του αλληλεπιδρούν με τα ROS οδηγώντας στο σχηματισμό ισχυρά νιτροποιών παραγόντων που ενώνονται σε πρωτεΐνες. Η νιτροποίηση των πρωτεϊνών συμμετέχει στην παθογένεια του καρκίνου, καθώς μεταβάλλει την ενζυμική δραστηριότητα και τη δομή των πρωτεϊνών επιδρώντας στα μονοπάτια φωσφορυλίωσης της θυροσίνης (46). Η νιτροποίηση των πρωτεϊνών είναι μία διαδικασία που παρατηρείται σε πολλές ασθένειες και θεωρείται ότι αποτελεί δείκτη του οξειδωτικού στρες (46). Ωστόσο, το εκπνεόμενο NO από μόνο του δεν αποδεικνύεται ικανό να ξεχωρίσει τους ασθενείς με ΚΠ από τους υγιείς μάρτυρες, καθώς η συγκέντρωσή του φαίνεται να επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες ένας εκ των οποίων και μάλιστα σημαντικός, είναι η καπνιστική συνήθεια (47).

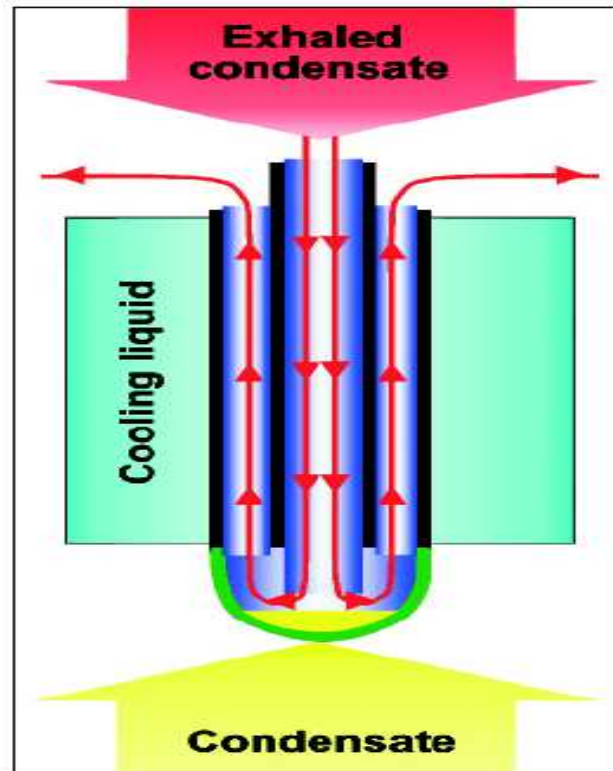
Η συλλογή του συμπυκνώματος εκπνεόμενου αέρα (EBC) είναι μία μη επεμβατική μέθοδος συλλογής μη πτητικών μορίων από τους πνεύμονες, ωστόσο μόνο ένα μικρό ποσοστό του συμπυκνώματος προέρχεται από σταγονίδια του κατώτερου αναπνευστικού που περιέχουν μη πτητικά μόρια (48). Οι συγκεντρώσεις των βιολογικών δεικτών που ανιχνεύονται στο EBC επηρεάζονται από τις διάφορες πνευμονικές παθήσεις και τροποποιούνται από τις θεραπευτικές παρεμβάσεις (49).

## 2.1 ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΑ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΥ ΑΕΡΑ (EBC)

Το ενδιαφέρον για την αξιοποίηση του EBC άρχισε στα μέσα της δεκαετίας του '80, για τη μελέτη ασθενών που νοσηλεύονταν στη μονάδα εντατικής θεραπείας (50). Από τότε και ιδιαίτερα από το 1990, αυξάνεται διαρκώς το ενδιαφέρον για τη μη επεμβατική αυτή τεχνική και τις πιθανές προοπτικές χρησιμοποίησής της στη μελέτη κυρίως της φλεγμονής των αεραγωγών. Ο αέρας στους βρόγχους και στις κυψελίδες είναι κορεσμένος με υδρατμούς σε ποσοστό 100% κι έχει θερμοκρασία 37° C, ανεξάρτητα από την υγρασία του εισπνεόμενου μίγματος αέρα (41). Με βάση την παρατήρηση αυτή, η ψύξη του εκπνεόμενου αέρα θα επιφέρει την υγροποίηση των υδρατμών. Οι υδρατμοί αυτοί, συμπαρασύρουν διάφορα πτητικά και μη πτητικά μόρια που προέρχονται από το κατώτερο αναπνευστικό (48). Η συλλογή του EBC στοχεύει στη μελέτη αυτή των μορίων, από την οποία είναι δυνατόν να αντληθούν πολύτιμες πληροφορίες για τις θέσεις του αναπνευστικού συστήματος που είναι προσπελάσιμες μόνο επεμβατικά (Εικόνα 2).

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, η μέτρηση πολλών μορίων στο EBC όπως το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, εικοσανοειδή, κυτταροκίνες, προϊόντα μεταβολισμού του NO, το Ph και προϊόντα υπεροξειδωσής των λιπών, έχει συμβάλει στην παρακολούθηση πολλών πνευμονικών παθήσεων (Πίνακας 1). Οι μέχρι τώρα κατευθύνσεις στις οποίες έχει στραφεί το ενδιαφέρον των ερευνητικών ομάδων που ασχολούνται με το συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα

περιλαμβάνουν παθήσεις, στις οποίες η φλεγμονή των αεραγωγών παίζει κεντρικό ρόλο στον παθοφυσιολογικό μηχανισμό τους.



**Εικόνα 2. Ο αέρας στις κυψελίδες είναι κορεσμένος σε υδρατμούς 100% ανεξάρτητα από τη  $\theta^{\circ}\text{C}$  του εισπνεόμενου μίγματος αέρα. Η ψύξη του εκπνεόμενου αέρα θα επιφέρει την υγραποίηση των υδρατμών οι οποίοι συμπαρασύρουν πτητικά και μη πτητικά μόρια που προέρχονται από το κατώτερο αναπνευστικό.**

Ομάδα ερευνητών της ERS/ATS Task Force το 2008, μελετώντας τα αποτελέσματα των μετρήσεων διάφορων βιολογικών δεικτών φλεγμονής στο συμπύκνωμα του εκπνεόμενου αέρα, κατέληξε σε κάποια μεθοδολογικά προβλήματα. Η μέτρηση ορισμένων βιολογικών δεικτών, όπως π.χ του υπεροξειδίου του υδρογόνου παρουσιάζει σημαντική μεταβλητότητα, τόσο ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιείται όσο και στο πλαίσιο της κάθε νοσολογικής οντότητας. Παρόλα αυτά, το γεγονός ότι τα επίπεδά του είναι σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με φλεγμονώδεις παθήσεις των



αεραγωγών, όπως στο βρογχικό άσθμα και στη χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια το καθιστά αξιόπιστο δείκτη του οξειδωτικού stress (51, 52). Παράλληλα, η μελέτη νεότερων δεικτών όπως είναι το 8-ισοπροστάνιο και τα προϊόντα μεταβολισμού του NO, άνοιξε νέους ορίζοντες στη μελέτη της οξειδωτικής φλεγμονής των αεραγωγών (53, 54). Τόσο τα ισοπροστάνια όσο τα προϊόντα μεταβολισμού του NO εμφανίζουν μεθοδολογικά προβλήματα, κυρίως στο επίπεδο της τυποποίησής τους στις διάφορες μελέτες. Επίσης, παραμένουν αναπάντητα πολλά ερωτήματα όσον αφορά τον ακριβή ρόλο αυτών των μορίων στους παθογενετικούς μηχανισμούς της φλεγμονής των αεραγωγών.

Πρωταρχική σημασία έχει κατά συνέπεια να διευκρινιστούν αρκετά προβλήματα σχετικά με τη συλλογή, την αποθήκευση και την ανάλυση του EBC, προκειμένου να τυποποιηθεί η μελέτη του και να καταστεί εφικτή η σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέρχονται από διαφορετικές ερευνητικές μονάδες. Η ERS Task Force επικεντρώθηκε σε κάποιες μεθοδολογικές συστάσεις προς όλους τους μελετητές σχετικά με περιορισμούς που αφορούν κυρίως το βιολογικό υλικό που συλλέγεται. Έτσι, αναφέρονται οι εξής περιορισμοί: α) η επιμόλυνση του δείγματος με βιολογικά μόρια από την ρινική και στοματική κοιλότητα, β) η επίδραση της ροής του αέρα και της θερμοκρασίας, γ) η διάρκεια συλλογής του δείγματος, δ) ο προσδιορισμός των υλικών της συσκευής με την οποία συλλέγεται το δείγμα και που μπορούν να επηρεάσουν τη σύστασή του, ε) η αποθήκευση του δείγματος θα πρέπει να γίνεται το συντομότερο δυνατόν, ζ) η ανάλυση των δειγμάτων πρέπει να είναι ταχεία έτσι ώστε να αποφευχθούν επιμολύνσεις, η) πρέπει να δοκιμάζεται η καταλληλότητα των ανοσοενζυματικών kit, θ) πρέπει να καθορίζεται ο παράγοντας διαλυτότητας για κάθε δείκτη, ι) πρέπει να συνεκτιμούνται παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη μέτρηση όπως η λήψη φαρμάκων, οι συστηματικές νόσοι και οι συνθήκες συλλογής.

### **Πίνακας 1. Ανίχνευση βιοχημικών δεικτών με τη μέθοδο του (EBC) σε διάφορες πνευμονικές παθήσεις όπως το άσθμα, η χρόνια αποφρακτική**

**πνευμονοπάθεια, η κυστική ίνωση, οι βρογχεκτασίες και οι διάμεσες πνευμονοπάθειες**

	Asthma		COPD		CF		Bronch	ILD	PCD
	Stable	Unstable	Stable	Unstable	Stable	Unstable			
Eicosanoids							?		?
8-isoprostanes	↑	↑↑↑	↑	?	↑↑↑	?		↑↑	
LTE <sub>4</sub> , C <sub>4</sub> , D <sub>4</sub>	↑	↑↑	↑	?	?	?		?	
LTB <sub>4</sub>	↑	↑↑	↑↑↑	?	?	?		?	
PG	?	?	?	?	?	?		?	
Tx	?	?	?	?	?	?		?	
NO-related products							?	?	?
Nitrotyrosine	↑	?	?	?	↑	?			
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	↑	↑↑	↑	?	↑	↑↑			
SNO	↑	↓	?	?	↑	↑↑			
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	↑	↑↑	↑	↑↑	?	?	↑	?	?
Lipid peroxidation product	↑	?	↑↑	?	?	?	?	?	?
Vasoactive amines	↑	?	?	?	?	?	?	?	?
Ammonia	↑	?	?	?	?	?	?	?	?
Hydrogen ions (pH)	↔	↑↑	?	?	?	?	?	?	?
Cytokines		?	?	?		?	?	?	?
IL-1 <sub>β</sub> , IL-2, IL-6, TNF-α IL-8	↑				↑				
Electrolytes		?	?	?		?	?	?	?
Na, Cl	?				↑↑				
Mg	↓								
Ca	↓								

## 2.2 ΕΒC ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Παρόλο που ο συνολικός αριθμός μελετών στις οποίες χρησιμοποιήθηκε το ΕΒC αυξήθηκε, ωστόσο λίγες είναι αυτές που αναφέρονται σε δείγματα που συλλέχθηκαν από ασθενείς με ΚΠ. Ο αριθμός μελετών που αναφέρεται σε μετρήσεις βιολογικών δεικτών ασθενών με ΚΠ μας επιτρέπει να κατηγοριοποιήσουμε τους βιολογικούς δείκτες σε πρωτεΐνες, δείκτες σχετιζόμενους με μεταλλάξεις του DNA, δείκτες που σχετίζονται με παθογενετικούς μηχανισμούς του ΚΠ όπως δείκτες ΟΣ και αγγειογενετικούς δείκτες.

Όσον αφορά στις πρωτεΐνες που μετρούνται στο EBC μεγάλο μέρος αναλογεί στις κυτταροκίνες. Υπάρχουν δύο προσεγγίσεις για τη μελέτη των κυτταροκινών σε βιολογικά δείγματα. Η μία περιλαμβάνει την ανίχνευση μεμονωμένων μορίων με διαφορετικά kit ανίχνευσης, ενώ η άλλη χρησιμοποιώντας μία σειρά αισθητήρων ανίχνευσης προσδιορίζει μια πληθώρα πρωτεϊνών και ονομάζεται πρωτεωμική.

Αναφορικά, ομάδα μελετητών ανίχνευσε αυξημένες τιμές μίας ιντερλευκίνης, της IL-6, σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (ΜΜΚΠ) σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες, προτείνοντας έτσι το EBC ως μία αξιόπιστη τεχνική για την παρακολούθηση ασθενών με καρκίνο πνεύμονα (55). Επίσης, η ίδια ομάδα επιστημόνων ανίχνευσε υψηλότερα επίπεδα του TNF-α, της λεπτίνης και της IL-2 στο EBC ασθενών με ΜΜΚΠ, αναδεικνύοντας τον πιθανό ρόλο των κυτταροκινών αυτών στην καρκινογένεση (36). Οι δύο τελευταίες αναφορές στη βιβλιογραφία στις οποίες γίνεται λόγος για τη χρησιμοποίηση του EBC για την ανίχνευση κυτταροκινών σε ασθενείς με ΚΠ, είναι του Conrad D.H. et al. (56) και αυτή του Kullmann T. et al. (57), οι οποίοι ερεύνησαν τη δυνατότητα να εφαρμοστεί η πρωτεωμική στο EBC των ασθενών με ΚΠ.. Μάλιστα, στη μελέτη του Kullmann για να ξεπεραστούν τα προβλήματα χαμηλής συγκέντρωσης των κυτταροκινών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των μικροσυστοιχιών (antibody microarray analysis) με την οποία μελετήθηκαν 120 κυτταροκίνες. Οι δύο ομάδες ασθενών περιλάμβαναν 50 ασθενείς με ΚΠ και 25 υγιείς μάρτυρες. Συνολικά 10 κυτταροκίνες είχαν διπλάσια διαφορά στη συγκέντρωση μεταξύ των δύο ομάδων. Η συγκεκριμένη πιλοτική μελέτη είναι ενδεικτικό παράδειγμα ότι η μελέτη του πρωτεϊνώματος στο EBC μπορεί να αξιοποιηθεί στον ΚΠ.

Στην προσπάθεια ανίχνευσης βιολογικών δεικτών που να διευκολύνουν τον εντοπισμό πρώιμων κυτταρικών βλαβών που οδηγούν σε καρκινογένεση, αρκετοί μελετητές βασίστηκαν στο γεγονός ότι ο ΚΠ προκύπτει από μία σειρά γενετικών ανωμαλιών σε ογκογονίδια και κατασταλτικά γονίδια (58). Πολλές αλλοιώσεις στο DNA που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρκίνου όπως γονιδιακές μεταλλάξεις, μεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων, αστάθεια των μικροδορυφόρων

(microsatellites) έχουν ανιχνευτεί σε βιολογικά υλικά ασθενών με ΚΠ (59). Παραταύτα, οι ιστοί που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη των γενετικών αλλοιώσεων δεν είναι πάντα διαθέσιμοι, καθώς η λήψη τους απαιτεί επεμβατικές μεθόδους. Έτσι, σε μία πρόσφατη μελέτη οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι ανθρώπινο DNA μπορεί να ανιχνευτεί με μη επεμβατικές μεθόδους όπως αυτή του EBC (58). Συγκεκριμένα, διαπίστωσαν ότι μεταλλάξεις του ογκογονιδίου p53 ανιχνεύονται στην πλειονότητα των δειγμάτων του EBC που λαμβάνονται από ασθενείς με ΚΠ (58). Σε μία άλλη εργασία, οι ίδιοι μελετητές έδειξαν ότι μεταλλάξεις και του ογκογονιδίου K-ras μπορούν να ανιχνευτούν στο EBC ασθενών με ΚΠ (60). Η μελέτη αυτή άνοιξε το δρόμο και σε άλλους μελετητές να διερευνήσουν την πιθανή ανίχνευση γενετικών ανωμαλιών μέσω του EBC. Έτσι, οι Carignano G. et al. το 2005 και το 2008 εισάγουν για πρώτη φορά ως δείκτη ανίχνευσης πρώιμων γενετικών αλλαγών τους μικροδορυφόρους, οι οποίοι είναι διαδοχικές νουκλεοτιδικές ακολουθίες ποικίλου μήκους που εμπεριέχονται μέσα στο γονιδίωμα και ανιχνεύονται στο EBC (61, 62). Τόσο στη μελέτη του 2005 όσο και σε αυτή του 2008, η αστάθεια των μικροδορυφόρων που διαπιστώθηκε στο EBC ασθενών με ΚΠ ήταν μεγαλύτερη από αυτή των υγιών μαρτύρων. Επιχειρήθηκε επίσης, η ανίχνευση μεταλλάξεων του EGFR στο EBC ασθενών με ΚΠ, χωρίς όμως αξιολογα αποτελέσματα (63). Αυτό το γεγονός οφείλεται στο ότι οι μεταλλάξεις στους μικροδορυφόρους είναι συχνότερες από αυτές στο μόριο του EGFR και εξαρτώνται και από προδιαθεσικούς παράγοντες του στοματικού βλεννογόνου, όπως π.χ το κάπνισμα κι όχι από καθαρά ογκοεξαρτώμενες αλλοιώσεις (63).

Μία άλλη κατηγορία βιολογικών δεικτών που επιχειρήθηκε να ανιχνευτεί στο EBC ασθενών με ΚΠ είναι και το ΟΣ και τα προϊόντα του όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου και το 8-ισοπροστανίνο (64). Το γεγονός της αναζήτησης νέων βιολογικών δεικτών για τον ΚΠ μεταξύ των προϊόντων του ΟΣ θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα κύτταρα του πνεύμονα εκτίθενται άμεσα στον ατμοσφαιρικό αέρα, υφίστανται ΟΣ από ερεθιστικούς παράγοντες του περιβάλλοντος, όπως ο καπνός του τσιγάρου, το όζον, το διοξειδίο του αζώτου και του θείου (65). Η πρώτη ενεργός ρίζα οξυγόνου που

παράγεται είναι το ανιόν του υπεροξειδίου, το οποίο λαμβάνει μέρος στην παραγωγή άλλων ενεργών μεταβολιτών όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου, τη ρίζα του υδροξυλίου και το υπεροξειδίο του αζώτου. Διαπιστώθηκε ότι τόσο υπεροξειδίο του υδρογόνου όσο και το NO μπορούν να ανιχνευτούν στον εκπνεόμενο αέρα όχι μόνο ασθενών με φλεγμονώδεις παθήσεις του πνεύμονα, αλλά και σε ασθενείς με ΚΠ. Έτσι σε μία πρόσφατη μελέτη, διαπιστώθηκε σημαντική μείωση στις συγκεντρώσεις τόσο του εκπνεόμενου υπεροξειδίου του υδρογόνου όσο και του NO κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας σε ασθενείς με ΚΠ (65). Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων του εκπνεόμενου υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ασθενείς με ΚΠ σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (66). Αντίθετα, στην ίδια μελέτη δεν αναδείχθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα του εκπνεόμενου 8-ισοπροστανίου μεταξύ ασθενών με ΚΠ και υγιών μαρτύρων (66).

Η επαγωγή της νεοπλασματικής αγγειογένεσης φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση, αλλά και να συμβάλλει στην περαιτέρω ανάπτυξη, διήθηση και μετάσταση του όγκου. Έτσι, πολλοί μελετητές προσπάθησαν να αναδείξουν τη σημασία των αγγειογενετικών παραγόντων στην καρκινογένεση ανιχνεύοντάς τους σε διάφορα βιολογικά υλικά, μεταξύ των οποίων και στο EBC. Μία πρώτη απόπειρα ανίχνευσης αγγειογενετικών παραγόντων στο EBC έγινε σε μελέτη όπου διαπιστώθηκε η αύξηση των επιπέδων της ενδοθηλίνης-1, ενός μιτογενούς αγγειογενετικού παράγοντα στους ασθενείς με ΚΠ σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες (67). Στη συνέχεια ακολούθησε μελέτη μίας άλλης ομάδας ερευνητών που ανίχνευσαν και υπολόγισαν τις συγκεντρώσεις αγγειογενετικών παραγόντων στο EBC ασθενών με ΚΠ (68). Στη συγκεκριμένη μελέτη παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα των εκπνεόμενων VEGF, αγγειογενίνης και b-FGF στους ασθενείς με ΚΠ σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες.

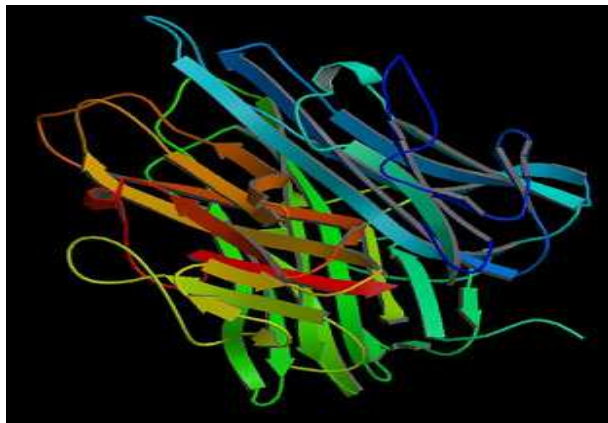
### **3 TNF- $\alpha$ , VEGF ΚΑΙ 8-ΙΣΟΠΡΟΣΤΑΝΙΟ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ**

#### **3.1 Παράγοντας νέκρωσης των όγκων άλφα (TNF- $\alpha$ )**

##### **3.1.1 Δομή και λειτουργία**

Ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων TNF- $\alpha$  είναι μία κυτταροκίνη που συμμετέχει στη διαδικασία της συστηματικής φλεγμονής και είναι μέλος της ομάδας των κυτταροκινών που διεγείρουν την αντίδραση της οξείας φάσης. Ο TNF- $\alpha$  εμπλέκεται σε πολλαπλούς μηχανισμούς, όπως η απόπτωση των κυττάρων, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η ογκογένεση. Ο πρωταρχικός ρόλος του TNF- $\alpha$ , είναι η ρύθμιση της δράσης των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Ανωμαλίες σε αυτή τη ρύθμιση εμφανίζονται σε πολλές ασθένειες και χαρακτηριστικά στον καρκίνο (69).

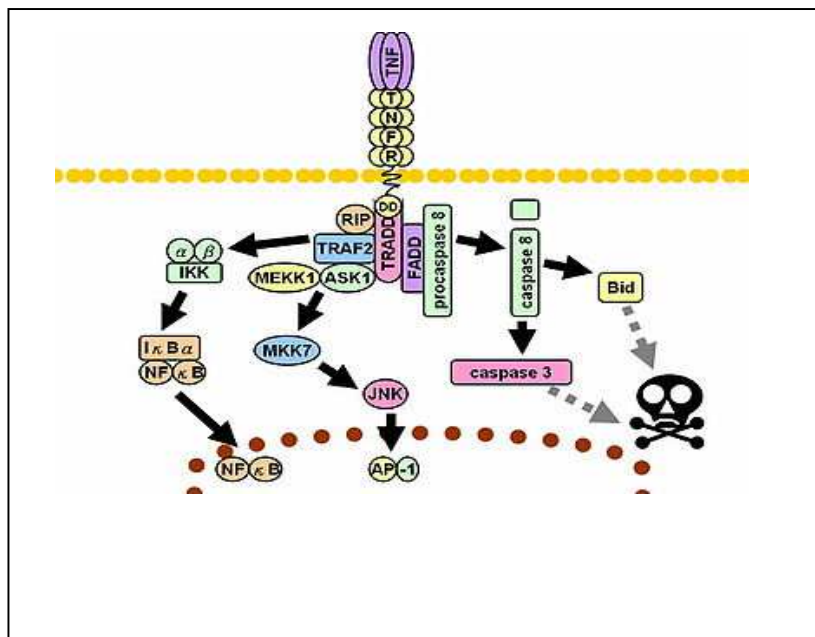
Ο TNF- $\alpha$  παράγεται ως μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II αποτελούμενη από 212 αμινοξέα και αναπτύσσεται στο χώρο ως ομοτριμερές (70) (Εικόνα 3). Παράγεται κυρίως από τα μακροφάγα, αλλά και από μία σειρά άλλων κυττάρων όπως τα λεμφοκύτταρα, μαστοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες και νευρικά κύτταρα, ενώ δρα σε πολλά όργανα και συστήματα όπως ο υποθάλαμος, το ήπαρ, το μυοκάρδιο κ.ά.



**Εικόνα 3. Ομοτριμερής δομή της πρωτεΐνης TNF- $\alpha$**

Ο TNF-α έχει δύο υποδοχείς τον TNFα-R1 και TNF-α-R2 (71). Ο TNFα-R1 εκφράζεται ευρέως, ενώ ο TNF-α-R2 μόνο στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (72). Παρόλο που και οι δύο υποδοχείς ενώνονται με τον TNF-α, ο κύριος υποδοχέας που καθορίζει κυτταρικές λειτουργίες σε διάφορους τύπους κυττάρων είναι ο TNFα-R1. Ο TNFα-R1 διαθέτει ένα τμήμα στο κυτταροπλασματικό μέρος του (death domain) που συμμετέχει στη διαδικασία της κυτταρικής απόπτωσης. Αντίθετα, ο TNFα-R2 δεν διαθέτει ανάλογο τμήμα που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, παρόλο που μπορεί έμμεσα μέσω του TNFα-R1 να σηματοδοτήσει τον κυτταρικό θάνατο (73). Ο TNF-α-R1 είναι ένα σημαντικό μέλος της οικογένειας των υποδοχέων που οδηγούν σε αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο.

Η διαδικασία αυτή όμως προϋποθέτει την ένωσή του με πρωτεΐνες, και τη δημιουργία τριμερών σύμπλοκων που συμμετέχουν σε τρία σημαντικά βιολογικά μονοπάτια: α) ενεργοποίηση του NF-κβ, ο οποίος είναι ένας παράγοντας που παίρνει μέρος στη μεταγραφή μίας σειράς πρωτεϊνών, σημαντικών για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την αντιμετώπιση της φλεγμονής και την απόπτωση (74) β) ενεργοποίηση της πρωτεΐνης MAP κινάσης που εμπλέκεται στο μηχανισμό διαφοροποίησης των κυττάρων (73). Η κύρια MAP κινάση που ενεργοποιείται από τον TNF-α είναι η JNK. Ο ρόλος της στη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου είναι αμφιλεγόμενος, ωστόσο τελευταίες μελέτες υποστηρίζουν ότι δρα υπέρ της προ-απόπτωσης των κυττάρων (75) γ) συμβάλλει στην απόπτωση των κυττάρων (76). Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει δύο ειδών μονοπάτια που ενεργοποιούνται μέσω συγκεκριμένων πρωτεϊνών των κασπασών (75). Το πρώτο μονοπάτι ονομάζεται και εξωτερικό μονοπάτι και οφείλεται κυρίως στη δράση των κασπασών -3 και -7, καθώς και σε ενδονουκλεάσες που καταστρέφουν τις δομικές πρωτεΐνες του κυττάρου και αποσυνθέτουν το DNA οδηγώντας σε απόπτωση. Το δεύτερο μονοπάτι ονομάζεται και εσωτερικό και οφείλεται στην δράση της κασπάσης-8 στο μιτοχόνδριο και στην απώλεια του δυναμικού της μεμβράνης του μιτοχονδρίου (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4. Τα τρία σημαντικότερα βιοχημικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχει ο TNF-α: α) ενεργοποίηση του NF-κβ β) ενεργοποίηση της πρωτεΐνης MAP κινάσης και γ) μηχανισμός απόπτωσης των κυττάρων μέσω των κασπασών**

### 3.1.2 Ο ρόλος του TNF-α στην καρκινογένεση

Πολλές επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες στηρίζουν τη θεωρία ότι η χρόνια φλεγμονή επάγει τη δημιουργία και την ανάπτυξη όγκων. Ο TNF-α ως μία πρωταρχική προφλεγμονώδης κυτταροκίνη δρα ώστε να προωθείται η φλεγμονή και η καρκινογένεση καθώς εμπλέκεται τόσο στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων όσο και στη διείσδυση, αγγειογένεση και μετάσταση του όγκου. Ο αμυντικός μηχανισμός της φαγοκυττάρωσης, παίζει πρωταρχικό ρόλο στη μη ειδική και ειδική ανοσοποίηση, στη ρύθμιση της ανάπτυξης των κυττάρων καθώς και στη διαδικασία της φλεγμονής (77). Σε πολλούς τύπους καρκίνου εμφανίζεται μεγάλη συγκέντρωση φαγοκυττάρων, τα οποία επιδιώκουν την εξουδετέρωση των καρκινικών κυττάρων, είτε με απλή φαγοκυττάρωση είτε με την έκκριση αντικαρκινικών παραγόντων (78). Ο TNF-α αποτελεί ένα από τα προϊόντα που ελευθερώνεται από τα φαγοκύτταρα ενάντια στα καρκινικά κύτταρα, χωρίς να προκαλεί φθορά στα φυσιολογικά (79). Επίσης, θεωρείται μία πρωτεΐνη που προκαλεί αιμορραγική



νέκρωση σε πολλούς τύπους καρκίνου (80). Από την άλλη, έχει αναφερθεί σε κάποιες μελέτες ότι τα καρκινικά κύτταρα συνθέτουν ουσίες με ανοσοκατασταλτική δράση επηρεάζοντας τη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού (81, 82). Έτσι, πολλά από τα φαγοκύτταρα που διεισδύουν στην καρκινική περιοχή δεν έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες και οι παράγοντες που εκκρίνουν, όπως ο TNF-α, αντί να έχει κυτταροτοξική δράση συμβάλλει στην ανάπτυξη του όγκου (80, 83).

Η συμμετοχή του TNF-α στην καρκινογένεση επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι πολυμορφισμοί σε περιοχές του γονιδίου του TNF-α είναι υπεύθυνοι για την ανάπτυξη κάποιων όγκων (84). Έτσι, άτομα με γονότυπο AA/GA στη θέση TNF-308 βρέθηκε ότι είχαν μεγαλύτερη έκφραση του TNF-α και περισσότερες πιθανότητες να αναπτύξουν καρκίνο πνεύμονα. Το αντίθετο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε για άτομα με γονότυπο στη θέση TNF-α 238 AA/GA.

Μελέτες όμως αναφέρουν, ότι ο TNF-α συμμετέχει και σε διαδικασίες που επάγουν την καρκινογένεση όπως είναι η καρκινική αγγειογένεση, η διείσδυση των καρκινικών κυττάρων και η μετάσταση. Ο TNF-α έχει αναφερθεί ότι επάγει την έκφραση αγγειογενετικών παραγόντων, μεταξύ των οποίων η IL-8 και ο VEGF σε κακοήγη γλοιώματα (85). Σε μετάσταση του πνεύμονα πειραματικού μοντέλου σε ποντίκια, ο TNF-α βρέθηκε να συντηρεί την ανάπτυξη της νεοαγγειογένεσης, επάγοντας τον παράγοντα ανάπτυξης των ηπατοκυττάρων (HGF) (86). Επιπλέον, ο TNF-α συμβάλλει στην διείσδυση των καρκινικών κυττάρων καθώς έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί μεταλλοπρωτεϊνάσες και ιντεγκρίνες (87). Όσον αφορά τη συμμετοχή του στις μεταστάσεις, ο TNF-α δρα έμμεσα ενεργοποιώντας πρωτεΐνες προσκόλλησης ICAM-1, επάγοντας την έκφραση της IL-8 και του MCP-1(monocyte chemoattractant protein) (88).

Παρόλο που οι περισσότερες μελέτες υποδεικνύουν ότι ο TNF-α συμβάλλει στην καρκινογένεση, σε μερικές μελέτες σε πειραματικά μοντέλα είχε αντικαρκινική δράση. Ο ρόλος αυτός του TNF-α βασίζεται σε ανοσολογικές απαντήσεις που εμποδίζουν το σχηματισμό όγκων, μέσω π.χ της

καταστροφής του καρκινικού στρώματος από κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα, από μακροφάγα και από δενδριτικά κύτταρα (89). Η ρύθμιση της προκαρκινικής ή αντικαρκινογενετικής ικανότητας του TNF-α δεν είναι ακόμη ξεκάθαρη, σίγουρα όμως επηρεάζεται από την κυτταρική ποικιλομορφία των οργάνων και των καρκινογόνων ουσιών που επιδρούν σε αυτά. Έτσι, η δράση του NF-κβ που επάγεται από τον TNF-α έχει διαφορετικές επιδράσεις σε όργανα με διαφορετική αναγεννητική ικανότητα, όπως αντικαρκινική δράση στο ήπαρ και προκαρκινική στο κόλον (90).

Προκειμένου να διαλευκανθεί ο πολύπλοκος ρόλος του TNF-α στην καρκινογένεση, χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για την κατανόηση της συμβολής του στους μηχανισμούς ανάπτυξης διαφόρων όγκων.

### **3.1.3 Η κλινική σημασία του TNF-α στον καρκίνο του πνεύμονα**

Ο TNF-α είναι μία πολυλειτουργική κυτταροκίνη, που παίζει σημαντικό ρόλο σε βιολογικές διαδικασίες όπως η επιβίωση, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και ο κυτταρικός θάνατος (91, 92). Αρκετές αναφορές έχουν δείξει υψηλές συγκεντρώσεις του TNF-α στον ορό ασθενών με διαφορετικούς τύπους καρκίνου, όπως και σε προκαρκινικές βλάβες (93, 94). Όσον αφορά τον ΚΠ, τα επίπεδα του TNF-α στον ορό έχουν μετρηθεί τόσο σε ασθενείς με ΜΜΚΠ όσο και σε ασθενείς με ΜΚΠ κι έχουν βρεθεί υψηλότερα σε σχέση με αυτά των υγιών μαρτύρων. Αυξημένα όμως επίπεδα του δείκτη έχουν διαπιστωθεί και σε άλλα βιολογικά υλικά (Πίνακας 2). Σε μία μελέτη όπου διερευνάται η διαγνωστική αξία βιολογικών δεικτών στον ΚΠ, ο TNF-α αυξάνεται στον ορό ανάλογα με την έκφραση του ογκογονιδίου bcl-2 και αντιστρόφως ανάλογα με τη μικροαγγειακή διασπορά. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αντίθετο με τα συμπεράσματα άλλων μελετών, στις οποίες παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του δείκτη με το στάδιο της νόσου και την αύξηση του όγκου. Σε μία άλλη μελέτη όπου μετρήθηκαν τα επίπεδα πολλών κυτταροκινών σε ασθενείς με ΚΠ πριν από οποιαδήποτε θεραπεία παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα του TNF-α είναι αυξημένα σε αρχικό στάδιο της νόσου. Επιπλέον, ο TNF-α συμβάλλει στην έκφραση μορίων προσκόλλησης

στα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως το ICAM-1 γεγονός που αναδεικνύει και το ρόλο του στη μεταστατική συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων. Από τις προαναφερόμενες μελέτες διαπιστώνονται οι αμφιλεγόμενες απόψεις σχετικά με το ρόλο του δείκτη στην καρκινογένεση. Πρέπει να σημειωθεί ότι και σε άλλα βιολογικά υλικά, όπως π.χ στο BAL, δε διαπιστώθηκαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα του TNF-α με το στάδιο της νόσου, αλλά ούτε και με τον ιστολογικό τύπο του καρκίνου. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις του δείκτη με άλλες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους όπως το φύλο, η απώλεια βάρους, η καπνιστική συνήθεια, η ηλικία, το PS, ο ιστολογικός τύπος και το TNM στάδιο της νόσου.

Επιπλέον, τα επίπεδα του TNF-α πριν και μετά τη ΧΜΘ έχουν προσδιοριστεί σε ορισμένες μελέτες. Έτσι σε μία πρόσφατη μελέτη, η αύξηση των επιπέδων του TNF-α που παρατηρήθηκε μετά τη ΧΜΘ ήταν ανεξάρτητη από την ανταπόκριση στη θεραπεία. Αντίθετα, σε μία παλαιότερη μελέτη, τα επίπεδα του TNF-α δεν μεταβάλλονται στατιστικά σημαντικά με τη θεραπεία.

Σε ασθενείς με ΚΠ και η προγνωστική αξία του TNF-α αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης. Σε μία μελέτη που διερευνά την προγνωστική αξία των βιολογικών δεικτών στον ΚΠ, ο TNF-α αναδεικνύεται ως δείκτης καλής πρόγνωσης καθώς η αύξηση των επιπέδων του στον ορό είναι ανάλογη, με την αύξηση της επιβίωσης των ασθενών. Η ίδια ομάδα μελετητών διαπίστωσε ότι τα αυξημένα επίπεδα του TNF-α σε ασθενείς με ΚΠ που είχαν αυξημένη έκφραση του bcl-2 είχε ως αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη συνολική επιβίωση των ασθενών. Αντίθετα, δύο άλλες μελέτες καταλήγουν ότι ο TNF-α αποτελεί δείκτη κακής πρόγνωσης καθώς τα επίπεδά του στον ορό αυξάνονται μαζί με την αύξηση του όγκου και την πρόοδο της νόσου. Σύμφωνα με άλλους μελετητές ο TNF-α δεν αποτελεί καν προγνωστικό δείκτη (26, 95).

Όσον αφορά την ανίχνευση του TNF-α στο EBC, η πρώτη αναφορά γίνεται στη μελέτη της Carpagnano G.et al. το 2007, όπου ο TNF-α μετρήθηκε σε διάφορα βιολογικά υλικά. Στη μελέτη αυτή παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα του δείκτη σε όλα τα βιολογικά υλικά σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες, ενώ παράλληλα μόνο στο EBC διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική

αύξηση των επιπέδων του δείκτη στους ασθενείς με πιο προχωρημένο στάδιο νόσου. Επιπλέον, σε μία άλλη μελέτη διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα του TNF-α στο EBC ήταν αυξημένα πριν από πνευμονεκτομή ή λοβεκτομή ασθενών με ΚΠ (96). Η πιο πρόσφατη μελέτη όμως το 2009 δεν βρήκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα του TNF-α σε ασθενείς με ΚΠ σε σχέση με τα επίπεδά τους σε υγιείς μάρτυρες (68).

**Πίνακας 2. TNF-α στα βιολογικά υλικά ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα**

ΥΛΙΚΟ	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΤΥΠΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	ΜΕΛΕΤΗ
Ορός	47	NSCLC	↑TNF-α, survivin	Derin D. et al .2008
	32	NSCLC	↑TNF-α, λεπτίνη , IL-2	CarpagnanoG. et al. 2007
	103	NSCLC	↑TNF-α, κυτταροκίνες	Kaminska J.et al. 2006
	44	NSCLC	↑TNF-α, IL-6	Kayacan O. et al 2006
	28	NSCLC	↑TNF-α,IL6,CRP,λεπτίνη	Tas F.et al. 2005
	130	NSCLC	↑TNF-α,D-dimers	Guadagni F. et al. 2004
	26	23NSCLC 3 SCLC	↑TNF-α, IL-6, IL-1β	MatanicD. et al. 2003
	112	NSCLC	↑TNF-α, ICAM-1	De Vita F. et al.1998
	60	↑TNF-α	↑TNF-α, IL-6, IL-1β	De Vita e F.t al.1998
24	NSCLC	↑TNF-α,IL-10	Bansal AS. et al 1997	
Πλάσμα	26	23NSCLC 3 SCLC	↑TNF-α, IL-6, IL-1β	Matanic D.et al. 2003
Πτύελα	32	NSCLC	↑TNF-α, λεπτίνη , IL-2	CarpagnanoG. Et al. 2007
BAL	32	NSCLC	↑TNF-α, λεπτίνη , IL-2	Carpagnan G. Et al. 2007
	26	23NSCLC/3SCLC	↑TNF-α, IL-6, IL-1β	Matanic D.et al. 2003
	20	NSCLC	↑TNF-α, IL-6, IL-1	Chyczewska E.et al.1997
Ούρα	32	NSCLC	↑TNF-α, λεπτίνη , IL-2	CarpagnanoG. et al. 2007
Πλευριτικό υγρό	15	NSCLC	↑TNF-α, κυτταροκίνες	Hamed EA et al. 2004
	32	NSCLC	↑TNF-α, κυτταροκίνες	AlexandrakisM et al 2002
	38	NSCLC	↑TNF-α, κυτταροκίνες	Momi H. et al. 2000

EBC	17	NSCLC	TNF- $\alpha$ ,IL-8,VEGF	Gessner C. et al. 2009
	32	NSCLC	↑TNF- $\alpha$ , λεπτίνη , IL-2	Carpagnano Γ.et al 2007
Ιστός	91	NSCLC	TNF- $\alpha$ μή ανιχνεύσιμο	Saji H. et al. 2003
	6	NSCLC	↑Έκφραση TNF- $\alpha$	Shimomoto H. et al. 1995

### 3.2 Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF)

#### 3.2.1 Δομή και λειτουργία

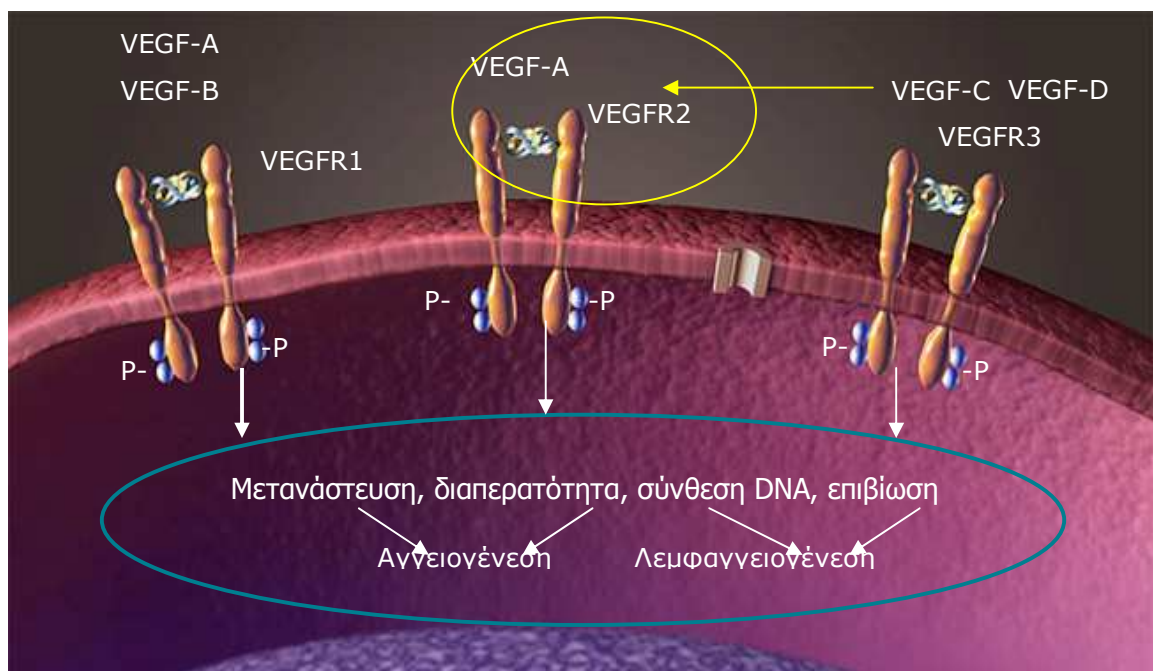
Ο VEGF είναι μία ομοδιμερής γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 45 KDa (Εικόνα 5). Αποτελείται από 4 ισομορφές VEGF121, VEGF165, VEGF189 και VEGF206 που έχουν παρόμοια βιολογική δράση όταν είναι ελεύθερες σε διάλυμα (97). Οι ισομορφές VEGF121, VEGF165 και VEGF189 είναι οι ισομορφές που εκκρίνονται από τους περισσότερους κυτταρικούς τύπους. Οι VEGF121 και VEGF165 επάγουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση *in vivo*. Αντίθετα, οι ισομορφές VEGF189 και VEGF206 βρίσκονται δεσμευμένες σε πρωτεογλυκάνες και έτσι μπορούν και απελευθερώνουν άλλους παράγοντες, όπως είναι ο bFGF, οι οποίοι βρίσκονται αποθηκευμένοι σε μόρια θειϊκής ηπαρίνης του εξωκυτταρικού υλικού (98).



**Εικόνα 5. Ομοδιμερής δομή της πρωτεΐνης VEGF**

Οι υποδοχείς του VEGF ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων με ενεργότητα τυροσινικής κινάσης και είναι οι VEGFR-1/flt-1, VEGFR-2/KDR/flk-1 και VEGFR-3/flt-4. Ο VEGF δρα μέσω της σύνδεσής του, κυρίως με δύο διαμεμβρανικούς υποδοχείς τυροσινικής κινάσης που εκλεκτικά, αλλά όχι αποκλειστικά εκφράζονται στο ενδοθήλιο (Εικόνα 6). Αυτοί οι υποδοχείς, VEGFR-1 και VEGFR-2, υπερεκφράζονται στο καρκινικό αγγειακό δίκτυο (99) ενώ ο υποδοχέας VEGFR-3 εκφράζεται στα λεμφαγγεία.

Όταν ο VEGF ενώνεται με τους υποδοχείς του, ξεκινά μία σειρά από διαδικασίες, όπως η αυτοφωσφορυλίωση και των δύο υποδοχέων TK συνοδευόμενη από ενεργοποίηση πρωτεϊνών όπως η GAP, GTPάση, MAPKινάση κ.ά (100). Αν και η βιολογική δράση κάθε υποδοχέα δεν είναι ξεκάθαρη φαίνεται ότι ο VEGFR2 είναι υπεύθυνος για την αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων (101).

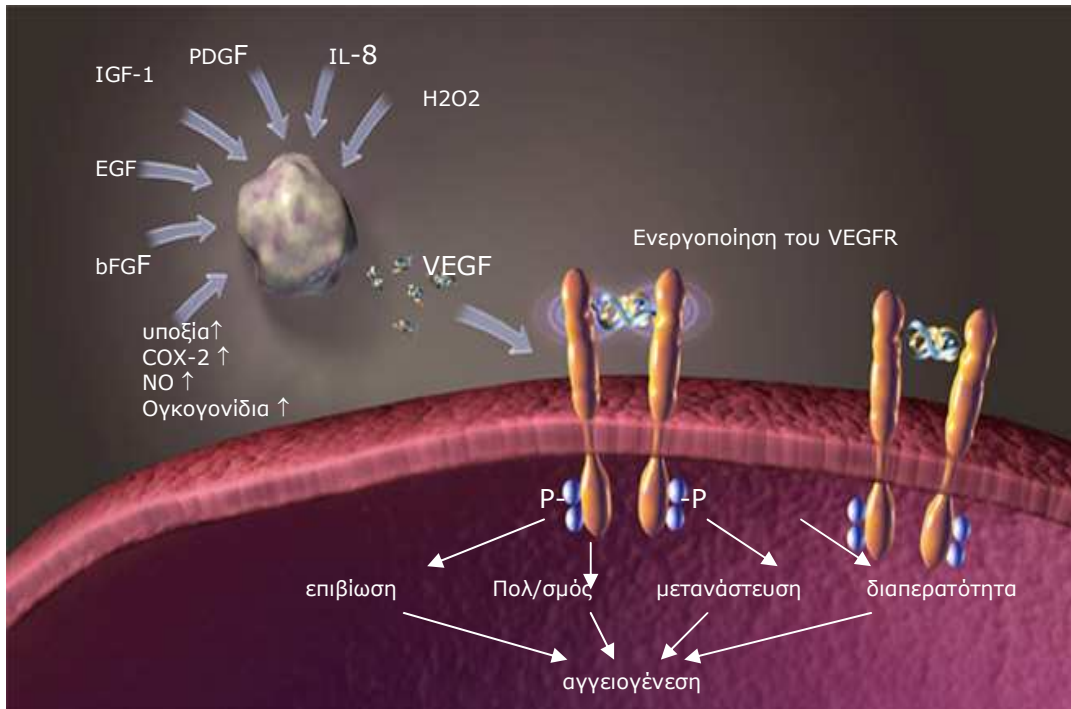


**Εικόνα 6. Ο VEGF ενωμένος με τους 3 υποδοχείς VEGFR1, VEGFR2 και VEGFR3 προκαλεί μία σειρά μεταβολών στο ενδοθήλιο: την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας**

### 3.2.2 Ο ρόλος του VEGF στην καρκινογένεση

Ο VEGF χαρακτηρίζεται από την ικανότητα να αυξάνει τη διαπερατότητα των μικρών αγγείων στα μακρομόρια. Η ικανότητα αυτή, όπως και η αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων των όγκων στις πρωτεΐνες του πλάσματος, οφείλεται στην υπερέκφραση του VEGF στα καρκινικά κύτταρα. Η έκφραση του VEGF υπόκειται σε κάποιες συνθήκες ελέγχου (Εικόνα 7) που είναι οι εξής: α) ο VEGF υπερεκφράζεται σε συνθήκες υποξίας με την αύξηση της μεταγραφής του mRNA του και με την αύξηση της σταθερότητας του μορίου του (102). Ο κυριότερος μεσολαβητής για την επαγωγή μεταγωγής σήματος από την υποξία είναι ο επαγόμενος παράγοντας υποξίας HIF-1 (103) β) τα ογκογονίδια *src*, *ras* και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια *p53*, *p73* παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασης του VEGF σε πολλούς τύπους καρκίνου (104). Ενεργοποίηση του ογκογονιδίου *ras* (K-*ras* και H-*ras*) για παράδειγμα, έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης του παράγοντα VEGF και αναστολή της έκφρασης του αναστολέα της αγγειογένεσης θρομβοσποντίνης (TSP1) (105). Παρόμοια, μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο *p53* επιτρέπουν στα καρκινικά κύτταρα να επάγουν την αγγειογένεση (104) γ) κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες όπως η IL-8, ο TNF-α, η IL-1, ο TGF-α, ο FGF, ο EGF κ.ά αυξάνουν την έκφραση του VEGF σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων (98, 106) δ) ο VEGF εκφράζεται επιπλέον από κύτταρα που συνθέτουν στεροειδείς ορμόνες (107), ενώ η έκφρασή του επηρεάζεται από τη θρόμβωση των αγγείων [60], το οξειδωτικό stress (27), την οξέωση (108) και την παραγωγή αδενοσίνης (109).

Αξίζει να σημειωθεί ότι το ΟΣ αναστέλλει την ενδοθηλιακή κυτταρική απόπτωση και επάγει την νεοαγγειογένεση (αγγειογένεση από προϋπάρχοντα αγγεία) μέσω της ενεργοποίησης του VEGF (110). Επίσης, προϊόντα του όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου επάγουν τη μεταγραφική έκφραση του VEGF και ενεργοποιούν με τον τρόπο αυτό την κυτταρική μετακίνηση, τον πολλαπλασιασμό και την μορφογένεση του αυλού των αγγείων (111).

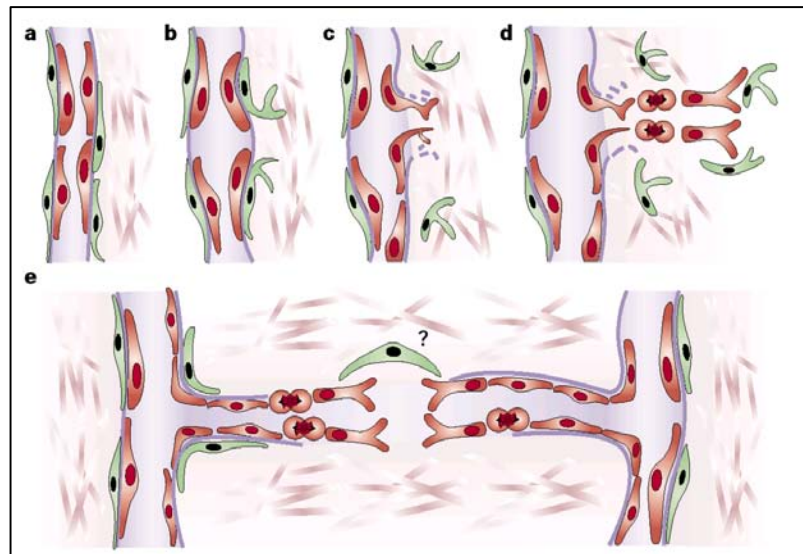


**Εικόνα 7. Ο VEGF εκκρίνεται από τα υποξικά καρκινικά κύτταρα υπό την επίδραση διαφόρων παραγόντων (οξειδωτικό stress, HIF-1, ο IGF-1 ,IL-8, ο EGFR, Bcl-2, p53, csrs, ras κ.α. Ο VEGF συνδέεται με τους υποδοχείς VEGFR-1/flt-1, VEGFR-2/KDR/flk-1 που βρίσκονται στην επιφάνεια των ήδη υπάρχοντων ενδοθηλιακών κυττάρων και προάγει τον πολλαπλασιασμό, τη μετακίνηση, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση τους.**

Ο βιολογικός ρόλος του VEGF στον καρκίνο, συνίσταται στην προώθηση της αγγειογένεσης που επιτυγχάνεται με τη διείσδυση των ενδοθηλιακών κυττάρων στο gel κολλαγόνου και το σχηματισμό μέσα σε αυτό δομών που μοιάζουν με τριχοειδή αγγεία (Εικόνα 8) (112). Έτσι, πραγματοποιείται η νεοαγγειογένεση, δηλαδή τα ενδοθηλιακά κύτταρα μεταναστεύουν στον περιαγγειακό χώρο και προσκολλώνται στα κύτταρα δημιουργώντας μικρά συστήματα αγγείων [65]. Η νεοαγγειογένεση αποτελεί βασική προϋπόθεση για την ανάπτυξη συμπαγών όγκων διαμέτρου 1-2 χιλιοστών (113). Η αγγειογενετική διαδικασία είναι μία ισορροπία μεταξύ διεγερτικών και ανασταλτικών παραγόντων. Τα προαγγειογενετικά ερεθίσματα μπορούν να απελευθερώνονται από τον όγκο, τα φλεγμονώδη κύτταρα, το



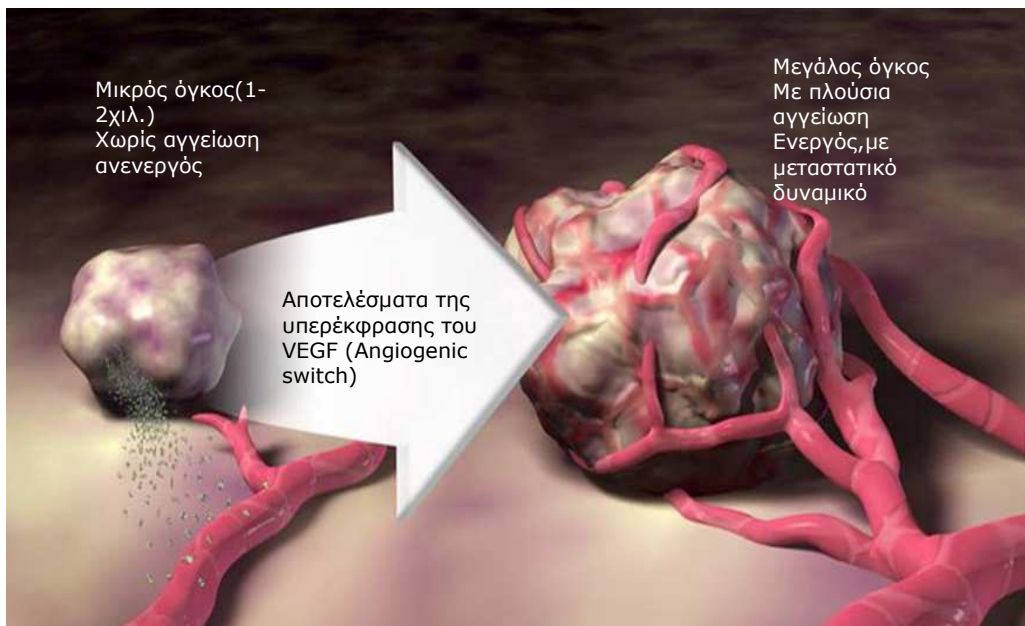
εξωκυττάριο στρώμα ή από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα καρκινικά κύτταρα υποβοηθούν την έκκριση παραγόντων που διεγείρουν τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον, οι παράγοντες αυτοί συμμετέχουν στην αγγειακή μορφοποίηση και στην απελευθέρωση πρωτεολυτικών ενζύμων (114).



**Εικόνα 8. Διαδικασία της νεοαγγειογένεσης με διείσδυση των ενδοθηλιακών κυττάρων στον περιαγγειακό χώρο: α,β) Τα περικύτταρα (πράσινο χρώμα) αποκολλώνται και τα αγγεία διαστέλλονται πριν η βασική μεμβράνη και το κυτταρικό στρώμα αποσυνθεθούν γ) Τα ενδοθηλιακά κύτταρα (κόκκινο χρώμα) μεταναστεύουν στον περιαγγειακό χώρο δ) Τα ενδοθηλιακά κύτταρα πολλαπλασιάζονται ε) Τα ενδοθηλιακά κύτταρα συγκολλούνται μεταξύ τους μαζί με τη βασική μεμβράνη και δημιουργούν αυλό.**

Με τη δημιουργία των νέων αγγείων τα καρκινικά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται να διεισδύουν στην κυκλοφορία και να δίνουν μεταστάσεις (115) (Εικόνα 9). Όταν η κυτταρική μάζα αυξάνει, είτε από υπερπλασία είτε από υπερτροφία, το τοπικό μικροπεριβάλλον αλλάζει με ποικίλους τρόπους. Ένας από αυτούς είναι η αύξηση της κατανάλωσης οξυγόνου. Η μεταφορά του οξυγόνου μειώνεται σαν αποτέλεσμα της αύξησης των αποστάσεων διάχυσης μεταξύ των τριχοειδών και του κέντρου απ' όπου

αυξάνεται η κυτταρική μάζα. Έτσι, η ανάπτυξη του πρώιμου όγκου σε μέγεθος οδηγεί σε ελάττωση της προσφοράς οξυγόνου στα κύτταρα που απέχουν πάνω από τα 150-200μm από τα πλησιέστερα τριχοειδή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη χαμηλή παροχή σε οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο (116). Η περαιτέρω ανάπτυξη του όγκου καθίσταται εφικτή μόνο όταν ανοίξει ο διακόπτης της αγγειογένεσης. Ο αγγειογενετικός διακόπτης (angiogenic switch) είναι "κλειστός", όταν τα προαγγειογενετικά μόρια είναι σε ισορροπία με τα αντιαγγειογενετικά, και είναι "ανοικτός" όταν η ισορροπία ευνοεί την αγγειογένεση (114).



**Εικόνα 9. Η επίδραση της αγγειογένεσης στην ανάπτυξη των όγκων (με τη διαδικασία του αγγειογενετικού διακόπτη) έχει ως συνέπεια την αύξηση του μεγέθους, της αγγείωσης και της αύξησης του μεταναστευτικού δυναμικού του όγκου.**

### **3.2.3 Η κλινική σημασία του VEGF στον καρκίνο του πνεύμονα**

Ο VEGF είναι ένας από τους πιο ισχυρούς παράγοντες που συμμετέχουν στην καρκινογένεση (117). Έκφραση του VEGF αναφέρεται στο

60-95% των ασθενών με ΚΠ (118), ενώ οι συγκεντρώσεις του στον ορό των ασθενών είναι υψηλότερες από αυτές των υγιών μαρτύρων. Ωστόσο, ο VEGF έχει ανιχνευτεί και σε άλλα βιολογικά υλικά όπως πλάσμα, καρκινικός ιστός, πλευριτικό υγρό και BAL ασθενών με ΚΠ (Πίνακας 3). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε βιολογικά υλικά έχουν ανιχνευτεί διάφορες ισομορφές του μορίου του VEGF καθώς και των υποδοχέων του όπως π.χ ο VEGFR-3 και η ισομορφή VEGF-C όπου η έκφραση της σε καρκινικά κύτταρα συσχετίστηκε με τις λεμφαδενικές μεταστάσεις (119).

Στη βιβλιογραφία έχουν παρατηρηθεί συσχετίσεις του VEGF με διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους, σε διάφορα βιολογικά υλικά αναδεικνύοντας την πιθανή προγνωστική του αξία. Έτσι υπάρχουν μελέτες όπου τα επίπεδα του δείκτη στον ορό συσχετίστηκαν με το στάδιο της νόσου, καθώς σε ασθενείς με προχωρημένο στάδιο νόσου ανιχνεύτηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις του VEGF από ότι σε αυτούς με αρχικό στάδιο (120, 121). Αντίθετα, καμία συσχέτιση με το στάδιο νόσου δεν έχει ανευρεθεί σε άλλες μελέτες (122, 123). Επιπρόσθετα, σε πολλές μελέτες έγινε απόπειρα συσχέτισης του VEGF με την έκταση του όγκου (T), τις μεταστάσεις (M) και τη λεμφαδενική διασπορά (N). Έτσι, σε μία ενδιαφέρουσα μελέτη προσδιορίστηκαν τα επίπεδα της έκφρασης του VEGF σε καρκινικό ιστό 91 ασθενών με ΜΜΚΠ διαπιστώνοντας υψηλότερα επίπεδα σε ασθενείς με T3-4 όγκο σε σύγκριση με τους ασθενείς με T1-2 (118). Αντίθετα, άλλη ομάδα ερευνητών διαπίστωσε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του VEGF στον ορό με τον αριθμό των αιμοπεταλίων και των λευκών αιμοσφαιρίων των ασθενών με ΜΜΚΠ, αλλά όχι με το μέγεθος T του όγκου (124). Επιπλέον, σε άλλη μελέτη προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις του VEGF-C στον ορό ασθενών με ΚΠ και διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα σε αυτούς με λεμφαδενικές μεταστάσεις (27, 125). Το αποτέλεσμα αυτό δεν είναι σύμφωνο με άλλες μελέτες, όπου δεν διαπιστώνονται στατιστικά σημαντικές διαφορές των επιπέδων του VEGF σε ασθενείς με λεμφαδενικές μεταστάσεις σε σχέση με αυτούς χωρίς λεμφαδενική συμμετοχή της νόσου (121).

Η προσπάθεια συσχέτισης του VEGF με τον ιστολογικό τύπο, αποτέλεσε εξίσου αντικείμενο πολλών ερευνών. Πρόσφατες μελέτες δεν

ανέδειξαν συσχέτιση του VEGF με τον ιστολογικό τύπο. Σε μία από αυτές διερευνήθηκε η σχέση του VEGF αλλά και του υποδοχέα VEGFR-2 με τον ιστολογικό τύπο, χωρίς όμως να βρεθεί στατιστικά σημαντική διαφορά (126). Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε άλλη μελέτη., σε 40 ασθενείς από τους οποίους 31 με ΜΜΚΠ και 9 με ΜΚΠ, όπου δεν διαπίστωσε στατιστικά σημαντικές διαφορές στις δύο επιμέρους ομάδες (127).

Όσον αφορά τη συσχέτιση με τη βιολογική κατάσταση των ασθενών, από τις πιο πρόσφατες μελέτες διαφαίνεται να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Σε δύο μόνο μελέτες, αναφέρθηκε ότι ασθενείς με ΚΠ και κακή βιολογική κατάσταση ( $PS > 2$ ) είχαν πολύ υψηλότερα επίπεδα VEGF (27, 128). Πρέπει να σημειωθεί επίσης και μία στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων του VEGF με την ηλικία. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκαν υψηλότερα επίπεδα του δείκτη, σε ασθενείς μικρότερους των 65 ετών, ενώ ανάλογο εύρημα παρατηρήθηκε και σε μελέτη σε πειραματικά μοντέλα (129). Επιπλέον, τα επίπεδα του VEGF πριν και μετά τη ΧΜΘ έχουν προσδιοριστεί σε αρκετές μελέτες. Σε κάποιες από αυτές βρέθηκαν ότι τα επίπεδα του VEGF δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά μετά τη ΧΜΘ, αντίθετα σε άλλες οι τιμές του VEGF ήταν μικρότερες μετά τη ΧΜΘ (126, 130).

Επιπρόσθετα, επιχειρήθηκε η ανάδειξη της προβλεπτικής αξίας του δείκτη από αρκετούς μελετητές. Τα ευρήματα είναι αντικρουόμενα καθώς υπάρχουν μελέτες όπου δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων του δείκτη με την ανταπόκριση στη ΧΜΘ (123), ενώ άλλοι μελετητές διαπίστωσαν ανάλογη συσχέτιση (131-133).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει σε πολλές μελέτες, η συσχέτιση του VEGF με την επιβίωση των ασθενών. Οι περισσότερες μελέτες αναδεικνύουν τον VEGF ως έναν δείκτη κακής πρόγνωσης (134, 135). Μάλιστα παλαιότερη μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι ο VEGF αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη (118). Αντίθετα, πιο πρόσφατες μελέτες δεν ανέδειξαν συσχέτιση των επιπέδων του VEGF πριν την θεραπεία με την επιβίωση των ασθενών με ΜΜΚΠ (128).

Όλες οι προαναφερθείσες μελέτες αφορούσαν μετρήσεις σε περιφερικό αίμα ή σε υλικά που συλλέγονται με πιο επεμβατικούς τρόπους. Η ανίχνευση του VEGF στο EBC αποτελεί μία νέα προσέγγιση για την πρώιμη διάγνωση και παρακολούθηση ασθενών με ΚΠ. Σε μία πρόσφατη μελέτη ο Gessner C et al. ανίχνευσε διάφορους αγγειογενετικούς παράγοντες στο EBC μεταξύ των οποίων και τον VEGF. Όλοι οι δείκτες βρέθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα στους ασθενείς με ΚΠ από ότι σε υγιείς μάρτυρες (68). Επίσης, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους και διαπιστώθηκε μείωση των τιμών του VEGF στους ασθενείς μετά από 2 κύκλους ΧΜΘ.

**Πίνακας 3. Ο VEGF στα βιολογικά υλικά ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα**

ΥΛΙΚΟ	ΑΣΘΕΝ.	ΤΥΠΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	ΜΕΛΕΤΗ
Ορός	451	NSCLC	↑VEGF	Chakra D.et al. 2008
	40	31 NS/9 SC	↑ VEGF	Saglam D. et al .2008
	63	39 NS/24 SC	↑ VEGF,OS	Katsabeki A. et al 2008
	80	44 NS/36 SC	↑ VEGF, VEGFR-2	Naumnik W.et al. 2007
	34	SCLC	↑ VEGF, IL-8	Tas F. et al.2006
	52	NSCLC	↑ VEGF,bcl-2	Tas F. et al.2006
	194	NSCLC	↑ VEGF,MMP-9	Laack E. et al. 2005
	23	SCLC	↑ VEGF	Hasegawa Y.et al. 2005
	21	NSCLC	↑ VEGF,bFGF,TP1	Dudek AZ. et al. 2005
	75	NSCLC	↑ VEGF	Kaya A. et al. 2004
	73	NSCLC	↑ VEGF,bFGF	Brattsrom D.et al. 2004
	70	SCLC	↑ VEGF	Mall J. et al. 2002
	40	NSCLC	↑ VEGF,bFGF	Ishimoto I.et al 2002
	58	NSCLC	↑ VEGF,bFGF	Brattsrom D.et al. 2002
	41	NSCLC	↑ VEGF	Choi J.et al. 2001
	49	NSCLC	↑ VEGF	Matsuyama W.etal.2000
	95	70NSCLC/25SCLC	↑ VEGF	Takigawa A.et al 1999

	68	SCLC	↑ VEGF	Salven P.et al.1998
Πλάσμ.	41	NSCLC	↑ VEGF	Ohta Y. et al 2002
	20	NSCLC	↑ VEGF	Kishiro I.et al.2002
	97	NSCLC	↑ VEGF	Tamura M. et al. 2002
BAL	41	NSCLC	↑VEGF	Ohta Y. et al 2002
	102	94 NS/12 SC	↑VEGF	Beinert T.et al. 2000
	60	NSCLC	↑VEGF	Beinert T.et al. 1999
Πλ.Υγ.	20	NSCLC	↑ VEGF	Kaya A.et al. 2005
	15	NSCLC	↑ VEGF,TNF-α	Hamed EA et al. 2004
	38	NSCLC	↑ VEGF,TNF-α	Momi H.et al. 2002
	40	NSCLC	↑ VEGF,bFGF	Ishimoto I.et al 2002
	94	NSCLC	↑ VEGF	Beinert T.et al. 2001
	60	NSCLC	↑ VEGF	Yanagawa H.et al.1999
EBC	17	NSCLC	↑VEGF,IL-8,b-FGF	Gessner C.et al. 2009
Ιστός	96	NSCLC	↑Έκφραση ↑ VEGF	WangL. et al. 2005
	27	NSCLC	↑Έκφραση mRNA VEGF	Merrick D. Et al. 2005
	129	NSCLC	↑ VEGF-C και VEGFR-3	Kojima H.et al. 2005
	91	NSCLC	↑ VEGF	Imoto A. et al.1998

### 3.3 8-ΙΣΟΠΡΟΣΤΑΝΙΟ

#### 3.3.1 Δομή και λειτουργία

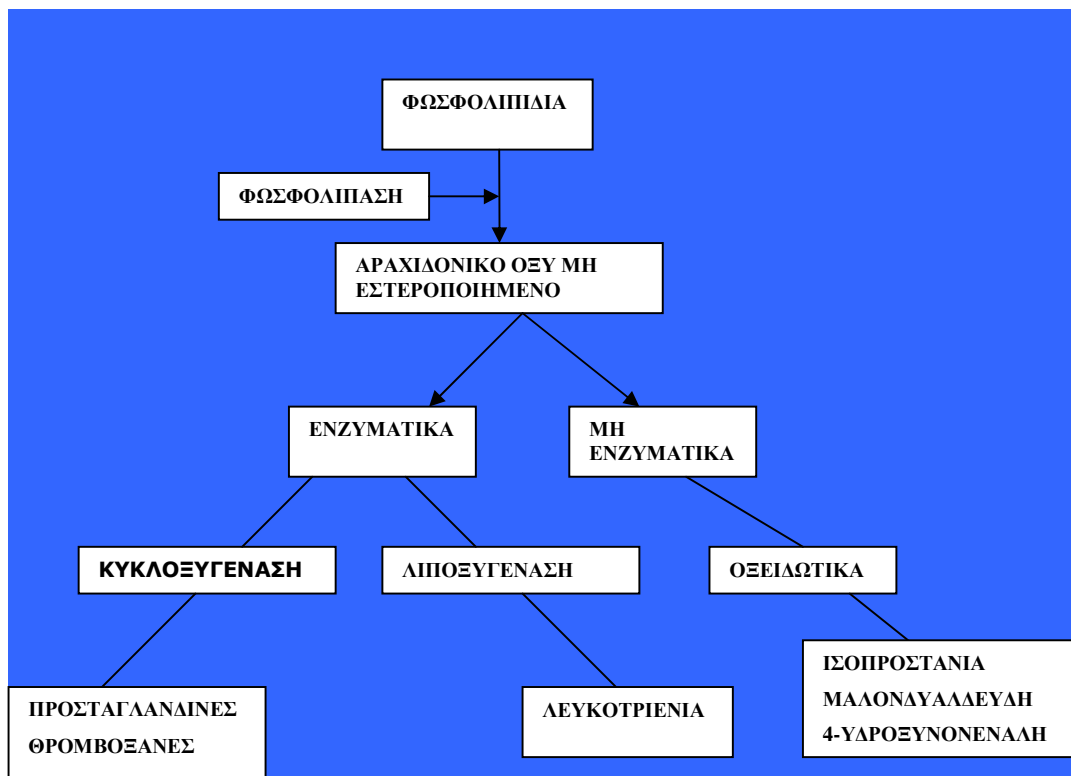
Το ΟΣ είναι η σοβαρή διαταραχή ισοζυγίου μεταξύ ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών παραγώγων. Τέτοιες ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) περιλαμβάνουν όχι μόνο τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου, όπως τη ρίζα του υδροξυλίου ( $\text{HO}^\cdot$ ) και τη ρίζα του υπεροξειδίου ( $\text{O}_2^\cdot-$ ), αλλά και άλλες οντότητες χωρίς αζευγάρωτα ηλεκτρόνια, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) και τη μονή ρίζα του οξυγόνου  $^1\text{O}_2^\cdot$ . Όλες οι ROS έχουν κοινή ικανότητα να αποσπούν ένα ηλεκτρόνιο από ένα μόριο-στόχο και αυτό χημικά ονομάζεται οξείδωση.

Επομένως, οι ROS δρουν ως οξειδωτικά, αποτελώντας επικίνδυνους παράγοντες, εναντίον των οποίων δρα το αμυντικό σύστημα. Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει ένζυμα, βιταμίνες, μικροστοιχεία κ.ά. Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικού και αντιοξειδωτικού συστήματος καταλήγει σε μια σειρά λειτουργικών και δομικών κυτταρικών αλλαγών, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή νέκρωση.

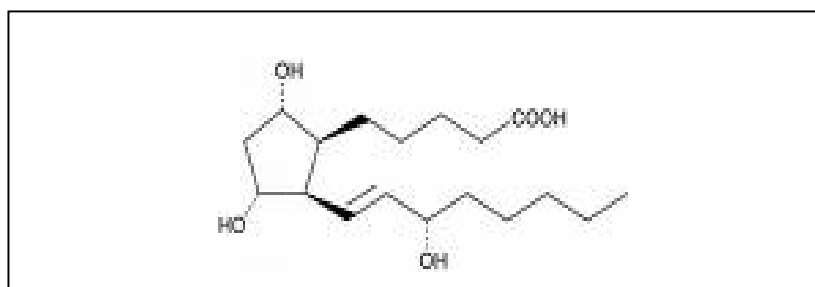
Οι ROS μπορούν να οξειδώσουν όλα τα οργανικά μόρια, όπως υδατάνθρακες, λιπίδια, αμινοξέα, πρωτεΐνες, νουκλεοτίδια και άλλα, προκαλώντας μια σειρά βιοχημικών αλλαγών, υπεύθυνων για τις βλάβες του οξειδωτικού stress που συμβαίνουν συνεχώς κατά τη διάρκεια της ζωής. Η επίδραση των ελεύθερων ριζών ειδικότερα στα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών έχει ως συνέπεια την παραγωγή των ισοπροστανίων.

Τα ισοπροστανία ή εικοσανοειδή είναι ενώσεις ανάλογες με τις προσταγλανδίνες, που παράγονται *in vivo* από την υπεροξειδωση του αραχιδονικού οξέος που καταλύεται από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου κυρίως μη ενζυμικά (136) (Εικόνα 10). Η παραγωγή τους, γίνεται *in situ* στα φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης από τα οποία διαχωρίζονται με τη δράση της φωσφολιπάσης  $A_2$ .

Λόγω της σταθερότητάς τους, της ειδικότητάς τους για την υπεροξειδωση των λιπών, της παραγωγής τους *in vivo* και της σχετικής τους αφθονίας στα βιολογικά υγρά, οι ουσίες αυτές αποτελούν άριστους δείκτες ΟΣ (137). Η πιο γνωστή ένωση της κατηγορίας των ισοπροστανίων είναι το 8-ισοπροστανίο, που αποτελεί και το κύριο μέλος της οικογένειας των εικοσανοειδών κι έχει ισχυρή βιολογική δράση (Εικόνα 11) (136).



**Εικόνα 10. Παραγωγή των ισοπροστανίων υπό την επίδραση των οξειδωτικών στοιχείων στα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών.**



**Εικόνα 11. Δομή του 8-ισοπροστανίου**



### 3.3.2 Ο ρόλος του 8-ισοπροστανίου στην καρκινογένεση

Τα προϊόντα του οξειδωτικού stress, όπως το 8-ισοπροστανίο, λόγω του υψηλού οξειδοαναγωγικού τους δυναμικού έχουν την ικανότητα να τροποποιούν τη δομή των πρωτεϊνών, λιπιδίων και του DNA (138, 139). Τα λιπίδια τα οποία αποτελούν συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών είναι ευαίσθητα στο οξειδωτικό stress. Η υπεροξειδωση των λιπών είναι μία αλυσιδωτή αντίδραση στην οποία πολυακόρεστα λιπαρά οξέα διασπώνται σε μικρότερες ενώσεις πιο δραστικές όπως διένια, υδροπεροξειδία και θιοβαρβιτουρικά οξέα (TBARS). Τα προϊόντα της υπεροξειδωσης των λιπών μπορούν να διαδραματίζουν δραστηριότητα ελεύθερων ριζών προκαλώντας αλλοιώσεις των κυτταρικών μεμβρανών (140).

Η καρκινογένεση φαίνεται να είναι συνδεδεμένη με την παραγωγή προϊόντων υπεροξειδωσης των λιπών και ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Το ΟΣ φαίνεται να επιδρά τόσο στην αρχή της καρκινογένεσης συμβάλλοντας στην έναρξη γενετικών δομικών αλλαγών όσο και στην ανώμαλη γονιδιακή έκφραση που έχει ως συνέπεια τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό (141). Επιπλέον, το ΟΣ προκαλεί γενετικές αλλαγές στα κύτταρα συμβάλλοντας με το τρόπο αυτό σε μεταστάσεις και ανθεκτικότητα του όγκου στη ΧΜΘ. Οι υψηλές τιμές ΟΣ προκαλούν ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού συστήματος με αποτέλεσμα το παραγόμενο κατά τη ΧΜΘ οξειδωτικό stress να μην επαρκεί για την απόπτωση (141).

Πράγματι, οι ROS είναι γνωστοί παράγοντες μεταλλάξεων και μπορούν να προκαλέσουν γονοτυπικές και φαινοτυπικές αλλαγές που αργότερα οδηγούν σε κακοήθειες (142). Ετσι, το ΟΣ προάγει την απόπτωση και τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό επάγοντας τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-κβ και AP-1 και αναστέλλοντας τους μεταγραφικούς παράγοντες bcl-2 και p53(143). Ο μεταγραφικός παράγοντας AP-1 αποτελεί σύμπλεγμα πρωτεϊνών (πρωτοογκογονίδια), οι οποίες επάγονται από τα υψηλά επίπεδα ΟΣ. Επίσης, το ΟΣ διαταράσσει την ομαλή λειτουργία των συστημάτων μεταγωγής σήματος, μέσω της οξειδωτικής βλάβης της

κυτταρικής μεμβράνης (λιπιδική υπεροξειδωση) και την διαταραχή της ενζυματικής δραστηριότητας (οξειδωση πρωτεϊνών) (141). .

Σημαντικός είναι και ο ρόλος του ΟΣ στην αγγειογένεση, κυρίως μέσω της επαγωγής αγγειογενετικών παραγόντων. Οι ROS που δημιουργούνται από τα καρκινικά κύτταρα κατά πολλούς μελετητές προκαλούν αλλοιώσεις στο τοίχωμα των αγγείων προάγοντας τον σχηματισμό μεταστάσεων (144-146). Η υποξία έχει βρεθεί ότι αποτελεί το κύριο παράγοντα ενεργοποίησης (*in vivo* και *in vitro*) του VEGF μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών (147). Είναι γνωστό ότι το ΟΣ προκαλεί μεταλλάξεις σε διαφορά γονίδια τα οποία προάγουν την καρκινογένεση μέσω διαφόρων μονοπατιών. Ενεργοποίηση του ογκογονιδίου *ras* (K-*ras*) για παράδειγμα, έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης του παράγοντα VEGF και αναστολή της έκφρασης του αναστολέα της αγγειογένεσης θρομβοσποντίνης (TSP1)(148). Παρόμοια, μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 επιτρέπουν στα καρκινικά κύτταρα να επάγουν την αγγειογένεση. Έτσι, η απουσία ή μετάλλαξη του γονιδίου του p53 επαγόμενη από τα υψηλά επιπέδα ΟΣ διαταράσσει την ισορροπία μεταξύ αναστολέων και διεγερτών της αγγειογένεσης με αποτέλεσμα την αυξημένη αγγείωση των όγκων (149, 150).

### **3.3.3 Η κλινική σημασία του 8-ισοπροστανίου στον καρκίνο του πνεύμονα**

Τα ισοπροστανία είναι ενώσεις που παράγονται από την υπεροξειδωση των λιπιδίων και συγκεκριμένα του αραχιδονικού οξέος που καταλύεται από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Μή ενζυμικά, από την ίδια βιολογική διαδικασία παράγεται η μαλονδιαλδεύδη, τα TRAPS και τα TBARS (151). Στον ΚΠ τα προϊόντα υπεροξειδωσης των λιπιδίων έχουν προσδιοριστεί στο πλάσμα, στον ορό, στον εκπνεόμενο αέρα, στο BAL και σε καρκινικό ιστό (Πίνακας 4).

**Πίνακας 4. Προϊόντα της υπεροξειδωσης των λιπιδίων στα βιολογικά υλικά ασθενών με ΚΠ.**

ΥΛΙΚΟ	ΑΣΘΕΝΕΙΣ	ΤΥΠΟΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	ΜΕΛΕΤΗ
Ορός	16	SCLC	TRAPS	Crohns M. et al. 2009
	57	NSCLC	↑TBARS	Mahdavi R.et al.2009
	39	NSCLC	↑MDA	Caliskan C. et al.2008
	49	NSCLC	↑MDA	Esme H.et al 2008
	63	39NSCLC/24SCLC	↑OS	Katsabeki A. et al. 2008
	37	SCLC	↑TBARS	Nowak D.et al. 2006
	38	26NSCLC/12SCLC	↑OS	Gencer C.et al. 2006
	32	NSCLC	↑ OS	La Torre F. et al. 1997
Πλάσμα	50	NSCLC	↑Λιπαρά οξέα	De Castro J.et al. 2006
	-	NSCLC/SCLC	↑MDA	Kaynar H.et.al. 2005
	9	NSCLC	↓TRAPS	Erhola M.et al 1997
	12	NSCLC	↑TBARS	LookMP et al. 1994
BAL	36	NSCLC	↑TBARS	Crohns M.et al. 2009
	94	82NSCLC/12SCLC	↑ OS	Beinert T.et al 2000
EBC	21	NSCLC	↑H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , ↓Αντιοξειδωτική ικανότητα, ↓pH	Chan HP.et al. 2009
	11	NSCLC	↑TBARS, πεντάνιο	Crohns M.et al. 2009
	87	NSCLC	↑αλκάνες	Phillips M.et al. 2003
Ιστός	29	NSCLC	↑MDA	Look MPet al.2008
	32	NSCLC	↑προϊόντα λιπιδικής υπεροξειδωσης	Zieba M.et al. 2001
	42	NSCLC/SCLC	↑TBARS	Zieba M. et al. 2000

Έτσι, τα προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης μαλονδιαλδεύδης (MDA) βρεθήκαν σημαντικά αυξημένα στο πλάσμα ασθενών με ΚΠ και συσχετίστηκαν με χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων (152-154). Επιπλέον, σε άλλη μελέτη προσδιορίστηκε το ΟΣ, μέσω των προϊόντων οξειδωτικής βλάβης των ερυθροκυττάρων και των αιμοπεταλίων (οξειδωτική βλάβη των πρωτεϊνών και των λιπιδίων τους) στο πλάσμα 50 ασθενών με ΜΜΚΠ. Οι ασθενείς είχαν αυξημένα επίπεδα των δεικτών αυτών αξιολόγησης του ΟΣ (155). Σημαντικές αναφορές σχετικά με τα επίπεδα των προϊόντων της λιπιδικής υπεροξειδωσης έχουμε και στον ορό ασθενών με ΚΠ. Συγκεκριμένα, υπάρχουν τελευταίες μελέτες που αναφέρουν αύξηση των επιπέδων του ΟΣ πριν από τη θεραπεία σε ασθενείς τόσο με ΜΜΚΠ όσο και με ΜΚΠ (27, 156-159).

Επιπρόσθετα, έχουν γίνει μελέτες που αναφέρουν συσχετίσεις των προϊόντων της λιπιδικής υπεροξειδωσης με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους με σκοπό την ανάδειξη της προγνωστικής του αξίας. Έτσι, σε μία πρόσφατη μελέτη παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων της μαλονδιαλδεύδης σε 49 ασθενείς με προχωρημένο στάδιο νόσου, ενώ σε μία παλαιότερη μελέτη βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων του ΟΣ με το κλινικό στάδιο της νόσου (17, 160). Τέλος, μόνο σε δυο μελέτες το ΟΣ προσδιορίστηκε στον ορό ασθενών με ΚΠ ως το συνολικό επίπεδο υπεροξειδίων (ενδιάμεσα προϊόντα οξειδωσης των λιπιδίων). Σε καμία από τις μελέτες αυτές δεν εκτιμήθηκε η πιθανή επίδραση του ΟΣ στην επιβίωση των ασθενών και η σχέση του με τις διαφορές κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους (159, 161).

Αξίζει να σημειωθεί η επίδραση των χημειοθεραπευτικών παραγόντων στις συγκεντρώσεις του ΟΣ σε ασθενείς με ΚΠ, καθώς έχει διαπιστωθεί ότι πολλές από τις χημειοθεραπευτικές ουσίες δρουν ενάντια στα καρκινικά κύτταρα μέσω των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (154). Έχει διαπιστωθεί σε ασθενείς με ΚΠ, ότι ορισμένα κυτταροτοξικά φάρμακα αυξάνουν τα προϊόντα της υπεροξειδωσης των λιπών (157). Επίσης, πρόσφατη μελέτη προσδιόρισε τις τιμές του ΟΣ πριν και μετά από ΧΜΘ σε ασθενείς με ΜΜΚΠ και βρήκε συσχέτιση του ΟΣ με την ανταπόκριση στη ΧΜΘ. Το ΟΣ προσδιορίστηκε ως

οξειδωτική μιτοχονδριακή βλάβη στον καρκινικό ιστό με PCR. Οι ασθενείς που ανταποκριθήκαν στη ΧΜΘ είχαν αυξημένα επίπεδα ΟΣ. Αυξημένες τιμές ΟΣ προσδιορίστηκαν και στον ορό ασθενών με συμπαγείς όγκους, μεταξύ των οποίων και ασθενείς με ΜΜΚΠ μετά από ΧΜΘ (161). Επίσης, αυξημένες τιμές ΟΣ βρέθηκαν και στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ασθενών με ΚΠ μετά από ΧΜΘ (162). Σε καμία όμως από τις 2 αυτές μελέτες δεν βρέθηκε συσχέτιση του ΟΣ με την ανταπόκριση στη ΧΜΘ. Έτσι, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία η θεραπεία αυξάνει την παραγωγή ΟΣ, η δυνατότητα όμως το ΟΣ να χρησιμοποιηθεί ως μελλοντικός δείκτης πρόβλεψης της ανταπόκρισης στη θεραπεία βρίσκεται ακόμη σε πρώιμο ερευνητικό στάδιο.

Ωστόσο, απαντήσεις σχετικά με την διαγνωστική και προγνωστική αξία των προϊόντων υπεροξειδωσης των λιπών θα μπορούσαν να δοθούν με την ανίχνευσή τους και στο EBC. Μέχρι σήμερα, προϊόντα του οξειδωτικού stress, όπως το 8-ισοπροστανίνο έχουν μετρηθεί κυρίως στο συμπύκνωμα εκπνεόμενου αέρα ασθενών με άσθμα, κυστική ίνωση, σαρκοειδωση, χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια κ.ά. (163-166). Από το 2005 ο Horvath et al. συνέστησαν τη χρήση του EBC για τη μέτρηση βιολογικών δεικτών, μεταξύ των οποίων και τα προϊόντα ΟΣ για τη μελέτη του ΚΠ (48). Έτσι σε μία μεταγενέστερη μελέτη διαπιστώθηκε η μείωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ασθενείς με ΚΠ που υποβάλλονται σε ΧΜΘ (65). Τέλος, σε μία πρόσφατη μελέτη αναδεικνύεται η διαγνωστική αξία του οξειδωτικού στρες στο EBC, καθώς βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα του υπεροξειδίου του υδρογόνου στους ασθενείς με ΚΠ σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες, χωρίς όμως να βρεθεί ανάλογη διαφορά και για το 8-ισοπροστανίνο (66).

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

---

## 4 ΥΛΙΚΟ

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 60 ασθενείς με πρωτοπαθή ΚΠ οι οποίοι διαγνώστηκαν στην Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας στο διάστημα Ιανουάριος 2006-Μάιος 2007. Οι ασθενείς ήταν 55 άνδρες και 5 γυναίκες, μέσης ηλικίας  $62.73 \pm 0.86$  έτη, (40-81 ετών), 25 καπνιστές, 9 μή καπνιστές, 26 πρώην καπνιστές σε καλή βιολογική κατάσταση ECOG PS=0,1. Ο ιστολογικός τύπος των ασθενών πριν από οποιαδήποτε θεραπεία ήταν 43 με ΜΜΚΠ και 17 με ΜΚΠ. Σύμφωνα με την TNM σταδιοποίηση οι ασθενείς με ΜΜΚΠ ήταν : 2 IA, 12 IB, 4 IIB, 3 IIIA, 9 IIIB και 13 IV ενώ οι ασθενείς με ΜΚΠ ήταν 1 IB, 2 IIIA, 5 IIIB και 9 IV. Ο ιστολογικός τύπος των ασθενών με ΜΜΚΠ ήταν: 19 αδενοκαρκίνωμα και 24 πλακώδες (Πίνακας 4).

Με βάση την σταδιοποίηση της νόσου ακολούθησε η θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών που περιελάμβανε χειρουργική αφαίρεση του όγκου, ΧΜΘ ή και ΑΚΘ. Οι 16 ασθενείς υποβλήθηκαν σε χειρουργείο, ενώ 39 ασθενείς έλαβαν ΧΜΘ. Ο μέσος όρος της ΧΜΘ που χορηγήθηκε ήταν 4 κύκλοι και αποτελούνταν από χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς με βάση την πλατίνα. Η ανταπόκριση στη θεραπεία εκτιμήθηκε με βάση τα κριτήρια της WHO. Ακολούθησε τακτική παρακολούθηση των ασθενών με τον απαραίτητο κάθε φορά κλινικοεργαστηριακό και απεικονιστικό έλεγχο.

Η ομάδα των 30 υγιών μαρτύρων περιελάμβανε 22 άνδρες και 8 γυναίκες, μέσης ηλικίας  $60.43 \pm 0.94$  έτη, χωρίς ιστορικό χρόνιας αποφρακτικής νόσου ή άλλης πάθησης του αναπνευστικού. Από τους υγιείς μάρτυρες αξίζει να σημειωθεί ότι 8 άτομα ήταν καπνιστές, 10 μή καπνιστές και 12 πρώην καπνιστές. Ασθενείς και υγιείς μάρτυρες με πρόσφατη ή σύγχρονη με τις μετρήσεις λοίμωξη αποκλείονταν από τη μελέτη.

Όλοι οι ασθενείς πριν από οποιαδήποτε θεραπεία και οι υγιείς μάρτυρες υποβάλλονταν σε λήψη δείγματος αίματος και στη διαδικασία λήψης του EBC. Τα ίδια υλικά συγκεντρώνονταν και μετά την ολοκλήρωση της χημειοθεραπείας στους 39 ασθενείς. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών αυτών ήταν τα ακόλουθα: 25 ασθενείς με ΜΜΚΠ, από τους οποίους 11 με αδενοκαρκίνωμα, 14 με πλακώδες. Όσον αφορά το στάδιο της νόσου: 2

ασθενείς ήταν σταδίου I, 2 ασθενείς σταδίου II, 10 ασθενείς σταδίου III και 11 ασθενείς σταδίου IV. Επίσης, έλαβαν μέρος 14 ασθενείς με ΜΚΠ: 6 ασθενείς σταδίου III και 8 ασθενείς σταδίου IV. (Πίνακας 5).

**Πίνακας 5. Τα κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά του συνόλου των ασθενών με πρωτοπαθή ΚΠ, που έλαβε μέρος στην μελέτη καθώς και της υποομάδας των ασθενών που συμπεριλήφθηκαν και μετά τη ΧΜΘ**

	<b>Σύνολο ασθενών TNF-α, VEGF,8-ισοπροστάσιο</b>	<b>Υποομάδα ασθενών (πριν και μετά τη ΧΜΘ) TNF-α, VEGF,8-ισοπροστάσιο</b>
Σύνολο	n=60	n=39
Ηλικία (έτη)	62.73 ± 0.86	63.23± 1.38
Φύλο(άνδρας/γυναίκα)	55/5	36/3
Ασθενείς με ΜΜΚΠ	43	25
Αδενοκαρκίνωμα	19	11
Πλακώδες	24	14
Στάδιο ΜΜΚΠ	14 ασθενείς σταδίου I 4 ασθενείς σταδίου II 12 ασθενείς σταδίου III 13 ασθενείς σταδίου IV	2 ασθενής σταδίου I 2 ασθενείς σταδίου II 10 ασθενείς σταδίου III 11 ασθενείς σταδίου IV
Ασθενείς με ΜΚΠ	17	14
Στάδιο ΜΚΠ	1 ασθενής σταδίου I 0 ασθενείς σταδίου II 7 ασθενείς σταδίου III 9 ασθενείς σταδίου IV	0 ασθενής σταδίου I 0 ασθενής σταδίου II 6 ασθενείς σταδίου III 8 ασθενείς σταδίου IV



## **5 ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **5.1 Τεχνική συλλογής EBC**

Η λήψη του EBC πραγματοποιήθηκε μέσω μίας συσκευής (Ecoscreen, Jaeger, Germany) που επιτρέπει τη μη επεμβατική συλλογή των μη πτητικών μορίων του εκπνεόμενου αέρα. Ο συμπυκνωτής παράγει ψυχρό αέρα σε θερμοκρασία από  $-15^{\circ}\text{C}$  έως  $-18^{\circ}\text{C}$  με ροή 80 λίτρων ανά λεπτό. Ο εξεταζόμενος ξέπλενε καλά το στόμα του με νερό πριν υποβληθεί στην δοκιμασία. Κατόπιν ανέπνεε ήρεμα και σταθερά μέσα σε ένα επιστόμιο για 10-15 λεπτά με τη μύτη του κλειστή με ένα ρινικό πίεστρο. Στο επιστόμιο υπάρχει μία βαλβίδα διπλής κατεύθυνσης με την οποία επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός της εισπνοής από την εκπνοή.

Η συλλογή του συμπυκνώματος έγινε σε ένα σωλήνα διπλού αυλού μήκους 30 εκατοστών. Το ένα στόμιο του εξωτερικού αυλού συνδέθηκε με το σημείο εξόδου του ψυχρού αέρα. Το EBC συλλέχθηκε σε ειδική διάταξη που βρισκόταν στο αντίθετο από τον ασθενή άκρο. Με τη διαδικασία αυτή επιδιώχθηκε η συλλογή 1-1.5 ml EBC το οποίο ψύχθηκε άμεσα στους  $-80^{\circ}\text{C}$  σε σωληνάρια erpendorf.

### **5.2 Αναπαραγωγικότητα των μετρήσεων στο EBC**

Η αναπαραγωγικότητα των μετρήσεων των βιοχημικών δεικτών στο EBC ελέγχθηκε σε δείγματα EBC που συλλέχθηκαν σε δύο διαδοχικές ημέρες σε ένα σύνολο 12 ατόμων, 8 εκ των οποίων ήταν ασθενείς και 4 υγιείς μάρτυρες. Όλοι τα άτομα που υποβλήθηκαν στη διαδικασία συλλογής του EBC βρίσκονταν σε σταθερή βιολογική κατάσταση. Η συλλογή πραγματοποιήθηκε μεταξύ 8:00 και 9:00 το πρωί. Για την εκτίμηση της αναπαραγωγικότητας χρησιμοποιήθηκε στατιστική μέθοδος που έχει περιγραφεί στην βιβλιογραφία από τους Bland and Altman (167).

### 5.3 Προσδιορισμός των βιοχημικών δεικτών στο EBC και στον ορό

Τα δείγματα του ορού μετά τη φλεβοκέντηση φυγοκεντρήθηκαν άμεσα στις 2000 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά, στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια erpendorf και αποθηκεύτηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Οι συγκεντρώσεις του TNF- $\alpha$  προσδιορίστηκαν με βάση τις αρχές πρωτοκόλλου του εμπορικού kit της Biosource Europe S.A και το κατώτερο σημείο ανίχνευσης του δείκτη στο EBC ήταν 1,540 pg/mL ενώ στον ορό ήταν 4,630 pg/mL. Ομοίως, οι συγκεντρώσεις του VEGF προσδιορίστηκαν με εμπορικά διαθέσιμα kits ( VEGF: R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) και σύμφωνα με τις αρχές του πρωτοκόλλου της κατασκευάστριας εταιρείας. Το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης στο EBC ήταν 1,573 pg/mL ενώ στον ορό ήταν 94,8 pg/mL. Τα επίπεδα του 8-ισοπροστανίου μετρήθηκαν σύμφωνα με τις αρχές του εμπορικού kit Cayman, Chemical (Ann Arbor , MI,USA) και το κατώτερο όριο ανίχνευσης στο EBC ήταν 1,623 pg/mL ενώ στον ορό ήταν 3,743 pg/mL.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του παραπάνω δεικτών τόσο στο EBC όσο και στον ορό επιτεύχθηκε με την χρήση της ανοσοπροσροφητικής ανάλυσης στερεάς φάσεως με σύνδεση ενζύμου (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assays, ELISA). Στη μέθοδο ELISA ένα άγνωστο ποσό αντιγόνου επισυνάπτεται σε μια επιφάνεια, και έπειτα ένα συγκεκριμένο αντίσωμα πλένεται πέρα από την επιφάνεια έτσι ώστε να μπορεί να δεσμεύσει το αντιγόνο. Αυτό το αντίσωμα συνδέεται με ένα ένζυμο, και στο τελικό βήμα προστίθεται μια ουσία που το ένζυμο μπορεί να μετατρέψει σε κάποιο ανιχνεύσιμο σήμα. Κατά συνέπεια στην περίπτωση του φθορισμού ELISA, κατά την εκπομπή του φωτός επάνω στο δείγμα, οποιαδήποτε σύμπλοκα αντιγόνων/αντισωμάτων θα φθορίσουν έτσι ώστε το ποσό αντιγόνου στο δείγμα να μπορεί να μετρηθεί.

### 5.4 Στατιστική ανάλυση

Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος GraphPad-Prism (έκδοση 5.0). Ελέγχθηκε η κατανομή των

μετρήσεων και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως τιμές της διαμέσου με τις ελάχιστες και μέγιστες τιμές median (min, max), εκτός εάν έχουν χρησιμοποιηθεί άλλες μεταβλητές οι οποίες και αναφέρονται. Για τη σύγκριση τιμών της ίδιας ποσοτικής παραμέτρου σε δύο ανεξάρτητες ομάδες, χρησιμοποιήθηκε η κατά ζεύγη ανάλυση (Unpaired t-test) στην περίπτωση κανονικής κατανομής, ενώ στην περίπτωση μη κανονικής κατανομής εφαρμόστηκε η διαδικασία Mann-Whitney U test. Ο βαθμός συσχέτισης μεταξύ δύο μεταβλητών εκτιμήθηκε με βάση τον συντελεστή συσχέτισης κατά Pearson (κανονική κατανομή τιμών) ή κατά Spearman (μη κανονική κατανομή τιμών). Ορίστηκαν οι καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier και η σύγκρισή τους έγινε με Log-rank test. Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι τιμές του  $p < 0.05$ .

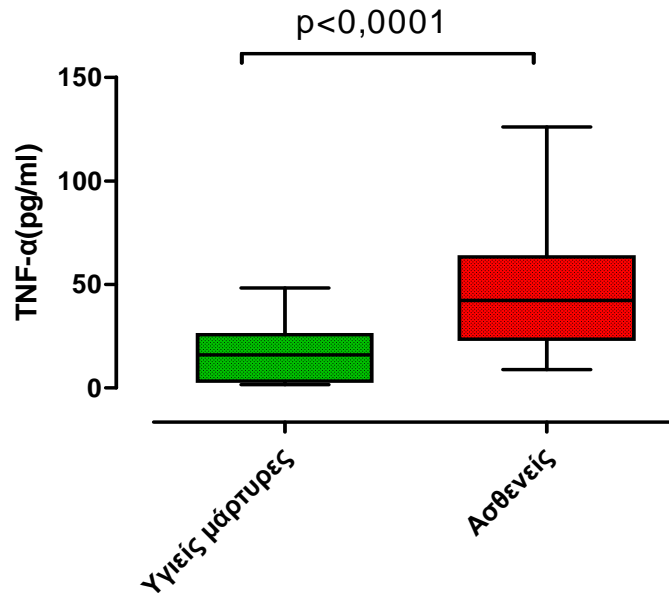
## 6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην μελέτη μας προσδιορίστηκαν τα επίπεδα του TNF- $\alpha$ , του VEGF και του 8-ισοπροστανίου στο EBC και στον ορό 60 ασθενών με πρωτοπαθή ΚΠ πριν από οποιαδήποτε θεραπεία. Οι τρεις βιολογικοί δείκτες ανιχνεύτηκαν τόσο στο EBC όσο και στον ορό πριν και μετά την ολοκλήρωση της ΧΜΘ και αξιολογήθηκε κατά πόσο τα επίπεδά τους επηρεάστηκαν από αυτήν. Οι τιμές τους συσχετίστηκαν με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους, με την ανταπόκριση στη θεραπεία και με τη συνολική επιβίωση των ασθενών. Επιπλέον, επιχειρήθηκε να γίνει συσχέτιση των δεικτών στα δύο επιμέρους βιολογικά υλικά.

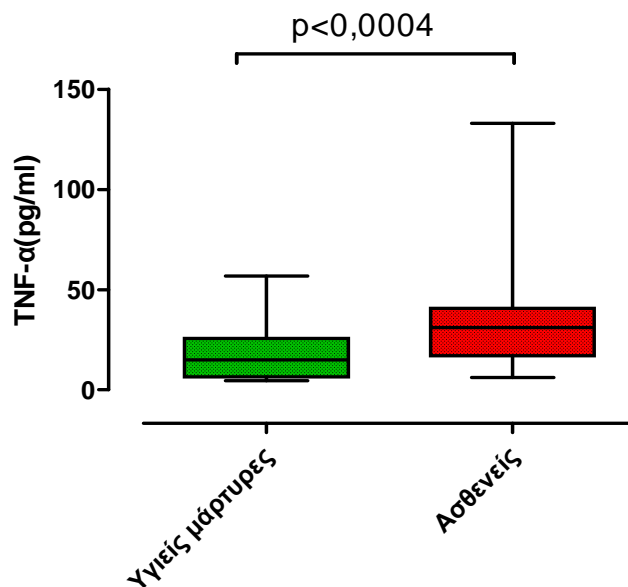
### 6.1 Οι τιμές του TNF- $\alpha$ στο EBC και στον ορό

Τα επίπεδα του TNF- $\alpha$  κατά τη διάγνωση ήταν αυξημένα στο EBC ασθενών με ΚΠ σε σχέση με αυτά των υγιών μαρτύρων (42.1 (8.776, 126.0) vs 15.90 (1.540, 48.20),  $p < 0.0001$ ) (Εικόνα 12). Σημαντικά αυξημένες ήταν και οι τιμές του TNF- $\alpha$  στον ορό ασθενών με ΚΠ έναντι των υγιών μαρτύρων (31.05 (6.235, 133.0) vs 14.89 (4.630, 56.90),  $p < 0.0004$ ) (Εικόνα 13). Δεν

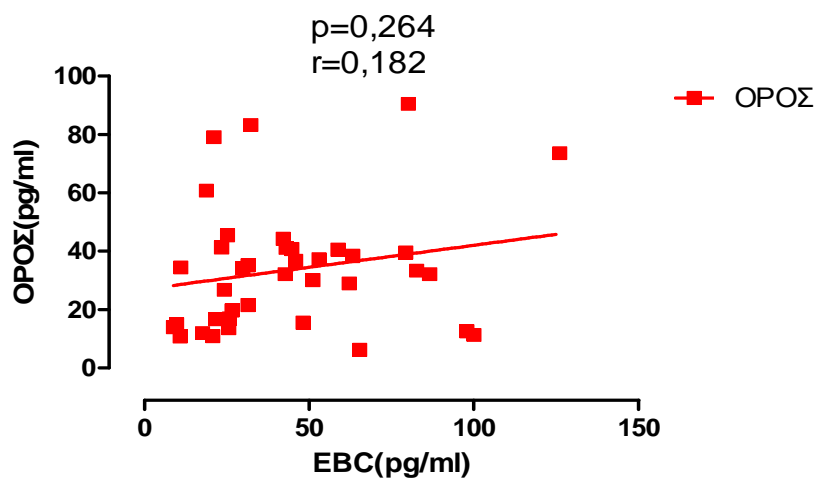
παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των τιμών του TNF-α στα δύο βιολογικά υλικά ( $p=0.264$ ,  $r=0.182$ ) (Εικόνα 14).



**Εικόνα 12.** Οι τιμές του TNF-α στο EBC ασθενών με ΚΠ σε σχέση με αυτές των υγιών μαρτύρων. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του TNF-α στο EBC ασθενών με ΚΠ σε σχέση με αυτά των υγιών μαρτύρων  $p < 0,0001$ .



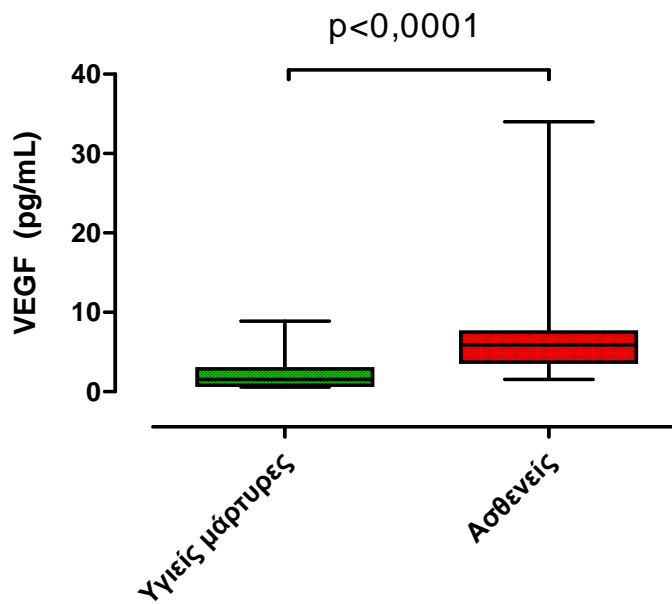
**Εικόνα 13.** Οι τιμές του TNF-α στον ορό ασθενών με ΚΠ σε σχέση με αυτές των υγιών μαρτύρων. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του TNF-α στον ορό των ασθενών με ΚΠ σε σχέση με αυτά των υγιών μαρτύρων  $p < 0,0004$ .



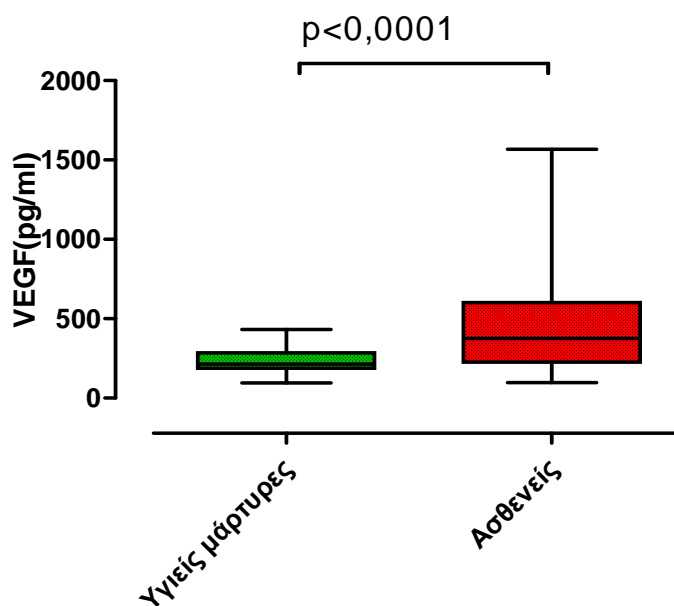
**Εικόνα 14. Συσχέτιση μεταξύ των τιμών του TNF-α στα δύο βιολογικά υλικά. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του TNF-α στα δύο βιολογικά υλικά ( $p=0.264$ ,  $r=0.182$ )**

## 6.2 Οι τιμές του VEGF στο EBC και στον ορό

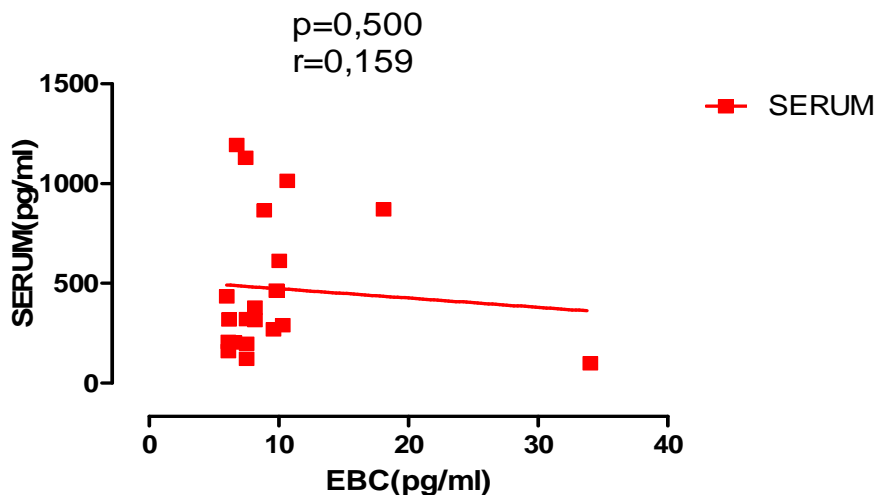
Οι τιμές του VEGF στο EBC κατά τη διάγνωση ήταν αυξημένες στους ασθενείς με ΚΠ σε σχέση με αυτές των υγιών μαρτύρων (5.895 (1.573, 34.03) vs 1.573 (0.590, 8.878)  $p<0.0001$ ) (Εικόνα 15). Επιπλέον, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα του VEGF στον ορό των ασθενών σε σχέση με αυτά των υγιών μαρτύρων (374.8 (97.0, 1568.0) vs 213.7 (94.8, 433.1)  $p<0.0001$ ) (Εικόνα 16). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των τιμών του VEGF στα δύο βιολογικά υλικά ( $p=0.500$ ,  $r=0.159$ ) (Εικόνα 17).



**Εικόνα 15. Οι τιμές του VEGF στο EBC ασθενών με ΚΠ σε σχέση με αυτές των υγιών μαρτύρων. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του VEGF στο EBC ασθενών με ΚΠ σε σχέση με αυτά των υγιών μαρτύρων  $p < 0,0001$ .**



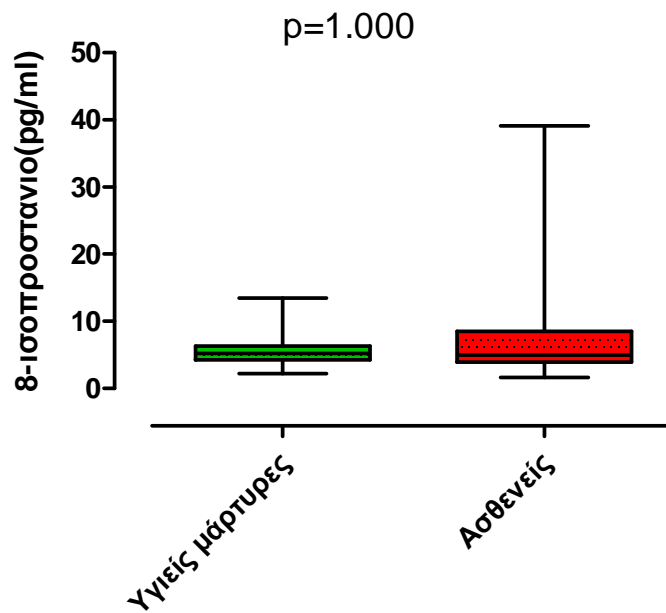
**Εικόνα 16. Οι τιμές του VEGF στον ορό ασθενών με ΚΠ σε σχέση με αυτές των υγιών μαρτύρων. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του VEGF στον ορό των ασθενών με ΚΠ σε σχέση με αυτά των υγιών μαρτύρων  $p < 0,0001$ .**



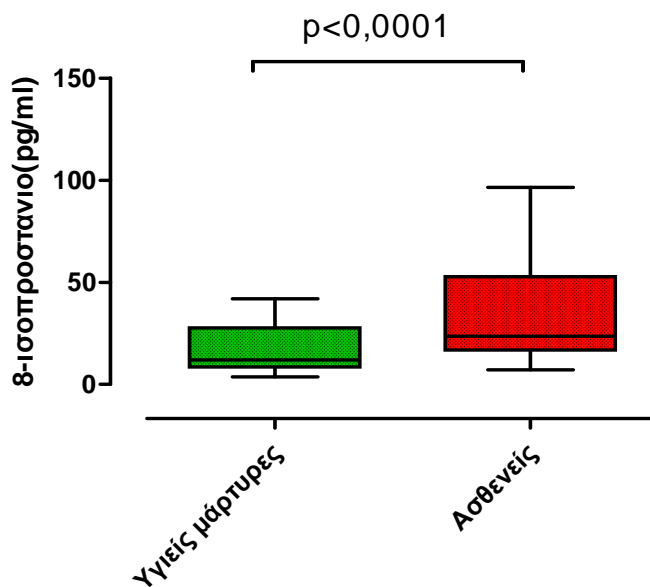
**Εικόνα 17. Συσχέτιση μεταξύ των τιμών του VEGF στα δύο βιολογικά υλικά. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του VEGF στα δύο βιολογικά υλικά (  $p=0.500$ ,  $r=0.159$  )**

### **6.3 Οι τιμές του 8-ισοπροστανίου στο EBC και στον ορό**

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών του 8-ισοπροστανίου στο EBC των ασθενών και σε αυτές των υγιών μαρτύρων (4.993 (2.224, 13.47) vs 4.993 (1.623, 39.10)  $p=1.00$ ) (Εικόνα 18). Αντίθετα, σημαντικά αυξημένες ήταν και οι τιμές του στον ορό των ασθενών έναντι των υγιών μαρτύρων (23.67 (7.196 96.44) vs 12.04 (3.743, 41.99)  $p<0,0001$ ) (Εικόνα 19). Επιπλέον, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των τιμών του 8-ισοπροστανίου στα δύο βιολογικά υλικά ( $p=0.01$ ,  $r=0.329$ ) (Εικόνα 20).

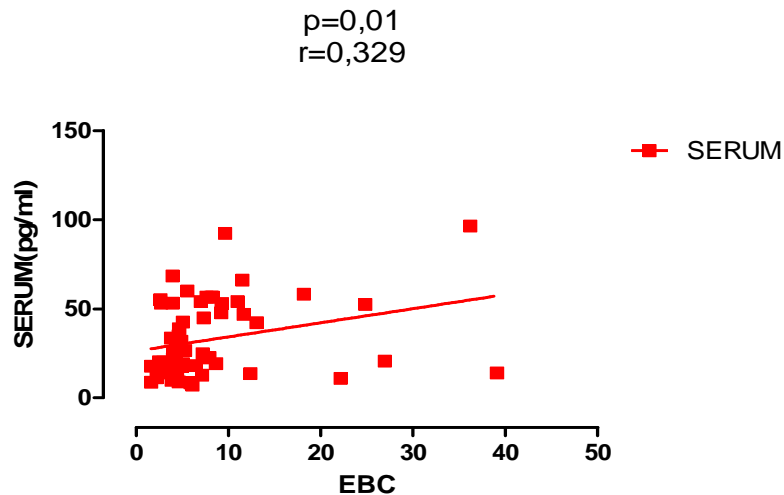


**Εικόνα 18.** Οι τιμές του 8-ισοπροστανίου στο EBC ασθενών με ΚΠ σε σχέση με αυτές των υγιών μαρτύρων. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του 8-ισοπροστανίου στο EBC ασθενών με ΚΠ σε σχέση με αυτά των υγιών μαρτύρων  $p=1.000$



**Εικόνα 19.** Οι τιμές του 8-ισοπροστανίου στον ορό ασθενών με ΚΠ σε σχέση με αυτές των υγιών μαρτύρων. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του 8-ισοπροστανίου στον ορό των ασθενών με ΚΠ σε σχέση με αυτά των υγιών μαρτύρων  $p<0,0001$ .





**Εικόνα 20. Συσχέτιση μεταξύ των τιμών του 8-ισοπροστανίου στα δύο βιολογικά υλικά. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του 8-ισοπροστανίου στα δύο βιολογικά υλικά ( $p=0.01$ ,  $r=0.329$ ).**

#### 6.4 Συσχέτιση του TNF- $\alpha$ , του VEGF και του 8-ισοπροστανίου με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους στο EBC

Έγινε συσχέτιση των τιμών του TNF- $\alpha$ , του VEGF και του 8-ισοπροστανίου στο EBC με διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους όπως η ηλικία, το φύλο, η καπνιστική συνήθεια, η βιολογική κατάσταση, το T, N και M (σύμφωνα με την σταδιοποίηση TNM), το στάδιο της νόσου και ο ιστολογικός τύπος. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης φαίνονται αναλυτικά στον (Πίνακας 6).

**Πίνακας 6. Τα επίπεδα των τιμών του TNF- $\alpha$ , του VEGF και του 8-ισοπροστανίου στο EBC σε σχέση με τις διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους**

		TNF- $\alpha$ (pg/ml)			VEGF (pg/ml)			8-ισοπροστανίο(pg/ml)		
		n	Median (min/max)	p	n	Median (min/max)	P	n	Median (min/max)	p
<b>Ηλικία</b>	<b>&lt;65</b>	21	30.67 (10.87/97.9)	0.430	25	5.447 (1.573/34.03)	0.56	33	4.959 (1.632/39.10)	0.457
	<b><math>\geq 65</math></b>	18	44.8 (8.776/126)		20	5.997 (1.573/10.65)		27	5.059 (1.623/18.17)	

<b>Απώλεια</b>	<b>&lt; 5%</b>	27	42.10	0.402	30	5.886	0.722	42	4.581	0.148
<b>Βάρους</b>			(8.776/120)			(1.573/18.57)			(1.623/36.19)	
	<b>≥ 5%</b>	12	37.8		15	5.997		18	7.218	
			(9.785/86.60)			(1.573/34.03)			(1.632/39.10)	
<b>Βιολογική κατάσταση</b>	<b>0</b>	25	44.8	0.08	31	5.942	0.55	41	4.888	0.774
			(11.0/26)			(1.573/34.03)			(1.623/36.19)	
	<b>1</b>	14	30.07		14	5.895		19	5.059	
			(8.776/97.90)			(1.573/10.65)			(1.632/39.10)	
<b>Ιστολογ.</b>	<b>ΜΜΚΠ</b>	27	42.70	0.305	30	5.891	0.735	43	4.611	0.052
<b>Τύπος</b>			(9.785/126)			(1.573/34.03)			(1.623/36.19)	
	<b>ΜΚΠ</b>	12	30.69		15	5/997		17	7.019	
			(8.776/86.6)			(1.573/18.07)			(2.975/39.10)	
<b>T- στάδιο</b>	<b>T1-T2</b>	20	45.35	0.593	20	5.997	0.837	30	4.993	0.379
			(8.776/126)			(1.573/10.65)			(2.485/39.10)	
	<b>T3-T4</b>	19	32.35		25	5.664		30	4.852	
			(9.785/100)			(1.573/34.03)			(1.623/36.19)	
<b>N- στάδιο</b>	<b>N0-N1</b>	18	46.35	0.560	20	5.946	0.735	30	6.737	0.169
			(8.776/126)			(1.573/10.65)			(2.224/39.10)	
	<b>N2-N3</b>	21	32.30		25	5.644		30	4.750	
			(9.785/97.90)			(2.117/34.03)			(1.623/7.142)	
<b>M -στάδιο</b>	<b>M0</b>	26	46.50	0.174	29	46.50	0.794	38	4.960	0.740
			(9.785/126)			(9.785/126)			(1.623/39.10)	
	<b>M1</b>	13	25.70		16	25.70		22	5.256	
			(8.776/97.90)			(8.776/97.90)			(2.224/26.96)	
<b>Στάδιο</b>	<b>I-IIIΑ</b>	16	46.50	0.542	16	46.50	0.990	24	4.202	0.184
			(18.78/126)			(18.77/126)			(1.632/36.19)	
	<b>IIIΒ-IV</b>	23	32.3		29	32.3		36	5.729	
			(8.776/100)			(8.776/100)			(1.623/39.10)	

Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά των τιμών του TNF-α, του VEGF και του 8-ισοπροστανίου σε σχέση με τις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους. Εντούτοις, οι τιμές του 8-ισοπροστανίου εμφανίζουν μια τάση συσχέτισης με τον ιστολογικό τύπο καθώς φάνηκε να είναι αρκετά μεγαλύτερες στους ασθενείς με ΜΚΠ σε σύγκριση με τους ασθενείς με ΜΜΚΠ (p=0.052).

### 6.5 Συσχέτιση του TNF-α, του VEGF και του 8-ισοπροστανίου με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους στον ορό

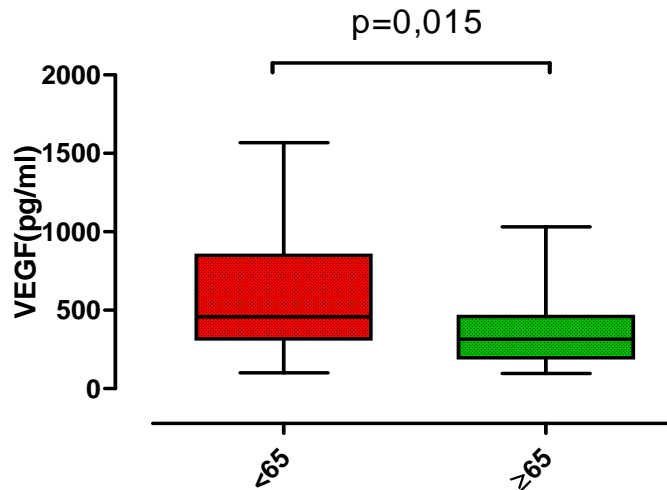
Έγινε συσχέτιση των τιμών του TNF-α, του VEGF και του 8-ισοπροστανίου στον ορό με διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους όπως η ηλικία, το φύλο, η καπνιστική συνήθεια, η βιολογική κατάσταση, το T, N, M, το στάδιο της νόσου (σύμφωνα με την σταδιοποίηση TNM) και ο ιστολογικός τύπος. Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης φαίνονται αναλυτικά στον (Πίνακας 7).

**Πίνακας 7. Τα επίπεδα των τιμών του TNF-α, του VEGF και του 8-ισοπροστανίου στον ορό με τις διάφορες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους**

		TNF-α(pg/ml)			VEGF (pg/ml)		8-ισοπροστανίο(pg/ml)	
		N	Median (min/max)	p-value	Median (min/max)	p-value	Median (min/max)	p-value
<b>Ηλικία</b>	<b>&lt;65</b>	33	26.8 (6.235/133)	0.143	458.9 (100.2/1568)	<b>0.015</b>	21.95 (7.146/96.44)	0.629
	<b>≥65</b>	27	33.8 (11.30/111)		315.8 (97/1032)		26.63 (8.763/92.49)	
<b>Απώλεια βάρους</b>	<b>&lt; 5%</b>	42	33.2 (6.235/133)	0.08	325.9 (97/1365)	0.144	22.28 (7.196/96.44)	0.852
	<b>≥ 5%</b>	18	26.65		446.4		26.39	

			(9.250/73.70)		(128.6/1568)		(8.961/66.15)	
<b>Βιολογική κατάσταση</b>	<b>0</b>	41	31.50	0.056	322	0.06	21.95	0.936
			(6.235/133)		(97/1365)		(7.196/96.44)	
	<b>1</b>	19	30.60		456.7		24.78	
			(10.89/90.50)		(226.3/1568)		(8.961/92.49)	
<b>Ιστολογικός Τύπος</b>	<b>ΜΜΚΠ</b>	43	31.50	0.558	418.1	0.416	26.63	0.237
			(9.650/133)		(97/1568)		(7.196/96.44)	
	<b>ΜΚΠ</b>	17	30.60		318		20.37	
			(6.235/111)		(162.5/1130)		(8.763/53.27)	
<b>T- στάδιο</b>	<b>T1-T2</b>	30	31.40	0.646	321	0.379	20.03	0.09
			(9.650/133)		(97/1568)		(7.196/96.44)	
	<b>T3-T4</b>	30	30.80		407		27.76	
			(6.235/111)		(128.6/1331)		(8.763/92.49)	
<b>N- στάδιο</b>	<b>N0-N1</b>	30	31.40	0.475	427	0.994	32.45	0.311
			(9.650/133)		(97/1568)		(8.583/96.44)	
	<b>N2-N3</b>	30	30.80		325.9		21.31	
			(6.235/111)		(123.3/1331)		(7.196/68.46)	
<b>M -στάδιο</b>	<b>M0</b>	38	30.80	0.475	353.1	0.701	21.01	0.717
			(9.650/133)		(97/1568)		(7.196/96.44)	
	<b>M1</b>	22	31.40		382.9		24.75	
			(6.235/90.50)		(114.6/1194)		(8.961/92.49)	
<b>Στάδιο</b>	<b>I-IIIΑ</b>	24	36.50	0.15	324.2	0.785	19.06	0.101
			(9.650/133)		(97/1568)		(7.196/96.44)	
	<b>IIIΒ-IV</b>	36	30.35		387.7		25.70	
			(6.235/90.50)		(114.6/1331)		(8.961/92.49)	

Οι τιμές του VEGF κατά τη διάγνωση βρεθήκαν αυξημένες στους νεότερους ασθενείς (ηλικίας < 65 ετών) σε σχέση με τους ηλικιωμένους ασθενείς, 458.9 (100,2 1568) vs 315.8 (97.0 1032),  $p=0.015$  (Εικόνα 21).



**Εικόνα 21. Συσχέτιση του VEGF με την ηλικία των ασθενών. Οι τιμές του ήταν υψηλότερες στους νεότερους ασθενείς (<65 ετών)**

#### **6.6 Συσχέτιση των επιπέδων του TNF- $\alpha$ , του VEGF και του 8-ισοπροστανίου στο EBC και στον ορό πριν και μετά τη ΧΜΘ**

Για να διερευνηθεί περαιτέρω η σχέση των επιμέρους βιολογικών δεικτών με την ανταπόκριση στη ΧΜΘ οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δυο ομάδες, στους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη ΧΜΘ-Responders (πλήρη ή μερική ανταπόκριση) και σε αυτούς που δεν ανταποκρίθηκαν-Non-Responders (ασθενείς με σταθερή νόσο και πρόοδο νόσου). Έτσι, οι τιμές των βιολογικών δεικτών, EBC και ορού κατά τη διάγνωση, στους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη ΧΜΘ δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά από τις τιμές τους στους μη ανταποκρινόμενους ασθενείς (Πίνακας 8).

Επιπρόσθετα, υπολογίστηκαν και αξιολογήθηκαν τα επίπεδα των τιμών του TNF- $\alpha$ , του VEGF και του 8-ισοπροστανίου στο EBC και στον ορό μετά την ολοκλήρωση της ΧΜΘ (Πίνακας 9). Τα επίπεδα των βιολογικών δεικτών στο EBC δεν μεταβλήθηκαν στατιστικά σημαντικά μετά τη ΧΜΘ. Ωστόσο, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα του 8-ισοπροστανίου

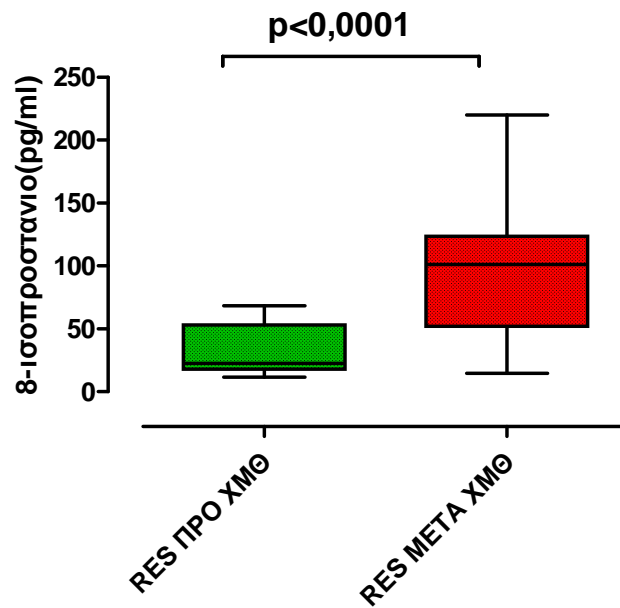
στον ορό των ασθενών που ανταποκρίθηκαν στην χημειοθεραπεία 22.61 (11.36, 68.46) vs 101.0 (14.75, 220.1)  $p < 0.0001$  (Εικόνα 22)

**Πίνακας 8. Τιμές των βιολογικών δεικτών στο EBC και στον ορό στους ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη ΧΜΘ-Responders (πλήρη ή μερική ανταπόκριση) και σε αυτούς που δεν ανταποκρίθηκαν-Non-Responders (ασθενείς με σταθερή νόσο και πρόοδο νόσου)**

	TNF- $\alpha$ (pg/ml)			VEGF (pg/ml)			8-ισοπροστάνιο (pg/ml)		
	Responders	Non responders	P	Responders	Non responders	p	Responders	Non responders	P
	Median min/max	Median min/max		Median min/max	Median min/max		Median min/max	Median min/max	
<b>EBC</b>	45.90 3.15/82.60	31.46 3.11/100	0.370	5.997 2.11/18.07	5.946 5.069/34.03	0.382	4.953 2.22/26.96	5.309 1.62/24.64	0.875
<b>ΟΡΟΣ</b>	33.80 6.23/100	25.0 9.25/111	0.795	320 97/1130	443.3 147.9/1568	0.352	22.61 11.36/68.46	30.3 8.76/92.49	0.709

**Πίνακας 9. Οι τιμές των επιπέδων του TNF- $\alpha$ , του VEGF και του 8-ισοπροστανίου στο EBC και στον ορό πριν και μετά τη ΧΜΘ**

	TNF- $\alpha$ (pg/ml)			VEGF (pg/ml)			8-ισοπροστάνιο (pg/ml)		
	Median	Median	P	Median	Median	p	Median	Median	P
	min/max	min/max		min/max	min/max		min/max	min/max	
	ΠΡΟ ΧΜΘ	ΜΕΤΑ ΧΜΘ		ΠΡΟ ΧΜΘ	ΜΕΤΑ ΧΜΘ		ΠΡΟ ΧΜΘ	ΜΕΤΑ ΧΜΘ	
<b>EBC</b>	45.90 3.15/82.60	43.10 3.75/86.10	0.07	5.997 2.117/18.07	5.664 1.225/10.10	0.412	4.953 2.224/26.96	6.808 3.608/17.95	0.510
<b>ΟΡΟΣ</b>	33.80 6.235/100	32.50 1.306/76.80	0.339	320 97/1130	333.5 41.58/805.5	0.233	22.61 11.36/68.46	101 14.75/220.1	0.001



**Εικόνα 22.** Τα επίπεδα του 8-ισοπροστανίου στον ορό των ασθενών που ανταποκρίθηκαν στη ΧΜΘ αυξήθηκαν σημαντικά σε σχέση με τα επίπεδα πριν τη ΧΜΘ

### 6.7 Σχέση των βιοχημικών δεικτών με την επιβίωση των ασθενών

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του TNF- $\alpha$ , του VEGF και του 8-ισοπροστανίου με τη συνολική επιβίωση των ασθενών τόσο στο EBC όσο και στον ορό (Πίνακας 10, Πίνακας 11).

**Πίνακας 10. Σχέση των επιπέδων των τιμών του TNF-α, του VEGF και του 8-ισοπροστάνιου με τη συνολική επιβίωση των ασθενών στο EBC**

<b>EBC</b>	<b>Ασθενείς</b>	<b>TIMEΣ(pg/ml)</b>	<b>p value</b>	<b>Μέση Επιβίωση (ημέρες)</b>
<b>TNF-α</b>	N=20	<42.10	0.975	447
	N=19	>42.10		433.5
<b>VEGF</b>	N=21	<5.895	0.539	415
	N=24	>5.895		503
<b>8-ISO</b>	N=30	<4.993	0.764	524
	N=30	>4.993		607

**Πίνακας 11. Σχέση των επιπέδων των τιμών του TNF-α, του VEGF και του 8-ισοπροστάνιου με τη συνολική επιβίωση των ασθενών στον ορό**

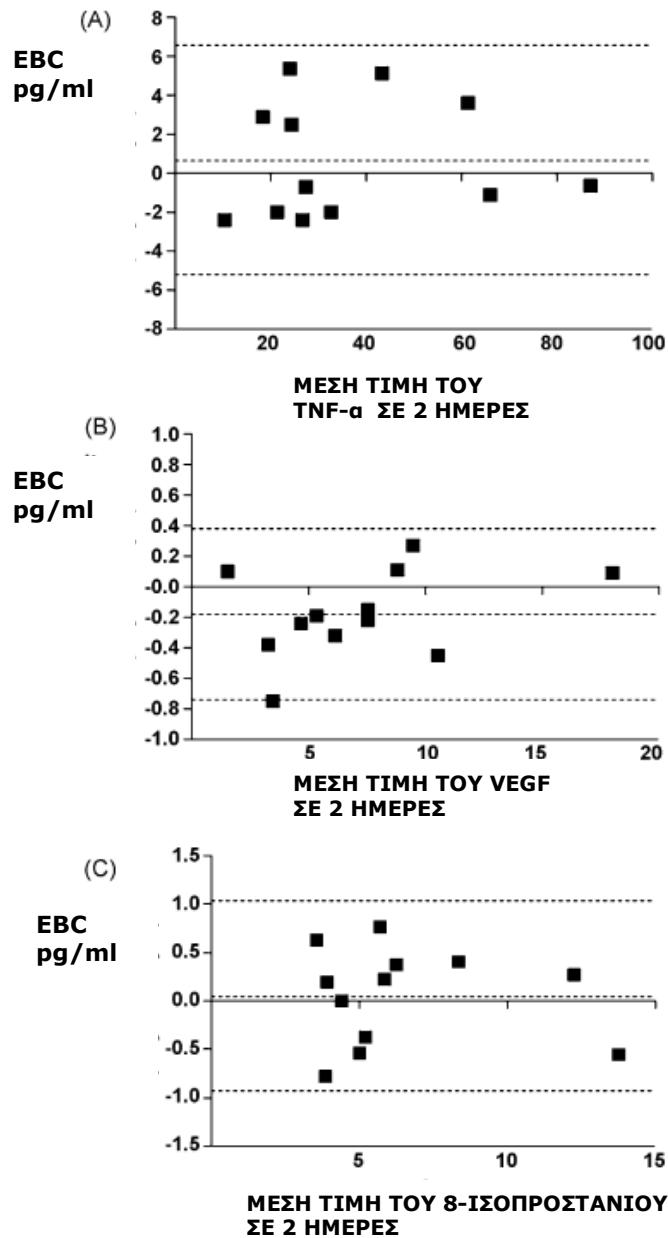
<b>Ορό</b>	<b>Ασθενείς</b>	<b>TIMEΣ(pg/ml)</b>	<b>p value</b>	<b>Μέση Επιβίωση (ημέρες)</b>
<b>TNF-α</b>	N=30	<31.05	0.367	384
	N=30	>31.05		524
<b>VEGF</b>	N=30	<374.8	0.680	524
	N=30	>374.8		503
<b>8-ISO</b>	N=30	<23.67	0.640	524
	N=30	>23.67		426

## **6.8 Αναπαραγωγικότητα των μετρήσεων των βιοχημικών δεικτών στο EBC**

Οι μετρήσεις των βιοχημικών δεικτών στο EBC σε δείγματα που συλλέχθηκαν δύο συνεχόμενες ημέρες εμφανίζουν αποδεκτή αναπαραγωγικότητα. Η μέση διαφορά με όρια συμφωνίας ( $\pm 2S.D.$ ) για τον TNF-α ήταν 0.69 (-5.16 έως 6.55), για τον VEGF ήταν -0.18 (-0.74 έως 0.38) και τέλος για το 8-ισοπροστάνιο ήταν 0.05 (-0.93 έως 1.04) (Εικόνα 23) (A, B



και Γ). Όλες οι τιμές ήταν μέσα στα αποδεκτά όρια συμφωνίας με την θεωρία Bland και Altman.



**Εικόνα 23. Αναπαραγωγικότητα των μετρήσεων στο EBC σε δύο διαδοχικές ημέρες συνολικά 8 ασθενών και 4 υγιών μαρτύρων όπως παρουσιάζεται σε γραφικές παραστάσεις Bland and Altman A)TNF-α B)VEGF C) 8-ισοπροστανίνο**

## 7 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του πνεύμονα εξακολουθεί να αποτελεί σημαντική αιτία θανάτου παγκοσμίως. Το 85% των περιπτώσεων αποδίδεται στο κάπνισμα και το υπόλοιπο σε συνδυασμό περιβαλλοντολογικών και/ή γενετικών παραγόντων. Παρόλο ότι υπάρχουν διάφορες θεραπευτικές προσεγγίσεις, η επιβίωση των ασθενών παραμένει μικρή. Για να μιλήσουμε για πιο αποτελεσματική θεραπεία πρέπει πρώτα απ' όλα να κατανοήσουμε τη βιολογία της πάθησης και τις νέες πληροφορίες να τις χρησιμοποιήσουμε για την ανάπτυξη νέων διαγνωστικών και θεραπευτικών προσεγγίσεων. Στην κατανόηση του καρκίνου του πνεύμονα την τελευταία δεκαετία έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος. Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες, η έκφραση ογκογονιδίων, η απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων και η μελέτη νέων βιολογικών δεικτών αποτελούν μέρος των σημαντικών εξελίξεων προς αυτή την κατεύθυνση.

Έτσι, μία προσέγγιση για την πρώιμη ανίχνευση του ΚΠ περιλαμβάνει την μελέτη των βιολογικών δεικτών που ανιχνεύονται σε ορισμένα βιολογικά υλικά. Η πρόσφατη πρόοδος στην κατανόηση της βιολογίας του καρκίνου διευκόλυνε την αναζήτηση και νέων μορίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες ανίχνευσης του ΚΠ και που συμμετέχουν σε σημαντικά μονοπάτια της καρκινογένεσης (6).

Τα αποτελέσματα επιδημιολογικών και κλινικών μελετών στηρίζουν τη θεωρία ότι η χρόνια φλεγμονή συμβάλλει στην ανάπτυξη του καρκίνου. Πρωταρχικές προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες συνδέονται με όλα τα στάδια της καρκινογένεσης. Ο TNF-α για παράδειγμα ασκεί τη βιολογική του δράση ενεργοποιώντας σημαντικά μονοπάτια επαγωγής σημάτων για τα κύτταρα, όπως αυτό του παράγοντα NF-κβ που δρα αντιαποπτωτικά για το κύτταρο και του JNK που η ενεργοποίησή του συμβάλλει στον κυτταρικό θάνατο (75).

Ένα σημαντικό μηχανισμό της βιολογίας του καρκίνου στον οποίο συμμετέχουν και οι κυτταροκίνες αποτελεί και η αγγειογένεση (168, 169). Ο καρκίνος επάγει την παραγωγή αγγείων που είναι απαραίτητα για την περαιτέρω ανάπτυξή του (170). Αγγειογενετικά μόρια έχουν χαρακτηριστεί ως καρκινικοί βιολογικοί δείκτες (171). Ο VEGF που αποτελεί τον κυριότερο αγγειογενετικό παράγοντα, εκκρίνεται από τα υποξικά καρκινικά κύτταρα υπό

την επίδραση διαφόρων παραγόντων όπως: οξειδωτικό stress, HIF-1, IGF-1, IL-8, EGFR, Bcl-2, p53, csrs, ras κ.α (172). Στην συνέχεια συνδέεται με τους υποδοχείς του VEGFR-R1 και VEGFR-R2 που βρίσκονται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων και προάγει το πολλαπλασιασμό, τη μετακίνηση, τη διαφοροποίηση και την επιβίωσή τους (173) .

Επίσης, πολλές μελέτες τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι το ΟΣ μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της καρκινογένεσης ως αποτέλεσμα των γενετικών δομικών αλλαγών που επιφέρει αλλά και να συμβάλλει στην περαιτέρω ανάπτυξη, διήθηση και μετάσταση του όγκου μέσω της επαγωγής της νεοπλασματικής αγγειογένεσης. Επιπλέον, το ΟΣ προάγει την απόπτωση και τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό επάγοντας τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-κβ και AP-1 (μέσω της οξειδωσης ή φωσφορυλίωσης αυτών) και αναστέλλοντας τους μεταγραφικούς παράγοντες bcl-2 και p53. Επιπρόσθετα, το ΟΣ διαταράσσει την ομαλή λειτουργία των συστημάτων μεταγωγής σήματος και την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων (7).

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μηχανισμοί της καρκινογένεσης στον ΚΠ, γίνονται εμφανείς πρώτα στους αεραγωγούς κι έπειτα στο περιφερικό αίμα και αυτό γιατί ο πνεύμονας αποτελεί το μοναδικό όργανο που είναι άμεσα εκτεθειμένο στους οξειδωτικούς παράγοντες του περιβάλλοντος και στα οξειδωτικά που παράγονται κατά τη διάρκεια διαφόρων παθήσεων του και των θεραπειών τους. Έτσι, η συλλογή του EBC θα μπορούσε να αποτελέσει μία νέα προσέγγιση για την ανίχνευση υψηλής ειδικότητας μορίων στον ΚΠ, απευθείας από το κατώτερο αναπνευστικό (174).

Ο σχεδιασμός της παρούσας μελέτης στηρίχτηκε στην αποδεκτή πλέον βιβλιογραφικά συμβολή της αγγειογένεσης και στον ρόλο του ΟΣ και των κυτταροκινών στους παθογενετικούς μηχανισμούς του ΚΠ (168). Σκοπός της μελέτης ήταν η ανίχνευση βιολογικών δεικτών που αντιπροσωπεύουν την αγγειογένεση, τις κυτταροκίνες και τα προϊόντα του ΟΣ με τη μη επεμβατική μέθοδο του EBC. Επιπλέον, με την παρούσα μελέτη διερευνάται και η πιθανή χρησιμοποίηση αυτών των δεικτών για την παρακολούθηση της πορείας των

ασθενών με ΚΠ. Επιπρόσθετα, εκτιμήθηκε και η προβλεπτική και προγνωστική αξία των δεικτών στους ασθενείς με ΚΠ.

### **7.1 Επίπεδα του TNF-α στον ΚΠ στο EBC και στον ορό**

Πρόσφατες μελέτες *in vivo* και *in vitro*, ανέδειξαν ένα μεγάλο φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων των κυτταροκινών στην παθογένεση του ΚΠ. Ο TNF-α είναι παράγοντας που συμμετέχει στην παθογένεση αρκετών νεοπλασιών μεταξύ των οποίων και ο ΚΠ (175). Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα του TNF-α στο EBC ασθενών με ΚΠ σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Το εύρημα αυτό στηρίζει την υπόθεση τοπικής παραγωγής του παράγοντα στον ΚΠ, που φαίνεται να καθορίζεται από τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα που εισχωρούν στον όγκο ή από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα (176). Στο ίδιο αποτέλεσμα κατέληξε και η μελέτη της Carpaghano G. et al., που προσδιόρισε τα επίπεδα του TNF-α στο EBC 32 ασθενών με ΜΜΚΠ, και στην οποία η μέτρηση του βιολογικού υλικού γίνεται με την ίδια μεθοδολογία (36). Στη μελέτη μας δε βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους όπως είναι το στάδιο της νόσου, ο ιστολογικός τύπος, η ηλικία, η βιολογική κατάσταση οι λεμφαδενικές μεταστάσεις. Παρόμοια, σε μία πρόσφατη μελέτη δεν διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με καμία από τις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους σε 17 ασθενείς με πρωτοδιαγνωσθέν ΚΠ και σε 15 ασθενείς που είχαν λάβει 2 κύκλους ΧΜΘ με βάση την πλατίνα (68). Στην ίδια μελέτη τα επίπεδα του TNF-α στο EBC των ασθενών ήταν αυξημένα σε σχέση με την ομάδα των υγιών μαρτύρων χωρίς όμως η διαφορά τους να είναι στατιστικά σημαντική. Ωστόσο, στη μελέτη της Carpaghano G. et al βρέθηκε ότι οι ασθενείς προχωρημένου σταδίου (III-IV) είχαν υψηλότερες τιμές του TNF-α στο EBC με στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0.05$ ). Το αποτέλεσμα αυτό κατά την Carpaghano θα μπορούσε να εξηγηθεί από τον κυτταροτοξικό ρόλο του TNF-α. Ωστόσο, για να επιβεβαιωθεί η συσχέτιση του με το στάδιο της νόσου θα ήταν χρήσιμη η μέτρηση των επιπέδων του σε

περισσότερους ασθενείς με αυστηρή εφαρμογή των νέων συστάσεων της ERS Task Force για τη μέτρηση βιολογικών δεικτών στο EBC.

Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη τα επίπεδα του TNF-α βρέθηκαν αυξημένα στον ορό των ασθενών με ΚΠ σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Το αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης είναι σύμφωνο με άλλες σύγχρονες μελέτες (26, 95) όπως π.χ σε μία μελέτη όπου βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα του νεκρωτικού παράγοντα στον ορό 103 ασθενών με ΚΠ σε σχέση με τα επίπεδα του στους υγιείς μάρτυρες πριν από κάθε θεραπεία (25). Ωστόσο, στη μελέτη μας δεν διαπιστώθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους. Στο ίδιο αποτέλεσμα καταλήγει και μία άλλη πρόσφατη μελέτη (177). Υπάρχουν όμως κάποιες άλλες μελέτες οι οποίες έρχονται σε αντίθεση με το αποτέλεσμα της μελέτης μας, καθώς παρατήρησαν στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του TNF-α στον ορό, με την πρόοδο της νόσου και την αύξηση του όγκου (178, 179). Ειδικότερα σε μία από αυτές, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα του TNF-α στον ορό ασθενών με μεταστάσεις σε σχέση με αυτούς που είχαν τοπικά περιορισμένη νόσο (179). Ωστόσο, για τον καθορισμό της συσχέτισης του TNF-α με το στάδιο της νόσου, θα ήταν απαραίτητες μελέτες με μεγαλύτερο εύρος ασθενών.

Επιχειρήθηκε επίσης, η ανάδειξη της προβλεπτικής αξίας του TNF-α. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του TNF-α με την ανταπόκριση στη ΧΜΘ, τόσο στα δείγματα του EBC όσο και στα δείγματα του ορού. Ανάλογα αποτελέσματα με τη μελέτη μας διαπιστώθηκαν και σε μία πρόσφατη μελέτη σε 57 ασθενείς με ΚΠ που έλαβαν ΧΜΘ με βάση την πλατίνα, όπου η αύξηση των επιπέδων του TNF-α που παρατηρήθηκε ήταν ανεξάρτητη από την ανταπόκριση στη θεραπεία (26). Επίσης, σε άλλες μελέτες παρατηρήθηκε παρομοίως, ότι τα επίπεδα του TNF-α στον ορό όχι μόνο ήταν ανεξάρτητα από την ανταπόκριση στη ΧΜΘ, αλλά δεν παρουσίασαν και στατιστικά σημαντικές μεταβολές από τα επίπεδα προ της ΧΜΘ (176, 180).

Επιπλέον, η μελέτη μας ανέδειξε ότι η χορήγηση ΧΜΘ δεν είχε επίδραση στα επίπεδα του TNF-α τόσο στο EBC όσο και στον ορό. Τα

ευρήματα της διεθνούς βιβλιογραφίας είναι αντικρουόμενα. Ανάλογο αποτέλεσμα με την μελέτη μας παρατηρήθηκε και σε μία άλλη μελέτη, όπου δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα του δείκτη με την επίδραση της ΧΜΘ (180). Αντίθετα, μία άλλη ομάδα μελετητών παρατήρησε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του TNF-α στον ορό των ασθενών που έλαβαν ΧΜΘ (26). Ενδιαφέρον παρουσιάζει και μία παλαιότερη μελέτη στην οποία διαπιστώθηκε ότι χορηγώντας πακλιταξέλη σε ασθενείς με ΚΠ προχωρημένου σταδίου, μειώνονταν σημαντικά τα επίπεδα του στον ορό, αποτέλεσμα όμως που θα μπορούσε να εξηγηθεί από την ταυτόχρονη λήψη δεξαμεθαζόνης (181).

Τέλος, στην παρούσα μελέτη δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση των τιμών του TNF-α με την συνολική επιβίωση των ασθενών. Αντίθετα, σε παλαιότερη μελέτη ο TNF-α αναδεικνύεται ως δείκτης καλής πρόγνωσης, καθώς η αύξηση στα επίπεδα του στον ορό είναι ανάλογη της αύξησης της επιβίωσης σε 47 ασθενείς με ΜΜΚΠ (168). Το αποτέλεσμα αυτό είναι παρόμοιο με αυτό της ίδιας ομάδας μελετητών που διαπίστωσε την ανάλογη αύξηση των επιπέδων του TNF-α με τον bcl-2 και την αντιστρόφως ανάλογη αύξηση με τη νεοαγγειογένεση (175). Αντίθετα, άλλη ομάδα επιστημόνων σε δύο μάλιστα μελέτες καταλήγει ότι ο TNF-α αποτελεί δείκτη κακής πρόγνωσης καθώς τα επίπεδα του στον ορό αυξάνονται μαζί με την αύξηση του όγκου και την πρόοδο της νόσου (178, 182). Επιπλέον, σε κάποιες άλλες μελέτες τα επίπεδα του TNF-α στον ορό δεν σχετίστηκαν με τη συνολική επιβίωση των ασθενών και υπολείπονταν προγνωστικής αξίας (26, 95). Η αξιολόγηση της προγνωστικής του αξίας στον ΚΠ χρήζει περαιτέρω ερευνητικής προσπάθειας.

## **7.2 Επίπεδα του VEGF στον ΚΠ στο EBC και στον ορό**

Ο VEGF, είναι ένας ισχυρός αγγειογενετικός παράγοντας με σημαντικές επιδράσεις στην αύξηση του όγκου και στο μεταστατικό δυναμικό του (183). Η συστηματική υποξία συμβάλλει στην αύξηση των επιπέδων του δείκτη στον ορό (120). Επιπλέον, ο VEGF σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες

έχει μετρηθεί σε διάφορα βιολογικά υλικά όπως σε ορό, πλευριτικό υγρό, βρογχοκυψελιδικό εκπλυμα και ιστό ασθενών με ΚΠ . Από τα αποτελέσματα των μελετών αυτών, διαπιστώνεται η αύξηση των επιπέδων του VEGF στους ασθενείς πριν από οποιαδήποτε θεραπεία (34, 162, 184, 185). Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκαν οι τιμές του VEGF στο EBC και στον ορό των ασθενών με ΚΠ και παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του και στα δύο υλικά σε σχέση με αυτά των υγιών μαρτύρων. Τα επίπεδα του VEGF στο EBC ασθενών με ΚΠ προσδιορίστηκαν μόνο σε μία ακόμη μελέτη. Ο Gessner et al. περιέλαβε 17 ασθενείς με ΜΜΚΠ παρατηρώντας παράλληλα με την αύξηση του VEGF και την αύξηση των επιπέδων και άλλων αγγειογενετικών παραγόντων όπως της αγγειογενίνης και του b-FGF (68). Αύξηση των επιπέδων ενός άλλου ενδοθηλιακού παράγοντα στο EBC, της ενδοθηλίνης-1, είχε παρατηρηθεί σε 30 ασθενείς με ΜΜΚΠ σε σχέση με υγιείς μάρτυρες (67). Η αύξηση της ET-1 στο EBC αποδόθηκε στην ύπαρξη ενός ενζύμου που δρα στο βρογχικό επιθήλιο και δεν προέρχεται από τη συστηματική κυκλοφορία του μετατρεπτικού ενζύμου της ενδοθηλίνης. Άλλωστε, αυξημένα επίπεδα του VEGF διαπιστώθηκαν και σε άλλα βιολογικά υλικά που προέρχονταν από τους αεραγωγούς όπως π.χ σε βρογχοκυψελιδικό εκπλυμα ασθενών με ΚΠ (37).

Ωστόσο, στη παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν συσχετίσεις με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους όσον αφορά τον εκπνεόμενο VEGF. Αντίθετα, τα επίπεδα της ενδοθηλίνης παρουσίασαν σημαντική συσχέτιση με το στάδιο της νόσου (67). Αυτό το αποτέλεσμα θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η δράση του μετατρεπτικού ενζύμου της ενδοθηλίνης που ανιχνεύτηκε σε ασθενείς με ΚΠ αυξάνεται με την πρόοδο του όγκου (186).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης κατέδειξαν αυξημένα επίπεδα VEGF στον ορό ασθενών με ΚΠ. Το αποτέλεσμα αυτό, είναι σύμφωνο με το μεγαλύτερο μέρος των μέχρι τώρα μελετών στον ΚΠ (Πίνακας 3) (128, 177, 187). Έτσι, στο παρελθόν μελετητές προσδιόρισαν και βρήκαν σημαντικά αυξημένα τα επίπεδα του VEGF σε σύνολο 70 ασθενών με ΚΠ ανεξάρτητα ιστολογικού τύπου (187).

Στη μελέτη μας, δεν αναδεικνύεται συσχέτιση των επιπέδων του VEGF με καμία από τις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους πλην της ηλικίας των ασθενών. Στη διεθνή βιβλιογραφία καμία μελέτη δεν βρήκε συσχέτιση του VEGF με το φύλο, την ηλικία και την απώλεια βάρους του ασθενούς, ενώ με τις υπόλοιπες κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους τα αποτελέσματα των ερευνών είναι αντικρουόμενα. Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, τα επίπεδα του VEGF βρέθηκαν αυξημένα στους ασθενείς με ΚΠ <65 ετών. Οι μέχρι τώρα μελέτες σε κλινικό και μοριακό επίπεδο δεν διαπίστωσαν συσχέτιση του VEGF με την ηλικία των ασθενών στο ΚΠ. Εντούτοις, ανάλογο εύρημα παρουσιάζει μελέτη που διενεργήθηκε σε πειραματικά μοντέλα. Συγκεκριμένα, οι Rivard et.al. χρησιμοποίησαν λεία μυϊκά κύτταρα από το αγγειακό τοίχωμα της αορτής ποντικών τα οποία υπέβαλλαν σε συνθήκες υποξίας. Διαπίστωσαν ότι στα νεότερα ποντίκια τα επίπεδα του VEGF ήταν υψηλότερα καθώς και η έκφραση του HIF-1 σε σύγκριση με τα ποντίκια μεγαλύτερης ηλικίας (129). Επιπλέον, τα αποτελέσματα της μελέτης δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων του VEGF μεταξύ των ασθενών με ΜΜΚΠ και των ασθενών με ΜΚΠ. Τα αποτελέσματά μας, συμφωνούν με τα ευρήματα των πιο πρόσφατων μελετών, σύμφωνα με τα οποία ο VEGF δεν συσχετίζεται με τον ιστολογικό τύπο στους ασθενείς με ΚΠ. Συγκεκριμένα, σε μία μελέτη, προσδιορίστηκαν οι τιμές του VEGF στον ορό 40 ασθενών (31 ασθενείς με ΜΜΚΠ και 9 ασθενείς με ΜΚΠ) πριν τη θεραπεία και δεν διαπιστώθηκε καμία συσχέτιση με τον ιστολογικό τύπο (127).

Επιπρόσθετα, στη παρούσα μελέτη δεν βρέθηκε συσχέτιση του VEGF με την λεμφαγγειακή διασπορά. Σε ανάλογη μελέτη των Kaya et al. επίσης δεν διαπιστώθηκαν υψηλότερα επίπεδα VEGF σε ασθενείς με λεμφαδενικές μεταστάσεις  $N \geq 2$  σε σχέση με τους ασθενείς ελεύθερων λεμφαδενικών μεταστάσεων ή με N1 επιχώριους λεμφαδένες (121).

Επιχειρήθηκε επίσης, η ανάδειξη της προβλεπτικής αξίας του VEGF τόσο στο EBC όσο και στον ορό. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση των τιμών του VEGF με την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία τόσο στο EBC όσο και στον ορό. Όσον αφορά τον ορό, τα



ευρήματα της διεθνούς βιβλιογραφίας είναι αντικρουόμενα. Σε αρκετές μελέτες δεν αναγνωρίστηκε η προβλεπτική αξία του VEGF (123, 130, 177). Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι υπάρχουν και μελέτες που κατέληξαν σε αντίθετο από το δικό μας συμπέρασμα, καθώς διαπίστωσαν σημαντική συσχέτιση του VEGF με την ανταπόκριση στη ΧΜΘ (131, 133, 188, 189). Έτσι, σε μία μελέτη όπου προσδιορίστηκαν εκτός από τα επίπεδα του VEGF και τα επίπεδα της ενδοστατίνης, του bFGF και της TSP σε 21 ασθενείς με ΜΜΚΠ και διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση των επιπέδων του VEGF με τη ΧΜΘ.. Επίσης, σε μία άλλη μελέτη διαπιστώθηκε ότι από τα μειωμένα προθεραπευτικά επίπεδα του VEGF σε ασθενείς με ΜΜΚΠ θα μπορούσε να προβλεφθεί η ανταπόκριση στη θεραπεία με gefinitib. Μάλιστα, σε άλλη μελέτη βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των επιπέδων του VEGF, VEGFR1 VEGFR2 σε 39 ασθενείς με ΜΚΠ.

Επιπλέον, η μελέτη μας ανάδειξε ότι η χορήγηση ΧΜΘ δεν είχε επίδραση στα επίπεδα του VEGF τόσο στο EBC όσο και στον ορό. Αντίθετα, σε μία πρόσφατη μελέτη διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων του VEGF στο EBC ομάδας ασθενών με ΚΠ, που έλαβε 2 κύκλους ΧΜΘ και ανταποκρίθηκαν σε αυτή. Ωστόσο, το αποτέλεσμα αυτό διερευνήθηκε σε μικρό αριθμό ασθενών (15) που έλαβαν ΧΜΘ. Επιπλέον, στη μελέτη μας οι τιμές του VEGF στον ορό πριν τη ΧΜΘ δεν διαφέρανε σημαντικά από τις τιμές του μετά τη ΧΜΘ, στο σύνολο των ασθενών. Το αποτέλεσμα αυτό συμβαδίζει με τα ευρήματα και άλλων μελετών, στις οποίες διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα του VEGF πριν μετά από τη ΧΜΘ (27, 123, 130). Παράλληλα όμως, έχει βρεθεί σημαντική μείωση των επιπέδων του VEGF στους ασθενείς που ανταποκριθήκαν στη ΧΜΘ (133).

Στην εν λόγω μελέτη δεν εμφανίζεται συσχέτιση των τιμών του VEGF με την συνολική επιβίωση των ασθενών. Σε ανάλογο συμπέρασμα κατέληξε μία μεγάλη μελέτη σε 451 ασθενείς με ΜΜΚΠ όπου δεν βρέθηκε συσχέτιση των επιπέδων του VEGF πριν την θεραπεία με την επιβίωση των ασθενών (128). Αντίθετα, σε άλλες μελέτες τα υψηλά επίπεδα VEGF ή η αυξημένη έκφραση του στο καρκινικό ιστό κατά την διάγνωση συσχετίστηκαν με μικρότερη επιβίωση των ασθενών, ανάγοντάς τον έτσι σε δείκτη κακής

πρόγνωσης (134, 135). Μία πρόσφατη μεταανάλυση 16 συνολικά μελετών από το 1993 έως το 2005 ανέδειξε τον VEGF ως δείκτη κακής πρόγνωσης σε 10 από αυτές (134). Σε ανάλογο αποτέλεσμα κατέληξε και άλλη ομάδα μελετητών. για ασθενείς με ΜΚΠ (135). Μάλιστα, έχει βρεθεί ότι η έκφραση του VEGF σε ιστούς 48 ασθενών με ΜΜΚΠ που υποβλήθηκαν σε χειρουργική αφαίρεση του όγκου, αποτέλεσε ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα (118). Παρόμοια και σε παλαιότερη μελέτη στον ορό 194 ασθενών με ΜΜΚΠ, τα επίπεδα του VEGF πριν τη ΧΜΘ αποτέλεσαν μαζί με τη βιολογική κατάσταση και την παρουσία μεταστάσεων, ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες (190). Ανάλογο αποτέλεσμα δεν διαπιστώθηκε σε δύο μάλιστα μελέτες όπου αναδεικνύεται η διαγνωστική και όχι η προγνωστική αξία του δείκτη τόσο στο ΜΜΚΠ όσο και στο ΜΚΠ (123, 177).

### **7.3 Επίπεδα του 8-ισοπροστανίου στον ΚΠ στο EBC και στον ορό**

Το 8-ισοπροστανίο λόγω της ειδικότητάς του στο μηχανισμό υπεροξειδωσής των λιπών αποτελεί άριστο δείκτη του ΟΣ. Αξίζει να αναφερθεί ότι, υψηλά επίπεδα του ΟΣ έχουν βρεθεί στο EBC ασθενών με φλεγμονώδεις πνευμονικές παθήσεις (191-193). Στην παρούσα μελέτη το 8-ισοπροστανίο ανιχνεύτηκε στον εκπνεόμενο αέρα ασθενών με ΚΠ και μάλιστα στο σύνολο των δειγμάτων που λήφθηκαν, ωστόσο, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του 8-ισοπροστανίου στους ασθενείς με ΚΠ και τους υγιείς μάρτυρες. Σε πρόσφατη μελέτη το 2009, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα προϊόντων του ΟΣ στο EBC ασθενών με ΚΠ και συγκρίθηκαν με αυτά υγιών μαρτύρων (27, 66). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα του εκπνεόμενου υπεροξειδίου του υδρογόνου σε 21 ασθενείς με ΜΜΚΠ σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Δεν διαπιστώθηκαν ωστόσο, στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα του 8-ισοπροστανίου μεταξύ των ασθενών και καθεμίας από τις ομάδες των υγιών μαρτύρων (καπνιστές και μή καπνιστές). Στο παρελθόν εξάλλου, είχε αναφερθεί ότι υπάρχει αυξημένη υπεροξειδωσής των λιπιδίων σε καρκινικούς ιστούς (17, 194). Οι περιορισμένες στη διεθνή βιβλιογραφία αναφορές για την ανίχνευση του 8-ισοπροστανίου

στο EBC ασθενών με ΚΠ, δεν επιτρέπει τη διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με τα επίπεδα του δείκτη στο συγκεκριμένο βιολογικό υλικό.

Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με τις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους. Η απουσία αυτών των συσχετίσεων θα μπορούσε να οφείλεται στην διαφορετική χημική υπόσταση του προϊόντος του ΟΣ που μετρήθηκε. Στην παρούσα μελέτη μετρήθηκε το 8-ισοπροστανίο ως δείκτης υπεροξειδωσής των λιπών, ενώ σε παλαιότερη μελέτη, πραγματοποιήθηκε μία συνολική μέτρηση των υδροπεροξειδίων που εκφράζονται σε καρκινικό ιστό ασθενών (17). Στην πιο πρόσφατη μελέτη ανίχνευσης του 8-ισοπροστανίου στο EBC δεν πραγματοποιήθηκε συσχέτιση με τις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους.

Επιπρόσθετα, στην παρούσα μελέτη το 8-ισοπροστανίο ανιχνεύτηκε για πρώτη φορά στον ορό ασθενών με ΚΠ και παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδά του ήταν σημαντικά αυξημένα σε σχέση με αυτά των υγιών μαρτύρων. Σε αρκετές μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται αυξήσεις των επιπέδων των προϊόντων υπεροξειδωσής των λιπών στον ορό ασθενών με ΚΠ. Έτσι, σε πρόσφατη μελέτη παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της μαλονδιαλδεύδης ως προϊόν της λιπιδικής υπεροξειδωσής σε 57 ασθενείς με ΚΠ σε σχέση με τα επίπεδά της σε υγιείς μάρτυρες (156). Στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα της μαλονδιαλδεύδης σε ασθενείς με ΚΠ παρατήρησαν και σε άλλες μελέτες (160, 195). Το εύρημα αυτό της μελέτης μας είναι ανάλογο και με τα αποτελέσματα πρόσφατης μελέτης, όπου αναφέρεται αύξηση των επιπέδων όλων των προϊόντων υπεροξειδωσής των λιπιδίων σε ασθενείς με διαφορετικό ιστολογικό τύπο καρκίνου (159).

Επιπλέον, έγινε απόπειρα συσχέτισης των επιπέδων του 8-ισοπροστανίου με τις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους χωρίς όμως να βρεθεί καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση. Εντούτοις, παρατηρήθηκε μία τάση συσχέτισης των επιπέδων του 8-ισοπροστανίου στους διαφορετικούς ιστολογικούς τύπους ΚΠ. Έτσι, διαπιστώθηκαν αυξημένες τιμές του δείκτη, σε ασθενείς με ΜΚΠ σε σχέση με αυτές των ΜΜΚΠ. Το ίδιο αποτέλεσμα βρέθηκε και σε μελέτη μίας άλλης ομάδας μελετητών οι οποίοι παρατήρησαν στατιστικά

σημαντική αύξηση σε όλους τους ιστολογικούς τύπους, αλλά τη μεγαλύτερη μεταξύ ασθενών με ΜΚΠ (159). Παράλληλα, άλλη ομάδα μελετητών διαπίστωσε στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα των προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης και παράλληλη μείωση των αντιοξειδωτικών μορίων σε ασθενείς με προχωρημένο στάδιο νόσου (IIIB-IV) (160). Επιπλέον, παλαιότερα είχε παρατηρηθεί θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης που ανιχνεύτηκαν σε καρκινικό ιστό με το στάδιο της νόσου (194). Ωστόσο, ο ρόλος του 8-ισοπροστανίου και των προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσης ως βιολογικοί δείκτες που σχετίζονται άμεσα με το κλινικό στάδιο της νόσου είναι ακόμη προς διερεύνηση καθώς υπολείπονται μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών σε παρόμοια βιολογικά υλικά.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εύρημα της μελέτης αποτελεί η στατιστικά σημαντική συσχέτιση που παρατηρήθηκε μεταξύ των επιπέδων του 8-ισοπροστανίου στα δύο διαφορετικά βιολογικά υλικά. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι τα ισοπροστανία είναι ενώσεις σταθερές και ειδικές για την υπεροξειδωση των λιπών και παράγονται σε αφθονία στα βιολογικά υγρά (50, 196).

Επίσης, ένας από τους στόχους της μελέτης ήταν η διερεύνηση της προβλεπτικής αξίας των επιπέδων του 8-ισοπροστανίου. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, μόνο οι τιμές του δείκτη που ανιχνεύτηκαν στον ορό επηρεάστηκαν από τη ΧΜΘ. Έτσι, οι ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη ΧΜΘ παρουσίασαν αύξηση των επιπέδων του 8-ισοπροστανίου στον ορό. Μία εξήγηση θα μπορούσε να δοθεί από το γεγονός ότι η κυτταροτοξικότητα της ΧΜΘ οδηγεί σε παραγωγή προϊόντων ΟΣ σε επίπεδα ικανά να οδηγήσουν σε θάνατο ή απόπτωση των νεοπλασματικών κυττάρων(27). Παρόμοια άλλωστε αποτελέσματα βρέθηκαν στη μελέτη του La Torre et al., όπου διαπιστώθηκε αύξηση των επιπέδων του ΟΣ μετά τη ΧΜΘ στον ορό των ασθενών με ΚΠ (161). Τα αποτελέσματα της μελέτης μας επιβεβαιώνονται και από τις πιο πρόσφατες μελέτες σε μία εκ των οποίων διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα των TBARS σε 19 από τους 37 συνολικά ασθενείς με ΜΚΠ που είχαν ανταπόκριση μετά τη λήψη 6 κύκλων ΧΜΘ, ενώ μείωση των επιπέδων τους

παρατηρήθηκε στους ασθενείς που σημείωσαν πρόοδο νόσου (158). Παράλληλα, σε πρόσφατη μελέτη ομάδα μελετητών καταλήγει στο συμπέρασμα ότι η μεγάλης διάρκειας ΧΜΘ επάγει το ΟΣ (157). Επίσης, τα επίπεδα του 8-ισοπροστανίου ήταν αυξημένα και στο EBC μετά τη ΧΜΘ χωρίς όμως αυτή η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική. Παρόμοιο αποτέλεσμα βρέθηκε και σε παλαιότερη μελέτη, όπου οι μετρήσεις των δεικτών του ΟΣ έγιναν σε BAL (162). Η δυνατότητα του 8-ισοπροστανίου να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης πρόβλεψης και παρακολούθησης της ανταπόκρισης στη ΧΜΘ χρήζει περαιτέρω αξιολόγησης.

Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση του ΟΣ με την συνολική επιβίωση των ασθενών με πρωτοπαθή ΚΠ, τόσο στο EBC όσο και στον ορό. Σε μία άλλη μελέτη όμως σε 37 ασθενείς με ΜΚΠ παρατήρησαν ότι τα αυξημένα επίπεδα των προϊόντων υπεροξειδωσής των λιπών στον ορό σχετίζονται με μεγαλύτερη επιβίωση των ασθενών (158). Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε και άλλη ομάδα μελετητών, οι οποίοι διαπίστωσαν ότι υψηλά επίπεδα των προϊόντων λιπιδικής υπεροξειδωσής στο πλάσμα ασθενών με ΜΚΠ σχετίζονται με μεγαλύτερη συνολική επιβίωση (157). Παρόλα τα αποτελέσματα των προαναφερθέντων μελετών, χρειάζονται περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο εύρος ασθενών (και με ΜΜΚΠ), έτσι ώστε να καταλήξουμε σε σαφή συμπεράσματα σχετικά με το ρόλο των προϊόντων υπεροξειδωσής των λιπών στην επιβίωση των ασθενών με ΚΠ.

#### **7.4 Συμπεράσματα και προοπτικές**

Η μέχρι σήμερα θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με ΚΠ δεν έχει προσφέρει τα μέγιστα. Η ανάδειξη τόσο της προβλεπτικής όσο και της προγνωστικής αξίας των βιολογικών δεικτών, είναι μείζονος κλινικού ενδιαφέροντος καθώς μπορεί να συμβάλει σημαντικά στην αύξηση της επιβίωσης των ασθενών με ΚΠ.

Έτσι, στην μελέτη μας διαπιστώθηκαν αυξημένα επίπεδα των τριών βιολογικών δεικτών σε ασθενείς με ΚΠ σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες. Ειδικότερα παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα του

TNF- $\alpha$  και του VEGF καί στα δύο βιολογικά υλικά (EBC και ορό) όπου πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις. Επιπλέον, διαπιστώθηκαν αυξημένες τιμές στα επίπεδα του 8-ισοπροστανίου μόνο στον ορό ασθενών με ΚΠ σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης μας αναδεικνύεται η πιθανή συμμετοχή των προφλεγμονωδών κυτταροκινών όπως είναι ο TNF- $\alpha$  στον καρκίνο του πνεύμονα. Ο TNF- $\alpha$ , όπως έχει προαναφερθεί ασκεί τη βιολογική του δράση μέσω μοριακών μονοπατιών που ενεργοποιούν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση του όγκου. Ο TNF- $\alpha$  θα μπορούσε να αποτελέσει μοριακό στόχο για την πρόληψη και θεραπεία του καρκίνου. Οι ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες του TNF- $\alpha$ , καθιστούν πιθανή την χρησιμοποίησή του στη θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών με καρκίνο, ωστόσο χρειάζονται περαιτέρω μελέτες που θα αναδείξουν την αντικαρκινική του δράση.

Επιπλέον, με την αύξηση του VEGF στα δύο βιολογικά υλικά αναγνωρίζεται ο σημαντικός ρόλος των αγγειογενετικών παραγόντων στον καρκίνο του πνεύμονα. Η παραγωγή αγγειογενετικών παραγόντων από τα καρκινικά κύτταρα είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των συμπαγών όγκων. Ο VEGF αποτελεί τον κυριότερο αγγειογενετικό παράγοντα, ο οποίος προάγει τον πολλαπλασιασμό, τη μετακίνηση, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο, στη μελέτη μας δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους, πέραν της ηλικίας. Είναι επιτακτική η ανάγκη καλά σχεδιασμένων κλινικών μελετών για τη διεξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων, σχετικά με τη συσχέτιση του δείκτη με τις κλινικοεργαστηριακές παραμέτρους.

Στις μέρες μας ιδιαίτερο κλινικό ενδιαφέρον έχει αποκτήσει η αναγνώριση της προβλεπτικής αξίας του VEGF, καθώς ένας αντι-VEGF παράγοντας (Bevacizumab), ήδη χρησιμοποιείται ως πρώτη γραμμή ΧΜΘ σε συγκεκριμένες ομάδες ασθενών με ΜΜΚΠ, ενώ πολλοί άλλοι παράγοντες με αντιαγγειογενετική δράση βρίσκονται υπό μελέτη. Είναι σημαντικό αν μπορούμε να γνωρίζουμε ποιοι ασθενείς θα έχουν όφελος από τη χορήγηση

των συγκεκριμένων φαρμάκων, αφενός μεν για την επίτευξη της βέλτιστης ανταπόκρισης στη θεραπεία και αφετέρου για την αύξηση της επιβίωσής τους. Απαιτείται όμως αρκετή μελλοντική έρευνα προς αυτή τη κατεύθυνση.

Επιπρόσθετα, ένα ακόμη αποτέλεσμα της μελέτης μας ήταν η αύξηση των επιπέδων του 8-ισοπροστανίου στον ορό των ασθενών με ΚΠ. Το εύρημα αυτό, υποδεικνύει ότι το ΟΣ και τα προϊόντα του μπορούν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη ΧΜΘ είχαν υψηλότερα επίπεδα του ΟΣ στον ορό. Αυτό το εύρημα θα μπορούσε να υποδηλώσει ότι η δράση των ΧΜΘ φαρμάκων και η δυνατότητα να οδηγήσουν σε απόπτωση εξαρτάται από το ΟΣ. Η δυνατότητα όμως το ΟΣ να χρησιμοποιηθεί ως μελλοντικός δείκτης πρόβλεψης της ανταπόκρισης στη θεραπεία βρίσκεται ακόμη σε πρώιμο ερευνητικό στάδιο.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη μελέτη μας παρουσιάζει η χρησιμοποίηση του EBC μίας μη επεμβατικής μεθόδου για την ανίχνευση βιολογικών δεικτών σε ασθενείς με ΚΠ. Η μέθοδος του EBC έχει ορισμένα σημαντικά πλεονεκτήματα απέναντι σε άλλες προτεινόμενες μεθόδους για την πρώιμη διάγνωση και παρακολούθηση των ασθενών με ΚΠ. Εκτός της μη επεμβατικότητάς της που είναι σημαντική σε ασθενείς με ΚΠ οι οποίοι τις περισσότερες περιπτώσεις έχουν υποστεί σωματική και ψυχολογική επιβάρυνση λόγω της νόσου, η μέθοδος αυτή είναι επιπλέον ασφαλής και οικονομική. Επίσης, η διαδικασία συλλογής του συμπυκνώματος μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ποικίλα κλινικά πλαίσια π.χ στη ΜΕΘ, στο εξωτερικό ιατρείο, στο σπίτι, από διάφορες ομάδες ασθενών μέχρι και βαρέως πάσχοντες. Παράλληλα, η δυνατότητα που δίνει η μέθοδος να επαναλαμβάνονται οι μετρήσεις στον ίδιο ασθενή, πριν και μετά τη θεραπεία, την καθιστούν πολύτιμη για την παρακολούθηση της πορείας της νόσου. Μάλιστα, μερικοί μελετητές πρότειναν ότι το EBC θα μπορούσε να αποτελέσει μέρος ενός προγράμματος screening. Αυτή η μελέτη προέβλεπε ότι οι υψηλού κινδύνου ασθενείς υπόκεινται αρχικά στη διαδικασία συλλογής του EBC. Αν τα αποτελέσματα ήταν θετικά για συγκεκριμένους βιολογικούς δείκτες, τότε θα πραγματοποιούνταν μία spiral αξονική τομογραφία θώρακος και ο έλεγχος

θα ολοκληρωνόταν με την κυτταρολογική ή ιστολογική επιβεβαίωση από δείγματα που θα λαμβάνονται με βρογχοσκόπηση ή βιοψία πνεύμονα.

Πρέπει να σημειωθεί ότι στη μελέτη μας ανιχνεύτηκαν και οι τρεις δείκτες στο EBC γεγονός που φανερώνει ότι οι βιολογικοί δείκτες συμμετέχουν σε διαδικασίες που μπορούν να προέρχονται κατευθείαν από το κατώτερο αναπνευστικό. Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν όλες οι κατευθυντήριες οδηγίες της ERS Task Force. Εντούτοις, απαιτείται βελτίωση των σύγχρονων τεχνικών με ελάχιστα όρια ανίχνευσης που θα πρέπει να τεθούν, για τη σωστή αξιολόγηση του κάθε δείκτη. Απαιτούνται περισσότερες και πιο ευρείες μελέτες για τη διεξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων που αφορούν τον κάθε δείκτη. Πρωταρχικής επίσης σημασίας είναι η διευκρίνιση των προβλημάτων σχετικά με τη συλλογή του συμπυκνώματος, την αποθήκευσή και την μέτρηση του προκειμένου να τυποποιηθεί η μελέτη του.

Είναι πλέον ξεκάθαρο ότι ο ΚΠ αποτελεί μία πολύπλοκη και ετερογενή νόσο. Ενώ συνεχίζεται η προσπάθεια ανίχνευσης βιολογικών δεικτών στο EBC ακόμη δεν έχει βρεθεί ένας δείκτης με ουσιαστική προβλεπτική και προγνωστική αξία. Οι γνωστοί προγνωστικοί παράγοντες όπως είναι το στάδιο, η ηλικία και η βιολογική κατάσταση θα είναι πάντα χρήσιμοι. Ωστόσο, η ταυτοποίηση νέων βιολογικών δεικτών θα μπορούσε να συμβάλλει στην επιλογή της καταλληλότερης θεραπείας και να διαφοροποιήσει την θεραπευτική προσέγγιση ανάλογα με την πρόγνωση της νόσου.

Έτσι, πρόσφατες μελέτες έχουν εισάγει στην μελέτη των βιολογικών δεικτών, το γονιδίωμα και το πρωτεϊνώμα που μπορούν να μας δώσουν μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα του μοριακού προφίλ του όγκου συμβάλλοντας στην σφαιρική κατανόηση των διαδικασιών της ανάπτυξης και προόδου των νεοπλασιών.

Τελευταίες μελέτες έχουν ασχοληθεί με την ανίχνευση του πρωτεϊνώματος τόσο στο πλάσμα όσο και στο EBC (57). Μία άλλη κατηγορία βιολογικών δεικτών που έχουν ήδη ανιχνευθεί στο EBC και θα μπορούσαν να αναδειχθούν σε δείκτες με μεγάλη προβλεπτική και προγνωστική αξία είναι και



οι αλλοιώσεις του μικροδορυφορικού DNA και των ογκογονιδίων. Έτσι έχει εκτιμηθεί ότι περίπου το 20% των ασθενών με ΚΠ παρουσιάζει μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο K-ras και p53 που έχουν ανιχνευτεί στο EBC (58). Επίσης, με την πρόσφατη εξέλιξη των στοχευμένων στον παράγοντα EGFR θεραπειών (gefitinib/erlonitib) έχει αναδειχθεί η κλινική αξία του EGFR και μεταλλάξεων του στον ΚΠ. Ήδη ορισμένοι μελετητές έχουν ανιχνεύσει μεταλλάξεις του EGFR στο EBC (63). Επίσης μεταλλάξεις του Rb έχουν αναφερθεί στο 90% των ασθενών με ΜΚΠ και στο 10% αυτών με ΜΜΚΠ, ενώ έχει βρεθεί ότι η απώλεια της λειτουργίας του συμβάλλει σε χειρότερη πρόγνωση των ασθενών με ΜΜΚΠ (197).

Είναι επίσης γνωστό, ότι ένα σημαντικό ποσοστό ασθενών με ΜΜΚΠ που λαμβάνουν ΧΜΘ με πλατίνα εκτίθενται στους κινδύνους της θεραπείας χωρίς ιδιαίτερα οφέλη. Ο παράγοντας (ERCC1) (excision repair cross complementation group) αποτελεί μέρος ενός μοριακού μονοπατιού επιδιόρθωσης του DNA από βλάβες που έχει υποστεί λόγω της σισπλατίνας και των καρκινογόνων ουσιών του καπνού και δρα μέσω της αποκοπής νουκλεοτιδίων Σε πρόσφατη μελέτη έχει διερευνηθεί η προβλεπτική αξία του ERCC1 σε ασθενείς με ΜΜΚΠ που έχουν λάβει σισπλατίνα. Επίσης, οι ασθενείς που στον καρκινικό τους ιστό δεν εκφράζεται ο παράγοντας ERCC1 ευνοούνται περισσότερο από τη ΧΜΘ με βάση την πλατίνα (198). Η ανίχνευση στο EBC του παράγοντα ERCC1 που εμπλέκεται στη διαδικασία επισκευής του DNA θα μπορούσε να αποτελέσει ένα χρήσιμο βιολογικό δείκτη για την επιλογή της ενδεδειγμένης θεραπείας των ασθενών με ΚΠ.

Η πρώιμη διάγνωση του ΚΠ μέσω της ανίχνευσης βιολογικών δεικτών στο EBC είναι ένας τομέας έρευνας που συνεχώς εξελίσσεται. Η καταγραφή της αναπνοής θα μπορούσε να μας δώσει πολύτιμες πληροφορίες συμβάλλοντας στην καλύτερη επιλογή των ατόμων που θα λάβουν μέρος σε προγράμματα screening για τον ΚΠ. Συμπληρώνοντας έτσι, άλλες μεθόδους πρώιμης διάγνωσης όπως η αξονική τομογραφία θώρακος πιθανόν να βοηθούσε στην μείωση της θνητότητας της νόσου. Πρόσθετα, η εφαρμογή στο EBC των νέων τεχνολογιών της γονιδιωματικής και της πρωτεωμικής μπορούν να έχουν μια πληθώρα εφαρμογών όπως: η ανακάλυψη νέων διαγνωστικών

και προγνωστικών δεικτών και δεικτών απάντησης σε θεραπείες, ο προσδιορισμός και η επικύρωση μοριακών στόχων και κατ' επέκταση η ανάπτυξη νέων εξειδικευμένων φαρμάκων, η πρόβλεψη των παρενεργειών και της τοξικότητας των διαφόρων θεραπειών, η επιβεβαίωση του τρόπου δράσης των διαφόρων φαρμάκων, καθώς και ο προσδιορισμός γονιδίων που εμπλέκονται στους μηχανισμούς αντίστασης και ευαισθησίας σε φάρμακα. Ανώτερος σκοπός όλων των παραπάνω η καθιέρωση της εξατομικευμένης θεραπευτικής προσέγγισης των ασθενών με ΚΠ συμβάλλοντας στην ουσιαστική αύξηση της επιβίωσής τους. Η μέθοδος του EBC χρήζει περαιτέρω αξιολόγησης, στο πλαίσιο καλά σχεδιασμένων κλινικών μελετών προκειμένου να αποτελέσει ένα ακόμη όπλο στα χέρια του θεράποντα ιατρού στην καταπολέμηση του καρκίνου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**ΣΚΟΠΟΣ:** Η συλλογή του EBC αποτελεί μία μη επεμβατική μέθοδο για τη μελέτη βιολογικών δεικτών σε ασθενείς με πνευμονικές παθήσεις. Σκοπός της μελέτης ήταν η ανίχνευση στο EBC και στον ορό ασθενών με ΚΠ του TNF- $\alpha$ , VEGF και του 8-ισοπροστανίου μορίων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση και η ανάδειξη της κλινικής τους αξίας.

**ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ:** Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 60 ασθενείς με πρωτοπαθή ΚΠ ( 55 άνδρες και 5 γυναίκες , μέσης ηλικίας  $62.73 \pm 0.86$  έτη) και 30 υγιείς μάρτυρες. Η λήψη του EBC πραγματοποιήθηκε μέσω μίας συσκευής (Ecoscreen, Jaeger, Germany) και για την μέτρηση των επιπέδων των βιοχημικών δεικτών τόσο στον ορό όσο και στο EBC χρησιμοποιήθηκε ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA.

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:** Τα επίπεδα του TNF- $\alpha$  κατά τη διάγνωση ήταν αυξημένα τόσο στο EBC όσο και στον ορό των ασθενών με ΚΠ σε σχέση με αυτά των υγιών μαρτύρων ( $p < 0.0001$ ,  $p < 0,0004$  αντίστοιχα). Ανάλογο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και για τις τιμές του VEGF οι οποίες βρέθηκαν αυξημένες στους ασθενείς με ΚΠ τόσο στο EBC όσο και στον ορό σε σχέση με αυτές των υγιών μαρτύρων ( $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0001$  αντίστοιχα). Αντίθετα, μόνο στον ορό παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών του 8-ισοπροστανίου των ασθενών έναντι των υγιών μαρτύρων ( $p < 0,0001$ ), όχι όμως και στο EBC. Επιπλέον, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των τιμών του 8-ισοπροστανίου στα δύο βιολογικά υλικά ( $p = 0.01$ ,  $r = 0.329$ ).

Οι τιμές των βιοχημικών δεικτών στο EBC δεν μεταβλήθηκαν στατιστικά σημαντικά μετά τη χορήγηση ΧΜΘ σε σχέση με τις τιμές κατά τη διάγνωση. Ωστόσο, στον ορό παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση μόνο των επιπέδων του 8-ισοπροστανίου μετά την ΧΜΘ ( $p < 0.0001$ ). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση των δεικτών με τη συνολική επιβίωση των ασθενών και στα δύο υλικά.

**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:** Ο TNF- $\alpha$ , ο VEGF και το 8-ισοπροστανίο ανιχνεύτηκαν για πρώτη φορά στο EBC ασθενών με ΚΠ που έλαβαν ΧΜΘ. Οι ασθενείς με

καρκίνο του πνεύμονα βρέθηκαν να έχουν αυξημένα επίπεδα TNF-α και VEGF τόσο στο συμπύκνωμα όσο και στον ορό ενώ το 8-ισοπροσάνιο βρέθηκε αυξημένο μόνο στον ορό. Η συλλογή του EBC θα μπορούσε να αποτελέσει μία χρήσιμη, μη επεμβατική μέθοδο μελέτης βιολογικών δεικτών για την πρόωμη διάγνωση και παρακολούθηση ασθενών με ΚΠ ωστόσο χρήζει περαιτέρω αξιολόγησης.

## ABSTRACT

**PURPOSE:** The aim of the present study was to evaluate the levels of VEGF, 8-isoprostane and TNF- $\alpha$  in EBC and serum of patients with primary lung cancer, in order to evaluate their possible diagnostic and prognostic role. Furthermore, associations between VEGF, 8-isoprostane and TNF- $\alpha$  levels in EBC and serum with clinicopathologic factors were investigated.

**MATERIAL & METHODS:** We enrolled 60 patients with lung cancer (55 male and 5 female, mean age  $62.73 \pm 0.86$  years) and 30 age and gender-matched healthy individuals as controls. EBC and serum were collected before and after chemotherapy. TNF- $\alpha$ , VEGF and 8-isoprostane levels in EBC and serum were analyzed by an immunoenzymatic method (ELISA).

**RESULTS:** A statistically significant difference was observed between lung cancer patients and the control group regarding the values of TNF- $\alpha$ , both in EBC ( $p < 0.0001$ ) and serum ( $p < 0.0004$ ). In addition, levels of VEGF were higher in lung cancer patients than in controls ( $p < 0.0001$ ) so as serum levels ( $p < 0.0001$ ). No differences were observed in 8-isoprostane in EBC between lung cancer patients and controls. In contrast, serum 8-isoprostane levels were higher in lung cancer patients compared to controls ( $p < 0.0001$ ). A statistically significant correlation was also observed between EBC and serum values of 8-isoprostane ( $p = 0.01$ ,  $r = 0.329$ ). None of the biomarkers presented a statistically significant alteration of concentration levels in EBC after the chemotherapy. Nevertheless a statistically significant increase was observed at the levels of serum 8-isoprostane after the chemotherapy ( $p < 0.0001$ ). There was no significant correlation with overall survival for any biomarker in both biological materials.

**CONCLUSIONS:** In conclusion, we have shown that TNF- $\alpha$ , VEGF and 8-isoprostane were detected for the first time in EBC of lung cancer patients. Both in EBC and serum, increased TNF- $\alpha$  and VEGF levels were observed in lung cancer patients, whereas increased levels of 8-isoprostane were observed only in serum. These findings suggest that EBC could provide a simple, non invasive and economic method of monitoring biomarkers in

patients with lung cancer. Further longitudinal studies are warranted for the evaluation of the prognostic role of these biomarkers in lung cancer.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*;46(4):765-81.
2. Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007;132(3 Suppl):29S-55S.
3. Brambilla E, Lantuejoul S, Sturm N. [Classification and pathogenesis of lung carcinoma]. *Rev Prat* 2003;53(7):714-20.
4. Schneider BJ. Non-small cell lung cancer staging: proposed revisions to the TNM system. *Cancer Imaging* 2008;8:181-5.
5. Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58(2):71-96.
6. Hirsch FR, Fischer JR, Niklinski J, Zochbauer-Muller S. Future developments in the treatment of lung cancer. *Lung Cancer* 2002;38 Suppl 3:S81-5.
7. Ahrendt SA, Hu Y, Buta M, *et al.* p53 mutations and survival in stage I non-small-cell lung cancer: results of a prospective study. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(13):961-70.
8. Yin Y, Solomon G, Deng C, Barrett JC. Differential regulation of p21 by p53 and Rb in cellular response to oxidative stress. *Mol Carcinog* 1999;24(1):15-24.
9. Mantovani G, Maccio A, Pisano M, *et al.* Tumor-associated lympho-monocytes from neoplastic effusions are immunologically defective in comparison with patient autologous PBMCs but are capable of releasing high amounts of various cytokines. *Int J Cancer* 1997;71(5):724-31.
10. Chouaib S, Asselin-Paturel C, Mami-Chouaib F, Caignard A, Blay JY. The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunol Today* 1997;18(10):493-7.
11. Utsumi K, Takai Y, Tada T, Ohzeki S, Fujiwara H, Hamaoka T. Enhanced production of IL-6 in tumor-bearing mice and determination of cells responsible for its augmented production. *J Immunol* 1990;145(1):397-403.
12. Yamaguchi T, Kimura H, Yokota S, *et al.* Effect of IL-6 elevation in malignant pleural effusion on hyperfibrinogenemia in lung cancer patients. *Jpn J Clin Oncol* 2000;30(2):53-8.
13. Joseph SB, Miner KT, Croft M. Augmentation of naive, Th1 and Th2 effector CD4 responses by IL-6, IL-1 and TNF. *Eur J Immunol* 1998;28(1):277-89.
14. Wang X, Lin Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacol Sin* 2008;29(11):1275-88.
15. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14(21):6735-41.
16. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, *et al.* Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999;284(5422):1994-8.
17. Zieba M, Nowak D, Suwalski M, *et al.* Enhanced lipid peroxidation in cancer tissue homogenates in non-small cell lung cancer. *Monaldi Arch Chest Dis* 2001;56(2):110-4.
18. Gackowski D, Kowalewski J, Siomek A, Olinski R. Oxidative DNA damage and antioxidant vitamin level: comparison among lung cancer patients, healthy smokers and nonsmokers. *Int J Cancer* 2005;114(1):153-6.
19. Petruzzelli S, Hietanen E, Bartsch H, *et al.* Pulmonary lipid peroxidation in cigarette smokers and lung cancer patients. *Chest* 1990;98(4):930-5.
20. Beinert T, Binder D, Stuschke M, *et al.* [Oxidative pulmonary stress in cytoreductive therapy]. *Pneumologie* 2000;54(5):201-11.

21. Miguel F, Augusto AC, Gurgueira SA. Effect of acute vs chronic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress on antioxidant enzyme activities. *Free Radic Res* 2009;43(4):340-7.
22. Massion PP, Caprioli RM. Proteomic strategies for the characterization and the early detection of lung cancer. *J Thorac Oncol* 2006;1(9):1027-39.
23. Latterich M, Abramovitz M, Leyland-Jones B. Proteomics: new technologies and clinical applications. *Eur J Cancer* 2008;44(18):2737-41.
24. Jackman D, Pao W, Riely GJ, *et al.* Clinical definition of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*;28(2):357-60.
25. Kaminska J, Kowalska M, Kotowicz B, *et al.* Pretreatment serum levels of cytokines and cytokine receptors in patients with non-small cell lung cancer, and correlations with clinicopathological features and prognosis. M-CSF - an independent prognostic factor. *Oncology* 2006;70(2):115-25.
26. Derin D, Soydinc HO, Guney N, *et al.* Serum levels of apoptosis biomarkers, survivin and TNF-alpha in nonsmall cell lung cancer. *Lung Cancer* 2008;59(2):240-5.
27. Katsabeki-Katsafli A, Kerenidi T, Kostikas K, *et al.* Serum vascular endothelial growth factor is related to systemic oxidative stress in patients with lung cancer. *Lung Cancer* 2008;60(2):271-6.
28. Bremnes RM, Sirera R, Camps C. Circulating tumour-derived DNA and RNA markers in blood: a tool for early detection, diagnostics, and follow-up? *Lung Cancer* 2005;49(1):1-12.
29. Camps C, Sirera R, Bremnes R, *et al.* Is there a prognostic role of K-ras point mutations in the serum of patients with advanced non-small cell lung cancer? *Lung Cancer* 2005;50(3):339-46.
30. Jahr S, Hentze H, Englisch S, *et al.* DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 2001;61(4):1659-65.
31. Beinert T, Binder D, Oehm C, *et al.* Increased levels of vascular endothelial growth factor in bronchoalveolar lavage of patients with bronchial carcinoma effect of tumour activity and oxidative stress due to radio-chemotherapy? *Eur J Med Res* 1999;4(8):328-34.
32. Bando H, Brokelmann M, Toi M, *et al.* Immunodetection and quantification of vascular endothelial growth factor receptor-3 in human malignant tumor tissues. *Int J Cancer* 2004;111(2):184-91.
33. Georgiades G, Myrianthefs P, Venetsanou K, *et al.* Temperature and serum proinflammatory cytokine changes in patients with NSCLC after BAL. *Lung* 2003;181(1):35-47.
34. Saji H, Nakamura H, Awut I, *et al.* Significance of expression of TGF-beta in pulmonary metastasis in non-small cell lung cancer tissues. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2003;9(5):295-300.
35. Oshita F, Nomura I, Yamada K, Kato Y, Tanaka G, Noda K. Detection of K-ras mutations of bronchoalveolar lavage fluid cells aids the diagnosis of lung cancer in small pulmonary lesions. *Clin Cancer Res* 1999;5(3):617-20.
36. Carpagnano GE, Spanevello A, Curci C, *et al.* IL-2, TNF-alpha, and leptin: local versus systemic concentrations in NSCLC patients. *Oncol Res* 2007;16(8):375-81.
37. Ohta Y, Ohta N, Tamura M, *et al.* Vascular endothelial growth factor expression in airways of patients with lung cancer: a possible diagnostic tool of responsive angiogenic status on the host side. *Chest* 2002;121(5):1624-7.
38. Bach PB, Kelley MJ, Tate RC, McCrory DC. Screening for lung cancer: a review of the current literature. *Chest* 2003;123(1 Suppl):72S-82S.
39. Simpson JL, Wood LG, Gibson PG. Inflammatory mediators in exhaled breath, induced sputum and saliva. *Clin Exp Allergy* 2005;35(9):1180-5.



40. Bechtel JJ, Kelley WR, Petty TL, Patz DS, Saccomanno G. Outcome of 51 patients with roentgenographically occult lung cancer detected by sputum cytologic testing: a community hospital program. *Arch Intern Med* 1994;154(9):975-80.
41. Phillips M, Cataneo RN, Cummin AR, *et al.* Detection of lung cancer with volatile markers in the breath. *Chest* 2003;123(6):2115-23.
42. Pauling L, Robinson AB, Teranishi R, Cary P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68(10):2374-6.
43. Pitkanen OM, Hallman M, Andersson SM. Determination of ethane and pentane in free oxygen radical-induced lipid peroxidation. *Lipids* 1989;24(2):157-9.
44. Stone BG, Besse TJ, Duane WC, Evans CD, DeMaster EG. Effect of regulating cholesterol biosynthesis on breath isoprene excretion in men. *Lipids* 1993;28(8):705-8.
45. Terasaki Y, Akuta T, Terasaki M, *et al.* Guanine nitration in idiopathic pulmonary fibrosis and its implication for carcinogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174(6):665-73.
46. Masri FA, Comhair SA, Koeck T, *et al.* Abnormalities in nitric oxide and its derivatives in lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172(5):597-605.
47. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996;313 ( Pt 1):17-29.
48. Horvath I, Hunt J, Barnes PJ, *et al.* Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005;26(3):523-48.
49. Kharitonov SA, Barnes PJ. Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath. *Biomarkers* 2002;7(1):1-32.
50. Baldwin SR, Simon RH, Grum CM, Ketai LH, Boxer LA, Devall LJ. Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 1986;1(8471):11-4.
51. Antczak A, Nowak D, Shariati B, Krol M, Piasecka G, Kurmanowska Z. Increased hydrogen peroxide and thiobarbituric acid-reactive products in expired breath condensate of asthmatic patients. *Eur Respir J* 1997;10(6):1235-41.
52. Nowak D, Kasielski M, Antczak A, Pietras T, Bialasiewicz P. Increased content of thiobarbituric acid-reactive substances and hydrogen peroxide in the expired breath condensate of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease: no significant effect of cigarette smoking. *Respir Med* 1999;93(6):389-96.
53. Montuschi P, Corradi M, Ciabattini G, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(1):216-20.
54. Abba AA. Exhaled nitric oxide in diagnosis and management of respiratory diseases. *Ann Thorac Med* 2009;4(4):173-81.
55. Carpagnano GE, Resta O, Foschino-Barbaro MP, Gramiccioni E, Carpagnano F. Interleukin-6 is increased in breath condensate of patients with non-small cell lung cancer. *Int J Biol Markers* 2002;17(2):141-5.
56. Conrad DH, Goyette J, Thomas PS. Proteomics as a method for early detection of cancer: a review of proteomics, exhaled breath condensate, and lung cancer screening. *J Gen Intern Med* 2008;23 Suppl 1:78-84.
57. Kullmann T, Barta I, Csiszer E, Antus B, Horvath I. Differential cytokine pattern in the exhaled breath of patients with lung cancer. *Pathol Oncol Res* 2008;14(4):481-3.
58. Gessner C, Kuhn H, Toepfer K, Hammerschmidt S, Schauer J, Wirtz H. Detection of p53 gene mutations in exhaled breath condensate of non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 2004;43(2):215-22.

59. Ahrendt SA, Chow JT, Xu LH, *et al.* Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(4):332-9.
60. Gessner C. [Detection of mutations of the K-ras gene in condensed breath of patients with non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) as a possible noninvasive screening method]. *Pneumologie* 1998;52(7):426-7.
61. Carpagnano GE, Foschino-Barbaro MP, Mule G, *et al.* 3p microsatellite alterations in exhaled breath condensate from patients with non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172(6):738-44.
62. Carpagnano GE, Foschino-Barbaro MP, Spanevello A, *et al.* 3p microsatellite signature in exhaled breath condensate and tumor tissue of patients with lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177(3):337-41.
63. Paradiso A, Tommasi S, Pinto R, Carpagnano GE, Foschino-Barbaro MP. Exhaled breath condensate is not suitable to detect EGFR somatic mutations. *Eur Respir J* 2008;32(4):1126-7.
64. Horvath I, Lazar Z, Gyulai N, Kollai M, Losonczy G. Exhaled biomarkers in lung cancer. *Eur Respir J* 2009;34(1):261-75.
65. Wewel AR, Crusius JA, Gatzemeier U, *et al.* Time course of exhaled hydrogen peroxide and nitric oxide during chemotherapy. *Eur Respir J* 2006;27(5):1033-9.
66. Chan HP, Tran V, Lewis C, Thomas PS. Elevated levels of oxidative stress markers in exhaled breath condensate. *J Thorac Oncol* 2009;4(2):172-8.
67. Carpagnano GE, Foschino-Barbaro MP, Resta O, Gramiccioni E, Carpagnano F. Endothelin-1 is increased in the breath condensate of patients with non-small-cell lung cancer. *Oncology* 2004;66(3):180-4.
68. Gessner C, Rechner B, Hammerschmidt S, *et al.* Angiogenic markers in breath condensate identify non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2009;68(2):177-84
69. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 2000;50(3):184-95.
70. Tang P, Hung MC, Klostergaard J. Human pro-tumor necrosis factor is a homotrimer. *Biochemistry* 1996;35(25):8216-25.
71. Jiang Y, Cui L, Yie TA, Rom WN, Cheng H, Tchou-Wong KM. Inhibition of anchorage-independent growth and lung metastasis of A549 lung carcinoma cells by IkappaBbeta. *Oncogene* 2001;20(18):2254-63.
72. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003;3(9):745-56.
73. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003;10(1):45-65.
74. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002;296(5573):1634-5.
75. Wang L, Du F, Wang X. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell* 2008;133(4):693-703.
76. Gaur U, Aggarwal BB. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* 2003;66(8):1403-8.
77. Ziegler-Heitbrock HW. The biology of the monocyte system. *Eur J Cell Biol* 1989;49(1):1-12.
78. Klostergaard J, Leroux ME, Hung MC. Cellular models of macrophage tumoricidal effector mechanisms in vitro. Characterization of cytolytic responses to tumor necrosis factor and nitric oxide pathways in vitro. *J Immunol* 1991;147(8):2802-8.
79. Gerrard TL, Terz JJ, Kaplan AM. Cytotoxicity to tumor cells of monocytes from normal individuals and cancer patients. *Int J Cancer* 1980;26(5):585-93.

80. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72(9):3666-70.
81. Coffey RJ, Jr., Shipley GD, Moses HL. Production of transforming growth factors by human colon cancer lines. *Cancer Res* 1986;46(3):1164-9.
82. Torre-Amione G, Beauchamp RD, Koeppen H, *et al.* A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(4):1486-90.
83. Browning J, Ribolini A. Studies on the differing effects of tumor necrosis factor and lymphotoxin on the growth of several human tumor lines. *J Immunol* 1989;143(6):1859-67.
84. Shih CM, Lee YL, Chiou HL, *et al.* Association of TNF-alpha polymorphism with susceptibility to and severity of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2006;52(1):15-20.
85. Nabors LB, Suswam E, Huang Y, Yang X, Johnson MJ, King PH. Tumor necrosis factor alpha induces angiogenic factor up-regulation in malignant glioma cells: a role for RNA stabilization and HuR. *Cancer Res* 2003;63(14):4181-7.
86. Tomita Y, Yang X, Ishida Y, *et al.* Spontaneous regression of lung metastasis in the absence of tumor necrosis factor receptor p55. *Int J Cancer* 2004;112(6):927-33.
87. Montesano R, Soulie P, Eble JA, Carrozzino F. Tumour necrosis factor alpha confers an invasive, transformed phenotype on mammary epithelial cells. *J Cell Sci* 2005;118(Pt 15):3487-500.
88. Ziprin P, Ridgway PF, Pfistermuller KL, Peck DH, Darzi AW. ICAM-1 mediated tumor-mesothelial cell adhesion is modulated by IL-6 and TNF-alpha: a potential mechanism by which surgical trauma increases peritoneal metastases. *Cell Commun Adhes* 2003;10(3):141-54.
89. Nakagawa J, Saio M, Tamakawa N, *et al.* TNF expressed by tumor-associated macrophages, but not microglia, can eliminate glioma. *Int J Oncol* 2007;30(4):803-11.
90. Karin M, Lawrence T, Nizet V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* 2006;124(4):823-35.
91. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 1996;334(26):1717-25.
92. Beutler B, Bazzoni F. TNF, apoptosis and autoimmunity: a common thread? *Blood Cells Mol Dis* 1998;24(2):216-30.
93. Szlosarek PW, Grimshaw MJ, Kulbe H, *et al.* Expression and regulation of tumor necrosis factor alpha in normal and malignant ovarian epithelium. *Mol Cancer Ther* 2006;5(2):382-90.
94. Ferrajoli A, Keating MJ, Manshouri T, *et al.* The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100(4):1215-9.
95. Kayacan O, Karnak D, Beder S, *et al.* Impact of TNF-alpha and IL-6 levels on development of cachexia in newly diagnosed NSCLC patients. *Am J Clin Oncol* 2006;29(4):328-35.
96. Jungraithmayr W, Frings C, Zissel G, Prasse A, Passlick B, Stoelben E. Inflammatory markers in exhaled breath condensate following lung resection for bronchial carcinoma. *Respirology* 2008.
97. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18(1):4-25.
98. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999;77(7):527-43.

99. Senger DR, Van de Water L, Brown LF, *et al.* Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 1993;12(3-4):303-24.
100. Zeng H, Sanyal S, Mukhopadhyay D. Tyrosine residues 951 and 1059 of vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR) are essential for vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-induced endothelium migration and proliferation, respectively. *J Biol Chem* 2001;276(35):32714-9.
101. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, *et al.* Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001;7(5):575-83.
102. Eriksson U, Alitalo K. Structure, expression and receptor-binding properties of novel vascular endothelial growth factors. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999;237:41-57.
103. Das DK, Maulik N, Moraru, II. Gene expression in acute myocardial stress. Induction by hypoxia, ischemia, reperfusion, hyperthermia and oxidative stress. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27(1):181-93.
104. Rak J, Filmus J, Finkenzeller G, Grugel S, Marme D, Kerbel RS. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1995;14(4):263-77.
105. Udagawa T, Fernandez A, Achilles EG, Folkman J, D'Amato RJ. Persistence of microscopic human cancers in mice: alterations in the angiogenic balance accompanies loss of tumor dormancy. *Faseb J* 2002;16(11):1361-70.
106. Claffey KP, Robinson GS. Regulation of VEGF/VPF expression in tumor cells: consequences for tumor growth and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1996;15(2):165-76.
107. Soh EY, Sobhi SA, Wong MG, *et al.* Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines. *Surgery* 1996;120(6):944-7.
108. Fukumura D, Xu L, Chen Y, Gohongi T, Seed B, Jain RK. Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors *in vivo*. *Cancer Res* 2001;61(16):6020-4.
109. Gu JW, Brady AL, Anand V, Moore MC, Kelly WC, Adair TH. Adenosine upregulates VEGF expression in cultured myocardial vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1999;277(2 Pt 2):H595-602.
110. Jang JH, Surh YJ. Potentiation of cellular antioxidant capacity by Bcl-2: implications for its antiapoptotic function. *Biochem Pharmacol* 2003;66(8):1371-9.
111. Xia C, Meng Q, Liu LZ, Rojanasakul Y, Wang XR, Jiang BH. Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2007;67(22):10823-30.
112. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;189(2):824-31.
113. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003;3(6):401-10.
114. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86(3):353-64.
115. Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001;19(4):1207-25.
116. Axelson H, Fredlund E, Ovenberger M, Landberg G, Pahlman S. Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells--a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16(4-5):554-63.
117. Shimanuki Y, Takahashi K, Cui R, *et al.* Role of serum vascular endothelial growth factor in the prediction of angiogenesis and prognosis for non-small cell lung cancer. *Lung* 2005;183(1):29-42.

118. Imoto H, Osaki T, Taga S, Ohgami A, Ichiyoshi Y, Yasumoto K. Vascular endothelial growth factor expression in non-small-cell lung cancer: prognostic significance in squamous cell carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115(5):1007-14.
119. Takizawa H, Kondo K, Fujino H, *et al.* The balance of VEGF-C and VEGFR-3 mRNA is a predictor of lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2006;95(1):75-9.
120. Matsuyama W, Hashiguchi T, Mizoguchi A, *et al.* Serum levels of vascular endothelial growth factor dependent on the stage progression of lung cancer. *Chest* 2000;118(4):948-51.
121. Kaya A, Ciledag A, Gulbay BE, *et al.* The prognostic significance of vascular endothelial growth factor levels in sera of non-small cell lung cancer patients. *Respir Med* 2004;98(7):632-6.
122. Park SH, Lee SS. The relationship between serum VEGF concentration and prognosis of lung cancer. *Korean J Intern Med* 2003;18(4):207-11.
123. Tas F, Duranyildiz D, Oguz H, Camlica H, Yasasever V, Topuz E. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and bcl-2 levels in advanced stage non-small cell lung cancer. *Cancer Invest* 2006;24(6):576-80.
124. Choi JH, Kim HC, Lim HY, *et al.* Vascular endothelial growth factor in the serum of patients with non-small cell lung cancer: correlation with platelet and leukocyte counts. *Lung Cancer* 2001;33(2-3):171-9.
125. Tamura M, Oda M, Tsunozuka Y, *et al.* Chest CT and serum vascular endothelial growth factor-C level to diagnose lymph node metastasis in patients with primary non-small cell lung cancer. *Chest* 2004;126(2):342-6.
126. Naumnik W, Izycki T, Swidzinska E, Ossoliniska M, Chyczewska E. Serum levels of VEGF-C, VEGF-D, and sVEGF-R2 in patients with lung cancer during chemotherapy. *Oncol Res* 2007;16(9):445-51.
127. Saglam DA, Ursavas A, Karadag M, Yilmaztepe Oral A, Coskun F, Gozu RO. [The evaluation to relationship between serum vascular endothelial growth factor (VEGF) level, metastases and other tumor markers in patients with lung cancer]. *Tuberk Toraks* 2008;56(1):50-5.
128. Chakra M, Pujol JL, Lamy PJ, *et al.* Circulating serum vascular endothelial growth factor is not a prognostic factor of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2008;3(10):1119-26.
129. Rivard A, Berthou-Soulie L, Principe N, *et al.* Age-dependent defect in vascular endothelial growth factor expression is associated with reduced hypoxia-inducible factor 1 activity. *J Biol Chem* 2000;275(38):29643-7.
130. Tas F, Duranyildiz D, Soydinc HO, *et al.* Effect of maximum-tolerated doses and low-dose metronomic chemotherapy on serum vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 levels in patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008;61(5):721-5.
131. Dudek AZ, Mahaseth H. Circulating angiogenic cytokines in patients with advanced non-small cell lung cancer: correlation with treatment response and survival. *Cancer Invest* 2005;23(3):193-200.
132. Ustuner Z, Saip P, Yasasever V, *et al.* Prognostic and predictive value of vascular endothelial growth factor and its soluble receptors, VEGFR-1 and VEGFR-2 levels in the sera of small cell lung cancer patients. *Med Oncol* 2008;25(4):394-9.
133. Kido Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF) serum concentration changes during chemotherapy in patients with lung cancer. *Kurume Med J* 2001;48(1):43-7.
134. Bremnes RM, Camps C, Sirera R. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. *Lung Cancer* 2006;51(2):143-58.

135. Hasegawa Y, Takanashi S, Okudera K, *et al.* Vascular endothelial growth factor level as a prognostic determinant of small cell lung cancer in Japanese patients. *Intern Med* 2005;44(1):26-34.
136. Morrow JD, Roberts LJ, 2nd. The isoprostanes. Current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharmacol* 1996;51(1):1-9.
137. Roberts LJ, 2nd, Morrow JD. The isoprostanes: novel markers of lipid peroxidation and potential mediators of oxidant injury. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1995;23:219-24.
138. Feig DI, Sowers LC, Loeb LA. Reverse chemical mutagenesis: identification of the mutagenic lesions resulting from reactive oxygen species-mediated damage to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(14):6609-13.
139. Cerutti PA, Trump BF. Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. *Cancer Cells* 1991;3(1):1-7.
140. Janero DA, Cohen N, Burghardt B, Schaer BH. Novel 6-hydroxychroman-2-carbonitrile inhibitors of membrane peroxidative injury. *Biochem Pharmacol* 1990;40(3):551-8.
141. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:239-67.
142. Chung-man Ho J, Zheng S, Comhair SA, Farver C, Erzurum SC. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Res* 2001;61(23):8578-85.
143. Schenk H, Klein M, Erdbrugger W, Droge W, Schulze-Osthoff K. Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(5):1672-6.
144. Monte M, Davel LE, de Lustig ES. Inhibition of lymphocyte-induced angiogenesis by free radical scavengers. *Free Radic Biol Med* 1994;17(3):259-66.
145. Shaughnessy SG, Buchanan MR, Turple S, Richardson M, Orr FW. Walker carcinosarcoma cells damage endothelial cells by the generation of reactive oxygen species. *Am J Pathol* 1989;134(4):787-96.
146. Orr FW, Warner DJ. Effects of systemic complement activation and neutrophil-mediated pulmonary injury on the retention and metastasis of circulating cancer cells in mouse lungs. *Lab Invest* 1990;62(3):331-8.
147. Sasaki H, Fukuda S, Otani H, *et al.* Hypoxic preconditioning triggers myocardial angiogenesis: a novel approach to enhance contractile functional reserve in rat with myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34(3):335-48.
148. Rak J, Kerbel RS. Ras regulation of vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Methods Enzymol* 2001;333:267-83.
149. Kumar S, Singh V, Chandra S, Agarwal D, Mohan A, Guleria R. Serum vascular endothelial growth factor is related to systemic oxidative stress in patients with lung cancer. *Lung Cancer* 2009;65(2):254; author reply -5.
150. Ambs S, Bennett WP, Merriam WG, *et al.* Vascular endothelial growth factor and nitric oxide synthase expression in human lung cancer and the relation to p53. *Br J Cancer* 1998;78(2):233-9.
151. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990;9(6):515-40.
152. Kaynar H, Meral M, Turhan H, Keles M, Celik G, Akcay F. Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 2005;227(2):133-9.

153. Erhola M, Nieminen MM, Kellokumpu-Lehtinen P, Metsa-Ketela T, Poussa T, Alho H. Plasma peroxy radical trapping capacity in lung cancer patients: a case-control study. *Free Radic Res* 1997;26(5):439-47.
154. Look MP, Musch E. Lipid peroxides in the polychemotherapy of cancer patients. *Chemotherapy* 1994;40(1):8-15.
155. de Castro J, Hernandez-Hernandez A, Rodriguez MC, Llanillo M, Sanchez-Yague J. Comparison of changes in erythrocyte and platelet fatty acid composition and protein oxidation in advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Invest* 2006;24(4):339-45.
156. Mahdavi R, Faramarzi E, Seyedrezazadeh E, Mohammad-Zadeh M, Pourmoghaddam M. Evaluation of oxidative stress, antioxidant status and serum vitamin C levels in cancer patients. *Biol Trace Elem Res* 2009;130(1):1-6.
157. Crohns M, Liippo K, Erhola M, *et al.* Concurrent decline of several antioxidants and markers of oxidative stress during combination chemotherapy for small cell lung cancer. *Clin Biochem* 2009;42(12):1236-45.
158. Nowak D, Janczak M. Effect of chemotherapy on serum end-products of lipid peroxidation in patients with small cell lung cancer: association with treatment results. *Respir Med* 2006;100(1):157-66.
159. Gencer M, Ceylan E, Aksoy N, Uzun K. Association of serum reactive oxygen metabolite levels with different histopathological types of lung cancer. *Respiration* 2006;73(4):520-4.
160. Esme H, Cemek M, Sezer M, *et al.* High levels of oxidative stress in patients with advanced lung cancer. *Respirology* 2008;13(1):112-6.
161. La Torre F, Orlando A, Silipigni A, Giacobello T, Pergolizzi S, Aragona M. [Increase of oxygen free radicals and their derivatives in chemo- and radiation treated neoplasm patients]. *Minerva Med* 1997;88(4):121-6.
162. Beinert T, Binder D, Oehm C, *et al.* Further evidence for oxidant-induced vascular endothelial growth factor up-regulation in the bronchoalveolar lavage fluid of lung cancer patients undergoing radio-chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000;126(6):352-6.
163. Shahid SK, Kharitonov SA, Wilson NM, Bush A, Barnes PJ. Exhaled 8-isoprostane in childhood asthma. *Respir Res* 2005;6:79.
164. Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattoni G, *et al.* Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis. *Thorax* 2000;55(3):205-9.
165. Psathakis K, Papatheodorou G, Plataki M, *et al.* 8-Isoprostane, a marker of oxidative stress, is increased in the expired breath condensate of patients with pulmonary sarcoidosis. *Chest* 2004;125(3):1005-11.
166. Ko FW, Lau CY, Leung TF, Wong GW, Lam CW, Hui DS. Exhaled breath condensate levels of 8-isoprostane, growth related oncogene alpha and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2006;100(4):630-8.
167. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1(8476):307-10.
168. Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, *et al.* Tumour necrosis factor-alpha: prognostic role and relationship with interleukin-8 and endothelin-1 in non-small cell lung cancer. *Int J Mol Med* 2006;17(5):887-92.
169. Kuhn H, Hammerschmidt S, Wirtz H. Targeting tumorangiogenesis in lung cancer by suppression of VEGF and its receptor - results from clinical trials and novel experimental approaches. *Curr Med Chem* 2007;14(30):3157-65.
170. Folkman J, Hanahan D. Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. *Princess Takamatsu Symp* 1991;22:339-47.

171. Herbst RS, Onn A, Sandler A. Angiogenesis and lung cancer: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 2005;23(14):3243-56.
172. Yano S, Nishioka Y, Goto H, Sone S. Molecular mechanisms of angiogenesis in non-small cell lung cancer, and therapeutics targeting related molecules. *Cancer Sci* 2003;94(6):479-85.
173. Merrick DT, Haney J, Petrunich S, *et al.* Overexpression of vascular endothelial growth factor and its receptors in bronchial dysplasia demonstrated by quantitative RT-PCR analysis. *Lung Cancer* 2005;48(1):31-45.
174. Chan HP, Lewis C, Thomas PS. Exhaled breath analysis: Novel approach for early detection of lung cancer. *Lung Cancer* 2008.
175. Boldrini L, Calcinai A, Samaritani E, *et al.* Tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta are significantly associated with better prognosis in non-small cell lung carcinoma: putative relation with BCL-2-mediated neovascularization. *Br J Cancer* 2000;83(4):480-6.
176. Mantovani G, Maccio A, Lai P, *et al.* Results of a dose-intense phase 1 study of a combination chemotherapy regimen with cisplatin and epidoxorubicin including medroxyprogesterone acetate and recombinant interleukin-2 in patients with inoperable primary lung cancer. *J Immunother* 2000;23(2):267-74.
177. Tas F, Duranyildiz D, Oguz H, Camlica H, Yasasever V, Topuz E. Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and interleukin-8 (IL-8) levels in small cell lung cancer. *Cancer Invest* 2006;24(5):492-6.
178. De Vita F, Orditura M, Auriemma A, Infusino S, Catalano G. Serum concentrations of proinflammatory cytokines in advanced non small cell lung cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res* 1998;17(4):413-7.
179. Bansal AS, Bruce J, Devine PL, Scells B, Zimmermann PV. Serum cytokines and tumour markers in patients with non-small cell carcinoma of the lung. *Dis Markers* 1997;13(3):195-9.
180. Tas F, Duranyildiz D, Argon A, *et al.* Serum levels of leptin and proinflammatory cytokines in advanced-stage non-small cell lung cancer. *Med Oncol* 2005;22(4):353-8.
181. Winegarden JD, Mauer AM, Gajewski TF, *et al.* A phase II study of bryostatin-1 and paclitaxel in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2003;39(2):191-6.
182. De Vita F, Orditura M, Infusino S, Auriemma A, Catalano G. Increased serum levels of tumor necrosis factor-alpha are correlated to soluble intercellular adhesion molecule-1 concentrations in non-small cell lung cancer patients. *Int J Mol Med* 1998;1(3):605-8.
183. Papaioannou AI, Kostikas K, Kollia P, Gourgoulialis KI. Clinical implications for vascular endothelial growth factor in the lung: friend or foe? *Respir Res* 2006;7:128.
184. Brattstrom D, Bergqvist M, Hesselius P, *et al.* Elevated preoperative serum levels of angiogenic cytokines correlate to larger primary tumours and poorer survival in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 2002;37(1):57-63.
185. Cheng D, Lee YC, Rogers JT, *et al.* Vascular endothelial growth factor level correlates with transforming growth factor-beta isoform levels in pleural effusions. *Chest* 2000;118(6):1747-53.
186. Cohen AJ, Skidgel RA, Gilman LB, *et al.* Carboxypeptidase M. Variable expression in normal human lung and inactivation in lung cancer. *Chest* 1997;111(6 Suppl):149S.
187. Takigawa N, Segawa Y, Fujimoto N, Hotta K, Eguchi K. Elevated vascular endothelial growth factor levels in sera of patients with lung cancer. *Anticancer Res* 1998;18(2B):1251-4.



188. Swidzinska E, Ossolinska M, Naumnik W, Izycki T, Kucejko W, Chyczewska E. [Circulating VEGF and its soluble receptor sVEGFR-1 in patients with lung cancer]. *Pneumonol Alergol Pol* 2004;72(9-10):389-94.
189. Yoshimoto A, Kasahara K, Nishio M, *et al.* Changes in angiogenic growth factor levels after gefitinib treatment in non-small cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2005;35(5):233-8.
190. Laack E, Scheffler A, Burkholder I, *et al.* Pretreatment vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) serum levels in patients with metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 2005;50(1):51-8.
191. Koutsokera A, Loukides S, Gourgoulisanis KI, Kostikas K. Biomarkers in the exhaled breath condensate of healthy adults: mapping the path towards reference values. *Curr Med Chem* 2008;15(6):620-30.
192. Montuschi P, Collins JV, Ciabattini G, *et al.* Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(3 Pt 1):1175-7.
193. Kostikas K, Papatheodorou G, Psathakis K, Panagou P, Loukides S. Prostaglandin E2 in the expired breath condensate of patients with asthma. *Eur Respir J* 2003;22(5):743-7.
194. Zieba M, Suwalski M, Kwiatkowska S, *et al.* Comparison of hydrogen peroxide generation and the content of lipid peroxidation products in lung cancer tissue and pulmonary parenchyma. *Respir Med* 2000;94(8):800-5.
195. Caliskan-Can E, Firat H, Ardic S, Simsek B, Torun M, Yardim-Akaydin S. Increased levels of 8-hydroxydeoxyguanosine and its relationship with lipid peroxidation and antioxidant vitamins in lung cancer. *Clin Chem Lab Med* 2008;46(1):107-12.
196. Montuschi P, Ragazzoni E, Valente S, *et al.* Validation of 8-isoprostane and prostaglandin E(2) measurements in exhaled breath condensate. *Inflamm Res* 2003;52(12):502-7.
197. Russo G, Claudio PP, Fu Y, *et al.* pRB2/p130 target genes in non-small lung cancer cells identified by microarray analysis. *Oncogene* 2003;22(44):6959-69.
198. Kang CH, Jang BG, Kim DW, *et al.* The prognostic significance of ERCC1, BRCA1, XRCC1, and betaIII-tubulin expression in patients with non-small cell lung cancer treated by platinum- and taxane-based neoadjuvant chemotherapy and surgical resection. *Lung Cancer* 2009.