



Η αξία της 8-υδροξυ-δεοξυγουανοσίνης (8-OHdG) ως βιοδείκτης στους ασθενείς που υπεβλήθησαν σε ακτινοθεραπεία στον ΜΜΚΠ

Ορφανάκος Κυριάκος ^{1,3}, Αλιφιέρης Κωνσταντίνος Ε. ^{2,3}, Βερίγος Εμμανουήλ Κ. ⁴, Δεληγιώργη Μαρία Β. ³, Βερίγος Κοσμάς Ε. ¹, Παναγιωτίδης Μιχάλης Ι. ⁵, Νικολάου Μιχαήλ ³, Δαλέζης Παναγιώτης ³, Τραφαλής Δημήτριος Θ. ³

1. Τμήμα Ακτινοθεραπείας και Στερεοτακτικής Ακτινοχειρουργικής, 401 Γενικό Στρατιωτικό Νοσοκομείο, 11525 Αθήνα, Ελλάδα 2. Τμήμα Χειρουργικής Ηπατοχοληφόρων και Μεταμοσχεύσεων, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο St. Vincent, D04 T6F4 Δουβλίνο, Ιρλανδία 3. Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 11527 Αθήνα, Ελλάδα 4. Τμήμα Ακτινοθεραπευτικής Ογκολογίας ΓΑΟΝΑ "Ο Άγιος Σάββας", 11522 Αθήνα, Ελλάδα 5. Τμήμα Γενετικής Καρκίνου, Θεραπευτικής & Υπερδομικής Παθολογίας, Ινστιτούτο Νευρολογίας & Γενετικής Κύπρου, Λευκωσία 2371, Κύπρος

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ιονίζουσα ακτινοβολία συνδέεται στενά με άμεση ή έμμεση βλάβη του DNA, όπως με την παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), τα οποία με τη σειρά τους παράγουν προϊόντα βλάβης του DNA, όπως η 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνη (8-OHdG).

Σε αυτή τη μελέτη, στοχεύσαμε να διερευνήσουμε το σχηματισμό 8-OHdG μετά από ακτινοβολήση σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο (NSCLC) και τη χρήση της ως βιοδείκτη.

Συμπεριλήφθηκαν δεκαέξι ασθενείς με πλακώδη και τριάντα έξι ασθενείς με μη πλακώδη παθολογία. Πραγματοποιήθηκε μια ενζυμική-συνδεδεμένη-ανανοσοφητική δοκιμασία (ELISA) πριν και μετά την ακτινοβολία.

Επιβεβαιώθηκε μια δοσοεξαρτώμενη σχέση: συγκεντρώσεις πλάσματος 8-OHdG, αυξημένες στο σύνολο των ασθενών με ΜΜΚΠ και συγκεκριμένα με γραμμική συσχέτιση στη μη πλακώδη παθολογία, στην πλακώδη ιστολογία, μετά από μια αρχική αύξηση, ακολούθησε σημαντική μείωση μετά από δόση ακτινοβολίας 20 Gy. Ο συνολικός ακτινοβολημένος όγκος καρκινικού όγκου πριν από τη θεραπεία (cm^3) συσχετίστηκε θετικά με τα επίπεδα 8-OHdG σε ασθενείς με πλακώδη ιστολογία. Κατά τη γραφική παράσταση της συγκέντρωσης πλάσματος 8-OHdG σε δόση ακτινοβολίας 10 Gy στην αρχική τιμή, η AUC ήταν 0,873 (95% CI 0,614–0,984), $p < 0,0001$, με μια σχετική τιμή κριτηρίου >1378 ως αποκοπή (ευαισθησία 72%, ειδικότητα 100%). Κατά την κανονικοποίηση αυτής της αναλογίας σε BSA, η σχετική τιμή αποκοπής κριτηρίου ήταν >708 (ευαισθησία 100%, ειδικότητα 80%).

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ

Κυριάκος Ορφανάκος
Επικουρικός Επιμελητής Β΄
Τμήμα Ακτινοθεραπείας και Στερεοτακτικής Ακτινοχειρουργικής, 401 ΓΣΝΑ
Email: kiriakosorfanakos@gmail.com
Phone: 6942809250

INTRODUCTION

Η ακτινοθεραπεία είναι η μορφή θεραπείας που χρησιμοποιείται σε ασθενείς με καρκίνο που περιλαμβάνει ιονίζουσα ακτινοβολία και συνηθέστερα με τη μορφή ακτινοβολίας Χ και γ [1]. Η δόση εξωτερικής ακτινοβολίας δέσμης (EBRT), δίνεται συνήθως σε κλάσματα λόγω του αυξημένου ηλεκτρικού δυναμικού (4–20 mV) και συνεπώς του συνοδού τραυματισμού στον περιβάλλοντα φυσιολογικό ιστό[2-3]. Η ακτινοθεραπεία έχει άμεσες ή έμμεσες επιδράσεις σε όλα τα ζωντανά κύτταρα. Έτσι, άτομα και μόρια που προσβάλλονται από ακτινοβολία απελευθερώνουν ηλεκτρόνια και παράγουν ιόντα που σχηματίζουν αντιδραστικά είδη οξυγόνου και αζώτου [4] .

Το νερό είναι μια κύρια πηγή ενεργών ειδών οξυγόνου (ROS) όπως τα ανιόντα υπεροξειδίου ($\text{O}_2 \bullet^-$), οι ρίζες υδροξυλίου ($\text{HO} \bullet$) και το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) [4]. Η πιο κοινή βλάβη βάσης που προκαλείται από το ROS είναι στη γουανίνη και μια ομάδα υδροξυλίου προστίθεται στην όγδοη θέση της βάσης πουρίνης, οδηγώντας στον σχηματισμό της 8-υδροξυ-δεοξυγουανοσίνης (8-OHdG). Λόγω της σημαντικής μεταλλαξογόνου δράσης του, η 8-OHdG είναι η πιο μελετημένη οξειδωτική βλάβη του DNA. Για το σκοπό αυτό, αυτή η κυρίαρχη μορφή της αλλοίωσης των ελεύθερων ριζών του DNA μετριέται συχνά ως ένδειξη της έκτασης της βλάβης του DNA και του οξειδωτικού στρες [5].

Το ερώτημα παραμένει εάν το 8-OHdG είναι ένας πολλά υποσχόμενος βιοδείκτης οξειδωτικής βλάβης του DNA ή/και προγνωστικής σημασίας μετά από ακτινοθεραπεία. Σε αυτή τη μελέτη, στοχεύουμε να διερευνήσουμε τον σχηματισμό 8-OHdG, τη μέτρησή του σε δείγματα αίματος και την πιθανή συσχέτισή του με τη δόση ακτινοβολίας σε ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΜΚΠ)

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Σε αυτή τη μελέτη, τα κριτήρια ένταξης απαιτούσαν ασθενείς ηλικίας άνω των 18 ετών που είχαν

- Κυτταρολογικά ή ιστολογικά και ακτινογραφικά επιβεβαιωμένο ΜΜΚΠ κατά τη διάγνωση,
- Κατάσταση νόσου μετρήσιμη με Κριτήρια Αξιολόγησης Απόκρισης σε Στερεούς Όγκους (RECIST) έκδοση 1.1
- Στάδιο της νόσου IIIA-IIIC όπως αναφέρεται από τα κριτήρια TNM 8η έκδοση
- Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) PS 0–2
- Στάδιο III ανεγχείρητο καρκίνο του πνεύμονα με ενδείξεις για ακτινοθεραπεία.

Πρόγραμμα χημειοθεραπείας: Το σχήμα χημειοθεραπείας περιλάμβανε συνδυασμό ντοσεταξέλης και καρβοπλατίνης. Η χημειοθεραπεία επιτρεπόταν πριν και/ή μετά την ακτινοβολία αλλά όχι ταυτόχρονα με την ακτινοθεραπεία. Ντοσεταξέλ 75 mg/m² και καρβοπλατίνη AUC 6 χορηγήθηκαν κάθε 3 εβδομάδες.

Πρόγραμμα ακτινοθεραπείας: Πραγματοποιήθηκε τρισδιάστατος σύμμορφος σχεδιασμός ακτινοβολίας προκειμένου να παρέχεται τεχνική παροχής διαμορφούμενης έντασης ακτινοθεραπείας (IMRT) με χρήση φωτονίων έως και 6-MV. Η πορεία θεραπείας με ακτινοβολία που ακολουθήθηκε ήταν μια ημερήσια δόση κλάσματος 2 Gy για ένα σύνολο 30 κλασμάτων. Η συνολική δόση που χορηγήθηκε στον όγκο και στις εμπλεκόμενες ομάδες λεμφαδένων ήταν 60 Gy.

Μέτρηση 8-OHdG: Φυγοκέντρηση δειγμάτων αίματος, απομόνωση ορού αίματος και χρήση OxiSelect™ Oxidative DNA Damage ELISA (8-OHdG Quantitation)

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η συγκέντρωση 8-OHdG (ng/mL) στα δείγματα πλάσματος ασθενών που έλαβαν ακτινοθεραπεία ποσοτικοποιήθηκε σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη 8-OHdG . Επιπλέον, σύμφωνα με το Σχήμα 1, εκτελέστηκαν οι δύο καμπύλες προσαρμογής 8-OHdG χρησιμοποιώντας τις εξισώσεις των γραμμικών και αλλομετρικών μοντέλων.

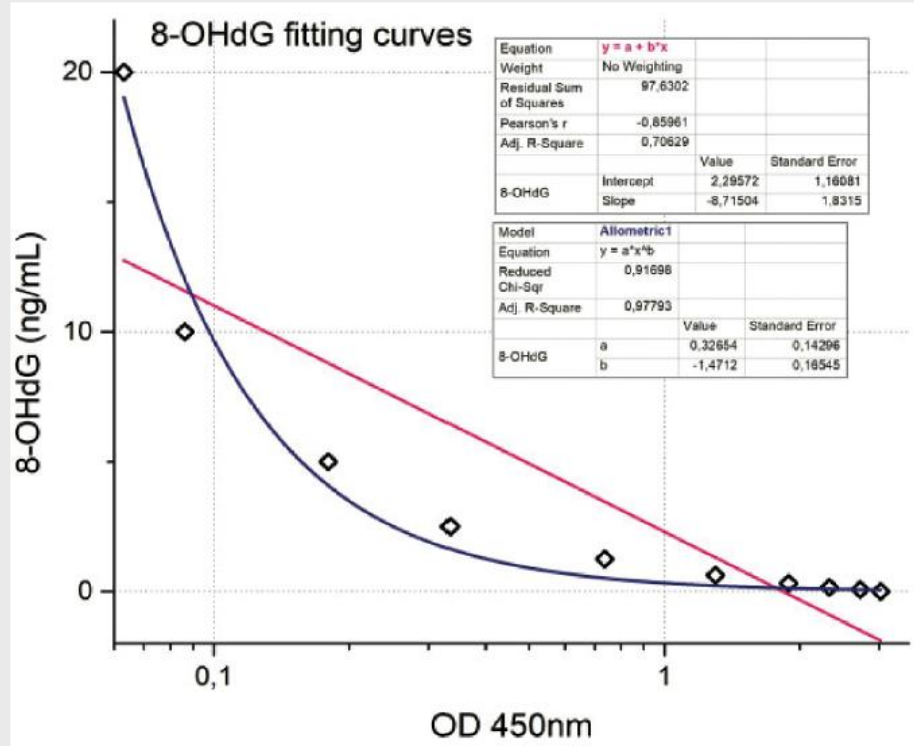
Καταδείχθηκε σημαντική αύξηση στις μέσες συγκεντρώσεις πλάσματος 8-OHdG στο σύνολο των ασθενών που ακτινοβολήθηκαν με ΜΜΚΠ ($p < 0,01$). Παρουσιάστηκε ισχυρή συσχέτιση των αυξήσεων 8-OHdG με τη δόση ακτινοβολίας (δείκτης συσχέτισης $r = 0,975$, διαστήματα εμπιστοσύνης 95%)

Επιπλέον, καταδείχθηκε σημαντική αύξηση στις συγκεντρώσεις πλάσματος 8-OHdG σε ΜΜΚΠ με μη πλακώδη ιστολογία, ειδικά μετά από δόσεις ακτινοβολίας 20 Gy, είτε με το μοντέλο γραμμικής προσαρμογής ή το μοντέλο λογιστικής προσαρμογής (Adj. R-square = 0,84), σε διαστήματα εμπιστοσύνης (CIs) 0,95.

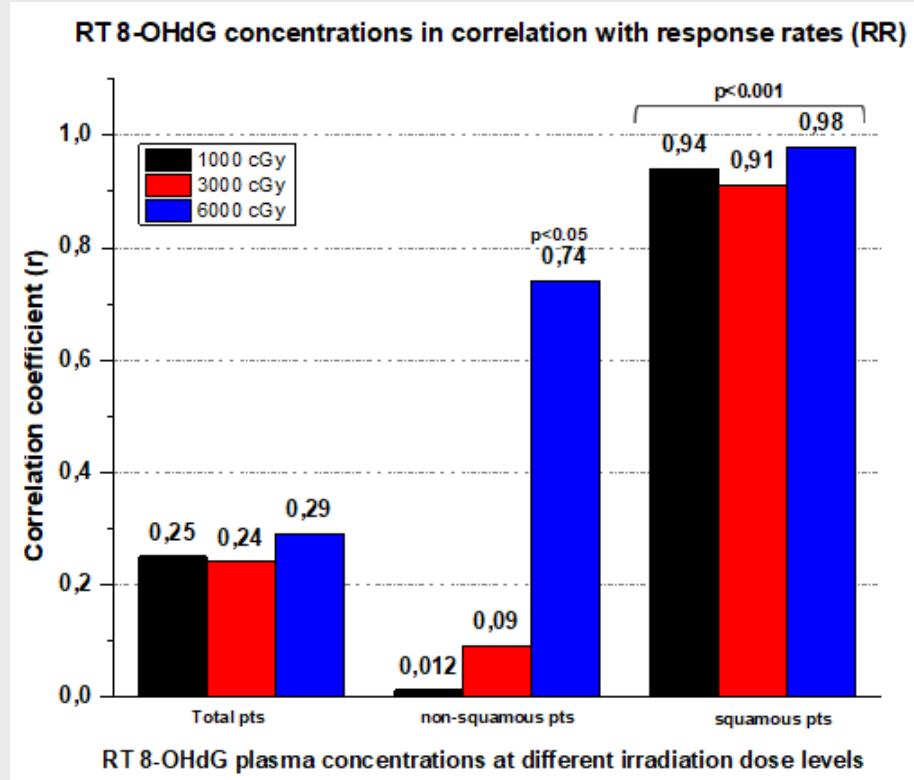
Από την άλλη πλευρά, σε ασθενείς με πλακώδη ιστολογία μετά από αρχική σημαντική αύξηση ($p < 0,01$) των συγκεντρώσεων 8-OHdG στο πλάσμα, ειδικά μετά από 10–15 Gy, σημαντική μείωση ($p < 0,01$) μετά από 20 Gy παρατηρήθηκε δόση ακτινοβολίας, όπως φάνηκε με το μοντέλο LogNormal (Σχήματα 2-3)

Μια πολύ ασθενής θετική συσχέτιση (δείκτης συσχέτισης $r = 0,07$) παρουσιάστηκε μεταξύ των (%) μεταβολών της συγκέντρωσης πλάσματος 8-OHdG μετά την ακτινοθεραπεία (μετά-RT) και της κατάστασης του ποσοστού ανταπόκρισης του όγκου στους 52 ασθενείς με ΜΜΚΠ που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη

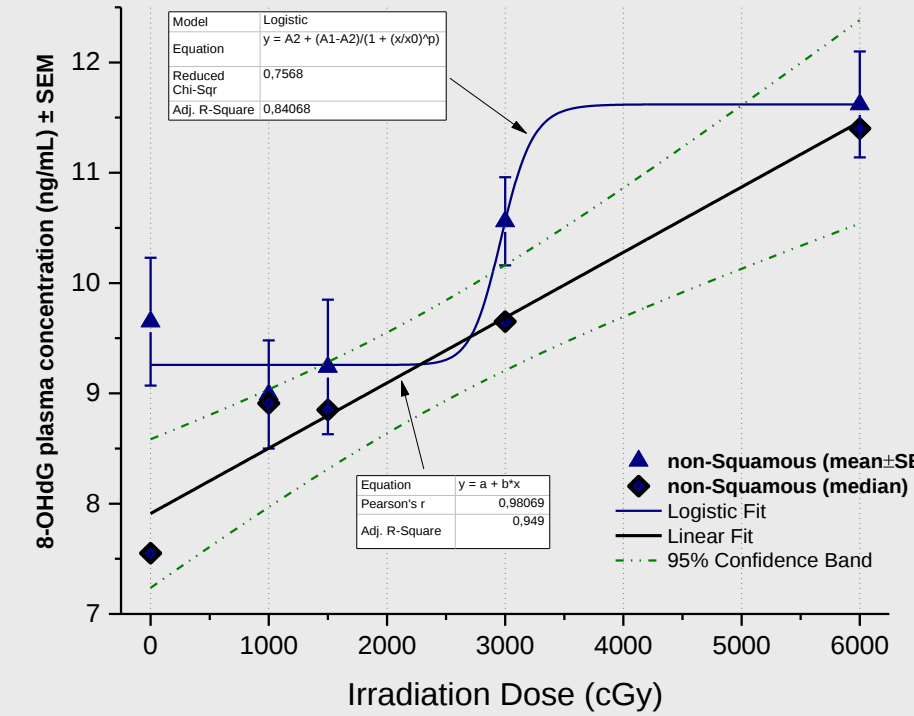
Εμφανίστηκε επίσης μια ασθενής θετική συσχέτιση μεταξύ των (%) μεταβολών της συγκέντρωσης πλάσματος μετά την RT 8-OHdG που κανονικοποιήθηκαν στην αντίστοιχη BSA και της κατάστασης του ρυθμού απόκρισης του όγκου στους 52 ασθενείς με ΜΜΚΠ.



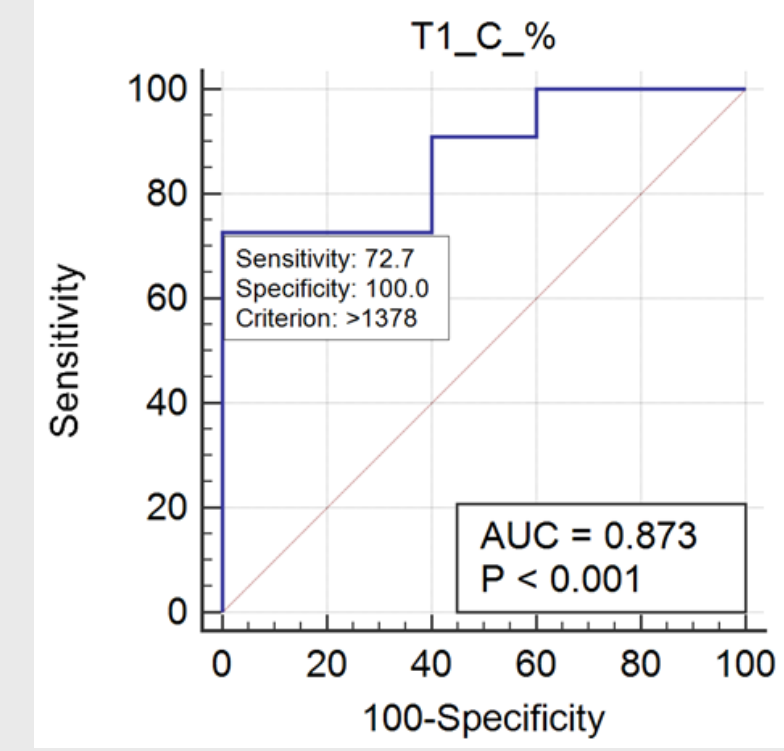
Σχήμα 1. Καμπύλη προσαρμογής 8-OHdG.



Σχήμα 4.Συσχέτιση των επιπέδων [8-OHdG] με τους αντίστοιχους ρυθμούς απόκρισης όγκου σε διαφορετικές δόσεις ακτινοβολίας στους ασθενείς που φέρουν όγκους με πλακώδες ΜΜΚΠ



Σχήμα 2. Συσχέτιση [8-OHdG] με δόση Ακτινοβολίας σε ασθενείς με μη-πλακώδη ΜΜΚΠ.



Σχήμα 5 Καμπύλη ROC αναλογίας [8-OHdG] στα 10 Gy με[8-OHdG] στα 0 Gy (ημέρα 0) .

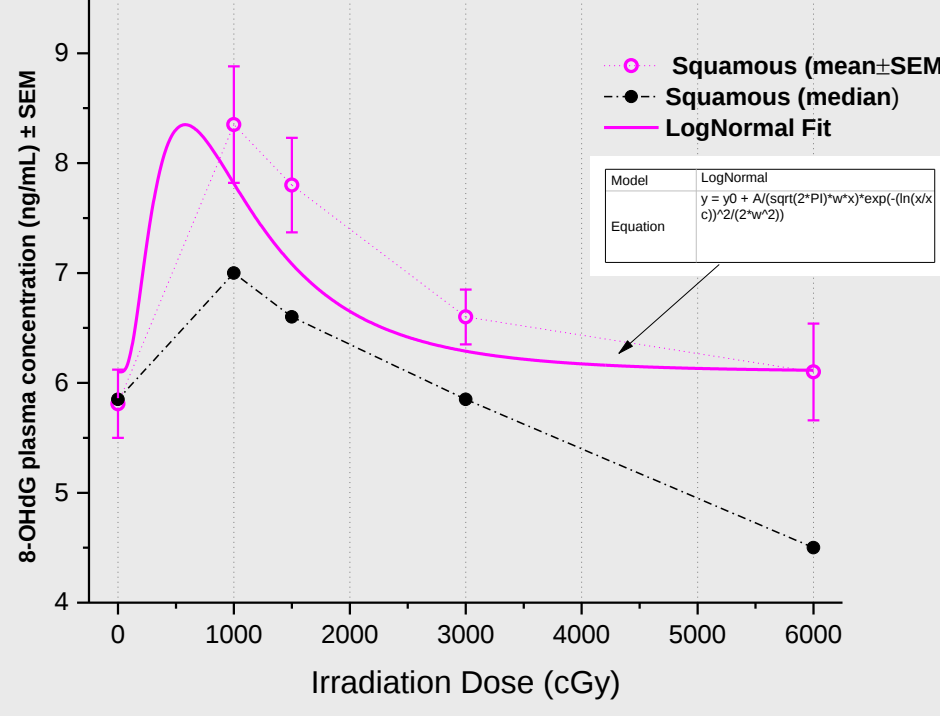
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Καταδείχθηκε πολύ ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων συγκέντρωσης πλάσματος 8-OHdG ή των αναλογιών των συγκεντρώσεων πλάσματος 8-OHdG προς τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις 8-OHdG πριν από την ακτινοβολία (προ-RT) και των αντίστοιχων ρυθμών απόκρισης όγκου σε διαφορετικές δόσεις ακτινοβολίας σε ασθενείς που φέρουν όγκους με πλακώδη ιστολογία.

Ομοίως, καταδείχθηκε μια πολύ ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων συγκεντρώσεων 8-OHdG στο πλάσμα ή των αναλογιών των συγκεντρώσεων πλάσματος 8-OHdG προς τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις 8-OHdG πριν από την ακτινοθεραπεία (προ-RT), κανονικοποιώντας με τα BSA των αντίστοιχων ασθενών. και τα αντίστοιχα ποσοστά απόκρισης όγκου σε διαφορετικές δόσεις ακτινοβολίας σε ασθενείς που φέρουν όγκους με πλακώδη ιστολογία.

Το ποσοστό ανταπόκρισης των ασθενών με ΜΜΚΠ με μη πλακώδη ιστολογία στην ακτινοβολία ήταν 58% (21/36 ασθενείς παρουσίασαν τουλάχιστον 30% συρρίκνωση του όγκου 2 μήνες μετά την ακτινοθεραπεία). Οι συσχετίσεις των επιπέδων συγκέντρωσης 8-OHdG στο πλάσμα και οι μεταβολές τους με την αντίστοιχη απόκριση όγκου σε διαφορετικές δόσεις ακτινοβολίας ήταν θετικές (υψηλότεροι στο επίπεδο δόσης ακτινοβολίας 6000 cGy) αλλά όχι τόσο σημαντικές σε σύγκριση με τους ασθενείς που έφεραν όγκους με πλακώδη ιστολογία.

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση ROC των συγκεντρώσεων 8-OHdG στο πλάσμα για ασθενείς με πλακώδη παθολογία, η οποία σε αυτή τη σειρά είχε ανταπόκριση 68,7% . Κατά την γραφική παράσταση της συγκέντρωσης πλάσματος 8-OHdG σε δόση ακτινοβολίας 10 Gy διαμερμένη στη συγκέντρωση πλάσματος 8-OHdG σε δόση ακτινοβολίας 0 Gy (την ημέρα 0), η AUC ήταν 0,873 (95% CI 0,614–0,984), $p < 0,0001$ με σχετική τιμή κριτηρίου >1378 ως αποκοπή, παράγοντας έτσι ευαισθησία 72,7% αλλά ειδικότητα 100% (Σχήμα 5). Κατά την κανονικοποίηση αυτής της αναλογίας σε BSA, η παραγόμενη AUC ήταν 0,927 $p < 0,0001$, με σχετική τιμή κριτηρίου >708 ως αποκοπή, παράγοντας έτσι ευαισθησία 100% και ειδικότητα 80% (Σχήμα 6)



Σχήμα 3. Συσχέτιση [8-OHdG] με δόση Ακτινοβολίας σε ασθενείς με πλακώδη ΜΜΚΠ.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε αυτή τη μελέτη, προσπαθήσαμε να αποσαφηνίσουμε εάν η μέτρηση στο αίμα της συγκέντρωσης της 8-OHdG στο πλάσμα μπορεί να χρησιμεύσει ως βιοδείκτης βλάβης του DNA και να διερευνήσουμε εάν μπορεί να υπάρξει οποιαδήποτε συσχέτιση με την ανταπόκριση στην ακτινοθεραπεία σε ασθενείς με ΜΜΚΠ.

Έχουν υπάρξει πολλές μελέτες που αναφέρουν τη σχέση μεταξύ της ιατρικά επαγόμενης ακτινοβολίας και της μέτρησης 8-OHdG είτε στα ούρα είτε στο αίμα. Ο Erhola et al. έδειξε αυξημένα επίπεδα 8-OHdG στα ούρα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα μετά από χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία και η μέγιστη απέκκριση στα ούρα ήταν μετά από αθροιστικές δόσεις 10 και 30 Gy.[6]

Υπάρχουν αυξανόμενα στοιχεία σχετικά με τη δοσοεξαρτώμενη σχέση των επιπέδων 8-OHdG και της ακτινοβολίας. Στην ακτινοθεραπεία μετά από χειρουργική επέμβαση καρκίνου του μαστού, τα επίπεδα 8-OHdG στο αίμα αυξήθηκαν σημαντικά μέσα στις δύο πρώτες εβδομάδες της θεραπείας (εύρος δόσης 10–30 Gy). Για τα επόμενα διαστήματα, όπου οι δόσεις ακτινοβολίας ήταν 30–40 Gy, τα επίπεδα της 8-OHdG μειώθηκαν και στη συνέχεια παρέμειναν σταθερά όταν η δόση ακτινοβολίας κυμαινόταν από 45 έως 60 Gy. Έτσι, υπάρχει ένα όριο πάνω από το οποίο έχει ήδη συμβεί ο περισσότερος κυτταρικός θάνατος, επομένως τα επίπεδα 8-OHdG μειώνονται.[7]

Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από πολλούς παράγοντες. Πρώτον, τα συστήματα επιδιόρθωσης του DNA αναορούν τη βλάβη του DNA και έτσι σταματά να συσσωρεύεται και η επιδιόρθωση του DNA χρειάζεται εβδομάδες έως μήνες μετά την πλήρη επίδραση της έκθεσης στην ακτινοβολία. Δεύτερον, τα επίπεδα 8-OHdG είναι έμμεσοι δείκτες καρκινογένεσης, επομένως είναι εγγενώς πιο αυξημένα σε καρκινοπαθείς παρά σε υγιή άτομα. Τρίτον, εκτός από το οξειδωτικό στρες που προκαλείται άμεσα από την ακτινοβολία, η απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος προκαλεί περαιτέρω δημιουργία ROS.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι οι μετρήσεις των συγκεντρώσεων 8-OHdG στο πλάσμα, ειδικά με την ενσωμάτωση παραμέτρων του BSA των ασθενών ή του όγκου του ακτινοβολημένου όγκου, μπορούσαν να προβλέψουν με ασφάλεια και σημαντική ακρίβεια τα ποσοστά απόκρισης όγκου σε ασθενείς με NSCLC που φέρουν όγκους με πλακώδη ιστολογία ακόμη και σε αρχικές δόσεις ακτινοβολίας 10 Gy.

REFERENCES

- LoCicero J, Ponn RB, Daly BDT. (2000). Surgical Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. In: Shields TW, LoCicero J, Ponn RB (eds). General Thoracic Surgery, 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp: 1311-1341.
- DeLeyn P, Lardiniois D, Van Schil P, et al. ESTS guidelines for preoperative lymph node staging for non-small cell lung cancer. Eur J Cardiothorac Surg 2007; 32: 1-8
- Rami-Porta R, Tsuboi M. Sublobar resection for lung cancer. Eur Resp J 2009; 33: 426-435.
- Diggleby, W., Wright, K., 2004. Elderly palliative care cancer patients' descriptions of hope-fostering strategies. International Journal of Palliative Nursing 10
- Jansen, M. C., H. B. Bueno-de-Mesquita, et al. (1999). "Dietary fiber and plant foods in relation to colorectal cancer mortality: the Seven Countries Study." Int J CaErhola, M., Toyokuni, S., Okada, K., Tanaka, T., Hiai, H., Ochi, H., Uchida, K.;
- Osawa, T.; Nieminen, M.M.; Alho, H.; et al. Biomarker Evidence of DNA Oxidation in Lung Cancer Patients: Association of Urinary 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine Excretion with Radiotherapy, Chemotherapy, and Response to Treatment. FEBS Lett. 1997, 409, 287–291Rader 81(2): 174-9.
- Bubici, C.; Papa, S.; Dean, K.; Franzoso, G. Mutual Cross-Talk between Reactive Oxygen Species and Nuclear Factor-Kappa B: Molecular Basis and Biological Significance. Oncogene 2006, 25, 6731–6748

Σχήμα 6. Σχήμα 5 κανονικοποιημένο ως προς το BSA