



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΕΤΑΦΡΑΣΤΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

*Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ
ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΒΑΣΗΣ
ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΜΗ-ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ
ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΝΕΥΜΟΝΑ (NSCLC) ΠΟΥ
ΛΑΜΒΑΝΟΥΝ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ*

Μοναστηριώτη Αλεξία

Βιολόγος, M.Sc.

Ηράκλειο 2023

Ο ρόλος των κυκλοφορούντων βιοδεικτών στην εκτίμηση της έκβασης ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) που λαμβάνουν ανοσοθεραπεία

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- 1) Αγγελάκη Σοφία (Επιβλέπουσα): Καθηγήτρια Παθολογικής Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- 2) Μαυρουδής Δημήτριος: Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- 3) Σπηλιανάκης Χαράλαμπος: Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας & Επιγενετικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή:

- 1) Αγγελάκη Σοφία (Επιβλέπουσα): Καθηγήτρια Παθολογικής Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- 2) Μαυρουδής Δημήτριος: Καθηγητής Παθολογικής Ογκολογίας Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- 3) Σπηλιανάκης Χαράλαμπος: Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας & Επιγενετικής, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- 4) Βασιλακοπούλου Μαρία: Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ογκολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- 5) Κουτσόπουλος Αναστάσιος: Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- 6) Θεοδωρόπουλος Παναγιώτης: Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης
- 7) Κεφαλογιάννης Εμμανουήλ: Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής Θώρακος, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας, του Τομέα Παθολογίας, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της διδακτορικής μου διατριβής, Καθηγήτρια Σοφία Αγγελάκη, για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω τα όνειρά μου, την εμπιστοσύνη της στη υλοποίηση αυτού του στόχου και την καθοδήγηση της όλα αυτά τα χρόνια. Ταυτόχρονα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Δημήτριο Μαυρουδή, που πίστεψε στις δυνατότητες μου, με δέχτηκε στην ομάδα του και για την παρουσία και καθοδήγηση του. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Χαράλαμπο Σπηλιανάκη, για την επίβλεψη και καθοδήγηση του στην διατριβή αυτή.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια Μαρία Βασιλακοπούλου, τον Καθηγητή Αναστάσιο Κουτσόπουλο, τον Καθηγητή Παναγιώτη Θεοδωρόπουλο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Εμμανουήλ Κεφαλογιάννη για την πρόθυμη συμμετοχή τους στην επταμελή επιτροπή αξιολόγησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Κατόπιν, θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. Χαρίκλεια Παπαδάκη, για την καθοδήγηση, την μεθοδικότητα και για πολλούς άλλους λόγους, η παρουσία της ήταν καθοριστική στην υλοποίηση αυτής της διατριβής.

Εν συνεχεία, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη και φοιτητές του Εργαστηρίου της Μεταφραστικής Ογκολογίας για την παρέα τους τα τελευταία χρόνια. Ευχαριστώ από καρδιάς Δέσποινα Αγγουράκη, Κλείτα Μιχαηλίδου, Ελένη Πολιτάκη, Γεωργία Σαλούστρου, Μαρία Παπαδάκη, Μαρία Σφακιανάκη, Χαρά Κουτουλάκη, Ιπποκράτη Μεσσαριτάκη, Μαρία Τρυπάκη. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλους τους συνεργάτες από την Παθολογική-Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠαΓΝΗ).

Δε θα μπορούσα να παραλείψω την απεριόριστη εκτίμηση στους ασθενείς της Παθολογικής-Ογκολογικής Κλινικής και τους συγγενείς αυτών, για τη συγκατάθεση τους για τη συμμετοχή στη μελέτη.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ γεμάτο αγάπη οφείλω στην φίλη μου και ερευνήτρια, Δρ. Αυγή Μαμαλάκη, η οποία αποτελεί πηγή έμπνευσης, ερευνητικής και ζωής. Αυγή, σε ευχαριστώ για όλα.

Τα ευχαριστώ στους φίλους μου δε θα είναι ποτέ αρκετά. Σας ευχαριστώ που είστε δίπλα μου, που μεγαλώνουμε μαζί και έχω την τιμή να σας λέω φίλους μου, Σεβαστιάνα, Νατάσα, Σόφι, Άλκηστη, Κατερίνα, Λένη, Νεφέλη, Θέμη, Νίκο, Βασίλη, Χάρη, Αθηνά, Γιώργο, Χαρά, Κωστή, Ελένη, Τεό, καθώς και κάποιες τελευταίες προσθήκες που έκαναν την 'ουρά' ευχάριστη.

Το τελευταίο ευχαριστώ και μεγαλύτερο, δε θα ήταν άλλο απ' αυτό στον Βαγγέλη και την Ελένη, είστε η πηγή της δύναμης μου. Σας ευχαριστώ που είστε οι γονείς μου!

Στον Βαγγέλη και την Ελένη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	6
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	10
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	18
ABSTRACT	22
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	27
1.1 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	27
1.2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	28
1.2.1 Επιδημιολογικά Δεδομένα	28
1.2.2 Συμπτωματολογία Καρκίνου του Πνεύμονα	34
1.2.3 Παράγοντες Κινδύνου	34
1.1.5 Διάγνωση	41
1.1.6 Σταδιοποίηση	42
1.1.7 Θεραπευτική Αντιμετώπιση & Διαχείριση	43
1.2 ΤΟ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	46
1.2.1 Το Ανοσοποιητικό Σύστημα και η Ανοσολογική Απόκριση	46
1.2.2 Αντικαρκινική Ανοσολογική Απόκριση και Ανοσοεπιτήρηση	47
1.2.3 Μηχανισμοί Ανοσοδιαφυγής κατά την Αντικαρκινική Ανοσολογική Απόκριση	49
1.2.4 Σημεία Ελέγχου του Ανοσοποιητικού Συστήματος	57
1.2.5 Προγνωστικοί Βιοδείκτες Ανταπόκρισης στην Ανοσοθεραπεία	60
1.3 ΜΙΚΡΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ ΜΟΡΙΑ RNA (MICRORNAs).....	64
1.3.1 Γενική Εισαγωγή και Μηχανισμός Βιογένεσης των microRNAs.....	64
1.3.2 Ο Ρόλος των microRNAs στον Καρκίνο του Πνεύμονα.....	67
1.3.3 Ο ρόλος των microRNAs στη Ρύθμιση του Αντικαρκινικής Ανοσολογικής Απόκρισης	68
1.3.4 Ο ρόλος των microRNAs ως Βιοδείκτες.....	71
ΣΚΟΠΟΣ	73
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	76
2.1 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ (LITERATURE REVIEW)	76
2.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ – ΟΜΑΔΕΣ ΑΣΘΕΝΩΝ	80
2.2.1 Κριτήρια Ένταξης και Αποκλεισμού των Ασθενών.....	81
2.2.2 Καταγραφή και Στάδια Αξιοποίησης των Κλινικών Δεδομένων των Ασθενών.....	82
2.2.3 Ομάδα Ελέγχου	82
2.3 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ - ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ	83
2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΠΛΑΣΜΑ ΚΑΙ ΑΠΟ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ	85
2.4.1 Απομόνωση Ολικού RNA από Πλάσμα Περιφερικού Αίματος.....	85
2.4.2 Απομόνωση Ολικού RNA από Μονοπύρηννα Κύτταρα Περιφερικού Αίματος	86
2.5 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΣΕ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟ DNA (COMPLEMENTARY DNA, cDNA)	88
2.6 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (REAL-TIME PCR).....	92
2.7 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΈΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ miRNAs	95
2.8 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	98
2.9 ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΟΥ ΠΑΚΕΤΟΥ SPSS.....	98
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	101
3.1 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ miRNAs ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΜΚΠ, ΠΟΥ ΕΛΑΒΑΝ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΠΡΩΤΗΣ ΓΡΑΜΜΗΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΠΛΑΤΙΝΟΥΧΑ ΣΥΜΠΛΟΚΑ	101

3.1.1 Ανάλυση της διαφορικής έκφρασης των miRNAs-στόχων στα δείγματα των ασθενών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου	103
3.1.2 Συσχέτιση των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών με την έκφραση των miRNAs-στόχων	105
• Συσχέτιση της ηλικίας με την έκφραση των miRNAs-στόχων	106
• Συσχέτιση της κλίμακας λειτουργικής κατάστασης με την έκφραση των miRNAs-στόχων	109
• Συσχέτιση της ιστολογικής ταξινόμησης με την έκφραση των miRNAs-στόχων	111
• Συσχέτιση του αριθμού των μεταστατικών εστιών με την έκφραση των miRNAs-στόχων	112
• Συσχέτιση της παρουσίας εγκεφαλικών μεταστάσεων με την έκφραση των miRNAs-στόχων	114
• Συσχέτιση της παρουσίας οστικών μεταστάσεων με την έκφραση των miRNAs-στόχων	116
• Συσχέτιση της αντικειμενικής ανταπόκρισης στη θεραπεία με την έκφραση των miRNAs-στόχων ...	117
• Συσχέτιση της ελεγχόμενης πορείας νόσου με την έκφραση των miRNAs-στόχων	120
• Συσχέτιση της παρατεταμένης ελεγχόμενης νόσου με την έκφραση των miRNAs-στόχων	122
3.1.3 Συσχέτιση του κινδύνου ανάπτυξης προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία των ασθενών με προγνωστικές μεταβλητές	124
3.1.4 Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (Progression Free Survival, PFS) και της ολικής επιβίωσης (Overall Survival, OS) με την έκφραση των miRNAs-στόχων	127
3.1.5 Συσχέτιση του Διαστήματος Ελεύθερου Υποτροπής και της Ολικής Επιβίωσης με προγνωστικές μεταβλητές	140
3.2 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ miRNAs ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΜΚΠ, ΠΟΥ ΕΛΑΒΑΝ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΔΕΥΤΕΡΗΣ ΓΡΑΜΜΗΣ ΜΕ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ PD-1/PD-L1	145
3.2.1 Ανάλυση της διαφορικής έκφρασης των miRNAs-στόχων στα δείγματα των ασθενών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου	147
3.2.2 Συσχέτιση των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών με την έκφραση των miRNAs-στόχων	149
• Συσχέτιση της κλίμακας λειτουργικής κατάστασης με την έκφραση των miRNAs-στόχων	150
• Συσχέτιση του σταδίου νόσου με την έκφραση των miRNAs-στόχων	153
• Συσχέτιση της ιστολογικής ταξινόμησης με την έκφραση των miRNAs-στόχων	155
• Συσχέτιση του αριθμού των μεταστατικών εστιών με την έκφραση των miRNAs-στόχων	159
• Συσχέτιση της παρουσίας ηπατικών μεταστάσεων με την έκφραση των miRNAs-στόχων	161
• Συσχέτιση της παρουσίας οστικών μεταστάσεων με την έκφραση των miRNAs-στόχων	164
• Συσχέτιση της ελεγχόμενης πορείας νόσου με την έκφραση των miRNAs-στόχων	166
• Συσχέτιση της παρατεταμένης ελεγχόμενης νόσου με την έκφραση των miRNAs-στόχων	167
3.2.3 Συσχέτιση του κινδύνου ανάπτυξης προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία των ασθενών με προγνωστικές μεταβλητές	171
3.2.4 Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (Progression Free Survival, PFS) και της ολικής επιβίωσης (Overall Survival, OS) με την έκφραση των miRNAs-στόχων	174
3.2.5 Συσχέτιση του Διαστήματος Ελεύθερου Υποτροπής και της Ολικής Επιβίωσης με προγνωστικές μεταβλητές	187
3.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ miRNAs ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ ΚΑΙ ΣΤΑ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ (PBMCs) ΣΕ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΙΣΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΜΜΚΠ, ΠΟΥ ΕΛΑΒΑΝ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΔΕΥΤΕΡΗΣ ΓΡΑΜΜΗΣ ΜΕ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ PD-1/PD-L1	192
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	196
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	213
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	216
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α'	243
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β'	277

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα με βάση την 8 ^η έκδοση του TNM [65, 66].....	43
Πίνακας 2: Οι φυσιολογικές λειτουργίες των miRNAs, ο ρόλος τους στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης και ο ρόλος τους στον καρκίνο.	77
Πίνακας 3: Κριτήρια Ένταξης και Αποκλεισμού των Ασθενών.....	81
Πίνακας 4: Αντιδραστήρια Συμπληρωματικού DNA.	91
Πίνακας 5: Πρόγραμμα σχηματισμού Συμπληρωματικού DNA (complementary DNA, cDNA) σε θερμικό κυκλοποιητή Thermal Cycler PTC-200.	91
Πίνακας 6: Αντιδραστήρια Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου.	94
Πίνακας 7: Πρόγραμμα ενίσχυσης DNA σε ViiA 7 Real-Time PCR System.	95
Πίνακας 8: Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με προχωρημένο ή μεταστατικό ΜΜΚΠ (N=125), που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.....	102
Πίνακας 9: Μέση τιμή έκφρασης (Ct), τυπική απόκλιση (SD*) και σχετική έκφραση για κάθε miRNA-στόχο στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ (N=125), που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα, και της ομάδας ελέγχου (N=33).	103
Πίνακας 10: Μοντέλα Δυαδικής Λογιστικής Παλινδρόμησης (Binary Logistic Regression) για τον κίνδυνο ανάπτυξης προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία σε ασθενείς με ΜΜΚΠ (N=125), που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.....	125
Πίνακας 11: Μοντέλα Δυαδικής Λογιστικής Παλινδρόμησης (Binary Logistic Regression) για τον κίνδυνο ανάπτυξης προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία σε ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα (N=77) και σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα (N=40), που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.	126
Πίνακας 12: Μοντέλα Αναλογικής Παλινδρόμησης Κινδύνου Cox (Cox Proportional Hazard Regression Models) για το Διάστημα Ελεύθερο Υποτροπής και την Ολική Επιβίωση σε ασθενείς με ΜΜΚΠ (N=125), που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.....	142
Πίνακας 13: Μοντέλα Αναλογικής Παλινδρόμησης Κινδύνου Cox (Cox Proportional Hazard Regression Models) για το Διάστημα Ελεύθερο Υποτροπής και την Ολική Επιβίωση σε ασθενείς	

με αδενοκαρκίνωμα (N=77), που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.....	143
Πίνακας 14: Μοντέλα Αναλογικής Παλινδρόμησης Κινδύνου Cox (Cox Proportional Hazard Regression Models) για το Διάστημα Ελεύθερο Υποτροπής και την Ολική Επιβίωση σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα (N=40), που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.....	144
Πίνακας 15: Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με προχωρημένο ή μεταστατικό ΜΜΚΠ (N=82), που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.	146
Πίνακας 16: Μέση τιμή έκφρασης (Ct), τυπική απόκλιση (SD*) και σχετική έκφραση για κάθε miRNA-στόχο στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ (N=82), που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1, και της ομάδας ελέγχου (N=33).	147
Πίνακας 17: Μοντέλα Δυαδικής Λογιστικής Παλινδρόμησης (Binary Logistic Regression) για τον κίνδυνο ανάπτυξης προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία σε ασθενείς με ΜΜΚΠ (N=82), που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.	172
Πίνακας 18: Μοντέλα Δυαδικής Λογιστικής Παλινδρόμησης (Binary Logistic Regression) για τον κίνδυνο ανάπτυξης προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα (N=40) και σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα (N=37), που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.....	173
Πίνακας 19: Μοντέλα Αναλογικής Παλινδρόμησης Κινδύνου Cox (Cox Proportional Hazard Regression Models) για το Διάστημα Ελεύθερο Υποτροπής και την Ολική Επιβίωση σε ασθενείς με ΜΜΚΠ (N=82), που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.	189
Πίνακας 20: Μοντέλα Αναλογικής Παλινδρόμησης Κινδύνου Cox (Cox Proportional Hazard Regression Models) για το Διάστημα Ελεύθερο Υποτροπής και την Ολική Επιβίωση σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα (N=40), που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.....	190
Πίνακας 21: Μοντέλα Αναλογικής Παλινδρόμησης Κινδύνου Cox (Cox Proportional Hazard Regression Models) για το Διάστημα Ελεύθερο Υποτροπής και την Ολική Επιβίωση σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα (N=37), που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.	191

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Ανατομία του Αναπνευστικού Συστήματος.....	28
Εικόνα 2: Ποσοστιαία κατανομή νέων κρουσμάτων για τους 8 πιο συχνούς τύπους καρκίνου για το 2020 για τα δύο φύλα (Α), άνδρες (Β) και γυναίκες (Γ).	29
Εικόνα 3: Γεωγραφική κατανομή νέων κρουσμάτων του καρκίνου του πνεύμονα για το 2020 και για τα δύο φύλα.	30
Εικόνα 4: Ποσοστιαία κατανομή περιστατικών θανάτου για τους 8 πιο συχνούς τύπους καρκίνου για το 2020 για τα δύο φύλα (Α), άνδρες (Β) και γυναίκες (Γ).....	31
Εικόνα 5: Κατανομή περιστατικών θανάτου του καρκίνου του πνεύμονα για το 2020 και για τα δύο φύλα.	32
Εικόνα 6: Ποσοστά σταδίου νόσου στη διάγνωση (Α) και 5-ετής Σχετική Επιβίωση ανά στάδιο νόσου (Β).	33
Εικόνα 7: Κατανομή Νέων περιστατικών (Α) και Περιστατικών Θανάτου (Β), με βάση την ηλικία.	33
Εικόνα 8: Ιστολογική ταξινόμηση καρκίνου του πνεύμονα και ιστολογικοί υπότυποι του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (ΜΜΚΠ) [42].	37
Εικόνα 9: Ενδεικτικά παραδείγματα ιστολογικών διαφορών μεταξύ αδenoκαρκινώματος (ADC) και πλακώδους καρκινώματος (SqCC) με ανοσοϊστοχημική χρώση (IHC, H & E) και ανάλυση δεικτών (TTF-1 % p40).	40
Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση της έμφυτης (α) και της προσαρμοστικής ανοσίας (β) κατά την αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων.	47
Εικόνα 11: Ο κύκλος της αντικαρκινικής ανοσολογικής απόκρισης [82].	48
Εικόνα 12: Τα 3 Es της ανοσοεπεξεργασίας.	53
Εικόνα 13: Μηχανισμός δράσης (α) και αναστολής (β) του CTLA-4 [200], κατά την ενεργοποίηση των Τ κυττάρων.....	58
Εικόνα 14: Μηχανισμός δράσης (α) και αναστολής (β) του PD-1/PD-L1 [200], στην επίδραση της λειτουργίας των Τ κυττάρων.	60
Εικόνα 15: Συχνότητα εμφάνισης των πιο κοινών οδηγιών μεταλλάξεων σε ασθενείς με ΜΜΚΠ προχωρημένου σταδίου [210].	61
Εικόνα 16: Κανονική οδός βιογένεσης των miRNAs [239].	65
Εικόνα 17: Αλληλεπίδραση των ανοσοκυττάρων και των miRNAs στο μικροπεριβάλλον του όγκου [277].	69

Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση διαχωρισμού κυττάρων περιφερικού αίματος σε σωληνάριο έπειτα από “Φυγοκέντρηση Διαβάθμισης Πυκνότητας”.....	83
Εικόνα 19: Σχηματική Απεικόνιση της Διαδικασίας Σχηματισμού Συμπληρωματικού DNA.....	89
Εικόνα 20: Συστάδα Μικροσωληναρίων Αντίδρασης Συμπληρωματικού DNA.....	90
Εικόνα 21: Σχηματική Απεικόνιση Ενίσχυσης Αλληλουχίας DNA με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου.....	93
Εικόνα 22: Πλάκα Αντίδρασης Μικροτιτλοδότησης 384-βοθρίων.....	94
Εικόνα 23: Συσχέτιση της έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου αναφοράς U6 snRNA (RNU6-1) μεταξύ των ασθενών και της ομάδας ελέγχου.....	97
Εικόνα 24: Σχηματική απεικόνιση της ροής της μελέτης της έκφρασης των κυκλοφορούντων miRNAs στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.....	101
Εικόνα 25: Διαφορική έκφραση των let-7c (a), miR-26a (b), miR-30d (c), miR-34a (d), miR-146a (e), miR-155 (f), miR-195 (g), miR-200b (h), miR-200c (i), miR-202 (j) και miR-223 (k), μεταξύ των ασθενών με ΜΜΚΠ (N=125), που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα, και της ομάδας ελέγχου (N=33).....	104
Εικόνα 26: Συσχέτιση της ηλικίας των ασθενών με την έκφραση του miR-34a, στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.....	107
Εικόνα 27: Συσχέτιση της ηλικίας των ασθενών με την έκφραση του let-7c, στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.....	107
Εικόνα 28: Συσχέτιση της ηλικίας των ασθενών με την έκφραση του miR-146a, στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.....	108
Εικόνα 29: Συσχέτιση της ηλικίας των ασθενών με την έκφραση του miR-200b, στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.....	108
Εικόνα 30: Συσχέτιση της κλίμακας λειτουργικής κατάστασης των ασθενών με την έκφραση του miR-195, στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.....	110

Εικόνα 31: Συσχέτιση της κλίμακας λειτουργικής κατάστασης των ασθενών με την έκφραση του miR-146a, στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.....	110
Εικόνα 32: Συσχέτιση του ιστολογικού υπότυπου των ασθενών με την έκφραση του miR-155 στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.....	111
Εικόνα 33: Συσχέτιση του αριθμού των μεταστατικών εστιών των ασθενών με την έκφραση του miR-26a στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.....	113
Εικόνα 34: Συσχέτιση του αριθμού των μεταστατικών εστιών των ασθενών με την έκφραση του miR-223 στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.....	113
Εικόνα 35: Συσχέτιση της παρουσίας εγκεφαλικών μεταστάσεων των ασθενών με την έκφραση του miR-155 στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.....	115
Εικόνα 36: Συσχέτιση της παρουσίας εγκεφαλικών μεταστάσεων των ασθενών με την έκφραση του miR- 26a στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.....	115
Εικόνα 37: Συσχέτιση της παρουσίας οστικών μεταστάσεων των ασθενών με την έκφραση του miR- 34a στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.....	116
Εικόνα 38: Συσχέτιση της αντικειμενικής ανταπόκρισης στη θεραπεία των ασθενών με την έκφραση του miR- 146a στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.....	118
Εικόνα 39: Συσχέτιση της αντικειμενικής ανταπόκρισης στη θεραπεία των ασθενών με την έκφραση του miR- 223 στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.....	118
Εικόνα 40: Συσχέτιση της αντικειμενικής ανταπόκρισης στη θεραπεία των ασθενών με την έκφραση του miR-200b στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.....	119
Εικόνα 41: Συσχέτιση της ελεγχόμενης πορείας νόσου των ασθενών με την έκφραση του miR- 34a στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.....	121

Εικόνα 42: Συσχέτιση της ελεγχόμενης πορείας νόσου των ασθενών με την έκφραση του miR-202 στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.	121
Εικόνα 43: Συσχέτιση της παρατεταμένης ελεγχόμενης νόσου των ασθενών με την έκφραση του miR-146a στο σύνολο του πληθυσμού, στους ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.....	123
Εικόνα 44: Συσχέτιση της παρατεταμένης ελεγχόμενης νόσου των ασθενών με την έκφραση του miR-34a στο σύνολο του πληθυσμού, στους ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.....	123
Εικόνα 45: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του let-7c στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.	129
Εικόνα 46: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-26a στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.	130
Εικόνα 47: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-30d στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.	131
Εικόνα 48: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-34a στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.	132
Εικόνα 49: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-146a στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.	133
Εικόνα 50: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-155 στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.	134
Εικόνα 51: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-195 στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.	135

Εικόνα 52: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-200b στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.	136
Εικόνα 53: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-200c στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.	137
Εικόνα 54: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-202 στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.	138
Εικόνα 55: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-223 στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.	139
Εικόνα 56: Σχηματική απεικόνιση της ροής της μελέτης της έκφρασης των κυκλοφορούντων miRNAs στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.	145
Εικόνα 57: Διαφορική έκφραση των <i>let-7c</i> (a), <i>miR-26a</i> (b), <i>miR-30d</i> (c), <i>miR-34a</i> (d), <i>miR-146a</i> (e), <i>miR-155</i> (f), <i>miR-195</i> (g), <i>miR-200b</i> (h), <i>miR-200c</i> (i), <i>miR-202</i> (j) και <i>miR-223</i> (k), μεταξύ των ασθενών με ΜΜΚΠ (N=82), που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1, και της ομάδας ελέγχου (N=33).	148
Εικόνα 58: Συσχέτιση της κλίμακας λειτουργικής κατάστασης των ασθενών με την έκφραση του <i>let-7c</i> , στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.	151
Εικόνα 59: Συσχέτιση της κλίμακας λειτουργικής κατάστασης των ασθενών με την έκφραση του <i>miR-26a</i> , στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.	151
Εικόνα 60: Συσχέτιση της κλίμακας λειτουργικής κατάστασης των ασθενών με την έκφραση του <i>miR-26a</i> , στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.	152
Εικόνα 61: Συσχέτιση του σταδίου νόσου με την έκφραση του <i>miR-34a</i> , στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.	154

Εικόνα 62: Συσχέτιση του σταδίου νόσου με την έκφραση του miR-34a, στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.	154
Εικόνα 63: Συσχέτιση του ιστολογικού υπότυπου των ασθενών με την έκφραση του let-7c στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.	156
Εικόνα 64: Συσχέτιση του ιστολογικού υπότυπου των ασθενών με την έκφραση του miR-26a στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.	156
Εικόνα 65: Συσχέτιση του ιστολογικού υπότυπου των ασθενών με την έκφραση του miR-30d στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.	157
Εικόνα 66: Συσχέτιση του ιστολογικού υπότυπου των ασθενών με την έκφραση του miR-146a στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.	157
Εικόνα 67: Συσχέτιση του ιστολογικού υπότυπου των ασθενών με την έκφραση του miR-30d στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.	158
Εικόνα 68: Συσχέτιση του αριθμού των μεταστατικών εστιών των ασθενών με την έκφραση του miR-200b στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.	160
Εικόνα 69: Συσχέτιση του αριθμού των μεταστατικών εστιών των ασθενών με την έκφραση του miR-195 στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.	160
Εικόνα 70: Συσχέτιση της παρουσίας ηπατικών μεταστάσεων των ασθενών με την έκφραση του miR-200b στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.	162
Εικόνα 71: Συσχέτιση της παρουσίας ηπατικών μεταστάσεων των ασθενών με την έκφραση του miR-200c στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.	162
Εικόνα 72: Συσχέτιση της παρουσίας ηπατικών μεταστάσεων των ασθενών με την έκφραση του miR-202 στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.	163
Εικόνα 73: Συσχέτιση της παρουσίας οστικών μεταστάσεων των ασθενών με την έκφραση του miR-200b στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.	165

Εικόνα 74: Συσχέτιση της παρουσίας οστικών μεταστάσεων των ασθενών με την έκφραση του miR- 200c στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.	165
Εικόνα 75: Συσχέτιση της ελεγχόμενης πορείας νόσου των ασθενών με την έκφραση του miR- 34a στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.	166
Εικόνα 76: Συσχέτιση της παρατεταμένης ελεγχόμενης νόσου των ασθενών με την έκφραση του miR-34a στο σύνολο του πληθυσμού, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.....	168
Εικόνα 77: Συσχέτιση της παρατεταμένης ελεγχόμενης νόσου των ασθενών με την έκφραση του miR-195 στο σύνολο του πληθυσμού, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.....	168
Εικόνα 78: Συσχέτιση της παρατεταμένης ελεγχόμενης νόσου των ασθενών με την έκφραση του miR-30d στο σύνολο του πληθυσμού, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.....	169
Εικόνα 79: Συσχέτιση της παρατεταμένης ελεγχόμενης νόσου των ασθενών με την έκφραση του miR-146a στο σύνολο του πληθυσμού, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.....	169
Εικόνα 80: Συσχέτιση της παρατεταμένης ελεγχόμενης νόσου των ασθενών με την έκφραση του miR-223 στο σύνολο του πληθυσμού, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.....	170
Εικόνα 81: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του let-7c στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.....	176
Εικόνα 82: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-26a στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.....	177
Εικόνα 83: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-30d στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.....	178

Εικόνα 84: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-34a στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.....	179
Εικόνα 85: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-146a στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.....	180
Εικόνα 86: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-155 στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.....	181
Εικόνα 87: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-195 στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.....	182
Εικόνα 88: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-200b στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.....	183
Εικόνα 89: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-200c στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.....	184
Εικόνα 90: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-202 στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.....	185
Εικόνα 91: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-223 στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.....	186
Εικόνα 92: Σύγκριση της έκφρασης των miR-34a, miR-146a, miR-155, miR-200b, miR-200c και miR-223 σε αντιστοιχισμένα δείγματα πλάσματος και μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (PBMCs) σε ασθενείς (N=82) που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.	194

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως και στα δύο φύλα, με 1.8 εκατομμύρια θανάτους εξαιτίας της νόσου να έχουν καταγραφεί για το 2020. Η πενταετής επιβίωση κυμαίνεται στο 10-20% του συνόλου των περιπτώσεων αυτών, καθ' ότι η πλειονότητα των ασθενών τη στιγμή της διάγνωσης παρουσιάζουν ήδη προχωρημένη ή μεταστατική νόσο, περιορίζοντας τις θεραπευτικές επιλογές του ασθενή και μειώνοντας σημαντικά την πιθανότητα επιβίωσης πέραν των πέντε ετών.

Οι στοχευμένες μοριακές θεραπείες και πρόσφατα η ανοσοθεραπεία έχουν βελτιώσει σε σημαντικό βαθμό την πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Ειδικότερα η ανοσοθεραπεία, αποτελεί μια καινοτόμο θεραπευτική προσέγγιση για τον μεταστατικό καρκίνο του πνεύμονα, που στοχεύει στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος και των στοιχείων του προκειμένου να καταστείλουν τον όγκο. Παρά όμως τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα από τη χορήγηση ανοσοθεραπείας, τα κλινικά οφέλη περιορίζονται σε ένα μικρό σχετικά ποσοστό ασθενών και επομένως, παραμένει επιτακτική η ανάγκη για την εύρεση νέων και περισσότερο πληροφοριακών προβλεπτικών βιοδεικτών για χρήση στην καθημερινή κλινική πρακτική.

Είναι πλέον γνωστό ότι οι όγκοι προκαλούν διαταραχή στην περιφερική ανοσολογική απάντηση η οποία σχετίζεται με την εξέλιξη της νόσου και με δυσμενή πρόγνωση των ασθενών. Επομένως, η ανάλυση βιομοριών, που έχουν καίριο ρόλο στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης και της αντικαρκινικής ανοσίας, σε δείγματα περιφερικού αίματος ως υλικού “υγρής βιοψίας” από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, θα μπορούσε να αποκαλύψει και να αναδείξει αποτελεσματικούς ή εύκολα προσβάσιμους βιοδείκτες.

Προς αυτή την κατεύθυνση, η μελέτη των μικρών μη κωδικών μορίων RNA (miRNAs) αποτελεί σημαντικό πεδίο έρευνας καθώς η έκφραση τους έχει βρεθεί να είναι απορυθμισμένη σε πληθώρα παθολογικών καταστάσεων, συμπεριλαμβανομένου του ΜΜΚΠ, ενώ παράλληλα ολοένα και περισσότερα δεδομένα συγκλίνουν στο ότι τα miRNAs μπορούν να ρυθμίσουν την ανοσολογική απάντηση κατά του όγκου, επηρεάζοντας την γονιδιακή έκφραση ανοσορυθμιστικών μορίων, σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, στον όγκο και τα ανοσοκύτταρα.

Λόγω της συμμετοχής των miRNAs στα διάφορα στάδια έναρξης και εξέλιξης του όγκου, τα μόρια αυτά εξετάζονται ως πιθανοί προγνωστικοί και προβλεπτικοί βιοδείκτες στον καρκίνο. Η αποτελεσματικότητα των miRNAs ως βιοδείκτες έγκειται στην υψηλή ειδικότητα τους και στο μοτίβο έκφρασης τους το οποίο διαφέρει μεταξύ φυσιολογικής και παθολογικής

κατάστασης. Σημαντικά πλεονεκτήματά τους είναι ότι εξαιτίας του μικρού τους μεγέθους (19-24 νουκλεοτίδια), είναι εξαιρετικά σταθερά και μπορούν εύκολα να προσδιοριστούν σε δείγματα πλάσματος με μεγάλη επαναληψιμότητα. Το πλάσμα αποτελεί μια δεξαμενή miRNAs που εκκρίνονται από διαφορετικά σημεία του αρχικού όγκου ή των μεταστατικών εστιών, αντανακλώντας την ετερογένεια του όγκου. Ως αποτέλεσμα, αλλαγές στην έκφραση των miRNAs προτείνουν ένα χρήσιμο εργαλείο για έγκαιρη διάγνωση και πρόβλεψη της έκβασης των ασθενών με καρκίνο.

Δεδομένων των παραπάνω, στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η ανάλυση της έκφρασης και η κλινική αξιολόγηση κυκλοφορούντων miRNAs, που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση στο μικροπεριβάλλον του όγκου, στο πλάσμα ασθενών με προχωρημένο ή μεταστατικό ΜΜΚΠ. Τα miRNAs που εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή δεν έχουν ακόμα μελετηθεί επαρκώς στον ΜΜΚΠ και αφορούν σε αυτά που ρυθμίζουν τα σημεία ελέγχου (miR-34a, miR-200b, miR-200c), που ελέγχουν τη ρύθμιση των T ρυθμιστικών κυττάρων Tregs (miR-155, miR-146) και των κατασταλτικών κυττάρων μυελοειδούς προέλευσης (MDSCs) (miR-223), και τέλος, σε αυτά που ρυθμίζουν την διαφοροποίηση των μακροφάγων προς M1 ή M2 φαινότυπο (let-7c, miR-26a, miR-30d, miR-195, miR-202). Για την υλοποίηση των στόχων της παρούσας έρευνας χρησιμοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητες ομάδες ασθενών. Στην 1^η ομάδα εντάχθηκαν ασθενείς με προχωρημένο ή μεταστατικό ΜΜΚΠ, οι οποίοι είχαν λάβει χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα και στη 2^η ομάδα εντάχθηκαν ασθενείς με προχωρημένο ή μεταστατικό ΜΜΚΠ, οι οποίοι είχαν λάβει ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση της έκφρασης των παραπάνω κυκλοφορούντων miRNAs στα δείγματα των ασθενών και των δύο ομάδων, μέσω ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο. Η διερεύνηση της κλινικής σημασίας των μελετώμενων miRNAs πραγματοποιήθηκε μέσω εκτενούς στατιστικής ανάλυσης.

Στην ομάδα των ασθενών με προχωρημένο ή μεταστατικό ΜΜΚΠ, οι οποίοι είχαν λάβει χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα, τα αποτελέσματα των αναλύσεων αρχικά έδειξαν ότι τα miR-146a, miR-195, miR-200c και miR-223 παρουσίασαν διαφορετική έκφραση μεταξύ των ασθενών και της ομάδας ελέγχου. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs συσχετίστηκαν με διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών, όπως ήταν η ηλικία, η κλίμακα λειτουργικής κατάστασης, ο ιστολογικός υπότυπος, το πλήθος των μεταστατικών εστιών, η παρουσία εγκεφαλικών και ηπατικών μεταστάσεων,

ενώ παράλληλα συσχετίστηκαν και με την αντικειμενική ανταπόκριση στη θεραπεία, με την ελεγχόμενη πορεία νόσου και την παρατεταμένη ελεγχόμενη νόσο. Ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες αυξημένου κινδύνου ανάπτυξης προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία αναδείχθηκαν στο σύνολο του πληθυσμού η χαμηλή έκφραση του miR-146a και η υψηλή έκφραση του miR-200c και στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα, η χαμηλή έκφραση του miR-34a και η υψηλή έκφραση του miR-200c.

Η υψηλή έκφραση του miR-200c συσχετίστηκε με μικρότερη ολική επιβίωση στο σύνολο του πληθυσμού και η υψηλή έκφραση του miR-202 συσχετίστηκε με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής στο σύνολο του πληθυσμού, καθώς και με μικρότερη ολική επιβίωση και στο σύνολο του πληθυσμού και στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα. Η υψηλή έκφραση του miR-26a συσχετίστηκε με μικρότερη ολική επιβίωση, ενώ η υψηλή έκφραση του miR-155 συσχετίστηκε με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής και με μικρότερη ολική επιβίωση, στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα. Τέλος, η υψηλή έκφραση του miR-202 αναδείχθηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης για μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής στο σύνολο του πληθυσμού, ενώ στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα βρέθηκε να αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη για μικρότερη ολική επιβίωση. Επίσης, στο σύνολο του πληθυσμού η υψηλή έκφραση του miR-200c αναδείχθηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης για μικρότερη ολική επιβίωση.

Στην ομάδα των ασθενών με προχωρημένο ή μεταστατικό ΜΜΚΠ, οι οποίοι είχαν λάβει ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1, τα αποτελέσματα των αναλύσεων αρχικά έδειξαν ότι τα miR-26a, miR-30d, miR-34a, miR-146a, miR-155, miR-195, miR-200b, miR-200c, miR-202 και miR-223 παρουσίασαν διαφορική έκφραση μεταξύ των ασθενών και της ομάδας ελέγχου. Επιπλέον, τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs συσχετίστηκαν με διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών, όπως ήταν η κλίμακα λειτουργικής κατάστασης, το στάδιο της νόσου, το πλήθος των μεταστατικών εστιών, η παρουσία ηπατικών και οστικών μεταστάσεων, ενώ παράλληλα συσχετίστηκαν και με την ελεγχόμενη πορεία νόσου και την παρατεταμένη ελεγχόμενη νόσο. Ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας αυξημένου κινδύνου ανάπτυξης προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία αναδείχθηκε στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα η χαμηλή έκφραση του miR-34a.

Η χαμηλή έκφραση του miR-34a συσχετίστηκε με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής στο σύνολο του πληθυσμού, ενώ στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα

συσχετίστηκε και με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής και με μικρότερη ολική επιβίωση. Η υψηλή έκφραση του miR-200c συσχετίστηκε με μικρότερη ολική επιβίωση και στο σύνολο του πληθυσμού και στο υποσύνολο των ασθενών με αδenoκαρκίνωμα, ενώ παράλληλα στο υποσύνολο των ασθενών με αδenoκαρκίνωμα η υψηλή έκφραση του let-7c συσχετίστηκε με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής. Η χαμηλή έκφραση του miR-26a συσχετίστηκε με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα. Τέλος, η υψηλή έκφραση του miR-200c αναδείχθηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης για μικρότερη ολική επιβίωση και στο σύνολο του πληθυσμού και στο υποσύνολο των ασθενών με αδenoκαρκίνωμα. Επιπλέον, η χαμηλή έκφραση του miR-34a αναγνωρίστηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης για μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής και μικρότερη ολική επιβίωση στο υποσύνολο των ασθενών με αδenoκαρκίνωμα. Επίσης, η χαμηλή έκφραση του miR-26a αναδείχθηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα.

Το τελευταίο κομμάτι μελέτης της παρούσας διατριβής αφορούσε στην αποσαφήνιση της προέλευσης των κυκλοφορούντων miRNAs στο πλάσμα των ασθενών. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων, η σύγκριση των κυκλοφορούντων miRNAs σε αντιστοιχισμένα δείγματα πλάσματος και μονοπύρηνων κυττάρων έδειξε ότι η έκφραση των miRNAs από τις δύο αυτές πηγές είναι ανεξάρτητη και δεν σχετίζονται μεταξύ τους, υποδεικνύοντας ότι τα συγκεκριμένα miRNAs πιθανόν να προέρχονται από τα κύτταρα του όγκου.

Συμπερασματικά, παρόλο που η λειτουργία των κυκλοφορούντων miRNAs στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης παραμένει ακόμα ασαφής, η μελέτη του ρόλου των μορίων αυτών ως πιθανοί βιοδείκτες είναι μεγάλης σημασίας. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής υποστηρίζουν περαιτέρω την υπόθεση ότι το μοτίβο έκφρασης των κυκλοφορούντων miRNAs που εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης και της αντικαρκινικής ανοσίας μέσω ρύθμισης βασικών στοιχείων του ανοσολογικού συστήματος, σχετίζεται με την επιβίωση των ασθενών και τα μόρια αυτά αξίζει να μελετηθούν περαιτέρω ως πιθανοί προγνωστικοί και προβλεπτικοί βιοδείκτες στον ΜΜΚΠ.

ABSTRACT

Lung cancer is the leading cause of cancer related deaths worldwide in both sexes, with 1.8 million deaths recorded in 2020. Five-year survival ranges from 10-20% of all lung cancer cases, because most patients at the time of diagnosis already have advanced or metastatic disease, which limits the patient's treatment options and significantly reduces the probability of survival beyond five years.

Targeted molecular therapies and recently immunotherapy have significantly improved the prognosis of lung cancer patients. Particularly, immunotherapy is an innovative therapeutic approach for metastatic lung cancer, which aims to activate the immune system and its components to suppress the tumor. However, despite the encouraging results from the administration of immunotherapy, clinical benefits are limited to a relatively small percentage of patients and therefore, the need to find new and more informative predictive biomarkers for use in daily clinical practice remains imperative.

It is now known that tumors cause a disturbance in the peripheral immune response which is associated with the progression of the disease and with an unfavorable prognosis of the patients. Therefore, the analysis of biomolecules that have a key role in the regulation of the immune response and anticancer immunity, in peripheral blood as "liquid biopsy" samples from lung cancer patients, could reveal and highlight effective or easily accessible biomarkers.

In this direction, the study of small non-coding RNA molecules (miRNAs) consists an important field of research as their expression has been found to be deregulated in a variety of pathological conditions, including NSCLC, while at the same time more and more data are converging that miRNAs can regulate the immune response against the tumor by modulating the gene expression of immunoregulatory molecules, at the post-transcriptional level, in the tumor and immune cells.

Due to the involvement of miRNAs in the different stages of tumor initiation and progression, these molecules are being examined as potential prognostic and predictive biomarkers in cancer. The effectiveness of miRNAs as biomarkers lies in their high specificity and their expression pattern that differs between normal and pathological conditions. Their significant advantages are that due to their small size (19-24 nucleotides), they are extremely stable and can be easily determined in plasma samples with high reproducibility. Plasma constitutes a pool of miRNAs secreted from different sites of the primary tumor or metastatic

foci, thus reflecting tumor heterogeneity. As a result, changes in the expression of miRNAs suggest a useful tool for early diagnosis and predicting the outcome of cancer patients.

The present research aimed to analyze the expression and clinical evaluation of circulating miRNAs that regulate the immune response in the tumor microenvironment, in the plasma of patients with advanced or metastatic NSCLC. The miRNAs examined are those that regulate immune checkpoints (miR-34a, miR-200b, miR-200c), control the regulation of T regulatory cells Tregs (miR-155, miR-146) and myeloid derived suppressor cells (MDSCs) (miR-223), and finally, those that regulate macrophage differentiation towards M1 or M2 phenotype (let-7c, miR-26a, miR-30d, miR-195, miR-202). Two independent groups of patients were used to implement the objectives of this research. Group 1 included patients with advanced or metastatic NSCLC who were treated with first-line chemotherapy based on platinum compounds and Group 2 included patients with advanced or metastatic NSCLC who were treated with second-line immunotherapy with PD-1/PD-L1 inhibitors.

Following that, quantification of the expression of the circulating miRNAs was performed in the samples of the patients of both groups, through real-time quantitative PCR. Investigation of the clinical significance of the studied miRNAs was performed through extensive statistical analysis.

In the group of patients with advanced or metastatic NSCLC who were treated with first-line chemotherapy based on platinum compounds, the results of the analysis initially showed that miR-146a, miR-195, miR-200c and miR-223 exhibited differential expression between patients and the control group. In addition, the expression levels of miRNAs were related to various clinicopathological characteristics of the patients, such as age, performance status, histological subtype, the number of metastatic foci, the presence of brain and liver metastases, while they were also related to the objective response rate, with disease control rate and prolonged duration disease control. Low expression of miR-146a and high expression of miR-200c emerged as independent predictors of increased risk of developing disease progression as an optimal response to treatment in the whole population, while in the subgroup of patients with adenocarcinoma, low expression of miR-34a and high expression of miR-200c emerged as independent predictors for the same factor.

High expression of miR-200c was associated with shorter overall survival in the whole population and high expression of miR-202 was associated with shorter progression free survival in the whole population, as well as with shorter overall survival in both the whole

population and the subgroup of patients with adenocarcinoma. High expression of miR-26a was associated with shorter overall survival, while high expression of miR-155 was associated with shorter progression free survival and shorter overall survival, in the subgroup of patients with squamous cell carcinoma. Finally, high miR-202 expression emerged as an independent prognostic marker for shorter progression free survival in the whole population, while in the subgroup of patients with adenocarcinoma it was found to be an independent prognostic marker for shorter overall survival. Also, in the whole population, high expression of miR-200c emerged as an independent prognostic indicator for shorter overall survival.

In the group of patients with advanced or metastatic NSCLC who had received second-line immunotherapy with PD-1/PD-L1 inhibitors, the results of the analysis initially showed that miR-26a, miR-30d, miR-34a, miR-146a, miR-155, miR-195, miR-200b, miR-200c, miR-202 and miR-223 exhibited differential expression between patients and the control group. In addition, the expression levels of miRNAs were related to various clinicopathological characteristics of the patients, such as performance status, the stage of the disease, the number of metastatic foci, the presence of liver and bone metastases, while at the same time they were also related to the disease control rate and the prolonged duration disease control. Low expression of miR-34a emerged as an independent predictor of increased risk of developing disease progression as an optimal response to treatment in the subgroup of patients with adenocarcinoma.

Low miR-34a expression was associated with shorter progression free survival in the whole population, while in the subgroup of patients with adenocarcinoma it was associated with both shorter progression free survival and shorter overall survival. High expression of miR-200c was associated with shorter overall survival in both the whole population and in the subgroup of patients with adenocarcinoma, while in the subgroup of patients with adenocarcinoma, high expression of let-7c was associated with progression free survival. Low expression of miR-26a was associated with a shorter progression free survival in the subgroup of patients with squamous cell carcinoma. Finally, high miR-200c expression emerged as an independent predictor of shorter overall survival in both the whole population and the subgroup of patients with adenocarcinoma. In addition, low miR-34a expression was identified as an independent prognostic marker for shorter progression free survival and shorter overall survival in the subgroup of patients with adenocarcinoma. Also, low expression of miR-26a emerged as an independent predictor of shorter progression free survival in the subgroup of patients with squamous cell carcinoma.

The last part of the present thesis aimed to identify the origin of circulating miRNAs. From the analysis of the results, the comparison of circulating miRNAs in matched samples of plasma and mononuclear cells showed that the expression of miRNAs from these two sources are independent and not related to each other, indicating that these miRNAs are possibly derived by the tumor cells.

In conclusion, although the function of circulating miRNAs in the regulation of the immune response remains unclear, the interpretation of the role of these molecules as potential biomarkers is of great importance. The results of this research further support the hypothesis that the expression pattern of circulating miRNAs involved in the regulation of immune response and antitumor immunity through regulation of key elements of the immune system is related to patient survival and these molecules should be further studied as potential prognostic and predictive biomarkers in NSCLC.

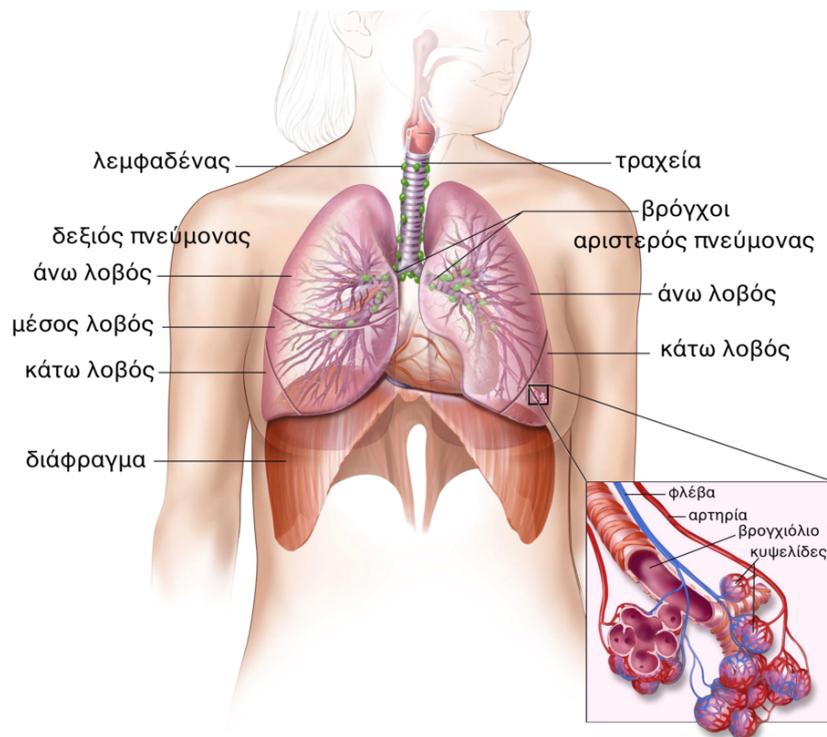
Κεφάλαιο Ι

Εισαγωγή

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ανατομία του Πνεύμονα

Ο πνεύμονας αποτελείται από ένα ζευγάρι κωνικών αναπνευστικών οργάνων (αριστερός και δεξιός πνεύμονας). Ο ρόλος των πνευμόνων είναι η μεταφορά οξυγόνου κατά την αναπνοή και η απελευθέρωση διοξειδίου του άνθρακα (ως παραπροϊόν της διαδικασίας της αναπνοής) κατά την εκπνοή. Κάθε πνεύμονας χωρίζεται τμηματικά σε δομές που ονομάζονται λοβοί (lobes), ο αριστερός πνεύμονας έχει δύο λοβούς και ο δεξιός τρεις. Κατά την αναπνοή, το εισπνεόμενο οξυγόνο, μεταφέρεται μέσω της τραχείας (κεντρικός αεραγωγός, trachea, windpipe) στους πνεύμονες. Η τραχεία χωρίζεται καθοδικά σε δύο σωληνοειδείς δομές, τους βρόγχους (bronchi), οι οποίοι εισέρχονται στους πνεύμονες και χωρίζονται περαιτέρω σε βρογχιόλια (bronchioles) και αποτελούν το εσωτερικό των πνευμόνων. Στο τέλος των βρογχιολίων συναντώνται οι αεροφόροι σάκοι ή κυψελίδες (alveoli). Ο υπεζωκότας (pleura) είναι μια λεπτή μεμβράνη που καλύπτει το εσωτερικό τοίχωμα της θωρακικής κοιλότητας και το εξωτερικό τμήμα του κάθε πνεύμονα, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένας σάκος, η υπεζωκοτική κοιλότητα (pleura cavity), που περιέχει μια μικρή ποσότητα υγρού έτσι ώστε να βοηθά την ομαλή κίνηση των πνευμόνων κατά την αναπνοή (Εικόνα 1) [1].



Εικόνα 1: Ανατομία του Αναπνευστικού Συστήματος.

Απεικονίζονται η τραχεία, οι δύο πνεύμονες, οι λοβοί και οι αεραγωγοί τους. Επίσης, απεικονίζονται οι λεμφαδένες και το διάφραγμα. Το οξυγόνο εισπνέεται στους πνεύμονες και περνάει μέσα από τις λεπτές μεμβράνες των κυψελίδων στην κυκλοφορία του αίματος.

1.2 Καρκίνος του Πνεύμονα

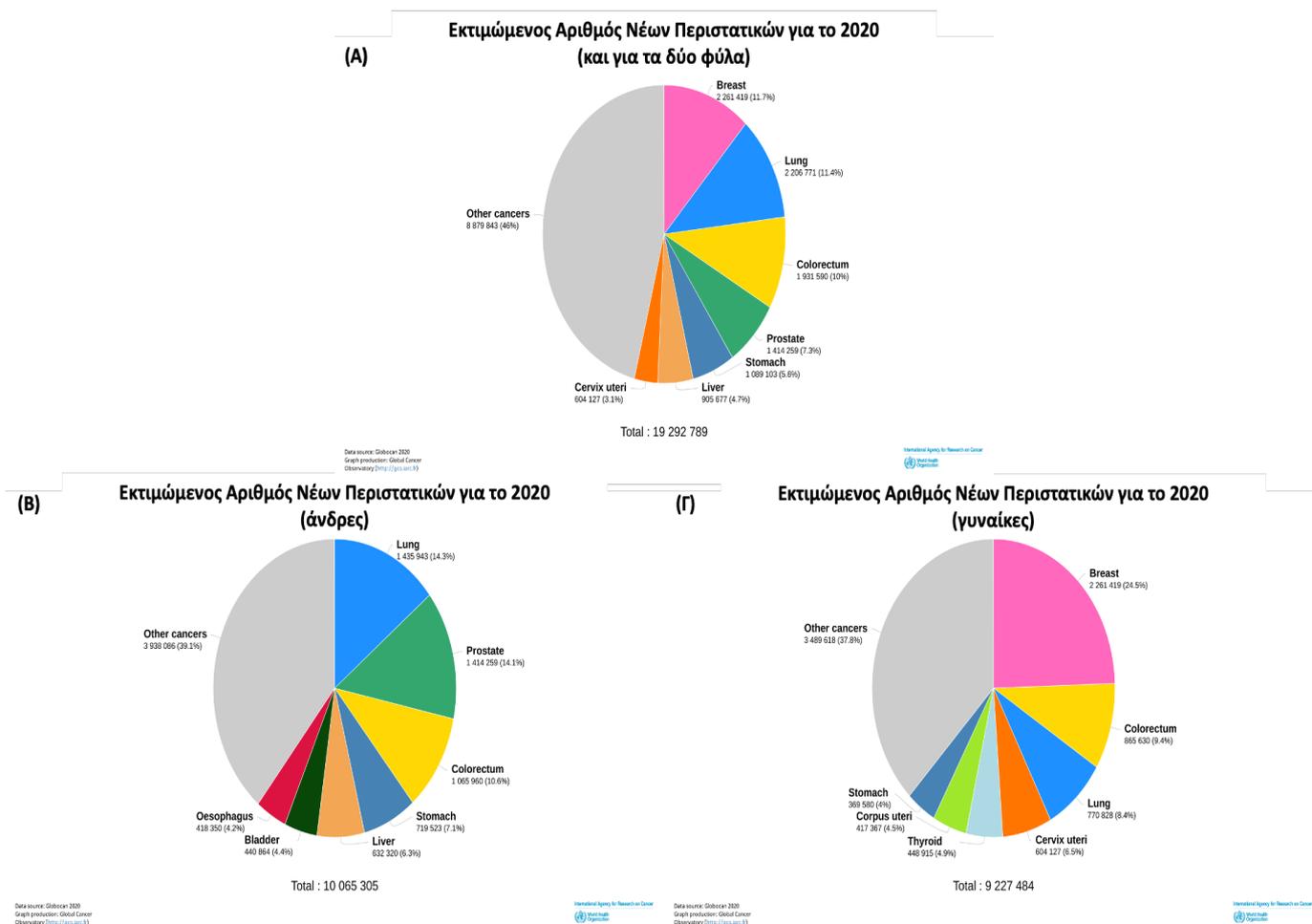
1.2.1 Επιδημιολογικά Δεδομένα

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί μέχρι και σήμερα τον πιο κοινό καρκίνο και την πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο, παγκοσμίως. Η συχνότητα εμφάνισης και τα γεωγραφικά πρότυπα διαφέρουν ανάμεσα σε άνδρες και γυναίκες, όπως αναλύεται στη συνέχεια [2].

1.2.1.1 Συχνότητα Εμφάνισης

Παγκοσμίως, το 2020, καταγράφηκαν περισσότερο από 2 εκατομμύρια νέα περιστατικά καρκίνου του πνεύμονα, ο οποίος αποτελεί πλέον τον δεύτερο (2^ο) πιο κοινό καρκίνο σε συχνότητα εμφάνισης (11.4%), μετά τον καρκίνο του μαστού, και για τα δύο φύλα. Στους άνδρες, ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ο πιο συχνά εμφανιζόμενος (14.3%), όπου για το 2020, καταγράφηκαν σχεδόν 1.5 εκατομμύρια νέα περιστατικά. Διαφορετικά είναι τα δεδομένα στο γυναικείο πληθυσμό, όπου ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ο τρίτος (3^{ος}) πιο κοινός καρκίνος σε συχνότητα εμφάνισης (8.4%), μετά τον καρκίνο του μαστού και τον καρκίνο του παχέος

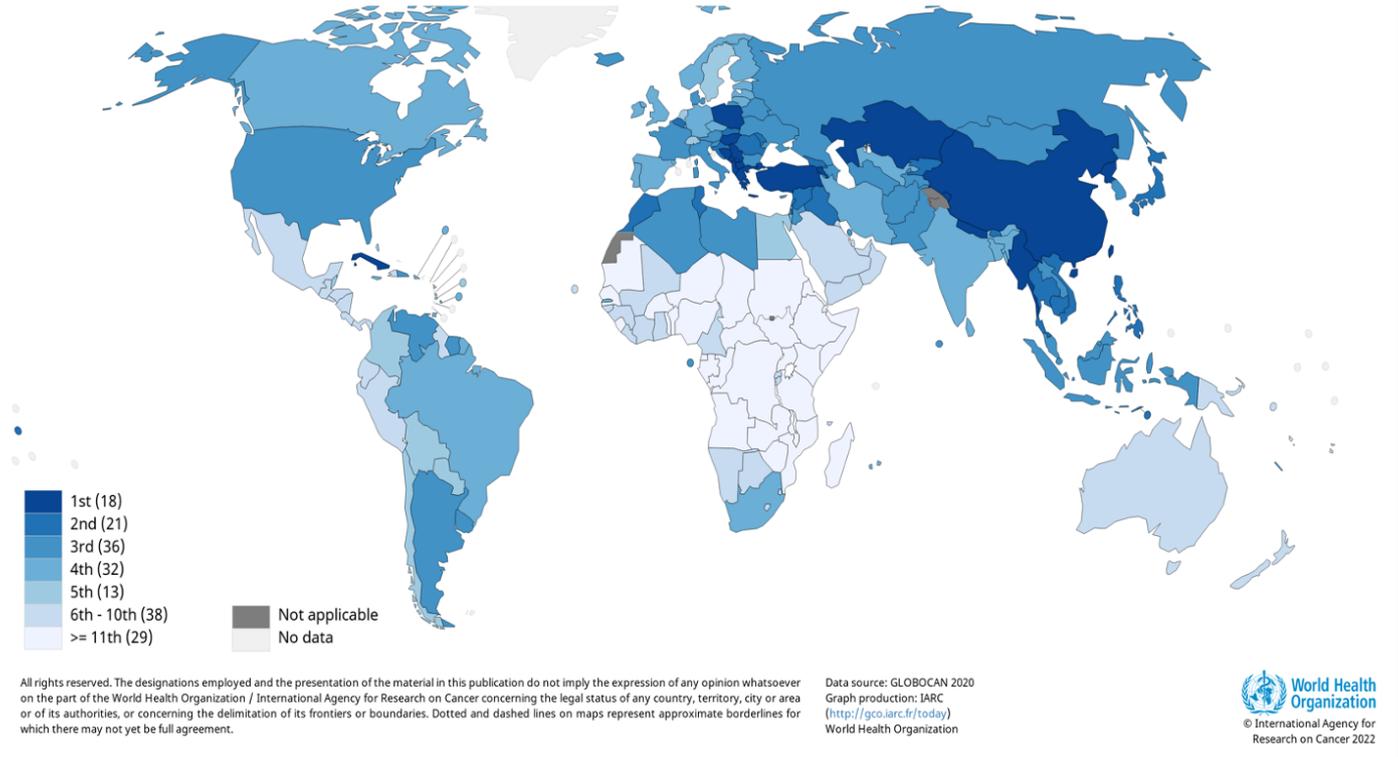
εντέρου, με λιγότερο από 800,000 νέα καταγεγραμμένα περιστατικά, για το 2020 (Εικόνα 2). Η Ελλάδα, είναι ανάμεσα στις χώρες με την υψηλότερη εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα, όπου το 2020, καταγράφηκαν 8,960 νέα περιστατικά, εκ των οποίων τα 6,786 αφορούσαν σε άνδρες και τα 2,174 σε γυναίκες (Εικόνα 3).



Εικόνα 2: Ποσοστιαία κατανομή νέων κρουσμάτων για τους 8 πιο συχνούς τύπους καρκίνου για το 2020 για τα δύο φύλα (Α), άνδρες (Β) και γυναίκες (Γ).

(GLOBOCAN 2020. Global Cancer Observatory, Accessed February 17, 2022, <http://gco.iarc.fr/>)

Παγκόσμια Κατάταξη Εκτιμώμενων Νέων Περιστατικών για το 2020

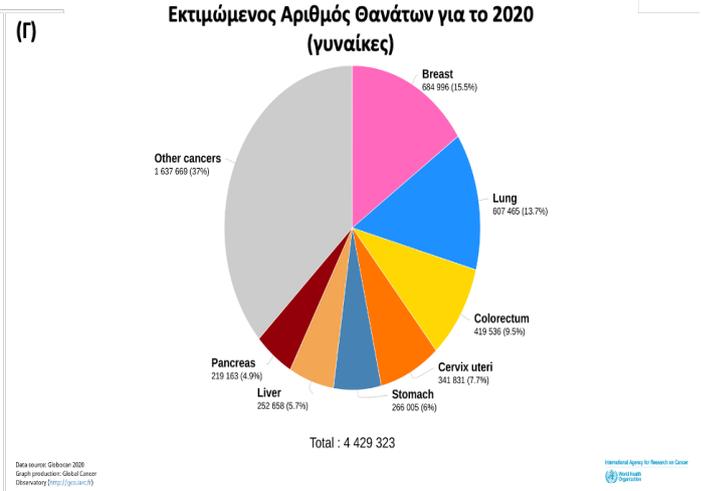
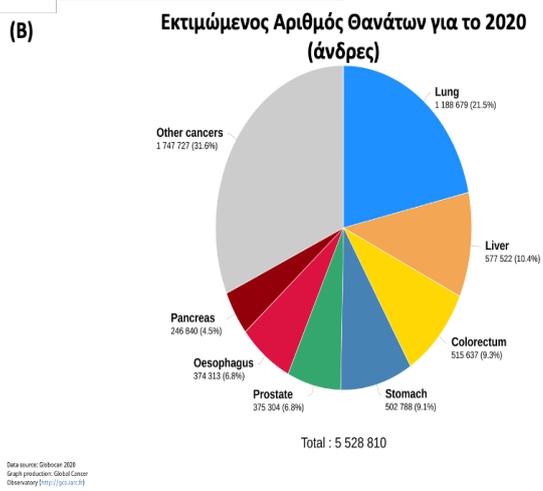
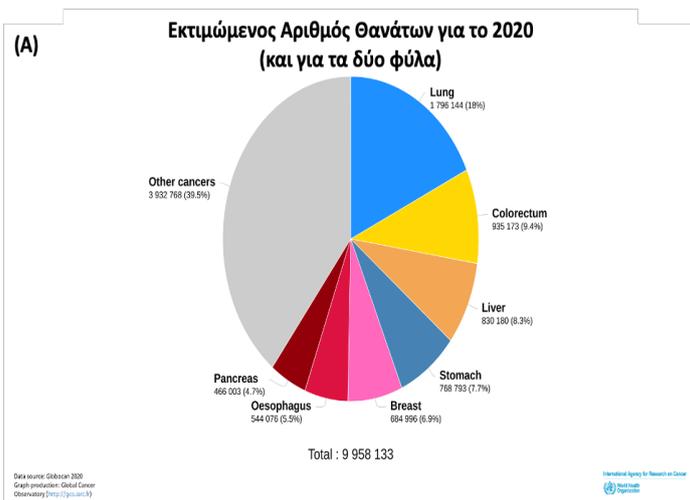


Εικόνα 3: Γεωγραφική κατανομή νέων κρουσμάτων του καρκίνου του πνεύμονα για το 2020 και για τα δύο φύλα.

(GLOBOCAN 2020. Global Cancer Observatory, Accessed February 17, 2022, <http://gco.iarc.fr/>)

1.2.1.2 Θνησιμότητα

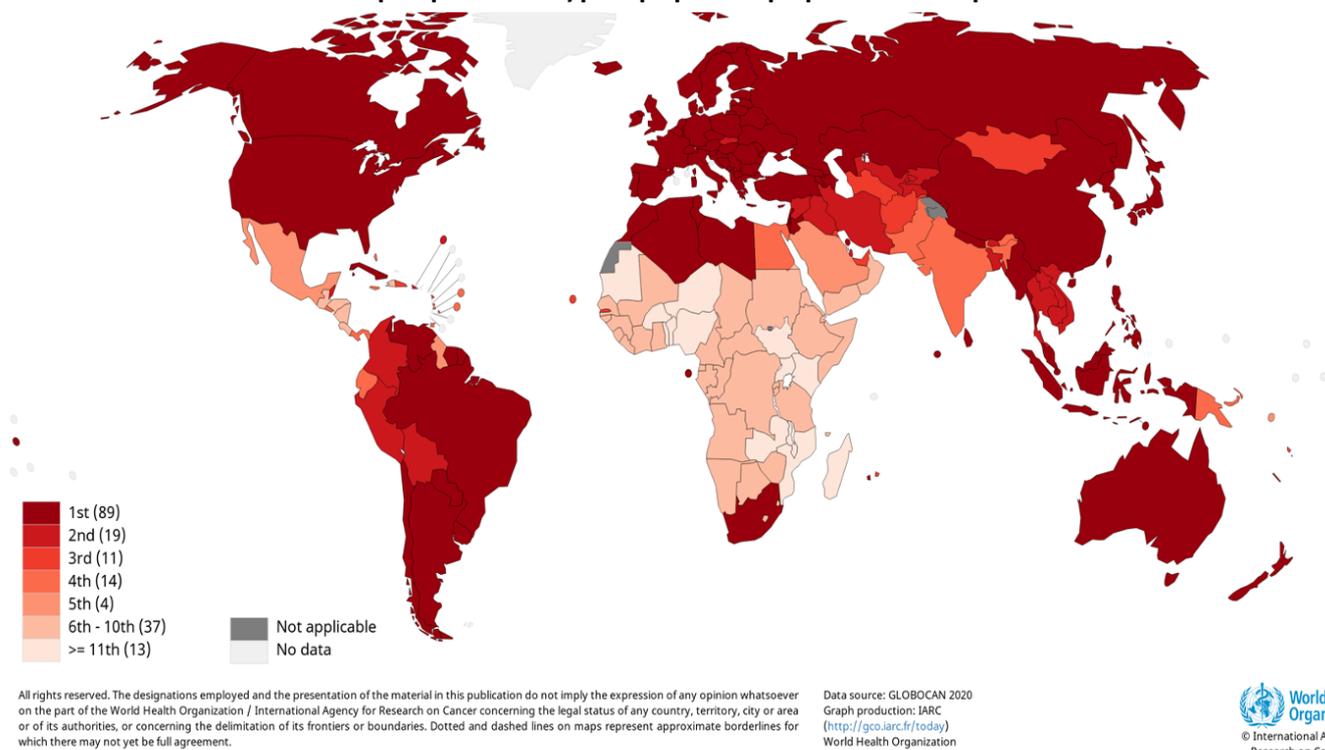
Το 2020, καταγράφηκαν παγκοσμίως σχεδόν 1.8 εκατομμύρια θάνατοι από καρκίνο του πνεύμονα. Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο και για τα δύο φύλα (18%). Στους άνδρες για το 2020, ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου (21.5%), με σχεδόν 1.2 εκατομμύρια καταγεγραμμένους θανάτους από καρκίνο, ξεπερνώντας με μεγάλη διαφορά τους θανάτους από καρκίνο του ήπατος και του παχέος εντέρου, που αποτελούν τη δεύτερη και τρίτη αιτία θανάτου από καρκίνο, αντίστοιχα. Για το 2020, στις γυναίκες καταγράφηκαν σχεδόν 600,000 θάνατοι από καρκίνο του πνεύμονα (13.7%), ο οποίος αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο, μετά τον καρκίνο του μαστού (Εικόνα 4). Στην Ελλάδα, το 2020, καταγράφηκαν 7,662 θάνατοι από καρκίνο του πνεύμονα, εκ των οποίων 5,922 θάνατοι αφορούσαν σε άνδρες και 1,740 σε γυναίκες (Εικόνα 5).



Εικόνα 4: Ποσοστιαία κατανομή περιστατικών θανάτου για τους 8 πιο συχνούς τύπους καρκίνου για το 2020 για τα δύο φύλα (Α), άνδρες (Β) και γυναίκες (Γ).

(GLOBOCAN 2020. Global Cancer Observatory, Accessed February 17, 2022, <http://gco.iarc.fr/>)

Παγκόσμια Κατάταξη Εκτιμώμενου Αριθμού Θανάτων για το 2020



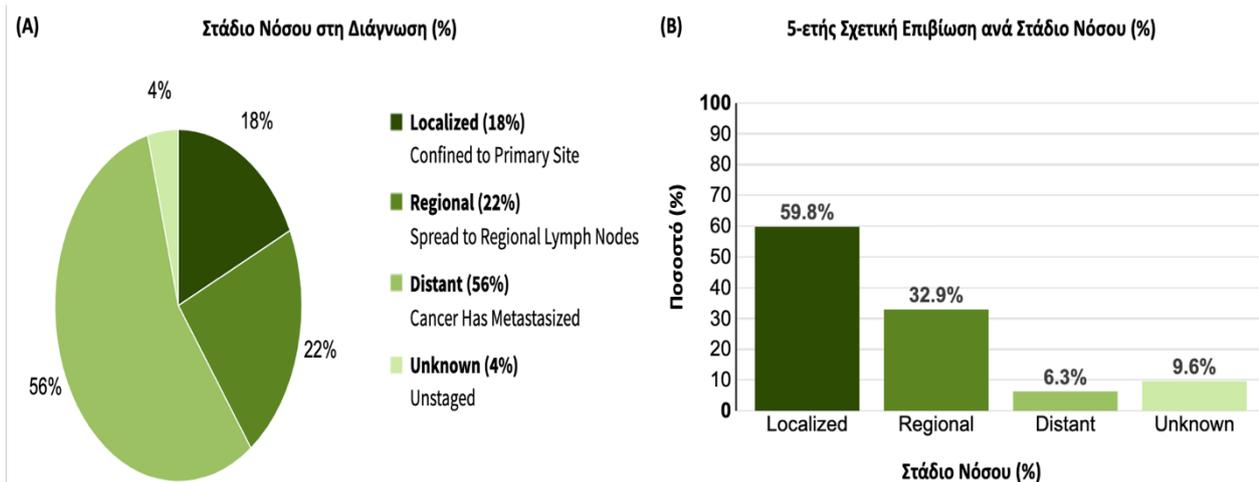
Εικόνα 5: Κατανομή περιστατικών θανάτου του καρκίνου του πνεύμονα για το 2020 και για τα δύο φύλα.

(GLOBOCAN 2020. Global Cancer Observatory, Accessed February 17, 2022, <http://gco.iarc.fr/>)

1.2.1.3 Πρόγνωση Ασθενών με Καρκίνο του Πνεύμονα

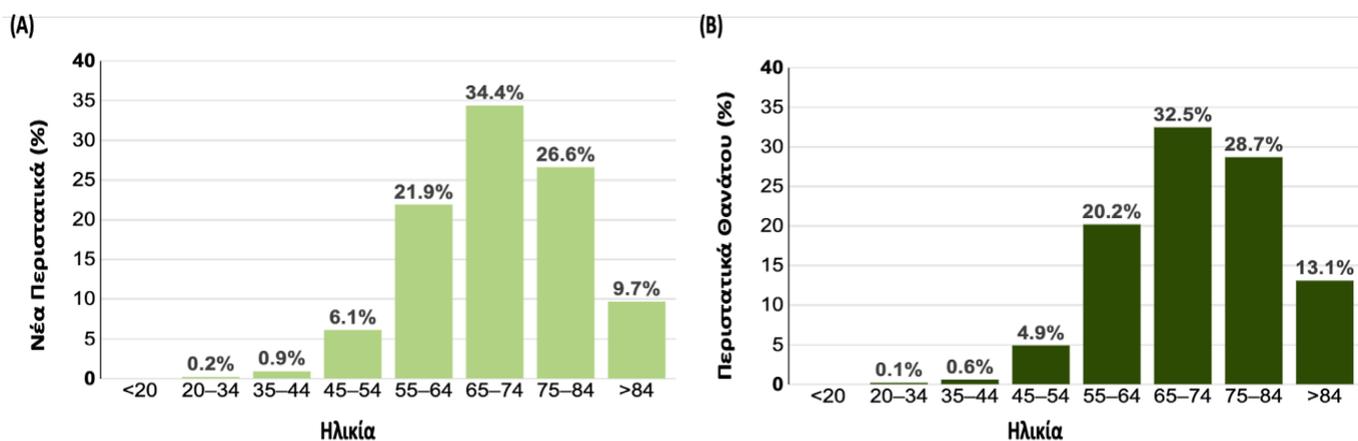
Ο καρκίνος του πνεύμονα έχει από τα χαμηλότερα ποσοστά 5-ετούς επιβίωσης, όπου η 5-ετής επιβίωση για το σύνολο των περιστατικών να κυμαίνεται στο 21.7% (2011-2017). Το στάδιο της νόσου κατά τη στιγμή της διάγνωσης καθορίζει σημαντικά τις επιλογές της θεραπείας, έχει όμως και παράλληλη εξάρτηση με τη διάρκεια της επιβίωσης.

Το 18% του συνόλου των περιστατικών με καρκίνο πνεύμονα, τη στιγμή της διάγνωσης παρουσιάζουν τοπικά εντοπισμένη νόσο και η σχετική 5-ετής επιβίωση κυμαίνεται στο 59.8% του συνόλου των εν λόγω περιστατικών. Εν αντιθέσει, το 56% του συνόλου των περιστατικών με καρκίνο του πνεύμονα, τη στιγμή της διάγνωσης παρουσιάζουν προχωρημένη ή μεταστατική νόσο, με αποτέλεσμα η 5-ετής επιβίωση να περιορίζεται στο 6.3% των συγκεκριμένων περιστατικών. Παρόλα αυτά, η τάση της 5-ετούς σχετικής επιβίωσης παρουσιάζει μια αύξηση τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω της καλύτερης πρόληψης και των διαγνωστικών τεχνικών και τέλος, λόγω της εξέλιξης και της αποτελεσματικότητας των θεραπευτικών προσεγγίσεων (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Ποσοστά σταδίου νόσου στη διάγνωση (A) και 5-ετής Σχετική Επιβίωση ανά στάδιο νόσου (B). (SEER 18 2011–2017, All Races, Both Sexes, <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lunqb.html>, Accessed February 17, 2022)

Ο μέσος όρος ηλικίας των ατόμων με καρκίνο του πνεύμονα τη στιγμή της διάγνωσης είναι τα 71 έτη και η συχνότητα εμφάνισης είναι υψηλότερη σε άτομα ηλικίας 65-74 ετών (34.4%). Ο μέσος όρος ηλικίας θανάτου από καρκίνο του πνεύμονα είναι τα 72 έτη, ενώ υψηλότερη θνησιμότητα παρατηρείται σε άτομα που ανήκουν στην ηλικιακή ομάδα των 65-74 ετών (32.5%) (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Κατανομή Νέων περιστατικών (A) και Περιστατικών Θανάτου (B), με βάση την ηλικία. (SEER 18 2011–2017, All Races, Both Sexes, <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lunqb.html>, Accessed February 17, 2022)

1.2.2 Συμπτωματολογία Καρκίνου του Πνεύμονα

Η πλειονότητα των καρκίνων του πνεύμονα δεν προκαλεί εκδήλωση συμπτωμάτων, παρά μόνο όταν η νόσος βρίσκεται ήδη σε προχωρημένο στάδιο. Τα πιο κοινά συμπτώματα περιλαμβάνουν βήχα, αιμόπτυση, θωρακικό άλγος, δύσπνοια, κόπωση και απώλεια όρεξης ή/και βάρους. Σε περιπτώσεις όπου ο καρκίνος έχει ήδη εξαπλωθεί και σε άλλα σημεία του σώματος (μετάσταση), τα συμπτώματα μπορεί να περιλαμβάνουν άλγος στα οστά, διαταραχές του νευρικού συστήματος, ενδείξεις ίκτερου σε δέρμα και οφθαλμούς, καθώς και διόγκωση λεμφαδένων [3-5].

1.2.3 Παράγοντες Κινδύνου

Ο βασικός παράγοντας που ενοχοποιείται για την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα είναι το κάπνισμα, ενώ άλλα αναγνωρισμένα αίτια είναι η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του πνεύμονα, καθώς και η χρόνια έκθεση σε βλαπτικούς παράγοντες όπως θα αναλυθεί παρακάτω. Η χρήση και κατανάλωση προϊόντων καπνού αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα κινδύνου που έχει συνδεθεί άμεσα με τη πρόκληση και εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα, με το 90% του συνόλου των περιστατικών να έχουν αποδοθεί στο κάπνισμα [6]. Η επίδραση του καπνίσματος στο αναπνευστικό επιθήλιο είναι αποτέλεσμα της δράσης ενός σύνθετου συνόλου οργανικών και ανόργανων καρκινογόνων ενώσεων οι οποίες προκαλούν σταδιακά γενετικές και επιγενετικές μεταβολές, οι οποίες μέσω ενεργοποίησης σηματοδοτικών μοριακών μονοπατιών οδηγούν στην κακοήθη εξαλλαγή των κυττάρων του αναπνευστικού επιθηλίου [2]. Στους μη καπνιστές ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την 7^η συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο [7]. Όσον αφορά στις περιπτώσεις των μη καπνιστών έχει αναφερθεί ότι η ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα σε αυτούς σχετίζεται άμεσα με περιβαλλοντικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της έκθεσης σε παθητικό κάπνισμα, της επαγγελματικής έκθεσης σε παράγοντες κινδύνου, της έκθεσης σε περιβαλλοντικά αιωρούμενα σωματίδια και της ατμοσφαιρικής ρύπανσης [8, 9].

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα με έκθεση σε οικοδομικά υλικά, όπως το ραδόνιο [10] και ο αμίαντος (asbestos). Η έκθεση σε καρκινογόνους παράγοντες στο περιβάλλον εργασίας εκτιμάται ότι ευθύνεται για το 5-10% του συνόλου των περιστατικών με καρκίνο πνεύμονα, εκ των οποίων η έκθεση σε αμίαντο είναι η πιο κοινή [11-14]. Από το 1920 έχει αναφερθεί ότι η ποιότητα του αέρα και του περιβάλλοντος είναι ικανή να προκαλέσει την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα [15]. Η

ανησυχία για την ποιότητα του αέρα αφορά και σε εξωτερικούς και σε εσωτερικούς χώρους [11]. Επαγγέλματα που έχουν παρατεταμένη έκθεση σε αυτούς τους παράγοντες έχουν αυξημένη πιθανότητα να εμφανίσουν καρκίνο του πνεύμονα [13].

Η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), είναι μια μη αναστρέψιμη χρόνια φλεγμονώδης κατάσταση που προκαλεί στένωση των μικρών αεραγωγών και καταστροφή του κυψελιδικού τοιχώματος [16, 17], συνοδευόμενη από ένα συνεχή κύκλο τραυματισμού και αποκατάστασης των βρόγχων και ως εκ τούτου είναι ικανή να προκαλέσει καρκινογένεση στον πνεύμονα [18]. Το κάπνισμα είναι ο κύριος παράγοντας πρόκλησης ΧΑΠ [16], ενώ υπάρχουν και άμεσες συσχετίσεις της παρουσίας ΧΑΠ με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα [19-21]. Η πνευμονία θεωρείται ένας παράγοντας κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα, καθότι μπορεί να επηρεάσει μηχανισμούς που σχετίζονται με τη φλεγμονή, με αντιαποπτωτικά μονοπάτια και με αγγειογένεση [22]. Δεδομένα μελετών αναφέρουν ότι το ιστορικό πνευμονίας αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα [20, 23], ενώ παράλληλα υπάρχουν ενδείξεις ότι η πνευμονία μπορεί να είναι μια επιπλοκή της νόσου και να συμπίπτει με τη διάγνωση [24].

Τα άτομα που έχουν προσβληθεί με τον ιό HIV έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης πολλών διαφορετικών τύπων καρκίνου, γεγονός το οποίο αποδίδεται στην ανοσοκαταστολή που προκαλεί ο ιός [25-28]. Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ο πιο συχνά εμφανιζόμενος καρκίνος σε HIV θετικά άτομα/ οροθετικούς και αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου των οροθετικών, αντιπροσωπεύοντας σχεδόν το 30% του συνόλου των θανάτων από καρκίνο της συγκεκριμένης ομάδας πληθυσμού [29-31].

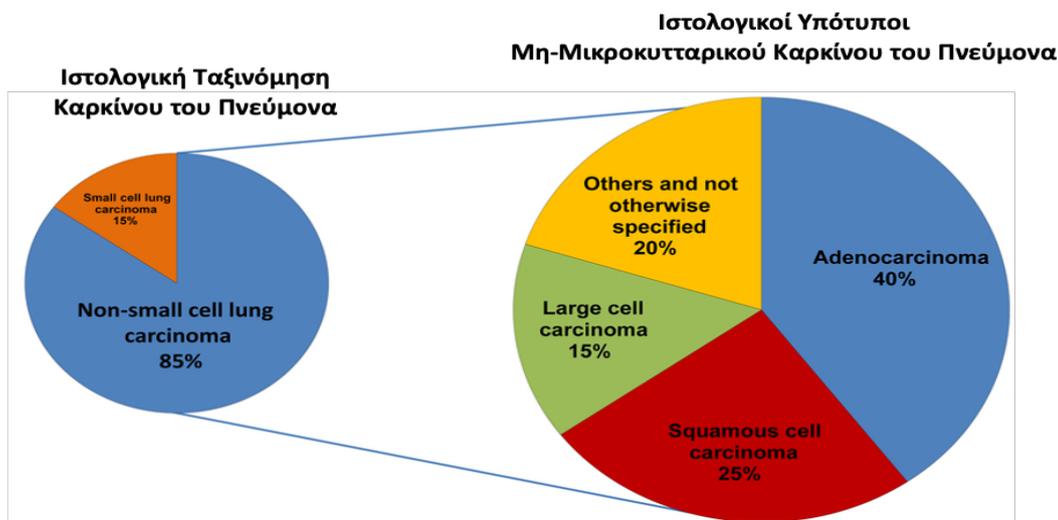
Η υπόθεση της γενετικής προδιάθεσης για την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα βασίζεται στο γεγονός ότι δεν εμφανίζουν καρκίνο του πνεύμονα όλοι οι καπνιστές. Η ύπαρξη μέλος/μελών σε μία οικογένεια που έχουν νοσήσει με καρκίνο του πνεύμονα αυξάνει κατά 1.7 φορές την πιθανότητα εμφάνισης και σε άλλα μέλη [32]. Αναλύσεις στο επίπεδο του γονιδιώματος έχουν συσχετίσει [33] με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα [34, 35]. Οι όγκοι τείνουν να εμφανίζουν οδηγές μεταλλάξεις γονιδίων (genetic driver mutations), όπου οι περισσότερες εξ αυτών εμπλέκονται σε μονοπάτια κυτταρικής σηματοδότησης [35]. Άλλες γενετικές και επιγενετικές αλλαγές μπορεί να προκαλέσουν καταστολή της έκφρασης ογκοκατασταλτικών γονιδίων (tumor suppressors), ενώ υπάρχουν και συγκεκριμένες μεταλλάξεις που έχουν επιβεβαιωθεί ότι σχετίζονται με συγκεκριμένο ιστολογικό υπότυπο [35].

1.2.4 Ιστολογική Ταξινόμηση Καρκίνου του Πνεύμονα

Η ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του πνεύμονα αποτελεί αναπόσπαστο στοιχείο της διαδικασίας της διάγνωσης, καθότι επηρεάζει σημαντικά την κλινική διαχείριση του ασθενή και την πρόγνωση της νόσου [36]. Η συντριπτική πλειοψηφία των καρκινωμάτων πνεύμονα είναι όγκοι που προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα και κατηγοριοποιούνται με βάση το μέγεθος και την εμφάνιση των κυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο [37]. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (Π.Ο.Υ.), η αναγνώριση των ιδιαίτερων ιστολογικών χαρακτηριστικών του όγκου, το βάθος της διήθησης και το μοτίβο εξάπλωσης φέρουν προγνωστική σημασία. Για παράδειγμα αναφέρεται ότι, η εξάπλωση του όγκου μέσω των εναέριων χώρων σχετίζεται με υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής ύστερα από χειρουργική αφαίρεση βλάβης και οφείλει να αναφέρεται στην παθολογική αξιολόγηση. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται επίσης στα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής διάγνωσης και εκτίμησης, τα οποία είναι εξαιρετικά χρήσιμα κυρίως σε περιπτώσεις όπου τα κύτταρα του όγκου δεν παρουσιάζουν τυπικά κυτταρολογικά χαρακτηριστικά στο οπτικό μικροσκόπιο [36].

Ο καρκίνος του πνεύμονα χωρίζεται σε δύο ευρείες κατηγορίες στο Μη-Μικροκυτταρικό (ΜΜΚΠ, Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) και στο Μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΚΠ, Small Cell Lung Cancer, SCLC) [38], με βάση την ιστολογική εκτίμηση. Ο ΜΜΚΠ αντιπροσωπεύει σχεδόν το 85% του συνόλου των περιστατικών με καρκίνο του πνεύμονα, εκ των οποίων το 40% αφορά σε αδενοκαρκινώματα (adenocarcinoma), το 25% σε καρκινώματα πλακωδών κυττάρων (squamous cell carcinoma) και τέλος το 15% σε μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (large cell carcinomas) (Εικόνα 8) [39-42]. Άλλοι λιγότερο συχνοί ιστολογικοί υπότυποι είναι το αδενοπλακώδες καρκίνωμα (adenosquamous carcinoma), το πλειομορφικό σαρκωματοειδές καρκίνωμα (pleomorphic sarcomatoid carcinoma), το νευροενδοκρινικό μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (large cell neuroendocrine carcinoma) και ο καρκινοειδής όγκος (carcinoid tumor) [43].

Ο ΜΚΠ ανήκει στους νευροενδοκρινείς όγκους και αντιστοιχεί στο 10-15% του συνόλου των κακοηθειών του πνεύμονα (Εικόνα 8). Αποτελεί έναν ταχέως αναπτυσσόμενο τύπο καρκίνου του πνεύμονα, που επεκτείνεται στο υποβλεννογόνια λεμφαγγεία και τους περιφερικούς λεμφαδένες, ενώ σπάνια παρατηρείται βρογχική διήθηση.



Εικόνα 8: Ιστολογική ταξινόμηση καρκίνου του πνεύμονα και ιστολογικοί υπότυποι του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (ΜΜΚΠ) [42].

1.1.4.2.1 Ιστολογική Ταξινόμηση του Μη Μικροκυτταρικού Καρκίνου του Πνεύμονα

Ι. Αδενοκαρκίνωμα (Adenocarcinoma)

Το αδενοκαρκίνωμα είναι ο πιο κοινός ιστολογικός υπότυπος καρκίνου του πνεύμονα (40% του συνόλου των περιστατικών), όπου η έκθεση σε ουσίες καπνού είναι η κύρια αιτία πρόκλησης και εμφάνισης του [44]. Παρόλο που υπάρχει αιτιολογική σχέση με το κάπνισμα, το αδενοκαρκίνωμα εμφανίζεται και σε μη καπνιστές, συχνότερα από οποιονδήποτε άλλο ιστολογικό υπότυπο [45]. Το αδενοκαρκίνωμα προέρχεται από βλεννογόνα κύτταρα των τραχειοβρογχικών αδένων και συνήθως προσβάλλει τα κύτταρα που βρίσκονται στους περιφερικούς βρόγχους του πνεύμονα, ενώ συχνά εμφανίζεται και σε περιοχές χρόνιας ή πρώην φλεγμονής [45].

Προοδευτικά με την εξέλιξη της νόσου το αδενοκαρκίνωμα χωρίζεται περαιτέρω σε 4 ομάδες: το αδενοκαρκίνωμα in situ (adenocarcinoma in situ, AIS), ελάχιστα διηθητικό καρκίνωμα (minimally invasive adenocarcinoma, MIA), το διηθητικό καρκίνωμα (invasive adenocarcinoma) και τις παραλλαγές του αδενοκαρκινώματος. Τα AIS και MIA αναφέρονται ως βρογχοκυψελιδικοί όγκοι και παρουσιάζουν την καλύτερη πρόγνωση [43, 46]. Το διηθητικό αδενοκαρκίνωμα απαρτίζεται από ένα ετερογενές σύνολο υπότυπων, το λεπιδικό αδενοκαρκίνωμα, το κυψελοειδές, το θηλώδες, το μικρο-θηλώδες και το συμπαγές αδενοκαρκίνωμα με παραγωγή βλέννας. Η πρόγνωση είναι ευνοϊκότερη για το λεπιδικό καρκίνωμα, ενδιάμεση για το κυψελοειδές και το θηλώδες και κακή για το μικρο-θηλώδες και το συμπαγές καρκίνωμα [47].

Η ανάπτυξη και η εμφάνιση του αδενοκαρκινώματος, σύμφωνα με μεγάλες μελέτες, όπως είναι για παράδειγμα το “The Cancer Genome Atlas” (TCGA), έχει συσχετιστεί με την ύπαρξη σωματικών γονιδιακών αλλοιώσεων [48]. Δεδομένου ότι το κάπνισμα είναι ένας παράγοντας καρκινογένεσης με ισχυρή μεταλλαξιγόνο δράση, το αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα είναι ένας όγκος που χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη, σε υψηλό ποσοστό των περιπτώσεων, σωματικών μεταλλάξεων σε σημαντικά ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια [49]. Συγκεκριμένα, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *TP53* (απαντώνται στο 46% των περιπτώσεων), *EGFR* (μετάλλαξη στο 27% των περιπτώσεων), *KRAS* (μετάλλαξη στο 32% των περιπτώσεων), καθώς και *KEAP1*, *STK11* και *NF1* (σε μικρότερα ποσοστά) [50]. Οι μεταλλάξεις του *KRAS* είναι συχνότερες στους καπνιστές, ενώ του *EGFR* στις γυναίκες και στους μη καπνιστές [47], ενώ έχουν αναπτυχθεί και στοχευμένες θεραπείες αναστολής του μονοπατιού του *EGFR* [48]. Έχουν βρεθεί επίσης και χρωμοσωμικές ανωμαλίες, οι πιο γνωστές εκ των οποίων είναι οι αναδιατάξεις και μετατοπίσεις στο γονίδιο του *ALK*, του *ROS1* και του *RET* [50]. Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες για το *ALK* συνήθως εμφανίζονται σε όγκους που δε φέρουν μεταλλάξεις του *EGFR* ή του *KRAS* και έχουν χαμηλότερη συχνότητα των μεταλλάξεων του *TP53* [50].

Συνοπτικά, ως αδενοκαρκίνωμα ορίζεται ένας επιθηλιακός όγκος με αδενική διαφοροποίηση, ο οποίος παράγει βλέννα και μπορεί να ανιχνευθεί με χρωστική βλεννίνης, όπως είναι για παράδειγμα η μουκικαρμίνη (mucicarmin) ή με την έκφραση του δείκτη πνευμονοκυττάρων, της ναψίνης Α (napsin A), ή με τον παράγοντα μεταγραφής του θυρεοειδούς 1 (thyroid transcription factor 1, TTF1) (Εικόνα 9) [51].

II. Πλακώδες Καρκίνωμα (Squamous cell carcinoma)

Το πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα [52] είναι ο 2^{ος} πιο συχνά εμφανιζόμενος υπότυπος ΜΜΚΠ, αφορά στο 25% περίπου των περιστατικών με καρκίνο του πνεύμονα και συνήθως εντοπίζεται αρχικά στους κεντρικούς βρόγχους και μετέπειτα στην τραχεία. Το πλακώδες καρκίνωμα είναι πιο συχνό στους άνδρες και σχετίζεται άμεσα με το ιστορικό καπνίσματος [5], όπου οι χρόνιοι καπνιστές έχουν 5.5 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης πλακώδους καρκινώματος σε σχέση με τους μη καπνιστές, ενώ ο κίνδυνος αυτός αυξάνεται δραματικά, ανάλογα και με τα έτη και την ένταση του καπνίσματος [53]. Τα κύτταρα του υπότυπου αυτού έχουν πλακώδη δομή, παρόμοια με αυτή των επιδερμικών κυττάρων [5]. Στις περισσότερες των περιπτώσεων εμφανίζεται σε κεντρικά σημεία των μεγάλων βρόγχων και παρουσιάζει μεταστάσεις σε τοπικά εκτεινόμενους λεμφαδένες. Οι μεγάλοι σε μέγεθος όγκοι

μπορεί να υποστούν κεντρικά νέκρωση, με αποτέλεσμα τη δημιουργία κοιλότητας (cavitation) [5].

Το πλακώδες καρκίνωμα ταξινομείται περαιτέρω σε πρωτογενές (primitive), βασικό (basal), εκκριτικό (secretory) και κλασικό (classical). Εξ' αυτών, το πρωτογενές πλακώδες καρκίνωμα είναι ο τύπος που συνδέεται με τη χειρότερη επιβίωση των ασθενών [54]. Σύμφωνα με τον Π.Ο.Υ. το πλακώδες καρκίνωμα χωρίζεται σε κερατινοποιημένο (keratinizing), μη κερατινοποιημένο (non keratinizing) και βασικοειδές (basaloid) [52]. Το κερατινοποιημένο πλακώδες καρκίνωμα εμφανίζει χαρακτηριστικά κερατινοποίησης, το μη κερατινοποιημένο εμφανίζει δείκτες πλακώδους φύσης, όπως είναι για παράδειγμα το p40 και το p63, και τέλος, το βασικοειδές είναι μια σπάνια κατηγορία κακώς διαφοροποιημένου πλακώδους καρκινώματος [52].

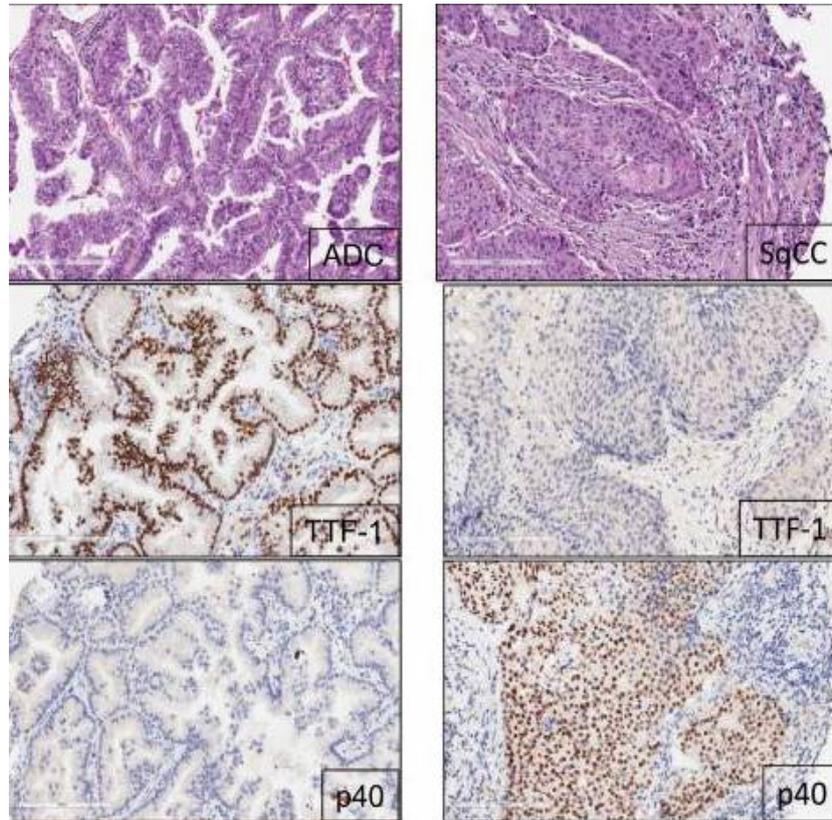
Ως πλακώδες καρκίνωμα χαρακτηρίζεται ένας κακοήθης επιθηλιακός όγκος που είτε παρουσιάζει κερατινοποίηση και/ή μεσοκυτταρικές γέφυρες, είτε εκφράζει ανοσοϊστοχημικούς δείκτες διαφοροποίησης πλακωδών κυττάρων, όπως είναι το p40, το p63 και η κυτταροκερατίνη 5/6 (cytokeratin) (Εικόνα 9) [51]. Η διαπίστωση της πλακώδους διαφοροποίησης είναι ιδιαίτερα σημαντική στην επιλογή της κατάλληλης θεραπευτικής στρατηγικής.

Σύμφωνα με το TCGA, η εμφάνιση και η ανάπτυξη τους πλακώδους καρκινώματος σχετίζεται με την ύπαρξη σωματικών γονιδιακών αλλοιώσεων [55, 56]. Όμοια με το αδενοκαρκίνωμα, το πλακώδες καρκίνωμα είναι μια οικογένεια όγκων με υψηλό φορτίο σωματικών μεταλλάξεων [49]. Στο πλακώδες καρκίνωμα, οι μεταλλάξεις συνήθως συμβαίνουν σε ογκοκατασταλτικά γονίδια, όπως είναι το *TP53* (μετάλλαξη στο 81% των περιπτώσεων), το *MLL2* (μετάλλαξη στο 20% των περιπτώσεων), το *CDKN2A* (μετάλλαξη στο 15% των περιπτώσεων), το *KEAP1* (μετάλλαξη στο 12% των περιπτώσεων) και το *PTEN* (μετάλλαξη στο 8% των περιπτώσεων), προκαλώντας την αποσιώπηση τους [50]. Σε αντίθεση με το αδενοκαρκίνωμα, οι όγκοι του πλακώδους καρκινώματος σπάνια εμφανίζουν μεταλλάξεις στα γονίδια του *EGFR* και του *KRAS* [56].

III. Μεγαλοκυτταρικό Καρκίνωμα (Large cell carcinoma)

Το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα αφορά στο 10% περίπου των περιστατικών με ΜΜΚΠ, αντιπροσωπεύοντας καρκινώματα αδιαφοροποίητα, τα οποία στερούνται μορφολογικών ή ανοσοϊστοχημικών στοιχείων αδενοκαρκινώματος, πλακώδους ή

νευροενδοκρινικού καρκινώματος. Εντοπίζεται κυρίως περιφερικά, ενώ συνήθως έχει ογκώδη και νεκρωτική εμφάνιση [52]. Τα καρκινικά κύτταρα είναι μεγάλα, πολυγωνικού σχήματος, με πλειόμορφους, κενοτοπιώδεις πυρήνες, τα οποία αναπτύσσονται χωρίς συγκεκριμένο αρχιτεκτονικό μοτίβο ή σχηματίζουν φωλιές [57]. Η πρόγνωση του μεγαλοκυτταρικού καρκινώματος είναι ιδιαίτερα πτωχή.



Εικόνα 9: Ενδεικτικά παραδείγματα ιστολογικών διαφορών μεταξύ αδenoκαρκινώματος (ADC) και πλακώδους καρκινώματος (SqCC) με ανοσοϊστοχημική χρώση (IHC, H & E) και ανάλυση δεικτών (TTF-1 % p40).

Το αδenoκαρκίνωμα παρουσιάζει θετική έκφραση για τον δείκτη TTF-1, με πυρηνική εντόπιση, και αρνητική έκφραση για το p40. Το πλακώδες καρκίνωμα παρουσιάζει θετική έκφραση για τον δείκτη p40, με πυρηνική εντόπιση, και αρνητική έκφραση για τον δείκτη TTF-1 [58].

1.1.5 Διάγνωση

Όταν η κλινική εικόνα ενός ασθενούς θέτει την υποψία καρκίνου του πνεύμονα πρέπει να γίνει άμεσα επιβεβαίωση της διάγνωσης και σταδιοποίηση της νόσου. Η τεκμηρίωση της ύπαρξης καρκίνου του πνεύμονα βασίζεται στα ευρήματα του ακτινολογικού ελέγχου και κυρίως στην ιστολογική εξέταση από δείγμα βιοψίας, κυτταρολογικό υλικό ή από χειρουργικό παρασκεύασμα [5].

Η ανεύρεση πνευμονικής μάζας στη συμβατική ακτινογραφία θώρακος αποτελεί έναν από τους συνηθέστερους τρόπους ανίχνευσης της νόσου. Η αξονική τομογραφία θώρακος και άνω κοιλίας με χορήγηση σκιαγραφικού μέσου υπερέχει της απλής ακτινογραφίας θώρακα για τη σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα, προσφέροντας πληροφορίες για την τοπική επέκταση του πρωτοπαθούς όγκου, την παρουσία υπεζωκοτικής συλλογής και την πιθανή διήθηση των λεμφαδένων [59]. Η μαγνητική τομογραφία (MRI) υπερέχει της αξονικής στην ανεύρεση μεταστατικών εστιών στον εγκέφαλο και στη διαφορική διάγνωση της μεταστατικής εστίας από το αδένωμα στα επινεφρίδια. Επίσης, η MRI στη σπονδυλική στήλη ενδείκνυται σε ασθενείς με υποψία επισκληρίδιων μεταστάσεων στο νωτιαίο σωλήνα ή πιθανό καρκίνο του πνεύμονα με συνοδό ραχιαλγία ή προσβολή του βραχιόνιου πλέγματος [60].

Η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET) με 18-φθόριο- δεοξυγλυκόζη (F-18 FDG) είναι μία καθιερωμένη μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως τα τελευταία χρόνια για τη διάγνωση και σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα. Βασίζεται στη διαφορά της πρόσληψης ραδιοσημασμένης γλυκόζης από το νεοπλασματικό ιστό σε σχέση με το φυσιολογικό. Χρησιμοποιείται επίσης στην εκ νέου σταδιοποίηση της νόσου μετά από θεραπεία [61].

Η κυτταρολογική εξέταση πτυέλων αποτελεί μία γρήγορη και οικονομική διαγνωστική μέθοδο του καρκίνου του πνεύμονα. Ενώ στο παρελθόν ήταν πάγια εξέταση, σήμερα έχει αντικατασταθεί από τη βρογχοσκόπηση με εύκαμπτο ενδοσκόπιο [62]. Η διαδερμική βιοψία πνεύμονα υπό αξονικό τομογράφο είναι μία ακριβής, ελάχιστα επεμβατική μέθοδος που μπορεί να οδηγήσει με ασφάλεια στην τελική διάγνωση. Ενδείκνυται για την ιστολογική διάγνωση μιας περιφερικής βλάβης (πρωτοπαθούς ή δευτεροπαθούς) και την επιβεβαίωση μεταστατικών αλλοιώσεων. Η διαγνωστική ακρίβεια της μεθόδου εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος της αλλοίωσης, με την αύξηση του μεγέθους να αυξάνει την ακρίβεια, και την απόσταση της βλάβης από το σημείο εισόδου [62].

Η βρογχοσκόπηση με εύκαμπτο βρογχοσκόπιο αποτελεί τη σημαντικότερη εξέταση για τη λήψη κυτταρολογικού και ιστολογικού υλικού για τη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα,

ιδιαίτερα όταν πρόκειται για κεντρικούς ενδοβρογχικούς όγκους. Κατά τη διάρκεια της εξέτασης λαμβάνονται βρογχικά εκπλύματα (washing) και ιστολογικά δείγματα με λαβίδα βιοψίας, κυτταρολογική βούρτσα (brushing) και κυτταρολογική βελόνη (TBNA/B). Τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη πιο εξελιγμένων βρογχοσκοπίων που συνδυάζουν τη χρήση ενδοβρογχικού υπερήχου κατά τη διάρκεια της εξέτασης (EBUS), βελτίωσε σημαντικά τη διαγνωστική ευαισθησία της μεθόδου [63].

1.1.6 Σταδιοποίηση

Η σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα είναι ένα απαραίτητο και κρίσιμο στάδιο της διάγνωσης, με πολυσχιδείς στόχους, όπως είναι η επιλογή της βέλτιστης θεραπευτικής αντιμετώπισης, η παροχή πληροφοριών σχετικά με την πρόγνωση, η καλύτερη αξιολόγηση της πορείας της νόσου, η ανταλλαγή πληροφοριών με άλλα θεραπευτικά κέντρα, και η συνεχής διερεύνηση του καρκίνου.

Το διεθνές σύστημα σταδιοποίησης (TNM-based staging system) περιγράφει την ανατομική επέκταση της νόσου. Ο δείκτης T (tumor) του συστήματος TNM αφορά στο μέγεθος και τη διηθητικότητα του όγκου και χωρίζεται σε 5 βασικές κατηγορίες: Tis, T1, T2, T3 και T4, με τις κατηγορίες T1 και T2 να χωρίζονται σε επιμέρους ομάδες. Ο δείκτης N (lymph Node) του συστήματος TNM αφορά στη συμμετοχή των λεμφαδένων, όπου το βασικό κριτήριο είναι σε εγκάρσια διάμετρο να ξεπερνούν το 1 εκατοστό. Ο δείκτης N χωρίζεται σε 4 κατηγορίες: N0, N1, N2 και N3. Ο δείκτης M (Metastasis) του συστήματος TNM αφορά στην παρουσία ή απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων και χωρίζεται σε 4 κατηγορίες: M0, M1a, M1b και M1c.

Η σταδιοποίηση και η ταξινόμηση των όγκων σύμφωνα με την 8^η έκδοση της ταξινόμησης κατά TNM παρατίθενται στον Πίνακα 1 [64]. Τα στάδια κατά TNM για τον ΜΜΚΠ κυμαίνονται από το I ως το IV, όπου όσο μικρότερο το στάδιο, τόσο μικρότερη είναι και η εξάπλωση της νόσου.

Πίνακας 1: Σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα με βάση την 8^η έκδοση του TNM [65, 66].

TNM		N0	N1	N2	N3
M0	Tis	0			
	T1mi	IA1			
	T1a	IA1	IIB	IIIA	IIIB
	T1b	IA2	IIB	IIIA	IIIB
	T1c	IA3	IIB	IIIA	IIIB
	T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB
	T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB
	T3	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
	T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
M1a	Tx	IVA	IVA	IVA	IVA
M1b	Tx	IVA	IVA	IVA	IVA
M1c	Tx	IVB	IVB	IVB	IVB

1.1.7 Θεραπευτική Αντιμετώπιση & Διαχείριση

Η θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών με ΜΜΚΠ εξαρτάται άμεσα από το στάδιο της νόσου κατά τη στιγμή της διάγνωσης [5]. Για τον ΜΜΚΠ, η χειρουργική εκτομή αποτελεί την πιο αποτελεσματική μορφή θεραπείας. Η ακτινοθεραπεία σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία μπορεί να επιφέρει ίαση σε μια μικρή ομάδα ασθενών, όμως μπορεί να είναι και ανακουφιστική (palliative) σε περισσότερους ασθενείς. Η προφυλακτική εγκεφαλική ακτινοβολία μπορεί να μειώσει την πιθανότητα εγκεφαλικών μεταστάσεων, ωστόσο δεν υπάρχουν επαρκείς και σαφείς ενδείξεις της επίδρασής της στην ποιότητα ζωής και την επιβίωση [67, 68]. Η χημειοθεραπεία παραμένει μέχρι και σήμερα ο ακρογωνιαίος λίθος της αντιμετώπισης ασθενών με προχωρημένη νόσο ΜΜΚΠ, παρόλο που τα οφέλη της έχουν βραχυπρόθεσμη διάρκεια. Η εύρεση σωματικών μεταλλάξεων στον καρκίνο του πνεύμονα οδήγησε στην ανάπτυξη μοριακά στοχευμένων θεραπειών (molecular targeted therapy), οι οποίες έχουν αυξήσει την επιβίωση της ομάδας αυτής των ασθενών [69].

Η χειρουργική επέμβαση αποτελεί θεραπευτική επιλογή για ασθενείς σταδίου I (λοβεκτομή ή πνευμονεκτομή, με ταυτόχρονη δειγματοληψία λεμφαδένων), για τους ασθενείς σταδίου II (ακολουθούμενη από επικουρική χημειοθεραπεία) και για ασθενείς σταδίου IIIA (με προσβεβλημένους λεμφαδένες τάξης N1, ενώ αν οι προσβεβλημένοι λεμφαδένες είναι τάξης

N2, τη χειρουργική επέμβαση συνοδεύει επικουρική χημειοθεραπεία) [36]. Τα ποσοστά 5-ετούς επιβίωσης για το στάδιο IA είναι 78% και για το στάδιο IB 53% [36]. Τα ποσοστά της 5-ετούς επιβίωσης είναι για το στάδιο IIA 46% και για το στάδιο IIB 36%.

Η ταυτόχρονη χορήγηση χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας αποτελεί θεραπευτική προσέγγιση για ασθενείς σταδίου IIIA (με προσβεβλημένους λεμφαδένες τάξης N2-N3) και σταδίου IIIB [36]. Για τα 2 πρώτα χρόνια της νόσου, η επιβίωση των ασθενών κυμαίνεται στο 40-45%, ωστόσο η 5-ετής επιβίωση περιορίζεται στο 20% των περιπτώσεων με ΜΜΚΠ.

Η νόσος σταδίου IV θεωρείται ανίατη και η θεραπεία στοχεύει στην βελτίωση της επιβίωσης και στην ανακούφιση από τα συμπτώματα. Στη θεραπεία ανταποκρίνεται μόνο το 10-30% του συνόλου των ασθενών και τα ποσοστά 5-ετούς επιβίωσης κυμαίνονται στο 5%. Για αυτή την ομάδα των ασθενών συνήθως επιλέγεται μονοθεραπεία ή συνδυασμός δύο χημειοθεραπευτικών σκευασμάτων, χωρίς όμως να παρατηρείται σημαντική βελτίωση και οφέλη στην ολική επιβίωση [36]. Η ανάπτυξη στοχευμένων θεραπειών στις αρχές του 2000, στοχεύοντας μεταλλάξεις κίριων πρωτεϊνών για την ανάπτυξη και αναπαραγωγή των κυττάρων, που αργότερα ονομάστηκαν οδηγές μεταλλάξεις, έχει βελτιώσει σημαντικά τα ποσοστά επιβίωσης των ασθενών σταδίου IV [70]. Από τις πιο κοινές μεταλλάξεις που συναντώνται σε όγκους πνεύμονα ασθενών με ΜΜΚΠ σταδίου IV, είναι οι σωματικές μεταλλάξεις στα γονίδια *EGFR* και *ALK*.

Η ανοσοθεραπεία αποτελεί μια ακόμα θεραπευτική επιλογή για αυτή την ομάδα ασθενών. Σκοπός της ανοσοθεραπείας είναι η ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και της ανοσολογικής απόκρισης, ούτως ώστε να αναγνωρίζονται αποτελεσματικότερα τα καρκινικά κύτταρα και να τα θανατώνονται. Τα καρκινικά κύτταρα δρουν πάνω στα σημεία ελέγχου του ανοσοποιητικού και προκαλούν ανοχή. Από τα πιο γνωστά και μελετημένα σημεία ελέγχου είναι ο άξονας PD-1/PD-L1. Ο φυσιολογικός ρόλος του κυτταρικού υποδοχέα προγραμματισμένου θανάτου 1 (programmed death 1, PD-1) είναι η αρνητική ρύθμιση και καταστολή της λειτουργίας των δραστικών T κυττάρων, ενώ παράλληλα προάγεται η ανοχή έναντι των αντιγόνων. Ο PD-1 μπορεί να αλληλεπιδράσει με δύο πρωτεΐνες, τον προσδέτη του υποδοχέα προγραμματισμένου θανάτου 1 (programmed death ligand 1, PD-L1) και τον προσδέτη του υποδοχέα προγραμματισμένου θανάτου 2 (programmed death ligand 2, PD-L2). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Φαρμάκων (Π.Ο.Φ, Federal Drug Administration, F.D.A.) έχει εγκρίνει αναστολείς του PD-1 και του PD-L1 (Nivolumab, Pembrolizumab, Atezolizumab). Η

αναστολή του υποδοχέα PD-1 και του προσδέτη PD-L1, επιτρέπει τη φυσιολογική ενεργοποίηση των T κυττάρων.

Το Nivolumab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα τάξης IgG4 έναντι του PD-1 και έχει εγκριθεί από τον F.D.A. για αδenoκαρκίνωμα και πλακώδες καρκίνωμα ΜΜΚΠ. Χορηγείται σε ασθενείς που έχουν υποτροπιάσει ύστερα από χημειοθεραπεία με βάση πλατινούχα σύμπλοκα, ενώ μπορεί και να χορηγηθεί και σε ασθενείς με υψηλή ή χαμηλή έκφραση PD-L1 [71, 72]. Το Pembrolizumab είναι, επίσης, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα τάξης IgG4 έναντι του PD-1. Είναι εγκεκριμένο από τον F.D.A. για χορήγηση σε ασθενείς που δεν έχουν λάβει άλλη θεραπεία προηγουμένως, με έκφραση PD-L1>50%. Σε ασθενείς με PD-L1<50% χορηγείται σε συνδυασμό με πεμετρεξίδη (pemetrexed) και καρβοπλατίνη (carboplatin), απουσία μεταλλάξεων για EGFR και ALK [71, 72]. Το Atezolizumab είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα τάξης IgG1 έναντι του PD-L1. Έχει εγκριθεί από τον F.D.A. και χορηγείται σε ασθενείς κατά τη διάρκεια ή μετά τη χημειοθεραπεία με βάση πλατινούχα σύμπλοκα, ενώ μπορεί να χορηγηθεί και σε ασθενείς που φέρουν μεταλλάξεις του EGFR και του ALK και δεν έχουν ανταποκριθεί στη στοχευμένη θεραπεία [71, 72].

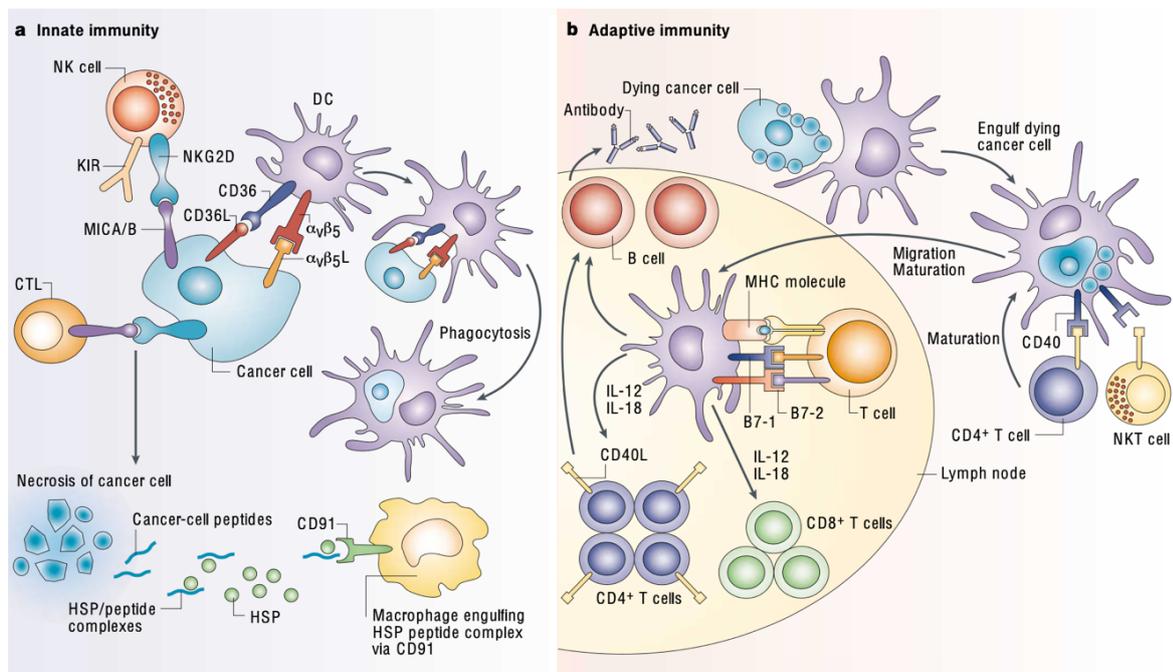
1.2 Το ανοσοποιητικό Σύστημα στον Καρκίνο

1.2.1 Το Ανοσοποιητικό Σύστημα και η Ανοσολογική Απόκριση

Το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να αναγνωρίσει οποιοδήποτε ξένο οργανισμό ή μη εαυτή ουσία που έχει εισέλθει στον ξενιστή, καθώς και οποιοδήποτε μετασχηματισμένο κύτταρο ως μη εαυτό, όπως είναι για παράδειγμα ένα καρκινικό κύτταρο, και το οποίο μπορεί να αποβεί επιβλαβές για τον οργανισμό (Εικόνα 10) [73, 74].

Η έμφυτη ανοσία αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού, δεν παρουσιάζει ειδικότητα για το αντιγόνο και αποτελείται από διάφορα κύτταρα/τελεστές, όπως είναι τα κύτταρα φυσικοί φονείς (natural killer cells, NK), τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα (polymorphonuclear leukocytes) και τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (antigen presenting cells, APCs), όπως είναι τα μακροφάγα (Μφ) και τα δενδριτικά κύτταρα (dendritic cells). Τα κύτταρα αυτά προκαλούν έκκριση ιντερφερόνης γ (interferon γ , IFN- γ), περφορινών και φλεγμονωδών κυτοκινών, που επάγουν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων [75].

Εν αντιθέσει, η προσαρμοστική ανοσία παρουσιάζει ειδικότητα για το αντιγόνο, η απόκριση χρειάζεται περισσότερο χρόνο και παράλληλα αναπτύσσεται ανοσολογική μνήμη στον οργανισμό. Η προσαρμοστική ανοσία χωρίζεται σε κυτταρική, που περιλαμβάνει τα Τ κύτταρα, και σε χυμική, που περιλαμβάνει τα Β κύτταρα [76, 77]. Ως εκ τούτου, η προσαρμοστική ανοσία είναι ικανή για ισχυρές και ανθεκτικές αντικαρκινικές ανοσολογικές αποκρίσεις. Η έμφυτη και η προσαρμοστική ανοσία είναι αλληλένδετες, διότι τα κύτταρα της έμφυτης είναι αναγκαία για την ενεργοποίηση της προσαρμοστικής [75].



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση της έμφυτης (a) και της προσαρμοστικής ανοσίας (b) κατά την αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων.

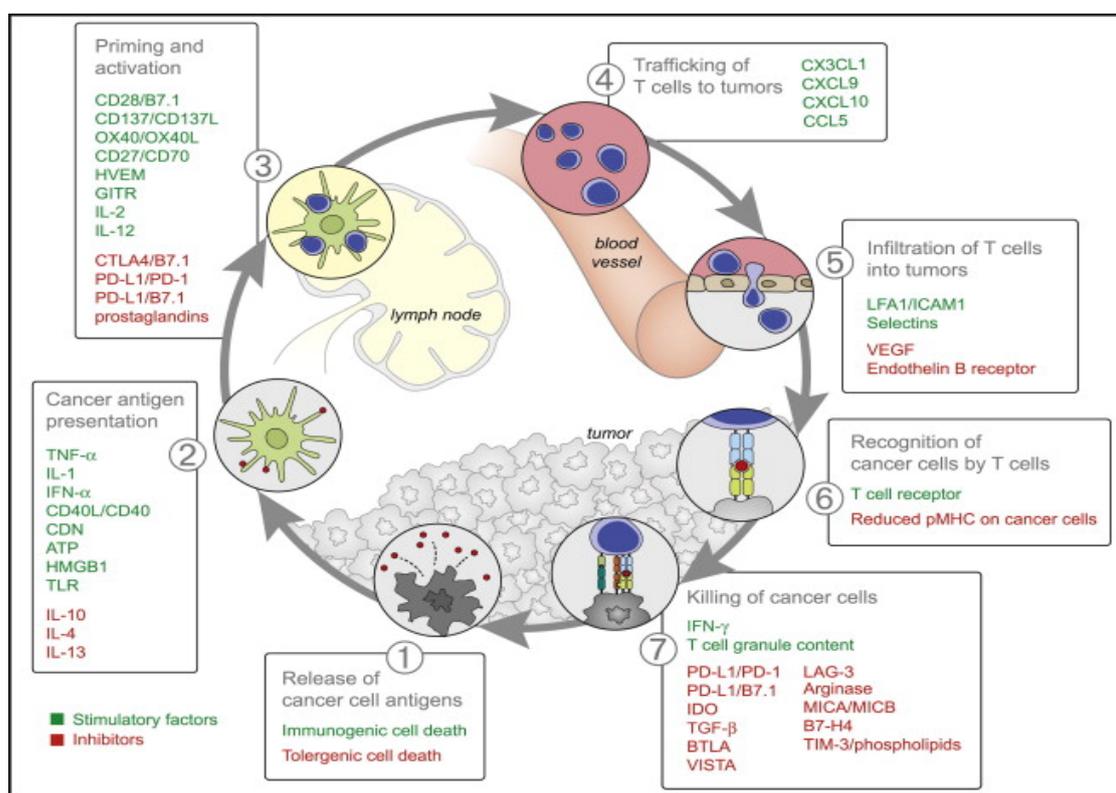
Απεικονίζονται οι διάφοροι πληθυσμοί ανοσοκυττάρων, καθώς και οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις και οι οδοί αναγνώρισης και αλληλεπίδρασης με τα καρκινικά κύτταρα [78].

1.2.2 Αντικαρκινική Ανοσολογική Απόκριση και Ανοσοεπιτήρηση

Η ανοσοεπιτήρηση (immunosurveillance) [79, 80] είναι μια φυσιολογική διαδικασία του ανοσοποιητικού συστήματος κατά την οποία τα κύτταρα ενός οργανισμού βρίσκονται υπό συνεχή επιτήρηση και αν παρατηρηθεί οποιοσδήποτε μετασχηματισμός σε ένα κύτταρο, τότε το τελευταίο αναγνωρίζεται και εξαλείφεται [81].

Για να θεωρηθεί επιτυχής η ανοσολογική απόκριση και η εξάλειψη των μετασχηματισμένων καρκινικών κυττάρων πρέπει να ακολουθηθεί μια διαδικασία 7 σταδίων (Εικόνα 11), η οποία περιγράφεται ως αντικαρκινική ανοσολογική απόκριση (cancer immunity cycle) [82, 83]. Η αφετηρία της ανοσολογικής απόκρισης είναι η αναγνώριση των νεοαντιγόνων που προέρχονται από τα κύτταρα του όγκου, κατά την απόπτωση ή τον κυτταρικό θάνατο, από τα δενδριτικά κύτταρα (dendritic cells, DCs) της έμφυτης ανοσίας και η έκφραση προφλεγμονωδών παραγόντων, όπως είναι οι κυτοκίνες (Βήμα 1). Ακολούθως, τα DCs παρουσιάζουν μέσω του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας I και II (major histocompatibility complex, MHC-I και MHC-II) τα αντιγόνα του όγκου στα T κύτταρα της προσαρμοστικής ανοσίας (Βήμα 2), με σκοπό την ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των δραστικών T κυττάρων έναντι των αντιγόνων (Βήμα 3) [84]. Η αποτελεσματικότητα της

αντικαρκινικής ανοσίας έγκειται στην αναλογία των δραστικών Τ κυττάρων (CD8+) έναντι των ρυθμιστικών Τ κυττάρων (T regulatory cells, Tregs, CD4+). Τα ενεργοποιημένα δραστικά Τ κύτταρα εγκαταλείπουν τους λεμφαδένες (Βήμα 4), μεταναστεύουν μέσω της αιματικής κυκλοφορίας και διεισδύουν στον όγκο (Βήμα 5). Τα δραστικά Τ κύτταρα έναντι των καρκινικών αντιγόνων ονομάζονται πλέον κυτταροτοξικά Τ λεμφοκύτταρα (cytotoxic T lymphocytes, CTLs), τα οποία αναγνωρίζουν με μεγάλη ειδικότητα τα καρκινικά κύτταρα και προσδένονται σε αυτά μέσω του υποδοχέα των Τ κυττάρων (T cell receptor, TCR) και του ήδη προσδεμένου αντιγόνου που βρίσκεται στο σύμπλεγμα MHC-I (Βήμα 6). Το τελικό αποτέλεσμα είναι η στόχευση και θανάτωση των καρκινικών κυττάρων/στόχων (Βήμα 7). Τα καρκινικά κύτταρα που οδηγούνται σε ανοσογονικό κυτταρικό θάνατο στο Βήμα 7 απελευθερώνουν καρκινικά αντιγόνα, προκαλώντας εκ νέου επιστροφή στο Βήμα 1 και επανέναρξη του κύκλου [83].



Εικόνα 11: Ο κύκλος της αντικαρκινικής ανοσολογικής απόκρισης [82].

Απεικονίζονται σε κάθε βήμα οι συνδιεγερτικοί και ανασταλτικοί παράγοντες.

Στους ασθενείς με καρκίνο, η αντικαρκινική ανοσολογική απόκριση δεν είναι πλήρως αποτελεσματική. Αυτό προκύπτει διότι τα αντιγόνα του όγκου μπορεί να εμφανίζουν μικρή

ανοσογονικότητα και να μην αναγνωρίζονται επιτυχώς από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα του ανοσοποιητικού, τα T κύτταρα μπορεί να μην είναι ικανά να διεισδύσουν στο μικροπεριβάλλον του όγκου (Tumor Microenvironment, TME), ή στο TME μπορεί να υπάρχουν άλλοι παράγοντες με κατασταλτική δράση που επηρεάζουν τη λειτουργία των δραστικών T κυττάρων [85]. Τα βήματα 3 και 6 που αναφέρθηκαν προηγουμένως αποτελούν σημεία ελέγχου του ανοσοποιητικού και ο φυσιολογικός τους ρόλος είναι η διατήρηση της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού συστήματος και η αποφυγή της αυτοανοσίας [83]. Ωστόσο, τα καρκινικά κύτταρα έχουν αναπτύξει ένα πλήθος εξειδικευμένων μηχανισμών με σκοπό τη διαφυγή της αναγνώρισης από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού και την παράλληλη καταστολή της λειτουργίας του [86].

1.2.3 Μηχανισμοί Ανοσοδιαφυγής κατά την Αντικαρκινική Ανοσολογική Απόκριση

Η ανοσοδιαφυγή κατά την αντικαρκινική ανοσολογική απόκριση αποτελεί σημαντικό ορόσημο των καρκινικών κυττάρων. Τα βήματα της περιγράφονται λεπτομερώς παρακάτω.

II. Ανοσοδιαφυγή κατά το Βήμα 1 της ανοσολογικής απόκρισης

Η απελευθέρωση αντιγόνων από το TME κατά την απόπτωση ή τον κυτταρικό θάνατο των καρκινικών κυττάρων είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την αποτελεσματικότητα των CTLs. Όταν τα προερχόμενα από τον όγκο αντιγόνα έχουν μειωμένη ανοσογονικότητα, η αναγνώριση από τα DCs και η αντιγονοπαρουσίαση είναι περιορισμένες, βοηθώντας με τον τρόπο αυτό την ανοσοδιαφυγή των καρκινικών κυττάρων [87]. Αποτελέσματα κλινικών μελετών έχουν δείξει ότι και το χαμηλό φορτίο μεταλλάξεων του όγκου (tumor mutational burden, TMB) είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με την ανοσοδιαφυγή των καρκινικών κυττάρων, και η παρουσία αυξημένου φορτίου μεταλλάξεων στον όγκο σχετίζεται με βελτιωμένη αποτελεσματικότητα της ανοσοθεραπείας [88, 89]. Το χαμηλό φορτίο μεταλλάξεων του όγκου σχετίζεται με μικρότερο αριθμό νεοαντιγόνων που παρουσιάζονται μέσω του συμπλέγματος MHC-I, επομένως μειώνεται η πιθανότητα αναγνώρισης αυτών ως ξένα, επηρεάζοντας και την ενεργοποίηση των CTLs [90, 91]. Σε κλινικές μελέτες ασθενών με MMKP που έλαβαν Nivolumab βρέθηκε ότι οι ασθενείς με χαμηλό TMB είχαν μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής έναντι των ασθενών με υψηλό TMB (2.6 vs. 7.1 μήνες, αντίστοιχα) [88].

III. Ανοσοδιαφυγή κατά το Βήμα 2 της ανοσολογικής απόκρισης

Τα νεοαντιγόνα του όγκου προκαλούν τη διέγερση και μετέπειτα ωρίμανση των DCs, γεγονός το οποίο οδηγεί με τη σειρά του στην αύξηση της έκφρασης των συνδιεγερτικών μορίων, των συμπλόκων MHC/αντιγονικών πεπτιδίων και των κυτοκινών [92]. Προκειμένου τα DCs να παραμείνουν σε ανώριμη κατάσταση και να αποφευχθεί μια επιτυχής αντιγονοπαρουσίαση, τα καρκινικά κύτταρα ρυθμίζουν θετικά την έκφραση παραγόντων, όπως είναι για παράδειγμα η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) [93, 94], η ιντερλευκίνη 35 (IL-35) [95], τα λιπίδια [96] και τα προερχόμενα από τον όγκο εξωσώματα [97]. Καθένας από αυτούς τους παράγοντες επηρεάζει την ωρίμανση των DCs και κατά συνέπεια την ενεργοποίηση των δραστικών T κυττάρων.

IV. Ανοσοδιαφυγή κατά το Βήμα 3 της ανοσολογικής απόκρισης

Όταν ένα αντιγόνο έχει ενδοκυτταρωθεί από το DC και παρουσιάζεται στην επιφάνεια του μέσω του συμπλέγματος MHC-I και οδηγεί στην ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των δραστικών T κυττάρων (CTLs). Η διαδικασία αυτή μπορεί να διαταραχθεί από τη δράση των μορίων που λειτουργούν ως σημεία ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως το κυτταροτοξικό αντιγόνο των T λεμφοκυττάρων 4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4, CTLA-4). Η ενεργοποίηση των δραστικών T κυττάρων προϋποθέτει 2 σήματα: τη σύνδεση του TCR με το σύμπλεγμα MHC και την ένωση των συνδιεγερτικών μορίων CD28 και B7 (CD80 και CD86). Ωστόσο, μετά τη δημιουργία του συμπλόκου TCR/MHC, αυξάνεται η έκφραση του μορίου CTLA-4 στην επιφάνεια των T κυττάρων, το οποίο δεσμεύεται με μεγαλύτερη συγγένεια και ειδικότητα στο μόριο B7 (από το CD28) και προκαλεί απελευθέρωση ανασταλτικών παραγόντων, έναντι του πολλαπλασιασμού και την ενεργοποίησης των T κυττάρων (φυσιολογικός μηχανισμός διατήρησης της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού συστήματος) [98, 99].

V. Ανοσοδιαφυγή κατά το Βήμα 4 & 5 της ανοσολογικής απόκρισης

Τα ενεργοποιημένα δραστικά T κύτταρα εγκαταλείπουν τους λεμφαδένες, εισέρχονται στην αιματική κυκλοφορία και στη συνέχεια μεταφέρονται στη θέση του όγκου, όπου αλληλεπιδρούν με τα μόρια του ενδοθηλίου και τελικά διαπερνούν τα τοίχωμα των αγγείων. Η αύξηση αγγειογενετικών παραγόντων, όπως είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (vascular endothelial growth factor, VEGF) προκαλεί το σχηματισμό νέων αγγείων,

διαμεσολαβώντας ως μηχανισμός ανοσοδιαφυγής. Επιπλέον, η αύξηση του επιπέδου έκφρασης του υποδοχέα της ενδοθηλίνης Β εμποδίζει τα δραστικά Τ κύτταρα να εισέλθουν στη θέση του όγκου και κατ' επέκταση παρατηρείται απουσία διηθημένων Τ λεμφοκυττάρων (tumor infiltrating lymphocytes, TILs) στο TME. Στον καρκίνο του μαστού η υψηλή έκφραση του υποδοχέα της ενδοθηλίνης Β σχετίζεται με κακή κλινική έκβαση των ασθενών και αυξημένη μεταστατική δραστηριότητα στους λεμφαδένες [100].

Ο παράγοντας VEGF συμμετέχει στο σχηματισμό αγγείων, τα οποία δρουν ως εμπόδιο στην εξαγγείωση των δραστικών Τ κυττάρων από την αιματική κυκλοφορία προς τον όγκο [101, 102] και μειώνει τη δυνατότητα των δραστικών Τ κυττάρων να προσκολληθούν στα ενδοθηλιακά κύτταρα [103, 104]. Αποτελέσματα ερευνών σε ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του στομάχου προτείνουν ότι η αναστολή του μονοπατιού VEGF/VEGFR μπορεί να μετατρέψει το ανοσοκατασταλτικό TME σε ανοσοδιεγερμένο [105].

VI. Ανοσοδιαφυγή κατά το Βήμα 6 της ανοσολογικής απόκρισης

Η αποτελεσματική δράση των CTLs προϋποθέτει την είσοδο των δραστικών Τ κυττάρων στο TME του όγκου και την αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων που εκφράζουν το σύμπλοκο MHC-I/νεοαντιγόνο στην επιφάνεια τους. Στο στάδιο αυτό, τα καρκινικά κύτταρα χάνουν ή μειώνουν τα μόρια του συμπλόκου MHC-I/πεπτιδίου και γίνονται ουσιαστικά 'μη ορατά' στα δραστικά Τ κύτταρα. Πληθώρα μελετών υποδεικνύει ότι ελαττώματα στη δομή του μορίου της Β-2-μικροσφαιρίνης (Β-2-microglobulin, Β2Μ) προκαλεί αντίσταση στην ανοσοθεραπεία [106, 107]. Στον καρκίνο του πνεύμονα, η απώλεια της έκφρασης του μορίου Β2Μ, μέσω γενετικών και επιγενετικών τροποποιήσεων, έχει συσχετιστεί με αντίσταση στην ανοσοθεραπεία [108]. Ένα επίσης σημαντικό μόριο που συνδέεται στο σύμπλεγμα MHC-I και συμμετέχει στην αναγνώριση των καρκινικών κυττάρων από τα δραστικά Τ κύτταρα είναι η ταπασίνη (tapasin). Στον ΜΜΚΠ, η έκφραση της ταπασίνης σχετίζεται με αυξημένη διήθηση στο TME από τα δραστικά Τ κύτταρα και ευμενή πρόγνωση [109].

VII. Ανοσοδιαφυγή κατά το Βήμα 7 της ανοσολογικής απόκρισης

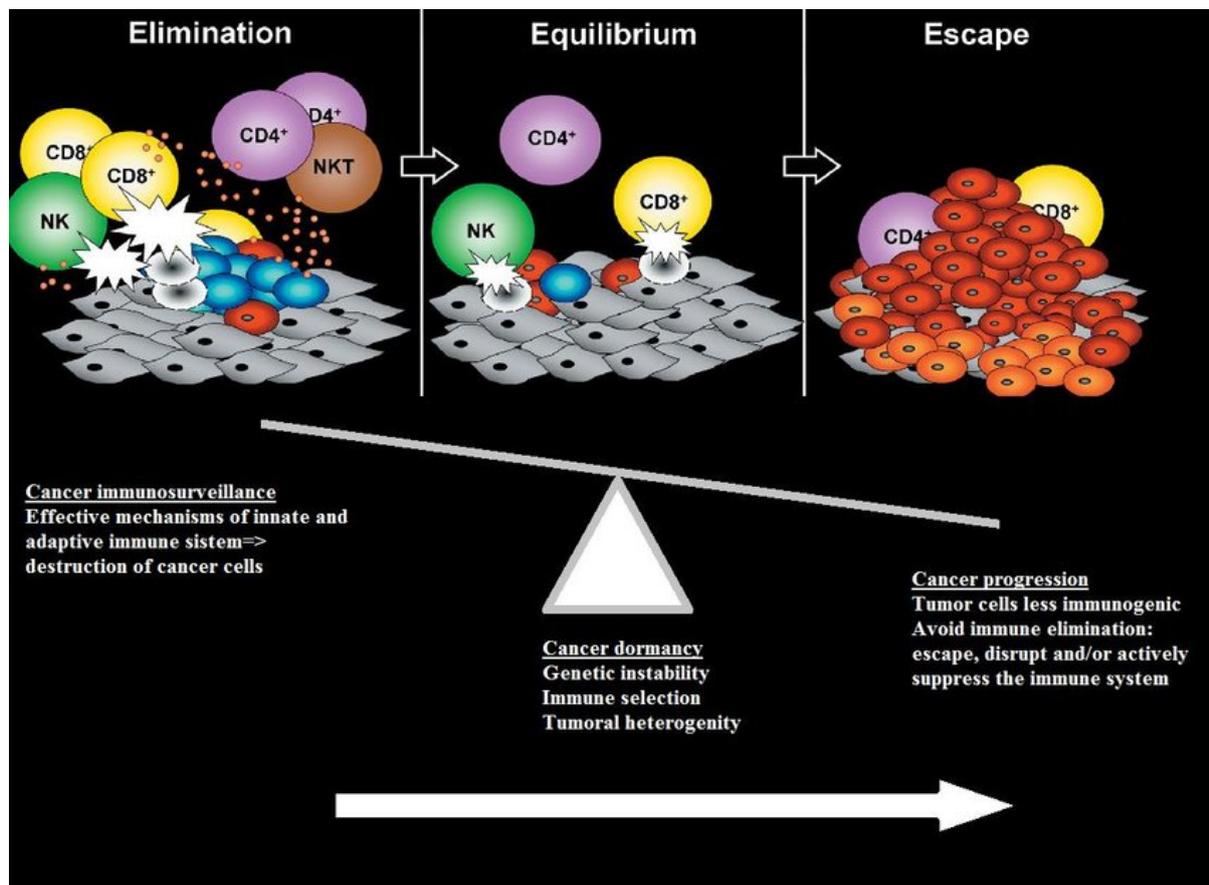
Ακόμη και στην περίπτωση όπου τα δραστικά Τ κύτταρα καταφέρουν να προσπεράσουν όλα τα προαναφερθέντα στάδια και να εισέλθουν στο TME του όγκου, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να προάγουν την ανοσοδιαφυγή μέσω έκφρασης ανοσοκατασταλτικών παραγόντων, παραγόντων ενίσχυσης των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος και

στρατολόγηση στο TME πληθυσμών ανοσοκυττάρων που βοηθούν στην εξέλιξη όγκου. Το πιο γνωστό και μελετημένο μονοπάτι το οποίο έχει συσχετιστεί με την ανοσολογική διαφυγή στον καρκίνο σε αυτό το στάδιο είναι του PD-1/PD-L1. Ο υποδοχέας του προγραμματισμένου θανάτου PD-1 είναι ένα μόριο με ανασταλτική λειτουργία, του οποίου η έκφραση παρατηρείται αυξημένη σε πληθώρα καρκίνων. Ο PD-1 βρίσκεται στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων T κυττάρων, ενώ ο προσδέτης του PD-L1 εκφράζεται από τα κύτταρα του όγκου. Η σύνδεση του PD-L1 με το PD-1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των T κυττάρων, την παραγωγή κυτοκινών και την κυτταροτοξική δραστηριότητα τους, με συνέπεια την λειτουργική αδρανοποίηση ή την εξάντληση των T κυττάρων. Συνεπώς, η δέσμευση του PD-1 με τον υποδοχέα του, PD-L1 (που εκφράζεται από πολλά ανοσοκύτταρα, μεσεγχυματικά κύτταρα, αγγειακά κύτταρα και νεοπλασματικά κύτταρα), έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της δραστηριότητας των T κυττάρων, αναστέλλοντας τις αντικαρκινικές τους δραστηριότητες με συνέπεια την επιβίωση και την εξέλιξη των νεοπλασματικών κυττάρων [110, 111]. Τα τελευταία χρόνια, η ανοσοθεραπεία, με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των μορίων των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος, κατέχει σημαντική θέση στη θεραπεία για τον καρκίνο, όπως το anti-PD-1 (pembrolizumab και nivolumab), το anti-PD-L1 (avelumab) και το anti-CTLA4 (ipilimumab) με ισχυρή αντινεοπλασματική δράση σε πολλούς τύπους καρκίνου. Άλλα γνωστά μόρια και ανοσοκύτταρα που συμμετέχουν στο σήμα αυτό είναι το IDO [112-115], το LAG3 [116, 117], τα Tregs [118-126], το TIM-3 [127-133], τα TAMs [134-138] και τα MDSCs [139-145].

1.2.3.2 Μηχανισμοί ανοσοδιαφυγής με ανοσοεπεξεργασία (immunoediting)

Μια ακόμη διαδικασία με την οποία οι όγκοι αναπτύσσουν αντίσταση στη θεραπεία είναι η ανοσοεπεξεργασία [146-148]. Κατά την ανοσοεπεξεργασία, τα καρκινικά κύτταρα που απέφυγαν επιτυχώς τις διαδικασίες της ανοσοεπιτήρησης και επιβίωσαν (φάση εξάλειψης, Elimination phase), εισέρχονται σε μια κατάσταση λήθαργου (φάση ισορροπίας, Equilibrium phase) [149]. Στη φάση της ισορροπίας, τα κύτταρα της προσαρμοστικής ανοσίας εμποδίζουν την ανάπτυξη και διήθηση του όγκου, ενώ ταυτόχρονα ρυθμίζεται και η ανοσογονικότητα του. Ως συνέπεια της συνεχούς ανοσολογικής επιλογής στα γενετικά τροποποιημένα κύτταρα του όγκου που παραμένουν στη φάση ισορροπίας, τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν μηχανισμούς όπου συνεχίζουν να παρακάμπτουν την αναγνώριση από τα κύτταρα του

ανοσοποιητικού και τελικά εξελίσσονται σε κλινικά ανιχνεύσιμους όγκους (φάση διαφυγής, Escape phase) (Εικόνα 12) [74, 150].



Εικόνα 12: Τα 3 Es της ανοσοεπεξεργασίας.

Η ανοσοεπεξεργασία αποτελείται από 3 στάδια. Φάση εξάλειψης (Elimination phase) (1), που είναι αποτέλεσμα της ανοσοεπιτήρησης. Φάση ισορροπίας (Equilibrium phase) (2), διαδικασία κατά την οποία επιλέγονται οι κυτταρικοί κλώνοι του όγκου με τη μεγαλύτερη πιθανότητα να επιβιώσουν από την ανοσολογική απόκριση. Φάση διαφυγής (Escape phase) (3), ο “επεξεργασμένος” όγκος από τον ανοσοποιητικό επεκτείνεται με ανεξέλεγκτους ρυθμούς [146].

Πιο αναλυτικά, κατά τη φάση της εξάλειψης, τα κύτταρα της έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας συνεργάζονται προκειμένου να ανιχνεύσουν και να εξαλείψουν τα μετασχηματισμένα κύτταρα του όγκου. Τα μετασχηματισμένα κακοήθη κύτταρα που επιβιώνουν από την ανοσοεπιτήρηση και τη φάση της εξάλειψης, εισέρχονται στη φάση ισορροπίας, όπου η ανάπτυξη τους ελέγχεται από το ανοσοποιητικό σύστημα. Στη φάση αυτή τα κύτταρα της προσαρμοστικής ανοσίας περιορίζουν την ανάπτυξη και επεξεργάζονται την ανοσογονικότητα των κλινικά μη ανιχνεύσιμων καρκινικών κυττάρων. Η φάση της ισορροπίας είναι χρονικά η

μεγαλύτερη εκ των τριών και δεν είναι απίθανο να διαρκέσει και χρόνια. Παρόλα αυτά, η ληθαργική αυτή κατάσταση μπορεί να διακοπεί ξαφνικά, οδηγώντας τα καρκινικά κύτταρα στην επόμενη φάση, τη φάση της διαφυγής. Κατά τη διαφυγή, οι όγκοι που έχουν επιβιώσει και παρουσιάζουν χαμηλή ανοσογονικότητα, αρχίζουν να αναπτύσσονται προοδευτικά, με ανεξέλεγκτους ρυθμούς, δημιουργώντας κατ' επέκταση ένα ανοσοκατασταλτικό TME και τελικά παρουσιάζουν κλινικά συμπτώματα [146, 151]. Η συνθήκη παραβίασης του ανοσολογικού συστήματος συνήθως συμβαίνει όταν τα κύτταρα του όγκου έχουν συγκεντρώσει γενετικές και επιγενετικές μεταλλάξεις, οι οποίες προσδίδουν αντίσταση στην αναγνώριση από το ανοσοποιητικό και επιτρέπουν σε αυτά να μεταναστεύσουν εν τέλει σε απομακρυσμένες θέσεις (μετάσταση) [146].

Η απώλεια αντιγόνων εμποδίζει την αναγνώριση από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού και με τον τρόπο αυτό η θεραπεία με αναστολείς των σημείων ελέγχου δεν είναι αποτελεσματική [87]. Σε ασθενείς με ΜΜΚΠ που έλαβαν ανοσοθεραπεία με αναστολείς των σημείων ελέγχου και παρουσίασαν εξάλειψη των νεοαντιγόνων, παρατηρήθηκε ανάπτυξη αντίστασης στη χορηγούμενη θεραπεία. Τα νεοαντιγόνα που εξαλείφονται είναι εκείνα που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για το μόριο ΜHC και δύναται να προκαλέσουν ισχυρές Τ μεσολαβούμενες κυτταρικές αποκρίσεις [152].

1.2.3.3 Μηχανισμοί ανοσοδιαφυγής στο μικροπεριβάλλον του όγκου

Το μικροπεριβάλλον του όγκου (Tumor Microenvironment, TME) περικλείει κυτταρικά και μη κυτταρικά δομικά στοιχεία που έχουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου και στη μετέπειτα διαδικασία της μετάστασης του όγκου [153-156]. Τα συστατικά του TME εμπλέκονται σε διαφορετικά μονοπάτια ορόσημα του καρκίνου (hallmarks of cancer), όπως για παράδειγμα της αγγειογένεσης, της ανοσοκαταστολής και της επιθηλιο-μεσεγχυματική μεταστροφής που είναι σημαντική για τη μετάσταση [153, 155]. Στο TME κυριαρχεί μια δυναμική συνθήκη ενός συνεχούς μεταβαλλόμενου περιβάλλοντος, προκειμένου να εξασφαλίζεται η συνεχής καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης, να προωθείται η ανάπτυξη του όγκου και τέλος να διευκολύνεται η αποφυγή της ανοσολογικής αναγνώρισης από τα καρκινικά κύτταρα [146].

Τα κύτταρα του στρώματος που στρατολογούνται στη θέση του όγκου (tumor bed) εκπαιδεύονται και επαναπρογραμματίζονται με σκοπό να αποκτήσουν έναν ενεργοποιημένο φαινότυπο και να δράσουν προς όφελος του όγκου. Η διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται μέσω

της παρακρινούς δραστηριότητας των επιθηλιακών κυττάρων του όγκου [157-159]. Το TME μεταλλάσσεται και τροποποιείται από τα κύτταρα του όγκου, μέσω απώλειας των μορίων του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας τάξης I (major histocompatibility complex I, MHC-I), απώλειας των αντιγονικών παραλλαγών και απώλειας της ενεργού έκκρισης διάφορων αυξητικών παραγόντων, όπως είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (vascular endothelial growth factor, VEGF) και ο παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) [160].

Τα ανοσοκύτταρα που εντοπίζονται στο TME παρουσιάζουν λειτουργική εξασθένηση, ενώ για τα ανοσοκύτταρα που εισέρχονται στο TME χρησιμοποιούνται εναλλακτικά μονοπάτια ενεργοποίησης, ούτως ώστε να παρουσιάζονται με διαταραγμένο φαινότυπο [160]. Τα σχετιζόμενα με τον όγκο ανοσοκύτταρα περιλαμβάνουν μακροφάγα που σχετίζονται με τον όγκο (tumor associated macrophages , TAMs), υποσύνολα δενδριτικών κυττάρων (dendritic cells, DCs), κυτταροτοξικά και ρυθμιστικά T κύτταρα (cytotoxic T lymphocytes, CTLs και T regulatory cells, Tregs), και τέλος κατασταλτικά κύτταρα μυελοειδούς προέλευσης (myeloid derived suppressor cells, MDSCs). Το πλήθος και το είδος των διαφορετικών συνόλων των ανοσοκυττάρων που απαντώνται στο TME ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ των ασθενών, ενώ σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου μπορεί και να αποτελούν δείκτες πρόγνωσης, απόκρισης στη θεραπεία και επιβίωσης [161-163].

Τα TAMs συνήθως παρατηρούνται σε M2 φαινότυπο, τα οποία τείνουν να συσσωρεύονται στον στρώμα του όγκου και σχετίζονται με χειρότερη έκβαση του ασθενή και μικρότερη επιβίωση [164]. Εν αντιθέσει, τα μακροφάγα M1 φαινοτύπου, που δρουν κατά του όγκου με αντικαρκινική δράση, έχουν την τάση να συσσωρεύονται στο εσωτερικό του όγκου και εκφράζουν τον παράγοντα HLA-DR, την επαγωγίμη συνθετάση του οξειδίου του αζώτου (inducible nitric oxide synthase, iNOS) και τον παράγοντα νέκρωσης όγκου α (tumor necrosis factor α , TNF- α) [165]. Επίσης αυξημένα επίπεδα στον όγκο, των μακροφάγων που εκφράζουν τον παράγοντα CD68⁺, έχει βρεθεί να σχετίζονται με καλύτερη επιβίωση των ασθενών με ΜΜΚΠ [166].

Τα DCs αποτελούν πιθανώς την πιο σημαντική ομάδα αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων στην γεφύρωση της έμφυτης (innate) με την προσαρμοστική (adaptive) ανοσία. Ωστόσο, στο TME τα DCs συνήθως βρίσκονται σε πρώιμο και ανώριμο στάδιο, με αποτέλεσμα να αδυνατούν να ενεργοποιήσουν τα T κύτταρα, καθώς εκφράζουν σε πολύ χαμηλά επίπεδα τα

απαραίτητα συνδιεγερτικά μόρια (για παράδειγμα τα CD80 και CD86) και η ικανότητα τους για αντιγονοπαρουσίαση είναι ασθενής και περιορισμένη [167, 168].

Τα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος φέρουν επίσης προγνωστική σημασία στον ΜΜΚΠ, διότι (1) ο συνολικός αριθμός του πληθυσμού των λεμφοκυττάρων στο αίμα έχει δείχθει να σχετίζεται με μικρότερο κίνδυνο θανάτου [164, 169], (2) όταν ο λόγος των ουδετερόφιλων προς τα λεμφοκύτταρα είναι μεγαλύτερος από 3.81 έχει δείχθει να αποτελεί προγνωστικό δείκτη επιβίωσης σε ασθενείς σταδίου I ΜΜΚΠ, και (3) τα ρυθμιστικά Tregs έχουν εντοπιστεί σε αυξημένα επίπεδα στο αίμα ασθενών με ΜΜΚΠ έναντι υγιών [170, 171].

Τα MDSCs ασκούν τη δράση τους υπέρ του όγκου, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό και την ενεργοποίηση των Τ κυττάρων, ενώ ταυτόχρονα ενισχύουν την αύξηση των επιπέδων της συνθετάσης του οξειδίου του αζώτου (nitric oxide synthase, NOS) και της αργινάσης-1 (arginase-1), απελευθερώνοντας ιντερλευκίνη-10 (interleukin-10, IL-10) και ενεργές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) [160, 172-175]. Ασθενείς σε προχωρημένο στάδιο ΜΜΚΠ παρουσιάζονται με υψηλότερα επίπεδα MDSCs στο περιφερικό αίμα, σε σχέση με τα επίπεδα των υγιών και αυτό συσχετίστηκε με χαμηλότερα επίπεδα CD8⁺ Τ κυττάρων [176].

Η χρόνια φλεγμονή μπορεί επίσης να επηρεάσει το TME, μέσω απελευθέρωσης ενεργών ελεύθερων ριζών οξυγόνου και αζώτου, καθώς και TNF- α . Κατά συνέπεια, η παθολογική αυτή κατάσταση έχει τη δυνατότητα να διευκολύνει της ανάπτυξη του όγκου μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού NF- κ B και της επακόλουθης καταστολής της προσαρμοστικής ανοσολογικής απόκρισης [161]. Στους όγκους του ΜΜΚΠ συχνά υπάρχουν υποξικές περιοχές, γεγονός που δίνει γένεση στην απελευθέρωση προ-αγγειογενετικών παραγόντων, όπως είναι ο VEGF, το οποίο βοηθά κατ' επέκταση και την αγγειογένεση στον όγκο [177, 178].

1.2.3.3.1 Κλινική συσχέτιση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου με τον μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα

Ο ΜΜΚΠ είναι ένας από τους πολλούς τύπους καρκίνου που δημιουργούν ένα ανοσοκατασταλτικό TME που ευνοεί την ανάπτυξη του όγκου [179-181]. Για παράδειγμα, η υψηλή συγκέντρωση Tregs στο TME, τα οποία εκφράζουν υψηλά επίπεδα CTLA-4 στην επιφάνεια τους, προκαλεί άμεση αναστολή του πολλαπλασιασμού των Τ κυττάρων. Ομοίως, αποτελέσματα ερευνών δείχνουν ότι CD8⁺ Τ κύτταρα που έχουν διεισδύσει στο TME και εκφράζουν υψηλά επίπεδα PD-1 σχετίζονται με μειωμένη αποτελεσματικότητα της

αντικαρκινικής ανοσολογικής απόκρισης [182]. Παράλληλα, καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα PD-L1 [183] και παρεμποδίζοντας την ωρίμανση των DCs [184] που έχουν διεισδύσει στο TME, σχετίζονται με μειωμένη ικανότητα των T κυττάρων να εισέλθουν στο TME [185].

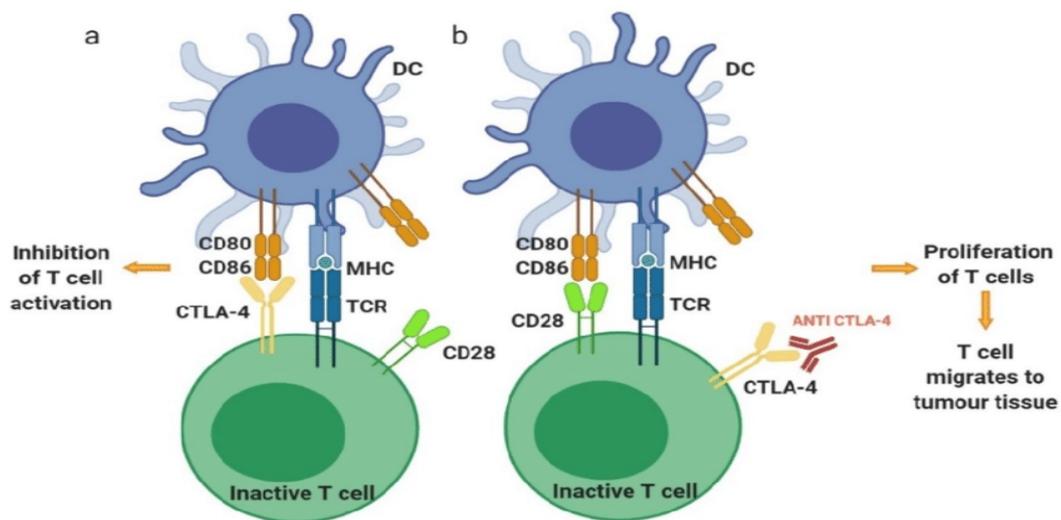
Επιπροσθέτως, τα καρκινικά κύτταρα μειώνουν τα επίπεδα της επιφανειακής έκφρασης του συμπλέγματος MHC-I/αντιγόνου, με αποτέλεσμα ο μηχανισμός αντιγονοπαρουσίασης να είναι δυσλειτουργικός και να ενισχύεται η ανοσοδιαφυγή [186]. Τέλος, τα καρκινικά κύτταρα του ΜΜΚΠ εκκρίνουν κυτοκίνες με ανασταλτική δράση που δρουν υπέρ του όγκου, όπως είναι η ιντερλευκίνη 10 (interleukin 10, IL-10) και ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β (transforming growth factor β, TGF-β) [187]. Ακολούθως, στον ΜΜΚΠ έχει βρεθεί ότι τα TILs που αποτελούνται από υψηλά ποσοστά CD8+ T κυττάρων σχετίζονται με μεγαλύτερη επιβίωση [188] και καλύτερη κλινική έκβαση [189]. Εν αντιθέσει, τα υψηλά επίπεδα Tregs [190, 191] και μακροφάγων [192] αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες για μικρότερη επιβίωση. Τέλος, η υψηλή έκφραση του PD-L1 από τα κύτταρα του όγκου σχετίζεται επίσης με δυσμενή πρόγνωση στους ασθενείς με ΜΜΚΠ [183, 184, 193].

1.2.4 Σημεία Ελέγχου του Ανοσοποιητικού Συστήματος

Η μελέτη του TME οδήγησε στην ανακάλυψη μορίων των οποίων ο φυσιολογικός ρόλος είναι η διατήρηση της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού συστήματος [194] και ονομάζονται σημεία ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος (immune checkpoints) [195]. Τα μόρια αυτά περιλαμβάνουν ένα σύνολο υποδοχέων στην επιφάνεια των T κυττάρων [196, 197] και έχουν ενοχοποιηθεί ότι δρουν υπέρ του όγκου και εξυπηρετούν στην ανοσοδιαφυγή [194]. Στον καρκίνο, η αναστολή των σημείων ελέγχου αντιστρέφει την ανοσοδιαφυγή και επανενεργοποιεί την αντικαρκινική ανοσολογική απόκριση. Τα πιο γνωστά και μελετημένα σημεία ελέγχου είναι το CTLA-4 και ο PD-1 [98], ενώ ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια εκδηλώνεται και τα LAG-3, TIM3 και TIGIT [127].

- CTLA-4

Ένας τρόπος με τον οποίο τα καρκινικά κύτταρα διαφεύγουν της ανοσοεπιτήρησης και εμποδίζουν την ενεργοποίηση των T κυττάρων είναι με την αύξηση της έκφρασης του CTLA-4 [198]. Το CTLA-4 είναι ένα μόριο που φυσιολογικά εκφράζεται στην επιφάνεια των T κυττάρων και συμμετέχει στη διατήρηση της ομοιόστασης [199]. Στον καρκίνο, η αντιγονοπαρουσίαση προκαλεί την αύξηση της έκφρασης του CTLA-4 [196, 198], το οποίο δρα ως ανταγωνιστής του μορίου CD28 για την πρόσδεση στα μόρια B7-1 (CD80) ή B7-2 (CD86) που εκφράζεται από τα DCs, με σκοπό την αποφυγή της ωρίμανσης και ενεργοποίησης των T κυττάρων και την επακόλουθη διαφυγή της αναγνώρισης από το ανοσοποιητικό σύστημα [194, 198]. Για τον ΜΜΚΠ, ο FDA έχει ήδη εγκρίνει μονοκλωνικά αντισώματα που χορηγούνται σε ασθενείς και δρουν ως αναστολείς του συγκεκριμένου σημείου ελέγχου. Ο μηχανισμός δράσης και αναστολής του CTLA-4 φαίνεται στην Εικόνα 13.



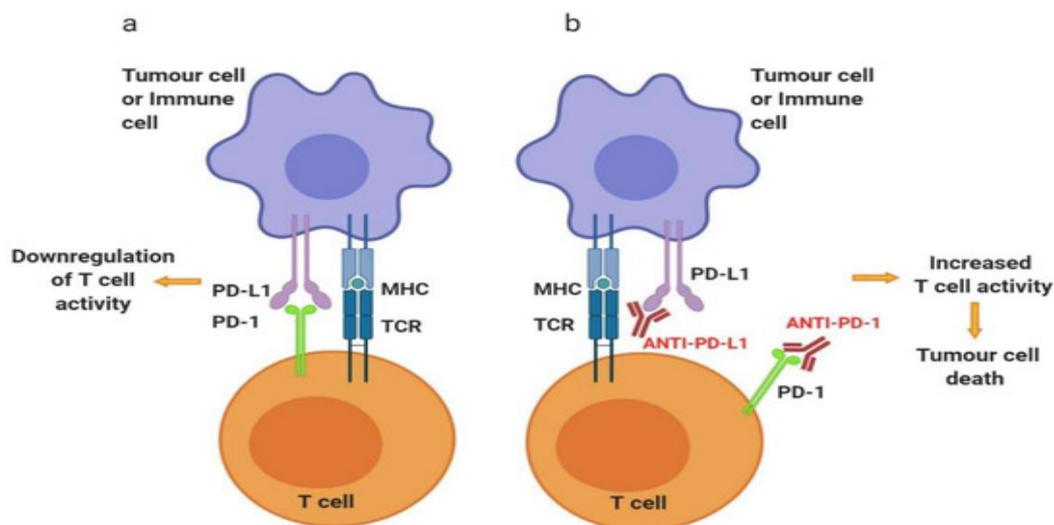
Εικόνα 13: Μηχανισμός δράσης (a) και αναστολής (b) του CTLA-4 [200], κατά την ενεργοποίηση των T κυττάρων.

(a) Μετά την αντιγονοπαρουσίαση από το σύμπλεγμα MHC-I και τη σύνδεση με τον TCR, το κατασταλτικό μόριο CTLA-4 προσδένεται στο μόριο B7-1 (CD80) ή B7-2 (CD86) των DCs και εμποδίζει την ενεργοποίηση των T κυττάρων.

(b) Η αναστολή της πρόσδεσης του CTLA-4 στο μόριο B7-1 (CD80) ή B7-2 (CD86) των DCs, με χορήγηση μονοκλωνικών anti-CTLA-4 αντισωμάτων, επιτρέπει στο συνδιεγερτικό μόριο CD28 να προσδεθεί στα B7-1 (CD80) και B7-2 (CD86), να επιτρέψει την ενεργοποίηση των T κυττάρων και τη μετανάστευση τους στις θέσεις του όγκου.

- Το μονοπάτι του PD-1/PD-L1

Η σύνδεση του PD-1 με τους προσδέτες PD-L1/PD-L2 αποτελεί ένα μείζονος σημασίας σημείο ελέγχου της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο άξονας PD-1/PD-L1 (ή PD-L2) φυσιολογικά ρυθμίζει την ανοχή έναντι των εαυτών αντιγόνων και συμβάλλει στη διατήρηση της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού συστήματος [201]. Το PD-1 εκφράζεται υπό φυσιολογικές συνθήκες στην επιφάνεια των NK, των μακροφάγων, των T και των B κυττάρων και η αύξηση της έκφρασης του είναι απόρροια της παρατεταμένης έκθεσης σε αντιγόνα, όπως είναι οι περιπτώσεις χρόνιας φλεγμονής ή στον καρκίνο [202]. Η αύξηση αυτή σταδιακά οδηγεί σε προσαρμογή της ανοσοδιέγερσης και εξασθένιση της ανοσολογικής απόκρισης [202]. Η έκκριση IFN τύπου I και τύπου II από το στρώμα του όγκου ενισχύει την αύξηση των επιπέδων του PD-1 [203, 204] και δεδομένα από πειραματικά μοντέλα ποντικών επιβεβαιώνουν ότι η συνεχής σηματοδότηση από IFN-γ οδηγεί σε αντίσταση στη θεραπεία με αναστολείς του PD-1 [111, 205]. Όταν ο PD-1 δεσμεύεται στον προσδέτη PD-L1 που βρίσκεται στα κύτταρα του όγκου, τα APCs, τα ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα, σηματοδοτείται η επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και η μείωση του ρυθμού απόπτωσης τους, προκαλώντας ταυτόχρονα ανέργεια και εξάντληση των T κυττάρων [194, 198, 206-209]. Ο προσδέτης PD-L2 εκφράζεται μόνο στα DCs και τα μακροφάγα [194, 207]. Για τον ΜΜΚΠ, ο FDA έχει ήδη εγκρίνει μονοκλωνικά αντισώματα που χορηγούνται σε ασθενείς και δρουν ως αναστολείς του συγκεκριμένου σημείου ελέγχου. Ο μηχανισμός δράσης και αναστολής του PD-1/PD-L1 φαίνεται στην Εικόνα 14.



Εικόνα 14: Μηχανισμός δράσης (a) και αναστολής (b) του PD-1/PD-L1 [200], στην επίδραση της λειτουργίας των T κυττάρων.

(a) Τα ενεργοποιημένα T κύτταρα στους λεμφαδένες αυξάνουν την έκφραση του ανασταλτικού μορίου PD-1 στην επιφάνεια τους και όταν αυτό συνδεθεί με τους προσδέτες PD-L1 ή PD-L2, που εντοπίζονται στην επιφάνεια των διάφορων ανοσοκυττάρων και στα καρκινικά κύτταρα, αναστέλλεται το μονοπάτι καθοδικά του TCR και παρεμποδίζεται η δραστική λειτουργία των T κυττάρων.

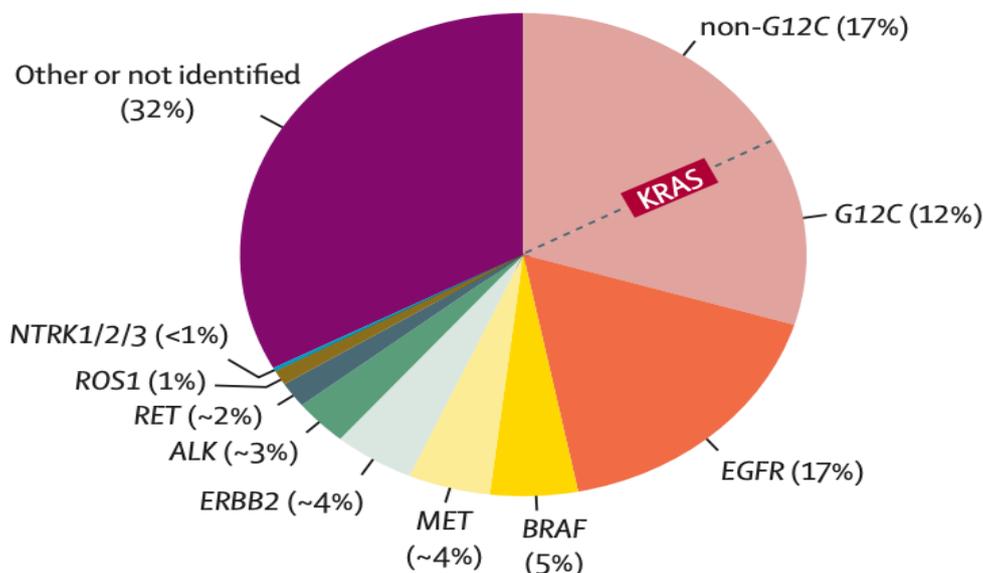
(b) Η αναστολή του PD-1 ή του PD-L1 με χορήγηση μονοκλωνικών anti-PD-1 ή anti-PD-L1 μονοκλωνικών αντισωμάτων, μπορεί να επαναφέρει την δραστική λειτουργία των T κυττάρων και την αποτελεσματική αντικαρκινική ανοσολογική απόκριση.

1.2.5 Προγνωστικοί Βιοδείκτες Ανταπόκρισης στην Ανοσοθεραπεία

Η διαχείριση των ασθενών με ΜΜΚΠ προχωρημένου σταδίου βασιζόταν για πολλά χρόνια στην ιστολογική ταξινόμηση και τη χημειοθεραπεία. Η ανακάλυψη όμως της προγνωστικής σημασίας βιοδεικτών οδήγησε στη δημιουργία νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων, συμπεριλαμβανομένου των στοχευμένων θεραπειών και της ανοσοθεραπείας [210]. Ως βιοδείκτες (biomarkers) ορίζονται μετρήσιμα χαρακτηριστικά των βιολογικών διεργασιών ή του όγκου ενός ασθενή και μπορούν να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την ανταπόκριση στη θεραπεία. Οι βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται στα πλαίσια της διάγνωσης θα πρέπει να μπορούν να ανιχνευθούν και να διαφοροποιηθούν από άλλες παθολογικές καταστάσεις και πιθανόν, να αφορούν μια συγκεκριμένη κατηγορία ασθενειών [211]. Οι προβλεπτικοί (predictive) βιοδείκτες χρησιμοποιούνται για να εντοπίσουν τα άτομα εκείνα που θα επωφεληθούν από συγκεκριμένες θεραπείες. Οι προγνωστικοί (prognostic) βιοδείκτες εφαρμόζουν στην εκτίμηση της κλινικής έκβασης, στο διάστημα ελεύθερο υποτροπής και στην

πορεία και εξέλιξη της νόσου [212]. Ένας βιοδείκτης για να θεωρηθεί ιδανικός θα πρέπει να πληροί μια σειρά από προϋποθέσεις: α) θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από υψηλή αναλυτική και διαγνωστική ευασθησία και ειδικότητα, β) υψηλή διαγνωστική ή/και προγνωστική αξία θετικού αποτελέσματος, γ) υψηλή αποτελεσματικότητα, δ) ικανότητα διαφορικής διάγνωσης και ε) χαμηλό κόστος προσδιορισμού. Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί ο ιδανικός καρκινικός δείκτης που να διαθέτει όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά και για αυτό η έρευνα επικεντρώνεται στην εύρεση νέων καρκινικών δεικτών [213].

Για όλους τους ασθενείς με μη πλακώδες μεταστατικό ΜΜΚΠ πρέπει να πραγματοποιείται ανάλυση του μοριακού προφίλ του όγκου για την ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων στα γονίδια *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *KRAS*, *RET*, *NTRK*, *MET* και *ERBB2* (*HER2*) πριν από την έναρξη πρώτης γραμμής συστηματικής θεραπείας. Η ανοσοθεραπεία είναι η θεραπεία επιλογής ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία, για τους οποίους δεν έχει ανιχνευθεί κάποια στοχεύσιμη σωματική μετάλλαξη [214, 215]. Δεδομένου αυτού, ότι όλοι οι νέο-διαγνωσθέντες ασθενείς με ΜΜΚΠ οφείλουν να αξιολογούνται με εκτενή μοριακό έλεγχο. Στην Εικόνα 15 απεικονίζονται οι πιο κοινές οδηγές μεταλλάξεις που παρατηρούνται στους ασθενείς αυτούς.



Εικόνα 15: Συχνότητα εμφάνισης των πιο κοινών οδηγών μεταλλάξεων σε ασθενείς με ΜΜΚΠ προχωρημένου σταδίου [210].

- Έκφραση PD-L1 στον ιστό.

Σε ασθενείς με ΜΜΚΠ, η εκτίμηση της έκφρασης του PD-L1 στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων αποτελεί ένα προγνωστικό βιοδείκτη για τη λήψη αποφάσεων σχετικά με τη βέλτιστη θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα (αναστολείς) έναντι των μορίων PD-1 και PD-L1. Η έκφραση του μορίου PD-L1 σχετίζεται με αυξημένη πιθανότητα απόκρισης στους αναστολείς του μονοπατιού PD-1/PD-L1. Ωστόσο ανταπόκριση στην εν λόγω θεραπεία παρατηρείται και σε ασθενείς που δεν εκφράζουν τον συγκεκριμένο δείκτη και θεωρείται ότι αυτό οφείλεται στις διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ ξενιστή και όγκου και σχετίζεται και με άλλους κλινικούς παράγοντες [216, 217].

Η έκφραση του PD-L1 παρατηρείται να εμφανίζει ετερογένεια και στο εσωτερικό του όγκου (intratumorally) και στην περιφέρεια του (intertumorally) [218, 219]. Παρόλα αυτά, η έκφραση του πρέπει να αξιολογείται σε όλους τους νέο-διαγνωσθέντες ασθενείς με ΜΜΚΠ προχωρημένου σταδίου, καθώς μπορεί να προσφέρει βοήθεια και πληροφορία για την αποτελεσματικότητα της χορήγησης μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των σημείων ελέγχου, ενώ ταυτόχρονα μπορεί να διακρίνει τις περιπτώσεις των ασθενών όπου η χημειοθεραπεία είναι προτιμητέα [210].

- Φορτίο Μεταλλάξεων του Όγκου (Tumor Mutational Burden, TMB).

Το υψηλό TMB αποτελεί προγνωστικό παράγοντα της απόκρισης στη χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των σημείων ελέγχου [220]. Αποτελέσματα ερευνών έχουν δείξει ότι οι ασθενείς με υψηλό TMB που έλαβαν Pembrolizumab είχαν καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία και μεγαλύτερη συνολική επιβίωση, σε σχέση με τους ασθενείς με χαμηλό TMB (32% vs. 22%) [221]. Επιπλέον, το TMB ενδέχεται να παρέχει περισσότερες πληροφορίες για την ανταπόκριση στη θεραπεία με αναστολείς των σημείων ελέγχου, ωστόσο περαιτέρω έρευνα για την επιβεβαίωση και αποσαφήνιση των ορίων θετικότητας για τους διάφορους τύπους καρκίνου είναι πρωτεύουσας σημασίας [210].

- Διήθηση του όγκου από λεμφοκύτταρα

Η διήθηση του όγκου από λεμφοκύτταρα (tumor infiltrating lymphocytes, TILs) αποτελεί έναν προγνωστικό βιοδείκτη. Τα TILs είναι ένας πληθυσμός ανοσοκυττάρων που συναντώνται στους όγκους. Τα κύτταρα αυτά κατέχουν σημαντικό ρόλο στην βέλτιστη επιλογή της θεραπευτικής

αντιμετώπισης, καθώς σχετίζονται σημαντικά με την εξέλιξη και υποχώρηση του όγκου [222]. Σε ασθενείς με ΜΜΚΠ που έλαβαν Nivolumab βρέθηκε ότι η υψηλή έκφραση διηθημένων στον όγκων CD8+ T λεμφοκυττάρων σχετίζεται με καλύτερη ανταπόκριση στην χορηγούμενη θεραπεία, καθώς και με μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής [222]. Ακόμη, σε ασθενείς που είχαν ήδη λάβει προηγουμένως στοχευμένη θεραπεία με αναστολείς της τυροσινικής κινάσης (tyrosine kinase inhibitors, TKIs), η αναλογία CD8+/CD4+ πιθανώς μπορεί να παρέχει πληροφορία για την ανταπόκριση σε επόμενης γραμμής ανοσοθεραπεία. Στην περίπτωση αυτή, η χαμηλή αναλογία σχετίζεται και με χαμηλότερη ανταπόκριση στη θεραπεία [223].

Δεδομένου ότι η ανάλυση του βιοπτικού υλικού του όγκου είναι περιορισμένη, κυρίως λόγω διαθεσιμότητας του δείγματος αλλά και γιατί αποτελεί μια επεμβατική μέθοδο επεξεργασίας, αξιολόγησης και εκτίμησης, η υγρή βιοψία έχει αναδειχθεί τα τελευταία χρόνια ως μια πολύτιμη πηγή υλικού για διαγνωστικούς και ερευνητικούς σκοπούς σε μια πληθώρα νεοπλασιών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του πνεύμονα [224]. Η πρόοδος της τεχνολογίας και ο όγκος των νέων πληροφοριών οδήγησαν στην ανάγκη αυξημένων αναλύσεων στα δείγματα των ασθενών για εύρεση βιοδεικτών, με ελάχιστα επεμβατικές μεθόδους.

Ως υγρή βιοψία ορίζεται η δειγματοληψία μη στερεών βιολογικών υλικών και περιλαμβάνει οποιοδήποτε υλικό προέρχεται από τον όγκο και εντοπίζεται στην κυκλοφορία του αίματος ή σε οποιοδήποτε άλλο σωματικό βιολογικό υγρό. Από τα πιο συχνά και μελετημένα μόρια στα πλαίσια της υγρής βιοψίας είναι τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (circulating tumor cells, CTCs), το ελεύθερο κυττάρων κυκλοφορούν DNA (cell-free DNA, cfDNA) και τέλος, τα μικρά μη κωδικά μόρια RNA (small non coding), όπως είναι τα microRNAs [225, 226].

1.3 Μικρά μη κωδικά μόρια RNA (microRNAs)

1.3.1 Γενική Εισαγωγή και Μηχανισμός Βιογένεσης των microRNAs

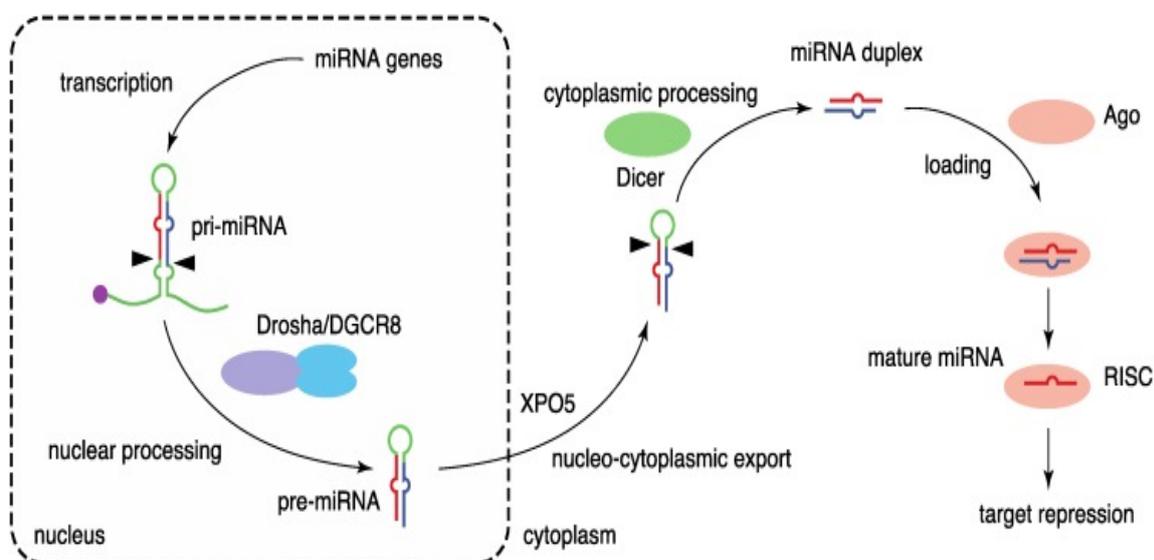
Τα microRNAs (miRNAs) είναι μια μεγάλη οικογένεια μικρών μη κωδικών μορίων RNA, μήκους 19-24 νουκλεοτιδίων, που συναντώνται σε ζώα, φυτά και ορισμένους ιούς και ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση των γονιδίων σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, στοχεύοντας δηλαδή το αγγελιοφόρο RNA (messenger RNA, mRNA) [227]. Με τον τρόπο αυτό συμμετέχουν και εμπλέκονται σε πληθώρα βιολογικών διαδικασιών, όπως είναι ο ρυθμός ανάπτυξης και η διαφοροποίηση των κυττάρων, η εμβρυογένεση, ο μεταβολισμός, η οργανογένεση και η απόπτωση [228], ενώ έχει προταθεί και η ενδεχόμενη συμμετοχή τους στη διακυτταρική επικοινωνία [229]. Ως εκ τούτου, η βιογένεση των μορίων αυτών και η λειτουργία τους υπόκεινται σε αυστηρό χώρο-χρονικό έλεγχο, ενώ η απορρύθμιση τους έχει συνδεθεί με πολλές διαταραχές και παθολογικές καταστάσεις, και ιδιαίτερα με τον καρκίνο [230].

Το πρώτο miRNA που ανακαλύφθηκε ονομάζεται lin-4, από το μικροοργανισμό *Caenorhabditis elegans* στις αρχές της δεκαετίας του 1990, το οποίο είναι υπεύθυνο για το ρυθμό ανάπτυξης των προνυμφών του εν λόγω μικροοργανισμού [227]. Το πρώτο miRNA που ανακαλύφθηκε στον άνθρωπο ήταν το let-7, το 2000, ενώ επί του παρόντος έχουν καταγραφεί περισσότερα από 2600 ώριμα μόρια miRNAs [231].

Υπάρχουν δύο μονοπάτια από τα οποία παράγονται τα miRNAs, η κλασική οδός (canonical pathway) και η μη κλασική οδός (non-canonical pathway). Συνοπτικά, η πλειονότητα των miRNAs παράγεται μέσω την κλασικής οδού, με τη βοήθεια δύο RNAασών τύπου III, της Drosha και της Dicer. Στην περίπτωση αυτή, η βιογένεση των miRNAs ρυθμίζεται στο επίπεδο μεταγραφής του miRNA, επεξεργάζεται στον πυρήνα από την Drosha και στη συνέχεια στο κυτταρόπλασμα από την Dicer, ενώ ακολουθεί επεξεργασία του RNA (RNA editing), μεθυλίωση (methylation), ουριδιλίωση (uridylation) και αδενυλίωση (adenylation), μεταφόρτωση του miRNA σε μια πρωτεΐνη «αργοναύτη» (argonaute protein, AGO) και τελικά, αποσύνθεση του μορίου-στόχου. Η μη κλασική οδός βιογένεσης είναι ανεξάρτητη από τις Drosha και Dicer [232-234].

Το μονοπάτι της βιοσύνθεσης των miRNAs χαρακτηρίζεται ως μια πολυδιάστατη και περίπλοκη διαδικασία [235], καθώς διαμεσολαβείται από πολλά στάδια. Ξεκινά με τη μεταγραφή των πρωτογενών miRNAs μετάγραφων (primary miRNAs, pri-miRNAs), ακολουθεί πυρηνική επεξεργασία από το ένζυμο Drosha, μεταφορά από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, κυτταροπλασματική επεξεργασία από το ένζυμο Dicer και σχηματισμός του επαγόμενου

συμπλέγματος σίγασης από RNA (RNA-induced silencing complex, RISC) με πρωτεΐνες-αργοναύτες (Argonaute proteins, Ago) [228, 236-239] (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Κανονική οδός βιογένεσης των miRNAs [239].

Η βιογένεση των miRNAs που ακολουθούν την κλασική οδό ξεκινά με τη δημιουργία ενός μεγάλου σε μήκος πρωτογενούς miRNA μετάγραφου (pri-miRNA), με τη βοήθεια της RNA πολυμεράσης II. Τα miRNAs που παράγονται από ζωικά κύτταρα μεταγράφονται ως μεμονωμένα γονίδια (monocistronic), ως συστάδες (polycistronic) ή από εσώνια γονιδίων υπεύθυνα για την έκφραση πρωτεϊνών (intronic) [228, 240]. Στον πυρήνα, το πρωτογενές miRNA επεξεργάζεται περαιτέρω σε ένα δίκλωνο μόριο με δομή φουρκέτας (hairpin-structured RNAs), το οποίο ονομάζεται πρόδρομο miRNA (precursor miRNA, pre-miRNA), μήκους περίπου 70 νουκλεοτιδίων, σε μια «ατελή» δομή φουρκέτας με 2 μη ζευγαρωμένα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο (3' overhang) και μια φωσφορική ομάδα στο 5' άκρο.

Η διαδικασία αυτή αποτελεί το πρώτο στάδιο ωρίμανσης των miRNAs και μεσολαβείται από ένα σύμπλοκο ωρίμανσης που απαρτίζεται από το ένζυμο Drosha, που έχει δράση RNάσης τύπου III και από την πυρηνική πρωτεΐνη που προσδέεται σε δίκλωνο RNA (double-stranded RNA, ds RNA) και ονομάζεται DGCR8 (DiGeorge critical region 8), καθώς και από άλλες πρωτεΐνες [239]. Στη συνέχεια, το πρόδρομο miRNA εξέρχεται από τον πυρήνα και εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα μέσω του πρωτεϊνικού συμπλόκου εξπορτίνης-5 (exportin-5) με τη Ran-GTP. Η υδρόλυση του GTP σε GDP απελευθερώνει το πρόδρομο miRNA από το σύμπλοκο μεταφοράς [228, 241]. Ορισμένα πρόδρομα miRNAs μπορούν να προκύψουν και από τη μη-

κλασική οδό βιογένεσης (mitrons). Αυτά τα miRNAs, επειδή συνήθως βρίσκονται εντός εσωνίων γονιδίων που εκφράζονται, εκμεταλλεύονται το μηχανισμό ωρίμανσης του γονιδίου (μάτισμα), ξεπερνώντας με τον τρόπο αυτό την ωρίμανση του πρώτου σταδίου που διαμεσολαβείται από το ένζυμο Drosha.

Στο κυτταρόπλασμα, το πρόδρομο miRNA επεξεργάζεται περαιτέρω από το πρωτεϊνικό σύμπλοκο RLC (RISC loading complex), το οποίο αποτελείται από την πρωτεΐνη Dicer, που έχει δράση RNάσης τύπου III, και από πρωτεΐνες που προσδέουν δίκλωνο RNA, όπως είναι η TRBP (Tar RNA binding protein), και από την πρωτεΐνη-αργοναύτη-2 (Ago-2). Η Dicer απομακρύνει από το μόριο τη δομή της θηλιάς, το miRNA πλέον έχει δομή δίκλωνου μορίου, μήκους περίπου 22 ζευγών βάσεων, ενώ στο 3' άκρο κάθε αλυσίδας υπάρχουν από 2 νουκλεοτίδια που προεξέχουν. Η μία εκ των δύο αλυσίδων που θα αποτελέσει το ώριμο miRNA ονομάζεται οδηγός αλυσίδα (guide strand) και η συμπληρωματική αναφέρεται ως συνοδός αλυσίδα (passenger strand) και συμβολίζεται miRNA*.

Όταν ολοκληρωθεί η ωρίμανση του miRNA, η οδηγός αλυσίδα προσδέεται στην Ago-2 για να σχηματίσει το σύμπλοκο RISC (RNA-induced silencing complex) [242] και η συνοδός αλυσίδα αποδομείται [241, 243, 244]. Το σύμπλεγμα miRNA-Ago καθοδηγεί το σύμπλοκο RISC. Το miRNA συνδέεται στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) των mRNA-στόχων [245] με βάση τη συμπληρωματικότητα των βάσεων (base pairing), ενώ η πρωτεΐνη-αργοναύτης λειτουργεί ως τελεστής στρατολογώντας και άλλες πρωτεΐνες, προκαλώντας βράχυνση των πολύ-(A) ουρών των mRNAs (αποαδενυλίωση) [246], καταστέλλοντας τη μετάφραση και αποσταθεροποιώντας το μόριο [237, 247].

Δεδομένου ότι η αλληλουχία αναγνώρισης είναι πολύ μικρή, σημειώνεται ότι κάθε miRNA μπορεί να στοχεύει πολλά mRNAs που αποτελούν μετάγραφα διαφορετικών γονιδίων, ενώ ένας τύπος mRNA μπορεί να αποτελεί στόχο διαφορετικών μορίων miRNAs [248-251]. Η αναγνώριση των mRNA-στόχων εξαρτάται από μια αλληλουχία στο miRNA που βρίσκεται στο 5' άκρο και ονομάζεται «σπόρος» (seed) και εκτείνεται μεταξύ των νουκλεοτιδίων 2-7. Καθοδικά της αλληλουχίας-σπόρου, τα νουκλεοτίδια που βρίσκονται στη θέση 8 και στις θέσεις 13-16 είναι επίσης πρωτεύουσας σημασίας προκειμένου να πραγματοποιηθεί η σύζευξη μέσω της συμπληρωματικότητας των βάσεων [252-254]. Η μερική ή απόλυτη συμπληρωματικότητα μεταξύ των miRNAs και των mRNA-στόχων οδηγεί σε καταστολή της μετάφρασης ή σε αποδόμηση του mRNA, αντίστοιχα [255].

1.3.2 Ο Ρόλος των *microRNAs* στον Καρκίνο του Πνεύμονα

Το 2004, οι Takamizawa et al., συσχέτισαν ισχυρά την έκφραση των miRNAs με την καρκινογένεση στον πνεύμονα [256]. Στους καρκινικούς ιστούς και κύτταρα του πνεύμονα, τα miRNAs παρουσιάζουν ένα αλλοιωμένο πρότυπο έκφρασης σε σχέση με τον υγιή ιστό [257, 258]. Στον καρκίνο του πνεύμονα τα miRNAs μπορεί να έχουν ογκογόνο ή ογκοκατασταλτική δράση και μπορούν να ρυθμίζουν την κυτταρική εισβολή, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση [259, 260], τη βιωσιμότητα των κυττάρων [259], την επιθηλιομεσεγχυματική μετάβαση (EMT) [261], τη μετάσταση [262], και την αντίσταση στη θεραπεία [263]. Στην έρευνα αυτή στόχος ήταν η ανάλυση της έκφρασης των miRNAs σε καρκινικά κύτταρα και βιολογικά υλικά, όπως το αίμα, δεδομένου ότι η συγκεκριμένη μέθοδος είναι ελάχιστα επεμβατική και ταυτόχρονα προσφέρει υψηλές δυνατότητες, ακόμη και για πρώιμη ανίχνευση του καρκίνου του πνεύμονα [258].

Συνεπώς, τα miRNAs μπορεί να χρησιμεύσουν ως πιθανοί βιοδείκτες για τη διάγνωση, πρόγνωση και θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα [264, 265]. Στο πλαίσιο αυτό θεωρείται ότι συμβάλλει η εύρεση μοριακών υπογραφών miRNAs, προσδιορίζοντας επακριβώς το επίπεδο έκφρασης πολλών miRNAs ταυτόχρονα [266, 267]. Σε μελέτες που συμμετείχαν ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα βρέθηκαν μοριακές υπογραφές miRNAs με εφαρμογή στη διάγνωση, οι οποίες παρέχουν υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα [268-270].

Παράλληλα, το μεγαλύτερο ποσοστό μελετών που χρησιμοποίησαν κυκλοφορούντα miRNAs που προσδιορίστηκαν από το πλάσμα ή τον ορό ασθενών, διαπίστωσαν ότι τα μόρια αυτά είναι αξιόπιστα για την πρώιμη ανίχνευση του καρκίνου του πνεύμονα [271]. Επιπλέον, ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της αξιοποίησης των μορίων αυτών είναι ότι η αλλοίωση του φυσιολογικού προτύπου έκφρασης μπορεί να γίνει αντιληπτή σε οποιοδήποτε στάδιο, δηλαδή από την έναρξη της απορρύθμισης και καθ' όλη τη διάρκεια της εξέλιξης, προσφέροντας τη δυνατότητα παρατήρησης των δυναμικών αλλαγών σε πραγματικό χρόνο [272]. Δεδομένου ότι ο καρκίνος του πνεύμονα είναι μια νόσος που εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια και τα miRNAs που εκφράζονται σχετίζονται με τον τύπο του καρκίνου του πνεύμονα, πιστεύεται ότι τα miRNAs μπορούν να βοηθήσουν στην ταξινόμηση των υπότυπων της νόσου. Πιο συγκεκριμένα, έρευνες έχουν δείξει ότι το προφίλ έκφρασης για τα miRNAs είναι ειδικό για κάθε ιστολογικό υπότυπο καρκίνου και άλλες μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα miRNAs μπορούν να διακρίνουν μεταξύ των υπότυπων του καρκίνου του πνεύμονα [258, 273, 274].

1.3.3 Ο ρόλος των *microRNAs* στη Ρύθμιση του Αντικαρκινικής Ανοσολογικής Απόκρισης

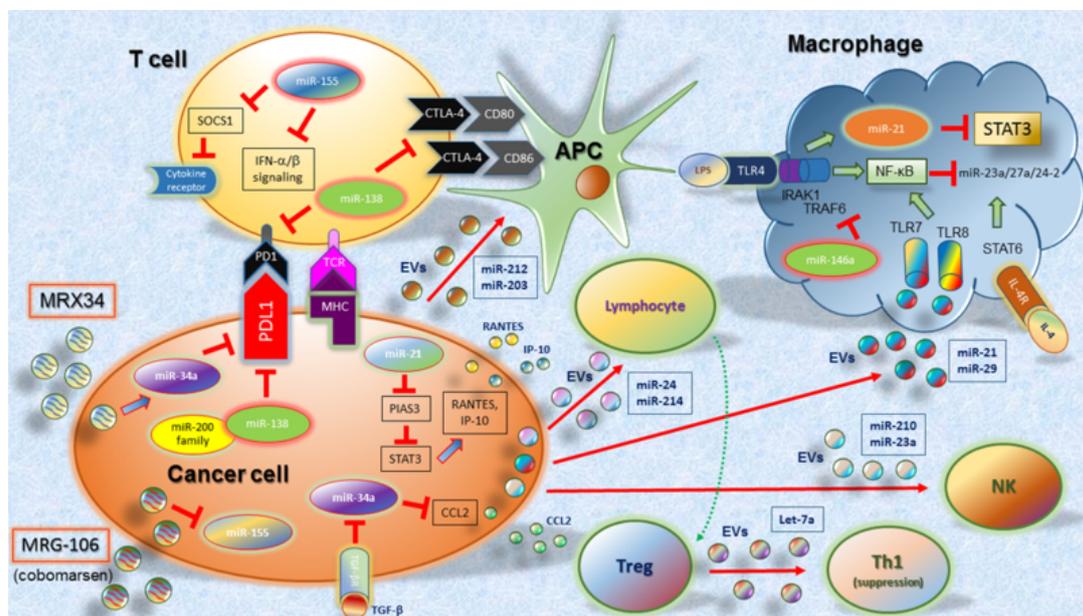
Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα miRNAs ελέγχουν τη ρύθμιση μιας πληθώρας βιολογικών διαδικασιών και η απορρύθμιση της έκφρασης τους έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη όγκων [230]. Οι μηχανισμοί με τους οποίους η έκφραση των miRNAs απορρυθμίζεται περιλαμβάνουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες, αλλαγές μεταγραφικού ελέγχου, επιγενετικές αλλαγές και αλλαγές στο μηχανισμό της βιογένεσης των miRNAs [275]. Οι Hanahan και Weinberg πρότειναν ότι τα γεγονότα που οδηγούν στον καρκίνο αποτελούνται από 6 βιολογικές ιδιότητες-ορόσημα, οι οποίες αποκτώνται κατά την ανάπτυξη του όγκου. Αυτές περιλαμβάνουν τη διατήρηση των σημάτων κυτταρικού πολλαπλασιασμού (sustaining proliferative signaling), τη διαφυγή από την καταστολή της ανάπτυξης (evading growth suppressors), την αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο (evading cell death), την ενεργοποίηση της αντιγραφικής αθανασίας (enabling replicative immortality), την ενεργοποίηση της μεταναστευτικής ικανότητας (activating invasion and metastasis) και τέλος την επαγωγή της αγγειογένεσης (inducing angiogenesis). Η απορρύθμιση των miRNAs στον καρκίνο θεωρείται ότι επηρεάζει ένα ή περισσότερα από τα παραπάνω μονοπάτια και ανάλογα με τη λειτουργία του mRNA-στόχου, τα miRNAs χαρακτηρίζονται είτε ως ογκογόνα (oncogenes), είτε ως ογκοκατασταλτικά (tumor suppressors) [155, 275].

Ανάμεσα στα γεγονότα που οδηγούν στην εμφάνιση καρκίνου περιλαμβάνεται και η αντικαρκινική ανοσολογική απόκριση (anticancer immune response). Τα τελευταία χρόνια αυξημένο ενδιαφέρον έχει συγκεντρωθεί στην αποσαφήνιση του ρόλου των miRNAs στη ρύθμιση των αντικαρκινικών ανοσολογικών αποκρίσεων και πως αυτό θα μπορούσε να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας [276, 277]. Στο μικροπεριβάλλον του όγκου οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων του ανοσοποιητικού και των καρκινικών κυττάρων προκαλούν τόσο προ-ογκογονικές, όσο και αντι-ογκογονικές επιδράσεις, γεγονός που επηρεάζει σημαντικά την πορεία της εξέλιξης του όγκου [155]. Τα miRNAs εμπλέκονται στη μεσολάβηση και ρύθμιση των διάφορων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων του ανοσοποιητικού και των καρκινικών κυττάρων, καθώς επίσης ελέγχουν και μηχανισμούς που αφορούν στις ανοσολογικές αποκρίσεις [278].

Αναφέρεται ότι τα miRNAs ελέγχουν τη διαφοροποίηση, ενεργοποίηση και δραστική λειτουργία των κυττάρων της έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσολογικής απόκρισης, οι οποίες επηρεάζουν την πρόοδο του όγκου [279]. Πιο συγκεκριμένα, στην έμφυτη ανοσία τα miRNAs ελέγχουν την ενεργοποίηση και πόλωση των μακροφάγων (Mφ) προς M1 ή M2

φαινότυπο, προωθώντας ή καταστέλλοντας την αντικαρκινική ανοσολογική απόκριση, αντίστοιχα [280], ενώ συμμετέχουν και στον έλεγχο της ωρίμανσης και δραστηριότητας των κυττάρων φυσικών φονέων (NK cells) [281].

Η ρύθμιση της προσαρμοστικής ανοσολογικής απόκρισης από τα miRNAs αφορά κυρίως στη διαφοροποίηση και ενεργοποίηση των διαφορετικών T κυτταρικών πληθυσμών [282], T βοηθητικά CD4⁺, T κυτταροτοξικά CD8⁺, T ρυθμιστικά Tregs [282-288]. Σχετικά με τα σημεία ελέγχου, τα miRNAs ρυθμίζουν την έκφραση των PD-1 και PD-L1 και κατά συνέπεια τις διάφορες λειτουργίες των T κυτταρικών πληθυσμών [289-291]. Στο μικροπεριβάλλον του όγκου μια πληθώρα παραγόντων συμβάλλουν στη δημιουργία και διατήρηση ενός ανοσοκατεσταλμένου φαινοτύπου, συμπεριλαμβανομένης της υψηλής συγκέντρωσης ανοσορυθμιστικών κυττάρων, όπως είναι για παράδειγμα τα κατασταλτικά κύτταρα μυελοειδούς προέλευσης (MDSCs), τα T ρυθμιστικά Tregs και τα μακροφάγα που σχετίζονται με τον όγκο (TAMs) [292]. Στο μικροπεριβάλλον, τα miRNAs παίζουν καίριο ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου [293], καθώς μελέτες έχουν δείξει ότι διαμορφώνουν την ανοσολογική απόκριση έναντι του όγκου, ρυθμίζοντας τη στρατολόγηση, την ενεργοποίηση και τις δραστικές λειτουργίες των διάφορων τύπων των ανοσοκυττάρων (Εικόνα 17).



Εικόνα 17: Αλληλεπίδραση των ανοσοκυττάρων και των miRNAs στο μικροπεριβάλλον του όγκου [277].

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή ελέγχθηκαν miRNAs που ρυθμίζουν την ανοσολογική απάντηση. Τα miRNAs που επελέγησαν αφορούν σε αυτά που ρυθμίζουν τα σημεία ελέγχου

(miR-34a, miR-200b, miR-220c), που ελέγχουν τη ρύθμιση των T ρυθμιστικών κυττάρων Tregs (miR-155, miR-146) και των κατασταλτικών κυττάρων μυελοειδούς προέλευσης (MDSCs) (miR-223), και τέλος, σε αυτά που ρυθμίζουν την διαφοροποίηση των μακροφάγων προς M1 ή M2 φαινότυπο (let-7c, miR-26a, miR-30d, miR-195, miR-202). Στον Πίνακα 2 (Υλικά και Μέθοδοι) αναγράφονται οι φυσιολογικές λειτουργίες των προαναφερθέντων miRNAs και ο ρόλος τους στη ρύθμιση της ανοσοαπόκρισης καθώς και ο ρόλος τους στον καρκίνο.

1.3.4 Ο ρόλος των *microRNAs* ως Βιοδείκτες

Όπως αναφέρθηκε, ο βασικός ρόλος των miRNAs είναι η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο [294-296]. Ωστόσο, μια εξίσου σημαντική ιδιότητα των μορίων αυτών είναι η συμμετοχή τους στη διακυτταρική επικοινωνία (intercellular signaling). Τα περισσότερα miRNAs εντοπίζονται μέσα σε κύτταρα, ένα μεγάλο ποσοστό όμως εξέρχεται από τα κύτταρα και μπορεί να εντοπιστεί σε βιολογικά υλικά [297-301]. Αυτά τα miRNAs ονομάζονται κυκλοφορούντα miRNAs (circulating miRNAs) και εκκρίνονται στο αίμα, τα ούρα και το σάλιο [298, 302].

Μελέτες προηγούμενων ετών έχουν δείξει ότι το 10% των κυκλοφορούντων miRNAs εμπεριέχεται σε εξωσώματα, ενώ το υπόλοιπο 90% προσδένεται σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα [303-305], και οι δύο αυτοί τρόποι πακεταρίσματος και μεταφοράς βοηθούν στη διατήρηση της σύστασης του miRNA, αποτρέποντας την πέψη των μορίων αυτών από τις RNάσες που βρίσκονται στα βιολογικά υλικά [296, 306]. Τα τελευταία χρόνια η ανάγκη για αποσαφήνιση της προέλευσης και των λειτουργιών των miRNAs, καθώς και της πιθανής χρήσης τους στην έρευνα και την κλινική πράξη, τόσο για φυσιολογικές, όσο και για παθολογικές καταστάσεις, έχει σημειώσει μεγάλη πρόοδο και έχει συγκεντρώσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητικών ομάδων [296].

Παρόλα αυτά, ο πιο πολλά υποσχόμενος ρόλος των miRNAs είναι αυτός του δυνητικού βιοδείκτη, καθώς υπάρχουν πολλές έρευνες στον ιατρικό κλάδο που μελετούν αυτή την πιθανότητα, όπως είναι και η βιολογία του καρκίνου και η ογκολογία [307-309]. Τέλος, θα πρέπει να μπορεί η ερευνητική και εργαστηριακή του αξία να σχετιστεί με την κλινική πράξη.

Τα miRNAs καθιερώθηκαν για πρώτη φορά ως πιθανοί βιοδείκτες για τον καρκίνο το 2008, όταν οι Lawrie et al., χρησιμοποίησαν κυκλοφορούντα miRNAs στον ορό ασθενών με διάχυτο λέμφωμα μεγάλων B κυττάρων (diffuse large B-cell lymphoma) και έκτοτε υπάρχουν πολλές αναφορές για τη χρήση τους ως πιθανοί βιοδείκτες σε πληθώρα ασθενειών [310, 311]. Αυτή η νέα τάξη μορίων διαθέτει μια σειρά από πλεονεκτήματα που την καθιστά ένα πολλά υποσχόμενο πιθανό βιοδείκτη. Τα miRNAs είναι εύκολα προσβάσιμα, καθώς μπορούν να αντληθούν από υγρές βιοψίες, όπως είναι το αίμα. Ακόμη, εμφανίζουν υψηλή ειδικότητα για τον ιστό ή το κύτταρο από το οποίο προέρχονται, αλλά και ευαισθησία για την εξέλιξη της νόσου, μιας και σε πολλές μελέτες χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση των σταδίων της νόσου [312], αλλά και την ανταπόκριση στη θεραπεία [313]. Επιπλέον, οι τεχνολογίες για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων απαιτούν λιγότερο χρόνο και

χαμηλότερο κόστος σε σχέση με την παραγωγή αντισωμάτων έναντι πρωτεϊνικών δεικτών [296].

Αναφορικά με τον καρκίνο, υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες και αναφορές που δείχνουν ότι η έκφραση των κυκλοφορούντων miRNAs στο πλάσμα και τον ορό των ασθενών είναι απορυθμισμένη, ενώ υπάρχουν και ενδείξεις που τα καθιστούν υποψήφιους διαγνωστικούς και προγνωστικούς βιοδείκτες στον καρκίνο [314-317]. Τα miRNAs με ογκογόνο δράση παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση [318, 319], ενώ τα miRNAs με ογκοκατασταλτική δράση εκφράζονται ανεπαρκώς [320].

ΣΚΟΠΟΣ

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως με τον μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΜΚΠ) να αφορά στο 85% των περιπτώσεων των ασθενών. Ο καρκίνος του πνεύμονα χαρακτηρίζεται από κακή πρόγνωση, ενώ λιγότερο από 18% των ασθενών ξεπερνούν το προσδόκιμο της πενταετούς επιβίωσης. Οι κοινές θεραπευτικές προσεγγίσεις όπως είναι η χημειοθεραπεία και το χειρουργείο παρατείνουν την επιβίωση ασθενών, χωρίς όμως να παρέχουν σημαντικά και μακροχρόνια θεραπευτικά αποτελέσματα.

Η ανοσοθεραπεία, δηλαδή η χορήγηση μονοκλωνικών αντισωμάτων που δρουν ως αναστολείς, αποτελεί μια πρωτοποριακή θεραπευτική προσέγγιση της ογκολογίας, η οποία ενισχύει το ανοσοποιητικό, με σκοπό τον περιορισμό της ανάπτυξης του όγκου, την παρεμπόδιση της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων σε άλλα σημεία του σώματος και την αύξηση της αποτελεσματικότητας του ίδιου του ανοσοποιητικού, μέσω στόχευσης των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού (immune checkpoints), όπως είναι το CTLA-4 και ο άξονας PD1/PD-L1. Δεδομένα ερευνών έχουν συσχετίσει την καλύτερη επιβίωση με έντονη ανοσολογική απόκριση έναντι του όγκου.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα σημεία ελέγχου χρησιμοποιούνται από το ανοσοποιητικό με σκοπό τη διατήρηση της ανοχής έναντι των εαυτών αντιγόνων, ενώ ταυτόχρονα ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση ώστε να προστατεύουν τους ιστούς κατά τη λοίμωξη και μπορούν να απορυθμιστούν στον όγκο. Τα καρκινικά κύτταρα ιδιοποιούνται τους μηχανισμούς αυτούς ώστε να διαφεύγουν της αναγνώρισης από τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα.

Κλινικοπαθολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά όπως το ιστορικό καπνίσματος, η γενική κατάσταση του ασθενούς, η παρουσία οδηγών μεταλλάξεων στον όγκο καθώς και το γενικό φορτίο μεταλλάξεων του όγκου, έχουν χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στους αναστολείς αυτούς, χωρίς όμως κάποιο από αυτά να εφαρμόζεται στην κλινική πράξη για την επιλογή των ασθενών. Κατά συνέπεια, η επιλογή αυτή είναι εξαιρετικά σημαντική με σκοπό να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα της θεραπείας, άρα η εύρεση αξιόπιστων βιοδεικτών με βάση τους οποίους θα διαχωρίζονται οι ασθενείς που θα επωφεληθούν είναι αναγκαία.

Τα miRNAs είναι μια οικογένεια μικρών, μη κωδικών RNA (20-22 νουκλεοτίδια), τα οποία ρυθμίζουν μια πληθώρα βιολογικών μονοπατιών, ελέγχοντας τη γονιδιακή έκφραση σε

μετα-μεταγραφικό επίπεδο στοχεύοντας mRNA και καταστέλλοντας τη μετάφραση τους. Σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, η έκφραση των miRNAs έχει βρεθεί απορυθμισμένη, ενώ ανιχνεύονται και στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΜΜΚΠ. Λόγω της συμμετοχής των miRNAs στα διάφορα στάδια έναρξης και εξέλιξης του όγκου, τα μόρια αυτά εξετάζονται ως πιθανοί προγνωστικοί και προβλεπτικοί βιοδείκτες στον καρκίνο. Ο λόγος που τα μόρια αυτά χαρακτηρίζονται ως αποτελεσματικοί βιοδείκτες έγκειται στην υψηλή ειδικότητα τους και στο μοτίβο έκφρασης τους το οποίο διαφέρει μεταξύ φυσιολογικής και παθολογικής κατάστασης. Ταυτόχρονα, ολοένα και περισσότερα δεδομένα συγκλίνουν στο ότι τα miRNAs μπορούν να ρυθμίσουν την ανοσολογική απάντηση κατά του όγκου, επηρεάζοντας την έκφραση ανοσορρυθμιστικών μορίων στον όγκο και τα ανοσοκύτταρα.

Τα κυκλοφορούντα miRNAs εμφανίζουν σημαντικά πλεονεκτήματα λόγω ευκολίας συλλογής και επαναληψιμότητας. Το πλάσμα αποτελεί μια δεξαμενή miRNAs που εκκρίνονται από διαφορετικά σημεία του αρχικού όγκου ή των μεταστατικών εστιών, ανακλώντας την ετερογένεια του όγκου. Ως αποτέλεσμα, αλλαγές στην έκφραση των miRNAs προτείνουν ένα χρήσιμο εργαλείο για έγκαιρη διάγνωση και πρόβλεψη της έκβασης και παρακολούθησης της πορείας των ασθενών με καρκίνο.

Δεδομένων των παραπάνω, ο στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η ανάλυση της έκφρασης και η διαλεύκανση του ρόλου των κυκλοφορούντων miRNAs που συμμετέχουν στη ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης σε ασθενείς με ΜΜΚΠ. Τα miRNAs που αναλύθηκαν αφορούν σε αυτά που ρυθμίζουν τα σημεία ελέγχου (miR-34a, miR-200b, miR-220c), που ελέγχουν τη ρύθμιση των T ρυθμιστικών κυττάρων Tregs (miR-155, miR-146) και των κατασταλτικών κυττάρων μυελοειδούς προέλευσης (MDSCs) (miR-223), και τέλος, σε αυτά που ρυθμίζουν την διαφοροποίηση των μακροφάγων προς M1 ή M2 φαινότυπο (let-7c, miR-26a, miR-30d, miR-195, miR-202).

Συγκρίνοντας το προφίλ έκφρασης των παραπάνω miRNAs στο πλάσμα ασθενών, στόχος είναι η εύρεση μιας μοριακής υπογραφής, η οποία θα αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο στην:

- 1) Πρόγνωση των ασθενών με ΜΜΚΠ,
- 2) Στην έκβαση των ασθενών που λαμβάνουν ανοσοθεραπεία και
- 3) Στη κατανόηση των μηχανισμών αντίστασης στην ανοσοθεραπεία.

Κεφάλαιο II

Υλικά & Μέθοδοι

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βιβλιογραφική Ανασκόπηση (Literature Review)

Για τη διεκπεραίωση των στόχων της παρούσας διδακτορικής διατριβής, πραγματοποιήθηκε αρχικά εκτενής ανασκόπηση της ήδη υπάρχουσας βιβλιογραφίας ώστε να επιλεγούν τα miRNAs με καίριο ρόλο στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης. Τα miRNAs που επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη καθώς και ο ρόλος τους στη ρύθμιση του ανοσολογικής απόκρισης, στην αντικαρκινική ανοσία και στον καρκίνο του πνεύμονα αναγράφονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Οι φυσιολογικές λειτουργίες των miRNAs, ο ρόλος τους στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης και ο ρόλος τους στον καρκίνο.

miRNAs	Φυσιολογικός ρόλος	Ρόλος στην ανοσολογική απόκριση	Ρόλος στον καρκίνο
let-7c	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ρύθμιση του μονοπατιού του NF-κΒ [321, 322] ▪ Κυτταρική διαφοροποίηση και ανάπτυξη [323-325] ▪ Απόπτωση και ρύθμιση της έκφρασης των πολυδύναμων κυττάρων [326] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Πόλωση των Μφ [322, 327, 328] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Υπερέκφραση στον καρκίνο του πνεύμονα εμποδίζει την κυτταρική ανάπτυξη [256, 329, 330] ▪ Υποεκφράζεται στον καρκίνο του προστάτη [331, 332] ▪ Εμποδίζει την ανάπτυξη, την εισβολή και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων [333-335]
miR-26a	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Κυτταρικός πολλαπλασιασμός [336] ▪ Απόπτωση ▪ Φλεγμονή ▪ Οξειδωτικό στρες ▪ Μεταβολική δραστηριότητα [337] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Πόλωση των μακροφάγων [327] ▪ Σηματοδότηση των μονοπατιών NF-κβ και MAPK ▪ Αυτοάνοσα νοσήματα (ρευματοειδής αρθρίτιδα) [338] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Καταστέλλει τη μετάσταση στον καρκίνο του ήπατος [339] και στον καρκίνο του οισοφάγου [340] ▪ Εμποδίζει τη μετάσταση και την εισβολή των κυττάρων στον καρκίνο του προστάτη [341] ▪ Προωθεί τη μετάσταση στο οστεοσάρκωμα [342] ▪ Προωθεί τη μετανάστευση και εισβολή των κυττάρων στον καρκίνο του πνεύμονα [343, 344]
miR-30d	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Κυτταρικός κύκλος ▪ Απόπτωση [345] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Προωθεί την πόλωση των μακροφάγων προς M1 φαινότυπο [346] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Υποέκφραση σε συμπαγείς όγκους [347, 348] ▪ Εμποδίζει την κυτταρική και μεταβολική δραστηριότητα στον ΜΜΚΠ [349, 350] ▪ Υπερέκφραση στον καρκίνο του οισοφάγου [351, 352] ▪ Η υποέκφραση στον καρκίνο του προστάτη σχετίζεται με κακή πρόγνωση [353]
miR-34a	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Κυτταρικός πολλαπλασιασμός ▪ Απόπτωση ▪ Ερυθροποίηση ▪ Μεταβολισμός ▪ Ανάπτυξη [227, 354-356] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Συμμετέχει στο μονοπάτι του p53 [357, 358] ▪ Ρυθμίζει την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων [359] ▪ Υποξία ▪ Φλεγμονή ▪ Μονοπάτι EMT ▪ Ανοσολογική απόκριση [360, 361] ▪ Ωρίμανση και λειτουργία των πληθυσμών των T κυττάρων [362, 363] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Εμποδίζει τη διαφοροποίηση των κυττάρων [364-366] ▪ Εμποδίζει τη μετάσταση [361, 367-370] ▪ Εμποδίζει την εισβολή των καρκινικών κυττάρων μέσω του μονοπατιού του EMT [371] ▪ Ελέγχει τα σημεία ελέγχου του άξονα PD-1/PD-L1 [290] ▪ Υποέκφραση στον καρκίνο του πνεύμονα [372-374] ▪ Η υποέκφραση σχετίζεται με μειωμένη επιβίωση και μετάσταση στον καρκίνο του πνεύμονα [375, 376] ▪ Διαφορική έκφραση στον καρκίνο του παχέος εντέρου [377, 378], του προστάτη [379], του μαστού [380-382] και του ήπατος [383]

miR-146	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Κυτταρικός πολλαπλασιασμός ▪ Διαφοροποίηση [384] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ελέγχει την έμφυτη και προσαρμοστική ανοσολογική απόκριση [385] ▪ Ωρίμανση, λειτουργία και ενεργοποίηση των πληθυσμών των T κυττάρων ▪ Απόπτωση των ανοσοκυττάρων [386] ▪ Ρυθμίζει την κυτταρική μοίρα των δενδριτικών κυττάρων [387, 388] ▪ Λειτουργία των μακροφάγων και ενεργότητα [389] ▪ Λειτουργία και ενεργότητα των T ρυθμιστικών κυττάρων (Tregs) [390-392] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Υπερέκφραση στον καρκίνο του θυροειδούς [393] ▪ Υποέκφραση στον καρκίνο του παγκρέατος [394, 395] και του στομάχου [396] ▪ Εμποδίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση στον καρκίνο του ήπατος [397], του μαστού [398], του παγκρέατος [399], του στομάχου [396] ▪ Η υποέκφραση στον καρκίνο του πνεύμονα σχετίζεται με αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων [400]
miR-155	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ερυθροποίηση [401] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ρυθμίζει τη λειτουργία των δενδριτικών κυττάρων [401, 402], των μακροφάγων [403] και των T ρυθμιστικών κυττάρων (Tregs) [404, 405] ▪ Παραγωγή και ωρίμανση των B κυττάρων [282] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Συμμετέχει στην καρκινογένεση και την πρόοδο νόσου [406, 407] ▪ Υπερέκφραση σε καρκίνο του μαστού [408], του ήπατος [409], του πνεύμονα [410, 411], του παγκρέατος [412] και του προστάτη [413]
miR-195	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ελέγχει τον κυτταρικό κύκλο και τον πολλαπλασιασμό [414-416] ▪ Απόπτωση [417] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Εμποδίζει την πόλωση των μακροφάγων προς M2 φαινότυπο [418] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Συμμετέχει στη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων [419], εισβολή [420] και μετάσταση [421] ▪ Σχετίζεται με αντίσταση στη θεραπεία στον ΜΜΚΠ [422] ▪ Υποέκφραση στον ΜΜΚΠ [423], στο γλοιοβλάστωμα [424] και στον καρκίνο του παγκρέατος [425] ▪ Εμποδίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στον ΜΜΚΠ [426] και στον καρκίνο του οισοφάγου [427]
miR-200b	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Κυτταρικός πολλαπλασιασμός [428] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Μονοπάτι EMT [429-432] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Η υπερέκφραση σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση στον καρκίνο των νεφρών [433] και με καλύτερη απόκριση στην ανοσοθεραπεία στον καρκίνο του πνεύμονα [434] ▪ Η υποέκφραση σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση στον καρκίνο του στομάχου [435] και του ήπατος [428] ▪ Υποέκφραση στον καρκίνο του παχέος εντέρου [436], του ήπατος [437], του παγκρέατος [438], του στομάχου [439], του μαστού [440] και στο μελάνωμα [441] ▪ Υπερέκφραση στον καρκίνο του προστάτη [442], του πνεύμονα [443-445], του οισοφάγου [446] και του μαστού [447]

<p>miR-200c</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Απόπτωση [448] ▪ Σημεία ελέγχου της καρκινογένεσης (Hallmarks of cancer) [449-451] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Μονοπάτι EMT [429-432] ▪ Ρύθμιση των κυττάρων μυελοειδούς προέλευσης [452], των πληθυσμών των T κυττάρων [452] και της πόλωσης των μακροφάγων [453] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Η υπερέκφραση σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση στον καρκίνο των νεφρών [433] ▪ Η υπερέκφραση σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση στον καρκίνο παχέος εντέρου [454] και των ωοθηκών [455] ▪ Καταστέλλει τη μετάσταση στον ΜΜΚΠ [456] ▪ Υποέκφραση στον καρκίνο του μαστού [457] ▪ Η υποέκφραση στον καρκίνο του πνεύμονα σχετίζεται με μετάσταση [458] ▪ Η υπερέκφραση στον καρκίνο του στομάχου εμποδίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προωθεί την απόπτωση [448] ▪ Υπερέκφραση στον καρκίνο του ενδομητρίου [459] <p>Καταστολή ογκοκατασταλτικών γονιδίων στον καρκίνο του παχέος εντέρου [460]</p>
<p>miR-202</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Έκφραση IFN-1 [461] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ρύθμιση της πόλωσης των μακροφάγων [462-464] ▪ Στοχεύει το μονοπάτι STAT3 [465] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Η υποέκφραση σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση στον καρκίνο του μαστού [466] ▪ Η υπερέκφραση σχετίζεται με πρόοδο νόσου [467] και με αντίσταση στη θεραπεία [468] στον καρκίνο του μαστού και στον καρκίνο του προστάτη σχετίζεται με μειωμένη μεταστατική ικανότητα [469] ▪ Η υπερέκφραση στον ΜΜΚΠ σχετίζεται με αυξημένη μεταστατική ικανότητα [470] ▪ Η υπερέκφραση σχετίζεται με πρόοδο νόσου και χειρότερη πρόγνωση [471] ▪ Η υπερέκφραση σχετίζεται με μειωμένη επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και μειωμένη μεταστατική ικανότητα [465]
<p>miR-223</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ερυθροποίηση [401] ▪ Παραγωγή κοκκιωδών κυττάρων του αίματος [472] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ρυθμίζει την έκφραση των κυττάρων μυελοειδούς προέλευσης [473] ▪ Ρυθμίζει την πόλωση των μακροφάγων [473] 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Η υπερέκφραση σχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση στον καρκίνο του μαστού [474] ▪ Προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την εισβολή στον καρκίνο του μαστού [475] ▪ Η υπερέκφραση στο στομάχι σχετίζεται με εισβολή των καρκινικών κυττάρων και λεμφαδενική μετάσταση [476] και υψηλή πιθανότητα επανεμφάνισης της νόσου [477, 478]

2.2 Επιλογή Δείγματος Μελέτης – Ομάδες Ασθενών

Πρόκειται για μια αναδρομική και μεταφραστική κλινικο-εργαστηριακή μελέτη, με σκοπό την συσχέτιση της έκφρασης κυκλοφορούντων miRNAs, που ενέχονται στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης και αντικαρκινικής ανοσίας, με (i) την εκτίμηση της πρόγνωσης ασθενών με ΜΜΚΠ, (ii) την πρόβλεψη της έκβασης ασθενών με ΜΜΚΠ και (iii) την μελέτη των μηχανισμών αντίστασης στην θεραπεία.

Οι ομάδες ασθενών που ανακτήθηκαν από τα αρχεία της Παθολογικής-Ογκολογικής κλινικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠΑΓΝΗ) ήταν:

- Ασθενείς με προχωρημένο ή μεταστατικό ΜΜΚΠ, που έλαβαν Χημειοθεραπεία με βάση πλατινούχα σύμπλοκα, ως θεραπεία πρώτης γραμμής, το χρονικό διάστημα 2009-2017.
- Ασθενείς με προχωρημένο ή μεταστατικό ΜΜΚΠ, που έλαβαν Ανοσοθεραπεία, ως θεραπεία δεύτερης γραμμής, το χρονικό διάστημα 2017-2021.

Για τους ασθενείς, ίσχυαν τα εξής:

- Οι ασθενείς χρησιμοποίησαν τις υπηρεσίες φροντίδας της Παθολογικής-Ογκολογικής Κλινικής του ΠΑΓΝΗ, στα πλαίσια της θεραπείας τους και της αντιμετώπισης της νόσου τους.
- Το δείγμα αίματος από κάθε ασθενή (αιμοληψία) συλλέχθηκε από την νοσηλεύτρια έρευνας της Παθολογικής-Ογκολογικής Κλινικής του ΠΑΓΝΗ, στο τμήμα της Ημερήσιας Νοσηλείας (τμήμα Χημειοθεραπείας) πριν από την προγραμματισμένη έναρξη της θεραπείας του και στη συνέχεια προωθήθηκε στο εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, όπου έλαβαν ένα μοναδικό κωδικό, προκειμένου να διατηρηθεί η ανωνυμία των ασθενών.
- Η καταγραφή των κλινικών δεδομένων των ασθενών διεξήχθη αποκλειστικά στους χώρους της Παθολογικής-Ογκολογικής Κλινικής του ΠΑΓΝΗ.
- Η καταγραφή των κλινικών δεδομένων των ασθενών έγινε σε λογιστικό φύλλο (Microsoft Office, Excel) και δημιουργήθηκε βάση δεδομένων.
- Τα κλινικά δεδομένα των ασθενών αντλήθηκαν από τον ιατρικό φάκελο/ φάκελο νοσηλείας.
- Η ανάλυση και κωδικοποίηση των κλινικών και εργαστηριακών δεδομένων πραγματοποιήθηκε σε στατιστικό πακέτο (IBM, SPSS Statistics).
- Υπάρχει έγγραφη συγκατάθεση συμμετοχής όλων των ασθενών.

Η μελέτη αυτή έλαβε άδεια υλοποίησης την 13^η Δεκεμβρίου 2017 από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠΑΓΝΗ) με αριθμό πρωτοκόλλου 13725. Στην παράγραφο Β' των παραρτημάτων βρίσκεται η αίτηση προς το επιστημονικό συμβούλιο, η απόφαση έγκρισης από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας, και τέλος το έντυπο ενημέρωσης και συγκατάθεσης που απευθύνεται στους ασθενείς.

2.2.1 Κριτήρια Ένταξης και Αποκλεισμού των Ασθενών

Τα κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού αναγράφονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Κριτήρια Ένταξης και Αποκλεισμού των Ασθενών.

<p>Κριτήρια Ένταξης</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Διαθέσιμο και αξιοποιήσιμο δείγμα αίματος. • Κλίμακα Λειτουργικής Κατάστασης: 0-3 (ECOG Performance Status, PS). • Ιστολογική εκτίμηση πριν την έναρξη της θεραπείας (διαγνωστική εκτίμηση). • Απεικονιστική εκτίμηση πριν την έναρξη της θεραπείας. • Τουλάχιστον μία (1) απεικονιστική εκτίμηση μετά τη χορήγηση της θεραπείας. • Επιβίωση για χρονικό διάστημα περισσότερο από ένα μήνα (>1) από την έναρξη της θεραπείας. • Πρόοδος νόσου σε διάστημα μεγαλύτερο του ενός (>1) μήνα από την έναρξη της θεραπείας. • Πλήρες ιστορικό καταγραφής από το φάκελο νοσηλείας.
<p>Κριτήρια Αποκλεισμού</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Διαθέσιμο, αλλά μη αξιοποιήσιμο δείγμα αίματος (αιμολυμένο δείγμα). • Κλίμακα Λειτουργικής Κατάστασης: >3 (ECOG Performance Status, PS). • Απουσία απεικονιστικών εκτιμήσεων. • Αλλαγή θεραπευτικού σχήματος λόγω παρενεργειών στο ήδη χορηγούμενο. • Επιβίωση για χρονικό διάστημα μικρότερο από ένα μήνα (<1) από την έναρξη της θεραπείας. • Πρόοδος νόσου σε διάστημα μικρότερο του ενός (<1) μήνα από την έναρξη της θεραπείας. • Ελλιπές ιστορικό καταγραφής από το φάκελο νοσηλείας.

Η κλίμακα και τα κριτήρια λειτουργικής κατάστασης (Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status, ECOG PS) χρησιμοποιείται για τη αξιολόγηση της επίδρασης της

ασθένειας στις καθημερινές ικανότητες διαβίωσης ενός ασθενή και στον καθαρισμό της κατάλληλης θεραπείας και πρόγνωσης [479]. Η κλίμακα διαμορφώνεται ως εξής:

- 0: Πλήρως ενεργός ασθενής, ικανός να πραγματοποιεί όλες τις εργασίες, χωρίς περιορισμούς.
- 1: Περιορισμένη η έντονη σωματική δραστηριότητα, περιπατητικός ασθενής και ικανός να εκτελέσει εργασίες ελαφριάς ή καθιστικής φύσης.
- 2: Περιπατητικός ασθενής και ικανός για κάθε αυτοεξυπηρέτηση, αλλά ανίκανος για οποιαδήποτε εργασιακή δραστηριότητα. Δραστήριος για $\geq 50\%$ των ωρών αφύπνισης.
- 3: Ασθενής ικανός μόνο για περιορισμένη αυτοεξυπηρέτηση, κλινήρης για $\geq 50\%$ των ωρών αφύπνισης.
- 4: Πλήρως εξαρτημένος ασθενής, ανίκανος για οποιαδήποτε αυτοεξυπηρέτηση, κλινήρης για 100% των ωρών αφύπνισης.
- 5: Θάνατος.

2.2.2 Καταγραφή και Στάδια Αξιοποίησης των Κλινικών Δεδομένων των Ασθενών

Τα δεδομένα των ασθενών που αντλήθηκαν από το φάκελο νοσηλείας αφορούσαν σε:

- Δημογραφικά στοιχεία.
- Ιατρικό & Χειρουργικό ιστορικό.
- Ιστολογικές εκτιμήσεις.
- Απεικονιστικές εκτιμήσεις.
- Θεραπευτικά σχήματα.
- Αποτελέσματα εξετάσεων (Κλινικών και Εργαστηριακών).
- Πορεία νόσου.

2.2.3 Ομάδα Ελέγχου

Ως ομάδα ελέγχου συμπεριελήφθησαν αιμοδότες που προσήλθαν στο τμήμα Εθελοντικής Αιμοδοσίας του ΠΑΓΝΗ. Τα κριτήρια επιλογής των αιμοδοτών ήταν ηλικία άνω των 50 ετών και ελεύθερο ιστορικό καπνίσματος.

2.3 Συλλογή Δειγμάτων - Απομόνωση Πλάσματος και Μονοπύρηνων Κυττάρων από

Περιφερικό Αίμα

Η συλλογή των δειγμάτων των ασθενών (αιμοληψία) πραγματοποιήθηκε πριν την έναρξη της θεραπείας τους στην Παθολογική-Ογκολογική κλινική του ΠΑΓΝΗ. Από τους ασθενείς συλλέχθηκαν 20ml περιφερικού αίματος σε σωληνάριο τύπου Falcon (50ml) που περιείχε EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ, Ethylene diamine tetraacetic acid) ως αντιπηκτικό και το δείγμα προωθήθηκε στο εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας για περαιτέρω επεξεργασία.

Το πλάσμα μπορεί να απομονωθεί από τα υπόλοιπα συστατικά του ολικού αίματος με “Φυγοκέντρηση Διαβάθμισης Πυκνότητας”. Η τεχνική αυτή βασίζεται στη δύναμη που ασκείται λόγω συνεχών περιστροφών, ωθώντας τα πυκνότερα και βαρύτερα συστατικά στις εξωτερικές πλευρές, με αποτέλεσμα τη δημιουργία τριών (3) στρωμάτων διαφορετικών πυκνοτήτων, οι οποίες περιλαμβάνουν διαφορετικούς πληθυσμούς κυττάρων. Στον πυθμένα συγκεντρώνονται τα ερυθρά αιμοσφαίρια, στη μεσαία στιβάδα τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια και η ανώτερη στιβάδα αποτελεί το πλάσμα (Εικόνα 18). Τα μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) εντοπίζονται στη μεσαία στιβάδα των λευκών αιμοσφαιρίων.



Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση διαχωρισμού κυττάρων περιφερικού αίματος σε σωληνάριο έπειτα από “Φυγοκέντρηση Διαβάθμισης Πυκνότητας”.

Πειραματικό Πρωτόκολλο: Απομόνωση Πλάσματος και Μονοπύρηνων Κυττάρων από

Περιφερικό Αίμα

- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 2500rpm, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο σταθερής θερμοκρασίας (4°C), για 15 λεπτά, από όπου προκύπτουν τρεις (3) στιβάδες, εκ των οποίων, η ανώτερη αποτελεί το πλάσμα, η μεσόφαση/λευκή στιβάδα περιέχει τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια και η κατώτερη στοιβάδα τα ερυθρά αιμοσφαίρια.
- Το πλάσμα απομακρύνεται (υπερκείμενο), χωρίς διατάραξη των άλλων δύο στιβάδων, με τη βοήθεια σιφωνίου και μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο τύπου Falcon (15ml).
- Το πλάσμα φυγοκεντρείται ξανά στις 3100rpm, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο σταθερής θερμοκρασίας (4°C), για 15 λεπτά, με σκοπό την απομάκρυνση θραυσμάτων (debris) και τον καλύτερο καθαρισμό του.
- Με τη βοήθεια σιφωνίου, το πλάσμα μεταφέρεται σε σωληνάριο τύπου cryo-vial (2ml) και αποθηκεύεται σε βαθιά κατάψυξη (-80°C), μέχρι περαιτέρω χρήση.
- Στο δείγμα από το οποίο αφαιρέθηκε το πλάσμα, επαναφέρεται ο αρχικός όγκος στα 20ml με προσθήκη χλωριούχου νατρίου 0.9% (sodium chloride) και κατόπιν το δείγμα αραιώνεται 1:1 με χλωριούχο νάτριο (τελικός όγκος 40ml) και το δείγμα αναδεύεται ελαφρώς για ομογενοποίηση.
- Σε νέο σωληνάριο τύπου Falcon (50ml) που περιέχει 15ml διαλύματος φικόλης προστίθεται στάγδην το αραιωμένο δείγμα, όπως προέκυψε από το προηγούμενο βήμα.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στα 400g, σε φυγόκεντρο σταθερής θερμοκρασίας (18°C) για 40 λεπτά (χωρίς φρένο).
- Ο δακτύλιος των μονοπύρηνων κυττάρων (~10ml) μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο τύπου Falcon (50ml) και προστίθενται 30ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (phosphate buffered saline, PBS) και το δείγμα φυγοκεντρείται στα 400g, σε φυγόκεντρο σταθερής θερμοκρασίας (18°C) για 15 λεπτά (με φρένο).
- Μετά τη φυγοκέντρωση, τα μονοπύρηννα κύτταρα έχουν καθιζάνει υπό μορφή ιζήματος και απομακρύνεται το υπερκείμενο. Το παραπάνω βήμα επαναλαμβάνεται άλλη μια φορά.
- Μετά τη δεύτερη φυγοκέντρωση, το σωληνάριο που περιέχει τα μονοπύρηννα κύτταρα υπό μορφή ιζήματος αποθηκεύεται σε βαθιά κατάψυξη (-80°C), μέχρι περαιτέρω χρήση.

Η διαδικασία απομόνωσης του πλάσματος και μονοπύρηνων κυττάρων ήταν κοινή για όλα τα δείγματα των ασθενών και για τα δείγματα της ομάδας ελέγχου.

2.4 Απομόνωση ολικού RNA από Πλάσμα και από Μονοκύρηννα Κύτταρα

Περιφερικού Αίματος

2.4.1 Απομόνωση Ολικού RNA από Πλάσμα Περιφερικού Αίματος

Η απομόνωση του RNA είναι η εξαγωγή του από βιολογικά δείγματα. Με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol LS (Ambion, Life Technologies, Waltham, MA, USA) επιτυγχάνεται η ακέραιη απομόνωση του ολικού RNA από τα δείγματα πλάσματος, αποφεύγοντας ταυτόχρονα τις προσμίξεις από DNA και πρωτεΐνες (Thermo Fisher Scientific). Η διαδικασία αυτή επιτρέπει τη μελέτη και ποσοτικοποίηση των RNA μεταγράφων σε δείγματα με τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας.

Τα δείγματα του πλάσματος των ασθενών και της ομάδας ελέγχου, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.3 φυλάσσονται στους -80°C .

Πειραματικό Πρωτόκολλο: Απομόνωση ολικού RNA από Πλάσμα

- Το πλάσμα αφήνεται να ξεπαγώσει σε επαφή με πάγο για περίπου σαράντα (40) λεπτά.
- 450μl πλάσματος μεταφέρονται σε σωληνάριο τύπου Eppendorf 1.5ml.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται σε 14000rpm, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο σταθερής θερμοκρασίας (4°C), για 15 λεπτά, προκειμένου να καθιζάνουν θραύσματα κυττάρων (debris).
- 400μl πλάσματος μεταφέρονται εκ νέου σε σωληνάριο τύπου Eppendorf 2ml, στο οποίο προστίθενται 1.2ml του χαοτροπικού παράγοντα Trizol-LS, με σκοπό την απομάκρυνση πρωτεϊνικών συμπλόκων ή άλλων δομών από το RNA (αποδιάταξη), το δείγμα ανακινείται ελαφρώς και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Στο δείγμα προστίθενται 5μl (25fmol) του συνθετικού microRNA cel-miR-39 (*Caenorhabditis elegans*, Qiagen Inc., USA), το οποίο χρησιμοποιείται ως εξωγενής μάρτυρας για την ομαλοποίηση των διαφορών μεταξύ των δειγμάτων που προκύπτουν κατά την απομόνωση. Στη συνέχεια, προστίθενται 300μl χλωροφορμίου, το οποίο βοηθά στο σχηματισμό 3 φάσεων στο δείγμα, όπου η οργανική διαχωρίζεται από την υδατική, η οποία περιέχει το συνολικό RNA. Έπειτα, το δείγμα ανακινείται ελαφρώς και τοποθετείται σε πάγο για (τουλάχιστον) 10 λεπτά.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται σε 14000rpm, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο σταθερής θερμοκρασίας (4°C), για 15 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση παρατηρούνται τρεις (3) φάσεις: (i) η υδατική φάση στο ανώτερο τμήμα, στην οποία εμπεριέχεται το ολικό RNA,

- (ii) η μεσαία φάση, στην οποία εμπεριέχεται το DNA και (iii) η οργανική φάση στο κατώτερο τμήμα, στην οποία εμπεριέχονται υπολείμματα από πρωτεΐνες και λοιπά στοιχεία του πλάσματος.
- 700μl της υδατικής φάσης μεταφέρονται σε σωληνάριο τύπου Eppendorf 1.5ml (χωρίς να διαταραχθούν οι υπόλοιπες φάσεις), όπου προστίθεται ίσος όγκος 2-προπανόλης (700μl) για την κατακρήμνιση του RNA. Επιπλέον, προστίθεται 1μl γλυκογόνου (13 μg/mL, QIAGEN), το οποίο αυξάνει την ανάκτηση του RNA και συγχρόνως το κάνει πιο ευδιάκριτο μετά από φυγοκέντρηση. Τέλος, το δείγμα φυλάσσεται στους -80°C.
 - Την επομένη, το δείγμα αφήνεται να ξεπαγώσει σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε 14000rpm, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο σταθερής θερμοκρασίας (4°C), για 15 λεπτά.
 - Το ολικό RNA του δείγματος εμφανίζεται με τη μορφή ιζήματος, το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 700μl αιθανόλης πυκνότητας 75%. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 14000rpm, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο σταθερής θερμοκρασίας (4°C), για 5 λεπτά, με σκοπό τον καθαρισμό του δείγματος.
 - Το παραπάνω βήμα επαναλαμβάνεται 3 φορές.
 - Μετά την 3^η φυγοκέντρηση, απομακρύνεται η αιθανόλη και το δείγμα αφήνεται να στεγνώσει (χωρίς να αφυδατωθεί) σε θερμοκρασία δωματίου.
 - Τέλος, το RNA επανα-διαλυτοποιείται σε 50μl υψηλής καθαρότητας νερό (DEPC-treated water) και το δείγμα φυλάσσεται στους -80°C μέχρι την επόμενη χρήση σε επακόλουθη PCR.

2.4.2 Απομόνωση Ολικού RNA από Μονοπύρρηνα Κύτταρα Περιφερικού Αίματος

Η απομόνωση του RNA είναι η εξαγωγή του από βιολογικά δείγματα. Με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol (Ambion, Life Technologies, Waltham, MA, USA) επιτυγχάνεται η ακέραιη απομόνωση του ολικού RNA από τα δείγματα μονοπύρηνων κυττάρων, αποφεύγοντας ταυτόχρονα τις προσμίξεις από DNA και πρωτεΐνες (Thermo Fisher Scientific). Η διαδικασία αυτή επιτρέπει τη μελέτη και ποσοτικοποίηση των RNA μεταγράφων σε δείγματα με τεχνικές της Μοριακής Βιολογίας.

Τα δείγματα των μονοπύρηνων κυττάρων των ασθενών και της ομάδας ελέγχου, όπως περιεγράφηκε στην ενότητα 2.3 φυλάσσονται στους -80°C.

Πειραματικό Πρωτόκολλο: Απομόνωση ολικού RNA από Μονοκύτταρα

- Τα κύτταρα αφήνονται να ξεπαγώσουν σε επαφή με πάγο για περίπου είκοσι (20) λεπτά.
- Στο σωληνάριο του δείγματος προστίθεται 1ml του χαστροπικού παράγοντα Trizol (Ambion, Life Technologies), με σκοπό την απομάκρυνση πρωτεϊνικών συμπλόκων ή άλλων δομών από το RNA (αποδιάταξη), το δείγμα ανακινείται ελαφρώς και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Η διάσπαση των κυτταρικών δομών και συμπλόκων πραγματοποιείται με τη βοήθεια βελόνας ινσουλίνης.
- Στο δείγμα προστίθενται 200μl χλωροφορμίου (το χλωροφόρμιο βοηθά στο σχηματισμό 3 φάσεων στο δείγμα, όπου η οργανική διαχωρίζεται από την υδατική, η οποία περιέχει το συνολικό RNA), το δείγμα ανακινείται ελαφρώς και τοποθετείται σε πάγο για (τουλάχιστον) 10 λεπτά.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται σε 14000rpm, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο σταθερής θερμοκρασίας (4°C), για 15 λεπτά. Από τη φυγοκέντρηση αυτή προκύπτει δείγμα με κλασμάτωση 3 φάσεων, στο ανώτερο τμήμα βρίσκεται η υδατική φάση, στην οποία εμπεριέχεται το ολικό RNA, στη μεσαία φάση το DNA και στο κατώτερο τμήμα, στην οργανική φάση, όλα τα υπόλοιπα στοιχεία του πλάσματος.
- Συλλέγεται περίπου το 80% της υδατικής φάσης (χωρίς να διαταραχθούν οι υπόλοιπες φάσεις σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή) και μεταφέρεται σε σωληνάριο τύπου Eppendorf 1.5ml, όπου προστίθεται 0,7 όγκοι 2-προπανόλης και το δείγμα φυλάσσεται στους -80°C.
- Την επομένη, το δείγμα αφήνεται να ξεπαγώσει σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε 14000rpm, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο σταθερής θερμοκρασίας (4°C), για 15 λεπτά.
- Το ολικό RNA του δείγματος εμφανίζεται με τη μορφή ιζήματος, το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 700μl αιθανόλης πυκνότητας 75% και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 14000rpm, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο σταθερής θερμοκρασίας (4°C), για 5 λεπτά, με σκοπό τον καθαρισμό του δείγματος.
- Το παραπάνω βήμα επαναλαμβάνεται 3 φορές.
- Μετά την 3^η φυγοκέντρηση, απομακρύνεται η αιθανόλη και το δείγμα αφήνεται να στεγνώσει (χωρίς να αφυδατωθεί) σε θερμοκρασία δωματίου.

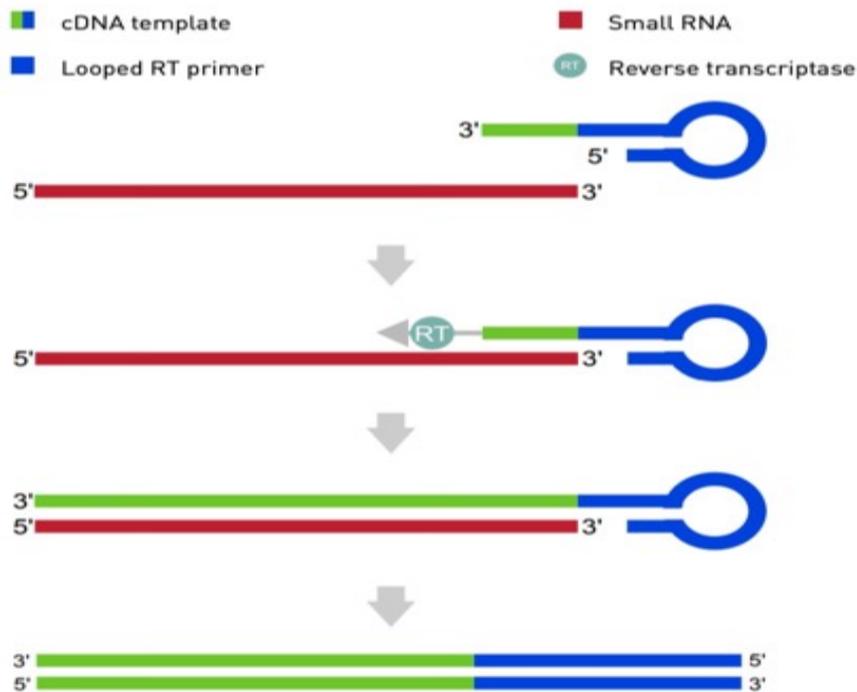
- Τέλος, το RNA επανα-διαλυτοποιείται σε 30μl υψηλής καθαρότητας νερό (DEPC-treated water) και το δείγμα φυλάσσεται στους -80°C μέχρι την επόμενη χρήση σε επακόλουθη PCR.

2.5 Αντίστροφη Μεταγραφή ολικού RNA σε Συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA)

Το συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA), παράγεται *in vitro* και χρησιμοποιεί ως εκμαγείο μονόκλωνο RNA (π.χ. αγγελιοφόρο RNA, mRNA ή microRNA, miRNA) μέσω μιας αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase). Η τεχνολογία του cDNA χρησιμοποιείται ευρέως στην κλωνοποίηση ευκαρυωτικών γονιδίων σε προκαρυωτικούς οργανισμούς. Στη Μοριακή Βιολογία, η τεχνολογία του cDNA χρησιμοποιείται για την ανάλυση του μεταγραφικού προφίλ σε ιστούς, μεμονωμένα κύτταρα ή πυρήνες μέσω μικροσυστοιχιών (microarrays) ή μέσω αλληλούχισης του RNA (RNA sequencing, RNA-seq). Ακόμη, η τεχνολογία του cDNA χρησιμοποιείται για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-qPCR). Στην περίπτωση αυτή, το cDNA χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την κατασκευή μιας δεύτερης συμπληρωματικής αλυσίδας, όπου οι εμπειριχόμενες αλληλουχίες μπορούν να ενισχυθούν στους κύκλους της PCR και τελικά να ποσοτικοποιηθούν με φθοριομετρικές μεθόδους (Εικόνα 19).

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία TaqMan. Η αρχή της μεθόδου αυτής βασίζεται στη λειτουργία της 5'-3' εξωνουκλεάσης της πολυμεράσης Taq για τη διάσπαση ενός διπλά σημασμένου ανιχνευτή (probe), κατά τον υβριδισμό με τη συμπληρωματική αλληλουχία-στόχο και την ανίχνευση μέσω εκπομπής φθορισμού [480].

Το ολικό RNA που απομονώθηκε από το πλάσμα και από τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος, όπως αναλύθηκε στην Ενότητα 2.4 χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία cDNA, με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription, RT).



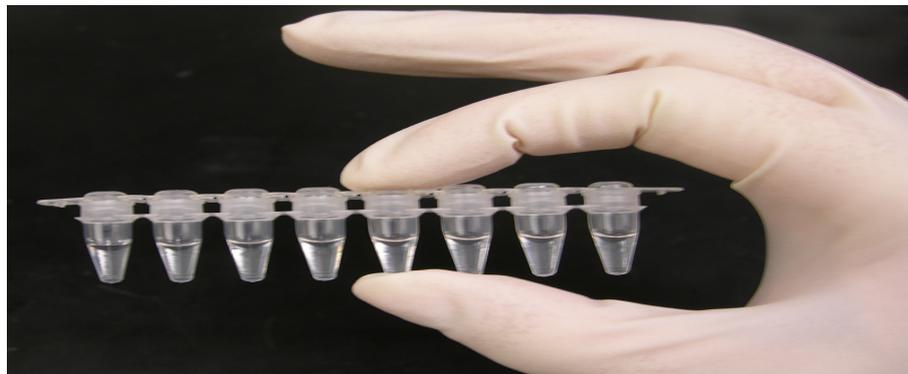
Εικόνα 19: Σχηματική Απεικόνιση της Διαδικασίας Σχηματισμού Συμπληρωματικού DNA.
(complementary DNA, cDNA, Thermo Fisher Scientific)

Πειραματικό Πρωτόκολλο: Κατασκευή Συμπληρωματικού DNA, cDNA

- Τα δείγματα RNA τα οποία ήταν αποθηκευμένα στους -80°C και τα αντιδραστήρια τα οποία ήταν αποθηκευμένα στους -20°C , αφήνονται να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια διατηρούνται σε πάγο καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.
- Δημιουργείται ένα συγκεντρωτικό διάλυμα (master mix) για κάθε ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή (RT-specific stem-loop primers), το οποίο περιέχει Μίγμα Τριφωσφορικών Δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs), Αντίστροφη Μεταγραφάση (MultiScribe Reverse Transcriptase), Αναστολέα RNασών (RNase inhibitors), Ρυθμιστικό Διάλυμα (RT buffer) και Υψηλής Καθαρότητας Νερό για εξομάλυνση των όγκων των αντιδράσεων (απαλλαγμένο από νουκλέασες και RNάσες, DEPC-treated water, Diethyl-Pyrocabonate).
- Το μίγμα των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών διαμοιράζεται σε συστάδα 8 μικροσωληναρίων αντίδρασης (8-well strips), όπως φαίνεται στην Εικόνα 20. Σε κάθε μικροσωληνάριο αντίδρασης προστίθεται ένα μοναδικό δείγμα RNA ασθενούς.
- Κάθε αντίδραση περιέχει 3.8μl διαλύματος αντίδρασης και 1.2μl (25-30ng) δείγματος RNA (τελικός όγκος αντίδρασης 5μl).

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία σχηματισμού cDNA, καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης αναφέρονται στον Πίνακα 4 και 5, αντίστοιχα. Στη διαδικασία του cDNA, ως αρνητικός μάρτυρας για κάθε ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή, χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα αντίδρασης που περιείχε όλα τα αντιδραστήρια, εκτός από δείγμα RNA, το οποίο είχε αντικατασταθεί από υψηλής καθαρότητας νερό (DEPC-treated water). Τα cDNA που παράχθηκαν με αυτή τη διαδικασία μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας στην RT-qPCR ή να φυλαχθούν στους -20°C , έως μία εβδομάδα.

Η παραπάνω διαδικασία ήταν κοινή και για να δείγματα πλάσματος και για τα δείγματα των μονοπύρηνων κυττάρων.



Εικόνα 20: Συστάδα Μικροσωληναρίων Αντίδρασης Συμπληρωματικού DNA.
(complementary DNA, cDNA)

Πίνακας 4: Αντιδραστήρια Συμπληρωματικού DNA.
(complementary DNA, cDNA)

Αντιδραστήρια cDNA	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση	μl/αντίδραση δείγματος RNA
Μίγμα Ελεύθερων Τριφωσφορικών Δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs)	100mM	10mM	0.50
Πολυμεράση Πολλαπλών Δράσεων (MultiScribe Reverse Transcriptase)	50U/μl	3.3U/μl	0.33
Αναστολέας RNασών (RNase inhibitors)	20U/μl	0.252U/μl	0.063
Ολιγονουκλεοτιδικοί Εκκινητές (RT-specific stem-loop primers)	5x	0.5x	0.50
Ρυθμιστικό Διάλυμα (RT buffer)	10x	1x	0.50
Υψηλής Καθαρότητας Νερό (DEPC-treated water)	-	-	1.907
RNA εκμαγείο (RNA template)	-	-	1.20
Τελικός Όγκος	-	-	5

Πίνακας 5: Πρόγραμμα σχηματισμού Συμπληρωματικού DNA (complementary DNA, cDNA) σε θερμικό κυκλοποιητή Thermal Cycler PTC-200.

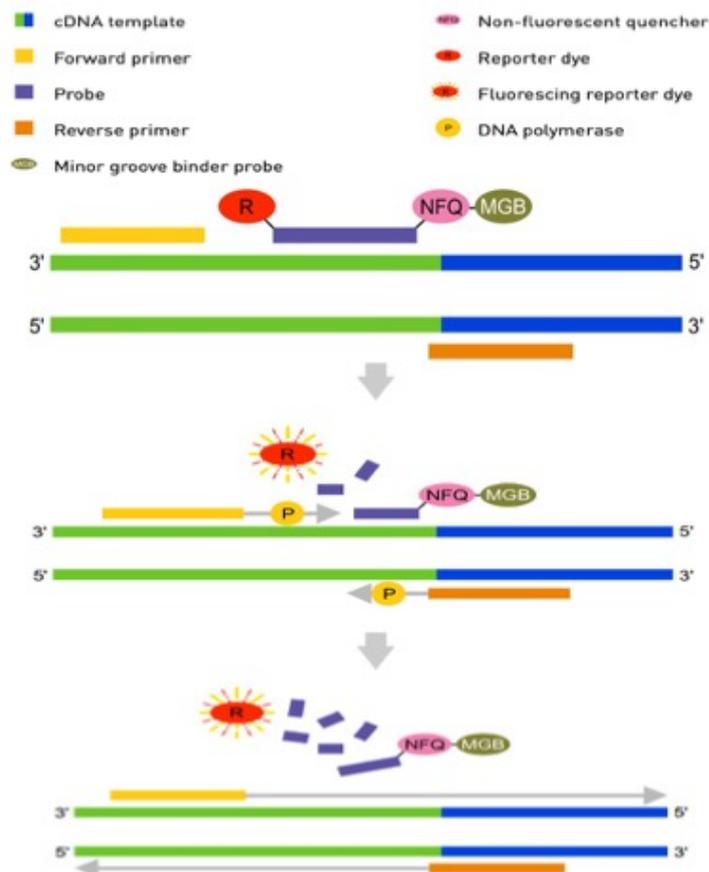
Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος Επώασης (min)	Στάδιο
16	30	Ανίχνευση και δημιουργία υβριδικών μορίων RNA/Ειδικών Εκκινητών
42	30	Σχηματισμός συμπληρωματικού DNA
85	5	Απενεργοποίηση αντίστροφης μεταγραφάσης και καταστροφή της αλυσίδας RNA
4	∞	Διατήρηση

2.6 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (real-time PCR)

Η ποσότητα ενός εκφραζόμενου γονιδίου σ' ένα βιολογικό δείγμα μπορεί να μετρηθεί από τον αριθμό των RNA μεταγράφων που εμπεριέχονται σ' αυτό. Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης μικρών ποσοτήτων RNA προϋποθέτει τον επαρκή πολλαπλασιασμό των μεταγράφων. Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (real-time PCR, RT-qPCR) αποτελεί μια εργαστηριακή τεχνική της Μοριακής Βιολογίας. Η λειτουργία της είναι να "παρακολουθεί" την ενίσχυση ενός μορίου DNA-στόχου κατά τη διάρκεια της διεργασίας (εξ' ου και πραγματικού χρόνου) και όχι στο τέλος της, όπως συμβαίνει στην περίπτωση της συμβατικής PCR, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ποσοτικά (quantitative) και ημι-ποσοτικά (semi-quantitative).

Οι δύο (2) πιο κοινές μέθοδοι για την ανίχνευση των προϊόντων της RT-qPCR είναι με:

1. Χρήση μη-ειδικών φθοριζουσών ουσιών που παρεμβάλλονται σε οποιοδήποτε δίκλωνο DNA.
2. Χρήση ειδικών ανιχνευτών αλληλουχίας DNA που αποτελούνται από σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια (ανιχνευτής αναφοράς φθορισμού, fluorescent reporter), επιτρέποντας την ανίχνευση μόνο μετά τον υβριδισμό του ανιχνευτή με τη συμπληρωματική αλληλουχία του DNA. Στην περίπτωση αυτή, οι ανιχνευτές αναφοράς φθορισμού ανιχνεύουν μόνο το DNA που περιέχει τη συμπληρωματική αλληλουχία, αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό την ειδικότητα. Ο ανιχνευτής αναφοράς φθορισμού συνδέεται συμπληρωματικά στο ένα άκρο της αλληλουχίας του DNA, ενώ στο άλλο άκρο υπάρχει ένας τελεστής απόσβεσης (quencher). Η αύξηση του προϊόντος σε κάθε κύκλο της PCR προκαλεί ανάλογη αύξηση του φθορισμού λόγω της υδρόλυσης του ανιχνευτή και της απελευθέρωσης του φθορισμού (Εικόνα 21).



Εικόνα 21: Σχηματική Απεικόνιση Ενίσχυσης Αλληλουχίας DNA με Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου.

Πειραματικό Πρωτόκολλο: Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (real-time PCR)

- Το cDNA αραιώνεται 1:4 με υψηλής καθαρότητας νερό (DEPC-treated water).
- Δημιουργείται ένα συγκεντρωτικό διάλυμα (master mix) για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση κάθε miRNA, το οποίο περιέχει Διάλυμα αντίδρασης (Universal PCR Master Mix) και έναν ανιχνευτή (probe) ειδικό για κάθε miRNA (TaqMan microRNA Assay).
- Το μίγμα του ανιχνευτή διαμοιράζεται στα βοηθία πλάκας 384-θέσεων (MicroAmp Optical 384-Well Reaction Plate with Barcode, Applied Biosystems) όπως φαίνεται στην Εικόνα 22. Σε κάθε βοηθίο αντίδρασης προστίθεται ένα μοναδικό δείγμα cDNA του αντίστοιχου ασθενή.
- Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 5μl όπου περιλαμβάνονται 2.5μl διαλύματος αντίδρασης, 0.25μl ειδικού ανιχνευτή και 2.25μl δείγματος αραιωμένου cDNA (τελικός όγκος αντίδρασης 5μl).

Τέλος, η πλάκα καλύπτεται με διαφανή μεμβράνη (MicroAmp Optical Adhesive film) και φυγοκεντρείται στις 1200rpm, σε ψυχόμενη φυγόκεντρο σταθερής θερμοκρασίας (4°C), για 2 λεπτά. Ακολούθως, τοποθετείται στο μηχάνημα ViiA 7 Duo Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) για την πραγματοποίηση της PCR.

Στη διαδικασία της RT-qPCR, ως αρνητικός μάρτυρας για κάθε ειδικό ανιχνευτή, χρησιμοποιήθηκε ένα δείγμα αντίδρασης που περιείχε το διάλυμα αντίδρασης και τον ειδικό ανιχνευτή, εκτός από δείγμα cDNA, το οποίο είχε αντικατασταθεί από υψηλής καθαρότητας νερό (DEPC-treated water). Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία της RT-qPCR, καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης αναφέρονται στον Πίνακα 6 και 7.

Η παραπάνω διαδικασία ήταν κοινή και για να δείγματα πλάσματος και για τα δείγματα των μονοπύρηνων κυττάρων.



Εικόνα 22: Πλάκα Αντίδρασης Μικροπιλοδότησης 384-βοθρίων.

(MicroAmp Optical 384-Well Reaction Plate with Barcode, Applied Biosystems)

Πίνακας 6: Αντιδραστήρια Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου.

(real time qPCR, RT-qPCR)

Αντιδραστήρια RT-qPCR	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση	μl/αντίδραση δείγματος cDNA
Διάλυμα αντίδρασης (Universal PCR Master Mix)	2x	1x	2.50
Ειδικός ανιχνευτής (TaqMan microRNA Assay)	20x	1x	0.25
cDNA εκμαγείο (cDNA template)	-	-	2.25
Τελικός Όγκος	-	-	5

Πίνακας 7: Πρόγραμμα ενίσχυσης DNA σε ViiA 7 Real-Time PCR System.

Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος Επώασης (min)	Στάδιο	
95	10	Ενεργοποίηση του ενζύμου] Επανάληψη για 40 κύκλους
95	0.4	Αποδιάταξη του DNA	
60	1	Υβριδοποίηση των ανιχνευτών/DNA- Επιμήκυνση αλυσίδας	
4	∞	Συντήρηση	

2.7 Ποσοτικός Προσδιορισμός της Έκφρασης των Υπό Μελέτη miRNAs

Η RT-qPCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων με δύο (2) τρόπους:

1. Απόλυτη Ποσοτικοποίηση (absolute quantification): μετράται ο ακριβής αριθμός των μορίων DNA-στόχων, με τη χρήση καμπύλης βαθμονόμησης (calibration curve).
2. Σχετική Ποσοτικοποίηση (relative quantification): βασίζεται σε ενδογενή γονίδια αναφοράς (endogenous reference gene/ house-keeping gene) για τον προσδιορισμό των διαφορών της έκφρασης των γονιδίων-στόχων.

Η ποσοτικοποίηση των σχετικών αλλαγών στη γονιδιακή έκφραση χρησιμοποιώντας την RT-qPCR απαιτεί ορισμένες εξισώσεις, υποθέσεις και τον έλεγχο των υποθέσεων αυτών για την κατάλληλη ανάλυση των δεδομένων. Η μέθοδος $2^{-\Delta\Delta Ct}$ μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των σχετικών αλλαγών από ποσοτικά πειράματα RT-qPCR [481]. Τα πιο σημαντικά βήματα σ' αυτού του τύπου την ανάλυση είναι:

1. Η επιλογή ενός κατάλληλου ενδογενούς γονιδίου αναφοράς.
2. Επιβεβαίωση ότι η έκφραση του ενδογενούς γονιδίου αναφοράς δεν επηρεάζεται από την πειραματική διαδικασία.
3. Τα δείγματα της PCR να προέρχονται από αραιώσεις RNA ή cDNA, και για τα γονίδια-στόχους και για το γονίδιο αναφοράς, προκειμένου να διασφαλίζεται η αποτελεσματικότητα της μεθόδου.

Η ομαλοποίηση/ κανονικοποίηση (normalization) των δειγμάτων σε σχέση με ένα ενδογενές γονίδιο αναφοράς αποτελεί μια μέθοδο “διόρθωσης” των αποτελεσμάτων όταν οι ποσότητες του προστιθέμενου RNA (RNA input) είναι διαφορετικές. Η μέθοδος αυτή είναι χρήσιμη όταν η μέτρηση του προστιθέμενου RNA δεν είναι πρακτική, όπως είναι οι περιπτώσεις που οι διαθέσιμες ποσότητες RNA είναι περιορισμένες. Η μέθοδος $2^{-\Delta\Delta Ct}$

χρησιμοποιεί δεδομένα που παράγονται ως αποτέλεσμα της RT-qPCR, με σκοπό την εκτέλεση της συνάρτησης ομαλοποίησης/ κανονικοποίησης [481].

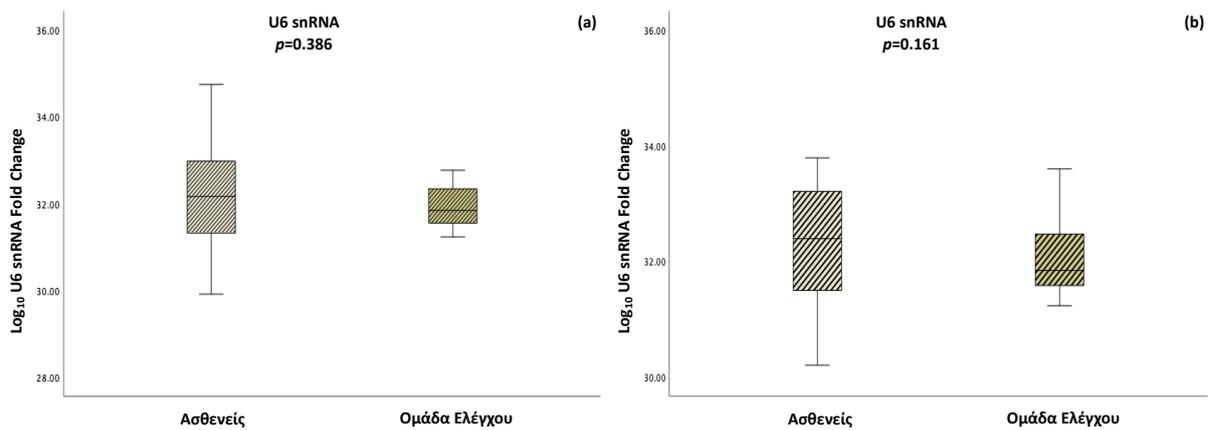
Γονίδια Αναφοράς (Reference Genes)

Υπάρχουν διάφορες προκλήσεις όταν κυκλοφορούντα miRNAs μελετώνται ως βιοδείκτες. Δεδομένου ότι η συγκέντρωση των miRNAs είναι μικρή στον ορό και το πλάσμα, η ποσοτικοποίηση τους προϋποθέτει μεθόδους υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας, όπως είναι η RT-qPCR, βασισμένη στην τεχνολογία της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription).

Ο σκοπός της κανονικοποίησης των δειγμάτων είναι η μείωση της αναλυτικής μεταβλητότητας (analytical variability) προκειμένου να επιτευχθεί ένα πιο αξιόπιστο αποτέλεσμα. Συνεπώς είναι απαραίτητη η επιλογή κατάλληλων δεικτών ομαλοποίησης/ κανονικοποίησης (normalizers) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης των miRNAs, ειδικά όταν εφαρμόζονται σε κλινικές μελέτες [482, 483].

Αναφορικά με τις διαδικασίες που σχετίζονται με την απομόνωση του RNA και την αντίστροφη μεταγραφή, από τις πιο κοινές μεθόδους ομαλοποίησης/ κανονικοποίησης είναι η προσθήκη στο δείγμα γνωστής συγκέντρωσης εξωγενών (exogenous) συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων [484]. Στην παρούσα διατριβή, ως εξωγενής δείκτης αναφοράς για τον έλεγχο της διαδικασίας της απομόνωσης του RNA επιλέχθηκε και προστέθηκε σε γνωστή συγκέντρωση (25fmol) σε κάθε δείγμα το συνθετικό miRNA cel-miR-39, που προέρχεται από τον οργανισμό *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Το μόριο αυτό δεν εμφανίζει ομόλογες αλληλουχίες με τα ανθρώπινα miRNAs, άρα είναι αδύνατο οι ειδικοί ανιχνευτές των μορίων miRNA-στόχων να υβριδοποιηθούν με αυτό.

Σχετικά με την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των miRNAs είναι αναγκαία η χρήση ενός ενδογενούς (endogenous) γονιδίου αναφοράς. Στην παρούσα διατριβή, ως γονίδιο αναφοράς επιλέχθηκε το U6 snRNA, διότι παρουσίασε σταθερή έκφραση σε όλα τα δείγματα ασθενών και στα δείγματα της ομάδας ελέγχου. Το U6 snRNA (RNU6-1), είναι ένα μικρό πυρηνικό RNA, εξαιρετικά διατηρημένο μεταξύ των ειδών, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως ως ενδογενές γονίδιο αναφοράς στη μελέτη των miRNAs [485, 486]. Στην εικόνα που ακολουθεί απεικονίζεται η συσχέτιση της έκφρασης του U6 snRNA μεταξύ των ασθενών και της ομάδας ελέγχου που συμπεριελήφθησαν σε αυτή τη μελέτη (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Συσχέτιση της έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου αναφοράς U6 snRNA (RNU6-1) μεταξύ των ασθενών και της ομάδας ελέγχου.

Ασθενείς με προχωρημένο ή μεταστατικό ΜΜΚΠ, που έλαβαν Χημειοθεραπεία με βάση πλατινούχα σύμπλοκα, ως θεραπεία πρώτης γραμμής, το χρονικό διάστημα 2009-2017 (α).

Ασθενείς με προχωρημένο ή μεταστατικό ΜΜΚΠ, που έλαβαν Ανοσοθεραπεία, ως θεραπεία δεύτερης γραμμής, το χρονικό διάστημα 2017-2021 (β).

Επεξεργασία Δεδομένων-Υπολογιστική Προσέγγιση

Οι τιμές των κύκλων ποσοτικοποίησης (Ct) αποκτήθηκαν με βάση το πρόγραμμα ViiA 7 software, όπως προέκυψαν από τις μετρήσεις. Ως κύκλος ποσοτικοποίησης ορίζεται ο κύκλος της αντίδρασης PCR κατά τον οποίο ο φθορισμός που παράγεται αντιστοιχεί στο παραγόμενο προϊόν και διακρίνεται από το σήμα υποβάθρου (background).

Για τη σχετική ποσοτικοποίηση των miRNAs ακολουθήθηκε η προσέγγιση $2^{-\Delta\Delta Ct}$, όπως περιγράφεται από τους Livak and Schmittgen [481]. Ως ΔCt ορίζεται η διαφορά μεταξύ των τιμών των κύκλων ποσοτικοποίησης (Ct) του miRNA-στόχου και του ενδογενούς γονιδίου αναφοράς (U6 snRNA, RNU6-1) του κάθε δείγματος, το οποίο εφαρμόστηκε σε όλα τα δείγματα ασθενών και στα δείγματα της ομάδας ελέγχου.

$$\Delta Ct = Ct_{miRNA-στόχος} - Ct_{U6 sn RNA}$$

Για κάθε miRNA-στόχο, η τιμή $\Delta\Delta Ct$ προσδιορίστηκε ως η διαφορά μεταξύ των τιμών ΔCt του κάθε δείγματος και της μέσης τιμής (average) των ΔCt (aver ΔCt) του συνόλου των δειγμάτων της ομάδας ελέγχου.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{miRNA-στόχος (δείγμα)} - aver\Delta Ct_{miRNA-στόχος (ομάδα ελέγχου)}$$

2.8 Εκτίμηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία

Η αξιολόγηση της ανταπόκρισης των ασθενών στη θεραπεία έγινε με βάση τα κριτήρια αξιολόγησης της απόκρισης σε συμπαγείς όγκους (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST, 1.1 criteria) [487] και τις διαθέσιμες αξονικές (computed tomography, CT) και μαγνητικές (magnetic resonance imaging, MRI) τομογραφίες από το φάκελο νοσηλείας του κάθε ασθενή. Με βάση την ανταπόκριση στη θεραπεία, οι ασθενείς χαρακτηρίστηκαν με μερική απόκριση (partial response, PR), σταθερή νόσο (stable disease, SD) και πρόοδο νόσου (progressive disease, PD). Ως αντικειμενική ανταπόκριση στη θεραπεία (Objective response rate, ORR) ορίστηκε το σύνολο των ασθενών που παρουσίασαν μερική απόκριση (PR), ως βέλτιστη απόκριση στη χορηγούμενη θεραπεία. Ως ελεγχόμενη πορεία νόσου (disease control rate, DCR) ορίστηκε το σύνολο των ασθενών που παρουσίασαν είτε μερική απόκριση (PR), είτε σταθερή νόσο (SD), ως βέλτιστη απόκριση στη χορηγούμενη θεραπεία. Τέλος, ως παρατεταμένη ελεγχόμενη νόσος (prolonged duration of disease control, PDDC) ορίστηκε το σύνολο των ασθενών που παρουσίασαν είτε μερική απόκριση (PR), είτε σταθερή νόσο (SD) για διάστημα μεγαλύτερο των 6 μηνών, ως βέλτιστη απόκριση στη χορηγούμενη θεραπεία.

2.9 Ανάλυση μέσω του Στατιστικού Πακέτου SPSS

Η συσχέτιση της έκφρασης των miRNAs με τις κλινικές παραμέτρους πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 28.0 (statistical package of the social sciences, SPSS Inc. Chicago IL, USA). Για κάθε ασθενή προσδιορίστηκε μία τιμή έκφρασης για κάθε miRNA σε σχέση με την αντίστοιχη έκφραση του γονιδίου αναφοράς (U6 snRNA) με βάση το λόγο $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η διάμεση τιμή έκφρασης για κάθε miRNA βάση της οποίας οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε υψηλής και χαμηλής έκφρασης. Πιο συγκεκριμένα, τιμές έκφρασης μεγαλύτερες ή ίσες της διάμεσης τιμής για κάθε miRNA χαρακτηρίστηκαν ως υψηλής έκφρασης, ενώ τιμές μικρότερες της διάμεσης τιμής για κάθε miRNA χαρακτηρίστηκαν ως χαμηλής έκφρασης, αντιστοίχως.

Η στατιστική ανάλυση εφαρμόστηκε στο σύνολο των ασθενών, καθώς και ξεχωριστά για κάθε ιστολογικό υπότυπο. Το διάστημα ελεύθερο υποτροπής (Progression Free Survival, PFS) και η ολική επιβίωση (Overall Survival, OS) υπολογίστηκαν από την έναρξη της θεραπείας μέχρι την πρώτη καταγεγραμμένη πρόοδο νόσου και τον θάνατο ή την τελευταία καταγραφή στο φάκελο νοσηλείας, αντίστοιχα. Η στατιστική σημασία ορίστηκε στο $p<0.05$ (δοκιμή διπλής όψης, two-sided test).

Η διατριβή αυτή έχει γραφτεί με βάση τα Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK criteria) [488].

Οι στατιστικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν καθώς και οι αντίστοιχες δοκιμές (test) είναι οι εξής:

- ⇒ Ανάλυση της διαφορικής έκφρασης των miRNAs-στόχων στα δείγματα των ασθενών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου: Mann-Whitney U τεστ
- ⇒ Συσχέτιση των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών με την έκφραση των miRNAs-στόχων: χ^2 (chi-square) τεστ
- ⇒ Συσχέτιση του κινδύνου ανάπτυξης προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία των ασθενών με προγνωστικές μεταβλητές (κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών και έκφραση των miRNAs-στόχων). Έγινε επίσης ανάδειξη της πιθανότητας κινδύνου (odds ratio-OR) και του διαστήματος εμπιστοσύνης 95% (95% Confidence Intervals, CI) για κάθε παράμετρο που εξετάστηκε: Διαδική Λογιστική Παλινδρόμηση (Binary Logistic Regression)
- ⇒ Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (Progression Free Survival, PFS) και της ολικής επιβίωσης (Overall Survival, OS) με την έκφραση των miRNAs-στόχων. Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των καμπυλών διεξήχθη με την εφαρμογή του log rank test: Ανάλυση Επιβίωσης (Kaplan-Meier)
- ⇒ Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (Progression Free Survival, PFS) και της ολικής επιβίωσης (Overall Survival, OS) με προγνωστικές μεταβλητές (κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών και έκφραση των miRNAs-στόχων). Έγινε επίσης ανάδειξη της αναλογίας κινδύνου (hazard ratio-HR) και του διαστήματος εμπιστοσύνης 95% (95% Confidence Intervals, CI) για κάθε παράμετρο που εξετάστηκε: Μοντέλα Αναλογικής Παλινδρόμησης Κινδύνου Cox (Cox Proportional Hazard Regression Models)
- ⇒ Συσχέτιση της έκφρασης των miRNAs-στόχων σε αντιστοιχισμένα δείγματα πλάσματος και μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος των ασθενών: Δοκιμασία Κατάταξης Wilcoxon (Wilcoxon Signed Rank Test)

Κεφάλαιο III

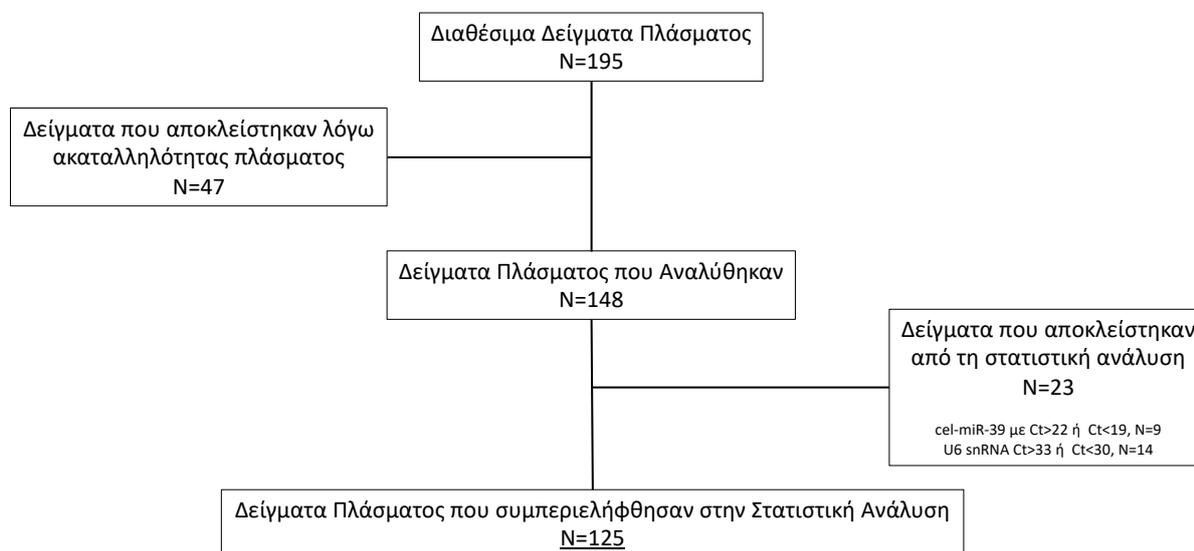
Αποτελέσματα

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ο ρόλος των κυκλοφορούντων miRNAs σε ασθενείς με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα

Στο κεφάλαιο αυτό μελετήθηκε η έκφραση των κυκλοφορούντων miRNAs στο πλάσμα ασθενών με προχωρημένο ή μεταστατικό ΜΜΚΠ, οι οποίοι έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα στην Παθολογική-Ογκολογική κλινική του ΠΑΓΝΗ κατά το χρονικό διάστημα 2009-2017 και συσχετίστηκε με την ανταπόκριση στη θεραπεία, το διάστημα ελεύθερο υποτροπής, την ολική επιβίωση και τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Η εύρεση και η επιλογή του δείγματος των ασθενών, καθώς επίσης και τα κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού περιγράφονται στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι» στην παράγραφο 2.2.

Συνολικά, στη μελέτη αυτή αναλύθηκαν 125 ασθενείς με ΜΜΚΠ, εκ των οποίων 17 ήταν γυναίκες (13.6%) και 108 άνδρες (86.4%). Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών ήταν τα 65 έτη (εύρος: 37-88), το 96.0% των ασθενών τη στιγμή της διάγνωσης βρίσκονταν ήδη σε μεταστατικό στάδιο και τέλος, το 61.6% των ασθενών είχε αδenoκαρκίνωμα ως ιστολογική εκτίμηση. Η ροή της μελέτης που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην Εικόνα 24 και τα χαρακτηριστικά των ασθενών συνοψίζονται στον Πίνακα 8.



Εικόνα 24: Σχηματική απεικόνιση της ροής της μελέτης της έκφρασης των κυκλοφορούντων miRNAs στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.

(N=αριθμός δείγματος, Ct=Cycle threshold, κατώφλι θετικότητας, cel-miR-39= εξωγενές γονίδιο αναφοράς, U6 snRNA= ενδογενές γονίδιο αναφοράς)

Πίνακας 8: Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με προχωρημένο ή μεταστατικό ΜΜΚΠ (N=125), που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.

Κλινικά Χαρακτηριστικά		Σύνολο Ασθενών		Αδενοκαρκίνωμα		Πλακώδες Καρκίνωμα		Άλλο		p value
		N	%	N	%	N	%	N	%	
Αριθμός Ασθενών		125	100	77	61.6	40	32.0	8	6.4	
Φύλο	Άρρεν	108	86.4	61	79.2	40	100	7	87.5	0.008 ^a
	Θήλυ	17	13.6	16	20.8	0	0	1	12.5	
Ηλικία	(έτη)	65 (37-88)		64 (37-82)		66.5 (46-88)		62.5 (59-76)		0.637 ^a
Λειτουργική Κατάσταση (ECOG PS)	0	31	24.8	18	23.4	11	27.5	2	25.0	0.271 ^a
	1	77	61.6	51	66.2	22	55.0	4	50.0	
	2	13	10.4	5	6.5	7	17.5	1	12.5	
	3	4	3.2	3	3.9	0	0	1	12.5	
Στάδιο Νόσου (Διάγνωση)	I	1	0.8	0	0	1	2.5	0	0	0.086 ^a
	II	3	2.4	0	0	0	0	0	0	
	III	1	0.8	0	0	4	10.0	0	0	
	IV	120	96.0	77	100	35	87.5	8	100	
Ιστολογική Ταξινόμηση	Αδενοκαρκίνωμα	77	61.6							ns ^a
	Πλακώδες Καρκίνωμα	40	32.0							
	Άλλο	8	6.4							
Χημειοθεραπευτικό Σχήμα	CDDP/PEM	44	35.2	43	55.8	1	2.5	0	0	<0.001 ^a
	CDDP/GEM	33	26.4	10	13.0	20	50.0	3	37.5	
	CDDP/TXT	46	36.8	24	31.2	19	47.5	3	37.5	
	Άλλο	2	1.6	0	0	0	0	2	25.0	
Αριθμός Μεταστατικών Εστιών	0	15	12.0	9	11.7	6	15.0	0	0	0.349 ^a
	1	50	40.0	27	35.1	21	52.5	2	25.0	
	2	33	26.4	21	27.3	2	22.5	3	37.5	
	≥3	27	21.6	20	25.9	4	10.0	3	37.5	
Ανταπόκριση στη θεραπεία	Μερική Ανταπόκριση (PR)	33	26.4	17	22.1	13	32.5	3	37.5	0.715 ^a
	Σταθερή Νόσος (SD)	49	39.2	32	41.6	14	35.0	3	37.5	
	Πρόοδος Νόσου (PD)	43	34.4	28	36.3	13	32.5	2	25.0	

ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; CDDP, cis-diamminedichloridoplatinum; PEM, pemetrexed; GEM, gemcitabine; TXT, taxotere; PR, partial response; SD, stable disease; PD, progressive disease; ns, non-significant; ^aPearson's chi-squared test. Η ανταπόκριση στη θεραπεία εκτιμήθηκε με βάση τα «Response Evaluation Criteria in Solid Tumors» (RECIST 1.1 criteria) [487]; Ο αριθμός των μεταστατικών εστιών αφορά στα όργανα που έχουν προσβληθεί.

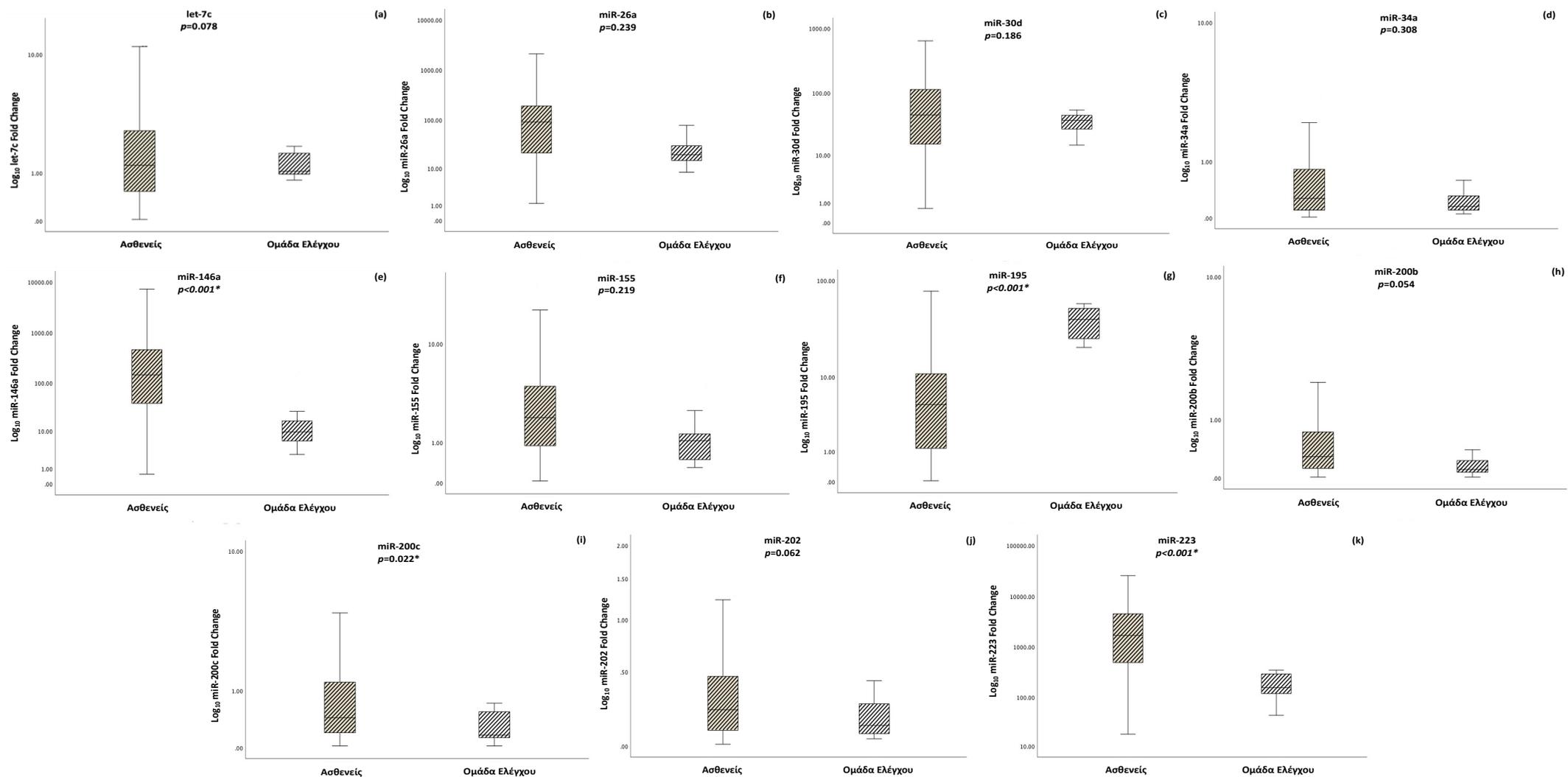
3.1.1 Ανάλυση της διαφορικής έκφρασης των miRNAs-στόχων στα δείγματα των ασθενών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου

Ο έλεγχος της διαφοροποίησης της έκφρασης των miRNAs-στόχων μεταξύ των δειγμάτων των ασθενών σε σχέση με τα δείγματα της ομάδας ελέγχου, πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμή Mann-Whitney U τεστ. Από την ανάλυση προέκυψε ότι στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση μεταξύ των δύο ομάδων παρουσίασε το miR-146a, το miR-195, το miR-200c και το miR-223. Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση των miR-146a ($p<0.001$), miR-200c ($p=0.022$) και miR-223 ($p<0.001$) ήταν υψηλότερη στα δείγματα των ασθενών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ αντίθετα η έκφραση του miR-195 ($p<0.001$) ήταν χαμηλότερη στα δείγματα των ασθενών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Για τα υπόλοιπα miRNA-στόχους (let-7c, miR-26a, miR-30d, miR-34a, miR-155, miR-200b και miR-202) δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην έκφραση μεταξύ της ομάδας των ασθενών και της ομάδας ελέγχου. Η μέση τιμή έκφρασης για το κάθε miRNA-στόχο, καθώς και η σχετική έκφραση για τα δείγματα των ασθενών και της ομάδας ελέγχου καταγράφονται στον Πίνακα 9. Στην Εικόνα 25 συγκεντρώνονται τα παραπάνω αποτελέσματα υπό μορφή διαγραμμάτων box plot.

Πίνακας 9: Μέση τιμή έκφρασης (Ct), τυπική απόκλιση (SD*) και σχετική έκφραση για κάθε miRNA-στόχο στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ (N=125), που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα, και της ομάδας ελέγχου (N=33).

	Ασθενείς με ΜΜΚΠ (N=125)			Ομάδα Ελέγχου (N=33)	
	Ct	SD*	Σχετική Έκφραση	Ct	SD*
let-7c	32.65	± 2.37	0.65	31.56	± 1.27
miR-26a	26.80	± 3.41	1.61	27.75	± 0.84
miR-30d	27.59	± 2.21	0.70	26.83	± 1.07
miR-34a	33.48	± 1.82	1.20	34.55	± 1.15
miR-146a	25.41	± 2.79	5.86	28.50	± 0.99
miR-155	31.29	± 1.87	1.31	32.02	± 0.77
miR-195	31.15	± 3.39	0.06	26.84	± 1.72
miR-200b	33.59	± 2.26	1.64	34.76	± 1.47
miR-200c	33.36	± 2.25	1.84	34.26	± 1.12
miR-202	34.30	± 1.65	1.56	34.39	± 1.55
miR-223	21.82	± 2.69	6.52	24.61	± 1.23

Ct, cycle threshold; SD*, standard deviation; η σχετική ποσοτικοποίηση για το κάθε miRNA-στόχο υπολογίστηκε με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Ct}$.



Εικόνα 25: Διαφορική έκφραση των *let-7c* (a), *miR-26a* (b), *miR-30d* (c), *miR-34a* (d), *miR-146a* (e), *miR-155* (f), *miR-195* (g), *miR-200b* (h), *miR-200c* (i), *miR-202* (j) και *miR-223* (k), μεταξύ των ασθενών με ΜΜΚΠ (N=125), που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα, και της ομάδας ελέγχου (N=33).

Η οριζόντια γραμμή απεικονίζει τη διάμεσο, ενώ το μήκος των πλαισίων είναι το διατεταρτημόριο που αντιπροσωπεύει τιμές μεταξύ του 75^{ου} και του 25^{ου} εκατοστημόριου των μεμονωμένων τιμών έκφρασης αλλαγής πτυχής. Οι σχετικές τιμές έκφρασης στον άξονα y απεικονίζονται σε κλίμακα log₁₀. Τα επίπεδα έκφρασης υπολογίστηκαν με τη μέθοδο 2^{-ΔCt}.

3.1.2 Συσχέτιση των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών με την έκφραση των miRNAs-στόχων

Όπως αναλύθηκε στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι» στην παράγραφο 2.8, οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την έκφραση των μορίων που μελετήθηκαν σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Πιο συγκεκριμένα, τιμές έκφρασης μεγαλύτερες ή ίσες της διάμεσης για κάθε miRNA χαρακτηρίστηκαν ως υψηλής έκφρασης, ενώ τιμές μικρότερες της διάμεσης για κάθε miRNA χαρακτηρίστηκαν ως χαμηλής έκφρασης, αντιστοίχως. Ο έλεγχος της συσχέτισης των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών με την έκφραση των miRNAs-στόχων πραγματοποιήθηκε στο σύνολο των ασθενών, καθώς και στους δύο βασικούς ιστολογικούς υποτύπους του ΜΜΚΠ, δηλαδή για τους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και για τους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα. Η στατιστική σημασία ορίστηκε στο $p < 0.05$ (δοκιμή διπλής όψης, two-sided test).

Οι παράμετροι οι οποίοι ελέγχθηκαν ήταν η ηλικία (>60 vs. <60), το φύλο (άρρεν vs. θήλυ), η λειτουργική κατάσταση (PS, 0-1 vs. ≥ 2), το στάδιο νόσου (I-III vs. IV), ο ιστολογικός υπότυπος (αδενοκαρκίνωμα vs. πλακώδες καρκίνωμα), ο αριθμός των μεταστατικών εστιών (0-2 vs. ≥ 3), η παρουσία εγκεφαλικών μεταστάσεων (ναι vs. όχι), η παρουσία ηπατικών μεταστάσεων (ναι vs. όχι), η παρουσία οστικών μεταστάσεων (ναι vs. όχι), η αντικειμενική ανταπόκριση στη θεραπεία (ORR, PR vs. SD/PD), η ελεγχόμενη πορεία νόσου (DCR, PR/SD vs. PD) και η παρατεταμένη ελεγχόμενη νόσος (PDDC, PR/SD > 6 μήνες vs. SD < 6 μήνες/PD).

Από την ανάλυση προέκυψε ότι όλα τα προαναφερθέντα κλινικά χαρακτηριστικά παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις με την έκφραση των miRNAs-στόχων, εκτός από το φύλο, το στάδιο νόσου και την παρουσία ηπατικών μεταστάσεων. Λόγω πολύ μεγάλου όγκου πληροφοριών, απεικονίζονται μόνο οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις.

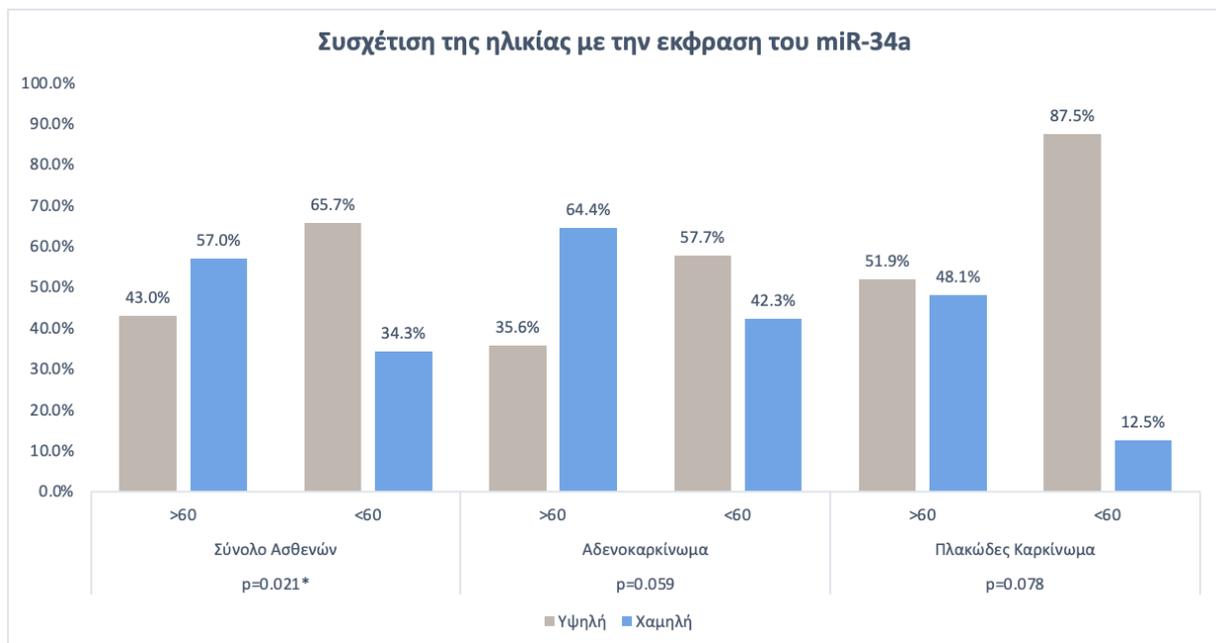
- Συσχέτιση της ηλικίας με την έκφραση των miRNAs-στόχων

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την ηλικία τους σε 2 επιμέρους ομάδες (>60 vs. <60) και ελέγχθηκε η συσχέτιση με την έκφραση των miRNAs-στόχων (υψηλή vs. χαμηλή), αρχικά στο σύνολο των ασθενών (N=125) και κατόπιν στους 2 βασικούς ιστολογικούς υπότυπους (αδενοκαρκίνωμα, N=77 και πλακώδες καρκίνωμα, N=40).

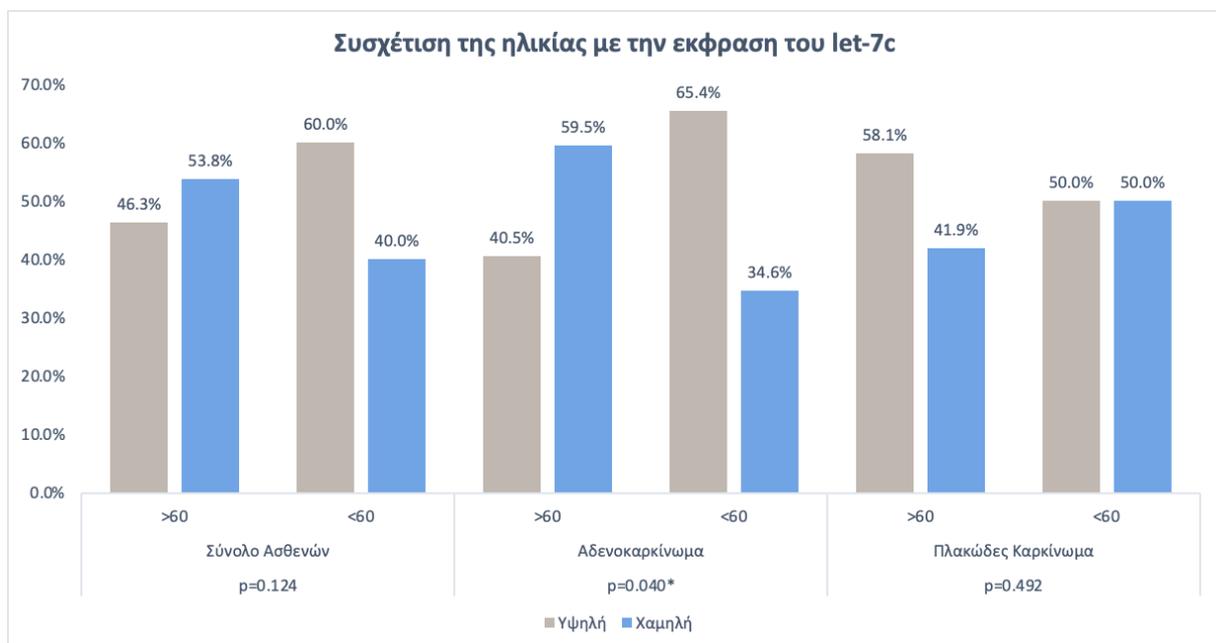
Από την ανάλυση προέκυψε ότι στο σύνολο των ασθενών (N=125), χαμηλή έκφραση του miR-34a παρουσίασε το 57.0% των ασθενών >60 ετών, ενώ υψηλή έκφραση του miR-34a παρουσίασε το 65.7% των ασθενών <60 ετών ($p=0.021$, Εικόνα 26).

Στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα (N=77) ως ιστολογική εκτίμηση, χαμηλή έκφραση του let-7c παρουσίασε το 59.5% των ασθενών >60 ετών, ενώ υψηλή έκφραση του let-7c παρουσίασε το 65.4% των ασθενών <60 ετών ($p=0.040$, Εικόνα 27). Επιπλέον, χαμηλή έκφραση του miR-146a παρουσίασε το 66.7% των ασθενών >60 ετών, ενώ υψηλή έκφραση του miR-146a παρουσίασε το 58.6% των ασθενών <60 ετών ($p=0.027$, Εικόνα 28). Τέλος, χαμηλή έκφραση του miR-200b παρουσίασε το 58.1% των ασθενών >60 ετών, ενώ υψηλή έκφραση του miR-200b παρουσίασε το 65.4% των ασθενών <60 ετών ($p=0.049$, Εικόνα 29).

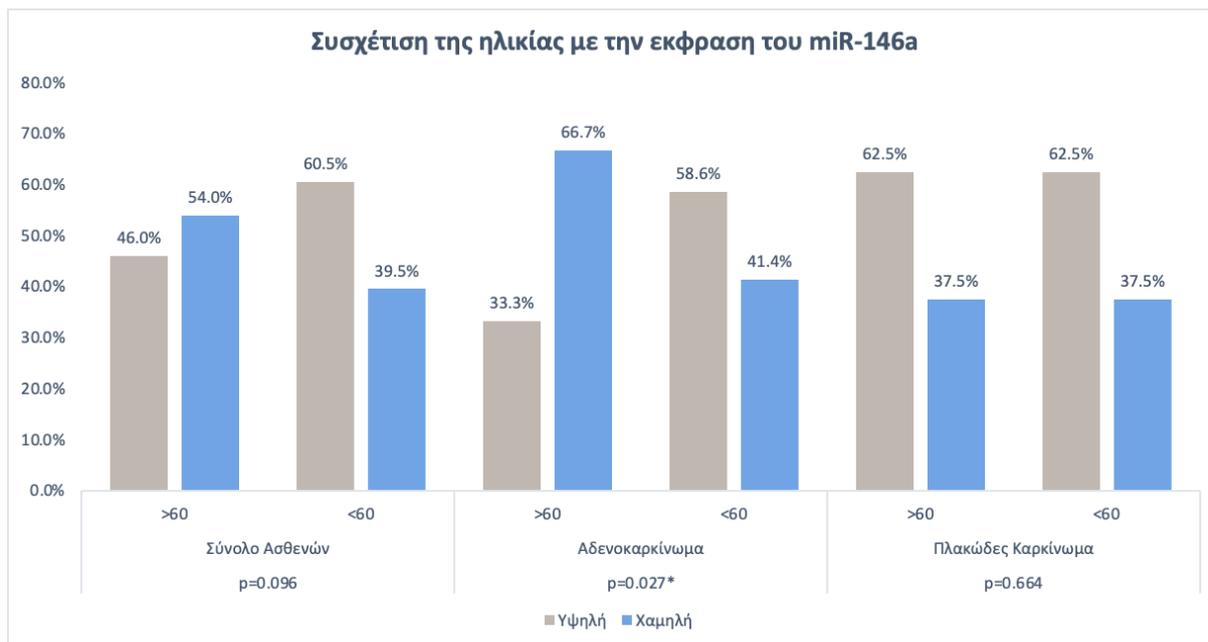
Δεν παρατηρήθηκαν άλλες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις της ηλικίας με την έκφραση των miRNAs-στόχων.



Εικόνα 26: Συσχέτιση της ηλικίας των ασθενών με την έκφραση του miR-34a, στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα. Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.

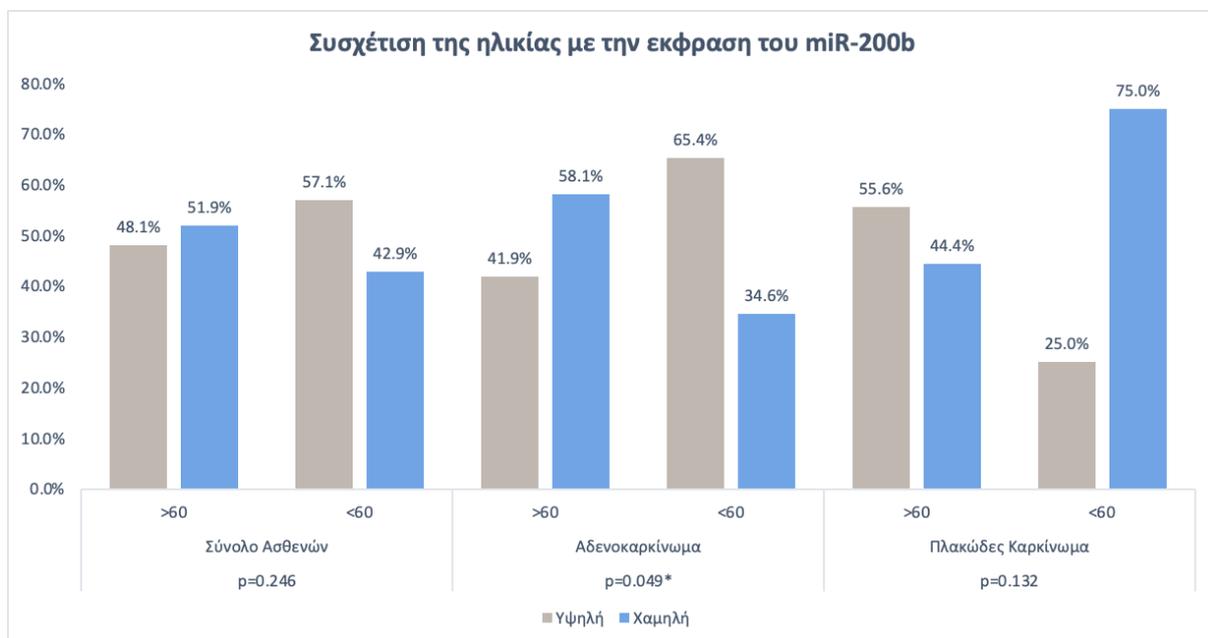


Εικόνα 27: Συσχέτιση της ηλικίας των ασθενών με την έκφραση του let-7c, στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα. Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.



Εικόνα 28: Συσχέτιση της ηλικίας των ασθενών με την έκφραση του miR-146a, στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.



Εικόνα 29: Συσχέτιση της ηλικίας των ασθενών με την έκφραση του miR-200b, στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.

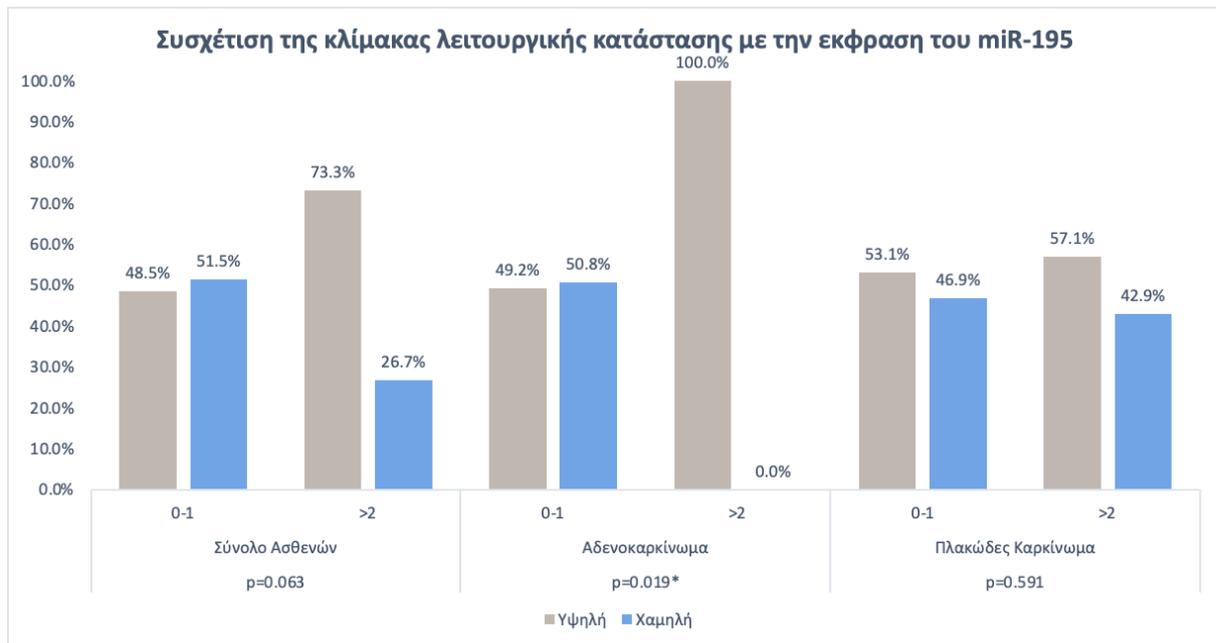
- Συσχέτιση της κλίμακας λειτουργικής κατάστασης με την έκφραση των miRNAs-στόχων

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την κλίμακα λειτουργικής κατάστασης σε 2 επιμέρους ομάδες (0-1 vs. ≥ 2) και ελέγχθηκε η συσχέτιση με την έκφραση των miRNAs-στόχων (υψηλή vs. χαμηλή), αρχικά στο σύνολο του πληθυσμού (N=125) και κατόπιν στους 2 βασικούς ιστολογικούς υπότυπους (αδενοκαρκίνωμα, N=77 και πλακώδες καρκίνωμα, N=40).

Από την ανάλυση προέκυψε ότι στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα (N=77) ως ιστολογική εκτίμηση, χαμηλή έκφραση του miR-195 παρουσίασε το 50.8% των ασθενών με PS:0-1, ενώ υψηλή έκφραση του miR-195 παρουσίασε το 100% των ασθενών με PS ≥ 2 ($p=0.019$, Εικόνα 30).

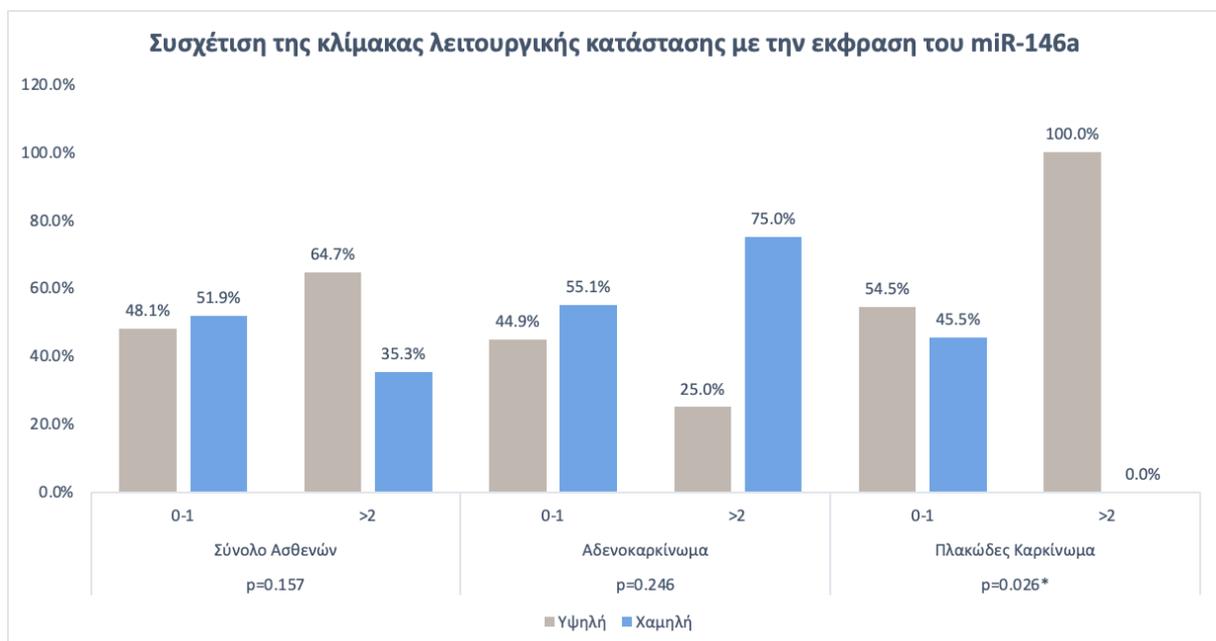
Στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα (N=40) ως ιστολογική εκτίμηση, χαμηλή έκφραση του miR-146a παρουσίασε το 45.5% των ασθενών με PS:0-1, ενώ υψηλή έκφραση του miR-146a παρουσίασε το 100% των ασθενών με PS ≥ 2 ($p=0.026$, Εικόνα 31).

Δεν παρατηρήθηκαν άλλες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις της κλίμακας λειτουργικής κατάστασης με την έκφραση των miRNAs-στόχων.



Εικόνα 30: Συσχέτιση της κλίμακας λειτουργικής κατάστασης των ασθενών με την έκφραση του miR-195, στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.



Εικόνα 31: Συσχέτιση της κλίμακας λειτουργικής κατάστασης των ασθενών με την έκφραση του miR-146a, στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

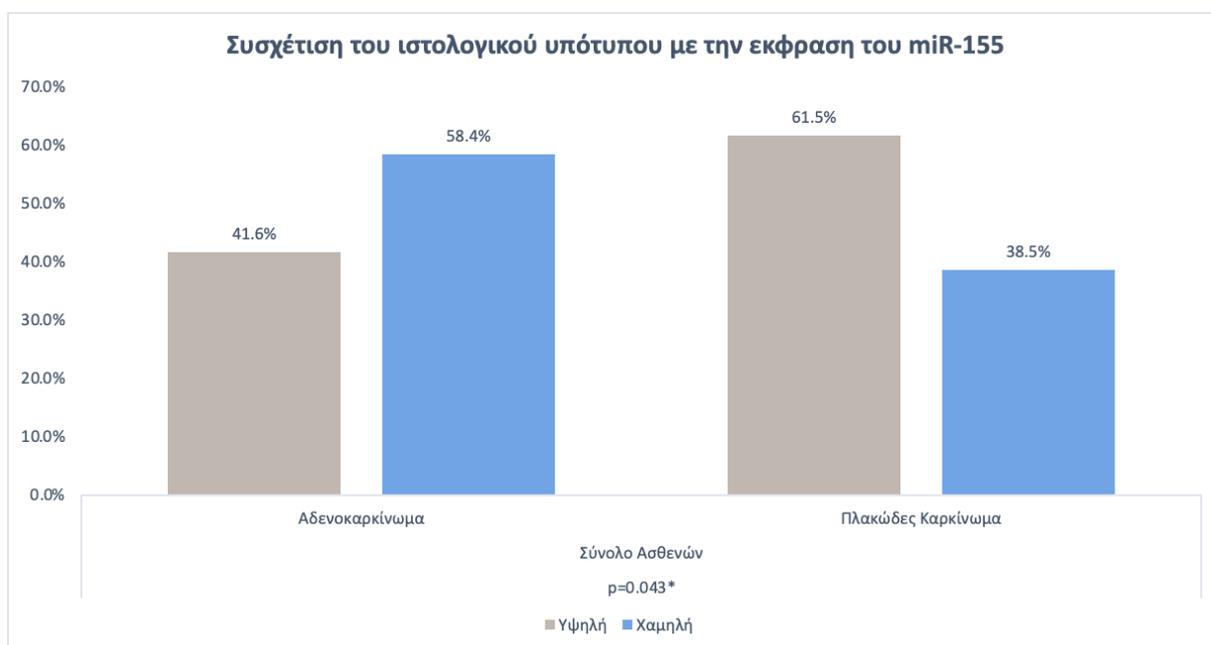
Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.

- Συσχέτιση της ιστολογικής ταξινόμησης με την έκφραση των miRNAs-στόχων

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τον ιστολογικό τους υπότυπο σε 2 επιμέρους ομάδες (αδενοκαρκίνωμα vs. πλακώδες καρκίνωμα) και ελέγχθηκε η συσχέτιση με την έκφραση των miRNAs-στόχων (υψηλή vs. χαμηλή), στο σύνολο του πληθυσμού (N=125).

Από την ανάλυση προέκυψε ότι χαμηλή έκφραση του miR-155 παρουσίασε το 58.4% των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα, ενώ υψηλή έκφραση του miR-155 παρουσίασε το 61.5% των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα ($p=0.043$, Εικόνα 32).

Δεν παρατηρήθηκαν άλλες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις του ιστολογικού υπότυπου με την έκφραση των miRNAs-στόχων.



Εικόνα 32: Συσχέτιση του ιστολογικού υπότυπου των ασθενών με την έκφραση του miR-155 στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

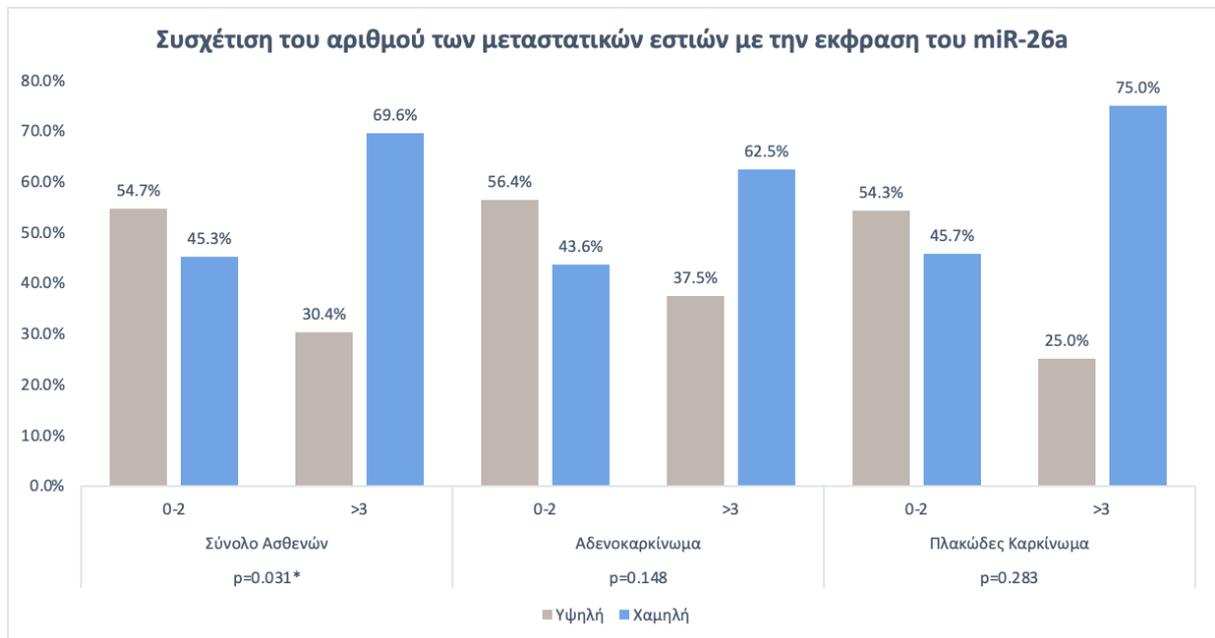
Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.

- Συσχέτιση του αριθμού των μεταστατικών εστιών με την έκφραση των miRNAs-στόχων

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τον αριθμό των μεταστατικών εστιών σε 2 επιμέρους ομάδες (0-2 vs. ≥ 3) και ελέγχθηκε η συσχέτιση με την έκφραση των miRNAs-στόχων (υψηλή vs. χαμηλή), αρχικά στο σύνολο των ασθενών (N=125) και κατόπιν στους 2 βασικούς ιστολογικούς υπότυπους (αδενοκαρκίνωμα, N=77 και πλακώδες καρκίνωμα, N=40).

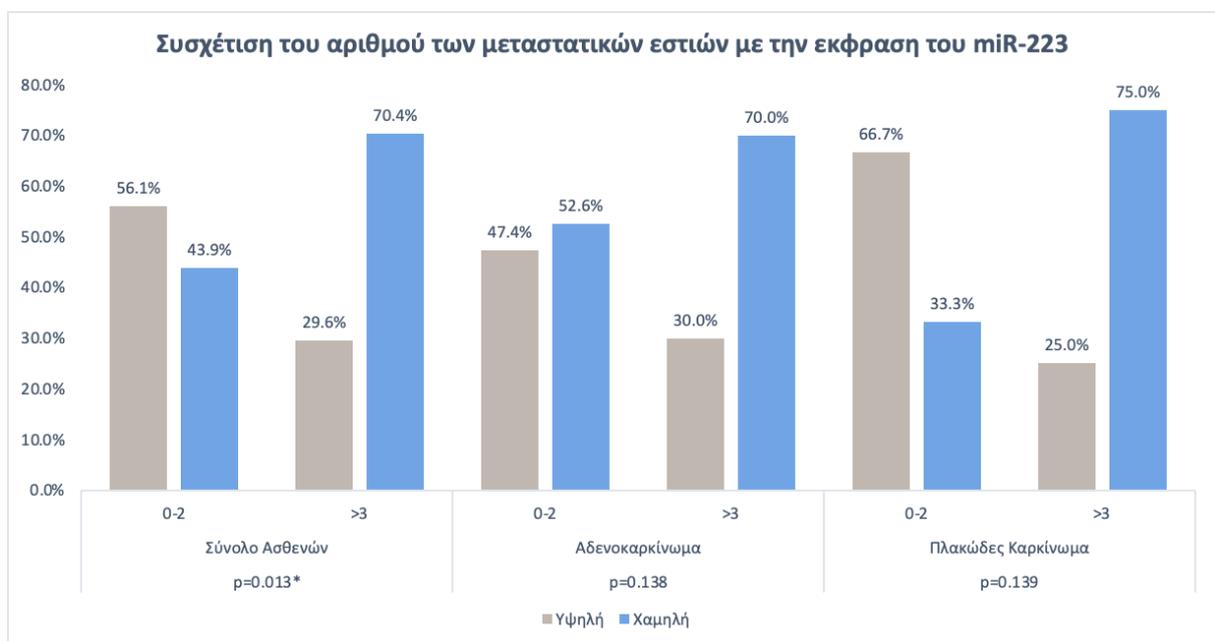
Από την ανάλυση προέκυψε ότι στο σύνολο των ασθενών (N=125), υψηλή έκφραση του miR-26a παρουσίασε το 54.7% των ασθενών με 0-2 μεταστατικές εστίες, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-26a παρουσίασε το 69.6% των ασθενών με ≥ 3 μεταστατικές εστίες ($p=0.031$, Εικόνα 33). Επίσης, υψηλή έκφραση του miR-223 παρουσίασε το 56.1% των ασθενών με 0-2 μεταστατικές εστίες, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-223 παρουσίασε το 70.4% των ασθενών με ≥ 3 μεταστατικές εστίες ($p=0.013$, Εικόνα 34).

Δεν παρατηρήθηκαν άλλες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις του αριθμού των μεταστατικών εστιών με την έκφραση των miRNAs-στόχων.



Εικόνα 33: Συσχέτιση του αριθμού των μεταστατικών εστιών των ασθενών με την έκφραση του miR-26a στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.



Εικόνα 34: Συσχέτιση του αριθμού των μεταστατικών εστιών των ασθενών με την έκφραση του miR-223 στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.

- Συσχέτιση της παρουσίας εγκεφαλικών μεταστάσεων με την έκφραση των miRNAs-στόχων

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την παρουσία εγκεφαλικών μεταστάσεων σε 2 επιμέρους ομάδες (ναι vs. όχι) και ελέγχθηκε η συσχέτιση με την έκφραση των miRNAs-στόχων (υψηλή vs. χαμηλή), αρχικά στο σύνολο των ασθενών (N=125) και κατόπιν στους 2 βασικούς ιστολογικούς υπότυπους (αδενοκαρκίνωμα, N=77 και πλακώδες καρκίνωμα, N=40).

Από την ανάλυση προέκυψε ότι στο σύνολο των ασθενών (N=125), χαμηλή έκφραση του miR-155 παρουσίασε το 82.4% των ασθενών με παρουσία εγκεφαλικών μεταστάσεων, ενώ υψηλή έκφραση του miR-155 παρουσίασε το 55.1% των ασθενών με απουσία εγκεφαλικών μεταστάσεων ($p=0.004$, Εικόνα 35).

Στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα (N=77) ως ιστολογική εκτίμηση, χαμηλή έκφραση του miR-26a παρουσίασε το 71.4% των ασθενών με παρουσία εγκεφαλικών μεταστάσεων, ενώ υψηλή έκφραση του miR-26a παρουσίασε το 57.9% των ασθενών με απουσία εγκεφαλικών μεταστάσεων ($p=0.047$, Εικόνα 36). Επιπρόσθετα, χαμηλή έκφραση του miR-155 παρουσίασε το 85.7% των ασθενών με παρουσία εγκεφαλικών μεταστάσεων, ενώ υψηλή έκφραση του miR-155 παρουσίασε το 47.6% των ασθενών με απουσία εγκεφαλικών μεταστάσεων ($p=0.020$, Εικόνα 35).

Δεν παρατηρήθηκαν άλλες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις της παρουσίας εγκεφαλικών μεταστάσεων με την έκφραση των miRNAs-στόχων.



Εικόνα 35: Συσχέτιση της παρουσίας εγκεφαλικών μεταστάσεων των ασθενών με την έκφραση του miR-155 στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.



Εικόνα 36: Συσχέτιση της παρουσίας εγκεφαλικών μεταστάσεων των ασθενών με την έκφραση του miR-26a στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

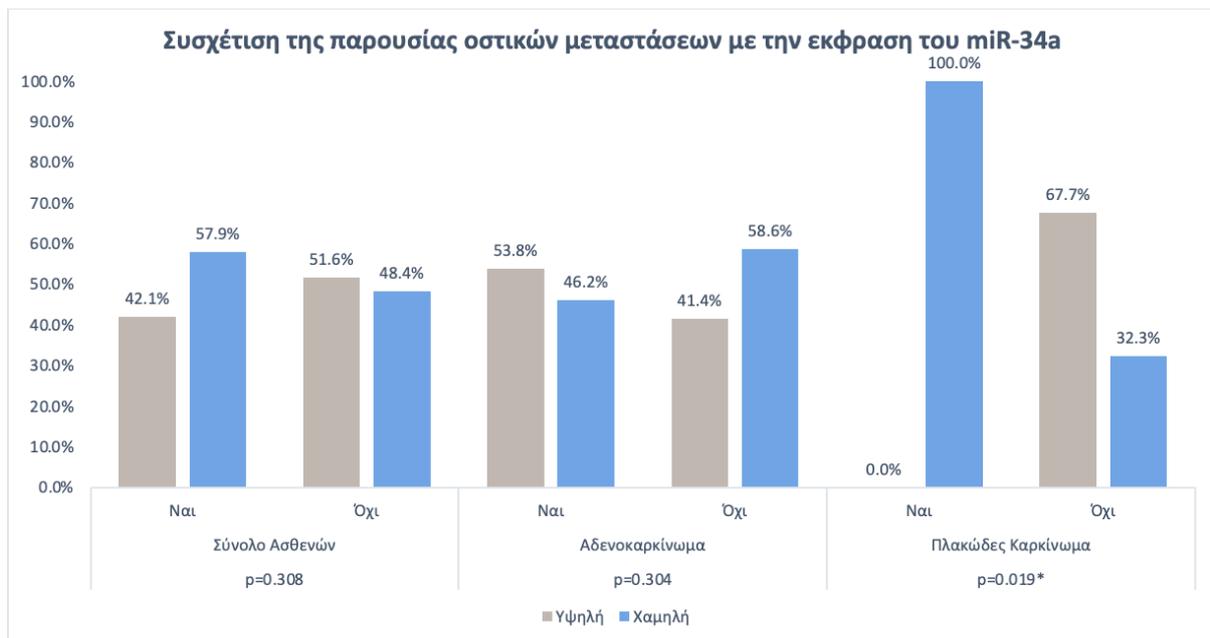
Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.

- Συσχέτιση της παρουσίας οστικών μεταστάσεων με την έκφραση των miRNAs-στόχων

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την παρουσία οστικών μεταστάσεων σε 2 επιμέρους ομάδες (ναι vs. όχι) και ελέγχθηκε η συσχέτιση με την έκφραση των miRNAs-στόχων (υψηλή vs. χαμηλή), αρχικά στο σύνολο των ασθενών (N=125) και κατόπιν στους 2 βασικούς ιστολογικούς υπότυπους (αδενοκαρκίνωμα, N=77 και πλακώδες καρκίνωμα, N=40).

Από την ανάλυση προέκυψε ότι στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα (N=40) ως ιστολογική εκτίμηση, χαμηλή έκφραση του miR-34a παρουσίασε το 100% των ασθενών με παρουσία οστικών μεταστάσεων, ενώ υψηλή έκφραση του miR-34a παρουσίασε το 67.7% των ασθενών με απουσία οστικών μεταστάσεων ($p=0.019$, Εικόνα 37).

Δεν παρατηρήθηκαν άλλες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις της παρουσίας οστικών μεταστάσεων με την έκφραση των miRNAs-στόχων.



Εικόνα 37: Συσχέτιση της παρουσίας οστικών μεταστάσεων των ασθενών με την έκφραση του miR-34a στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.

- Συσχέτιση της αντικειμενικής ανταπόκρισης στη θεραπεία με την έκφραση των miRNAs-στόχων

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την ανταπόκριση στη θεραπεία σε 2 επιμέρους ομάδες (PR vs. SD/PD) και ελέγχθηκε η συσχέτιση με την έκφραση των miRNAs-στόχων (υψηλή vs. χαμηλή), αρχικά στο σύνολο των ασθενών (N=125) και κατόπιν στους 2 βασικούς ιστολογικούς υπότυπους (αδενοκαρκίνωμα, N=77 και πλακώδες καρκίνωμα, N=40).

Από την ανάλυση προέκυψε ότι στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα (N=77) ως ιστολογική εκτίμηση, υψηλή έκφραση του miR-146a παρουσίασε το 64.7% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως PR, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-146a παρουσίασε το 63.3% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως SD/PD ($p=0.038$, Εικόνα 38). Επίσης, υψηλή έκφραση του miR-223 παρουσίασε το 64.7% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως PR, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-223 παρουσίασε το 63.3% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως SD/PD ($p=0.038$, Εικόνα 39).

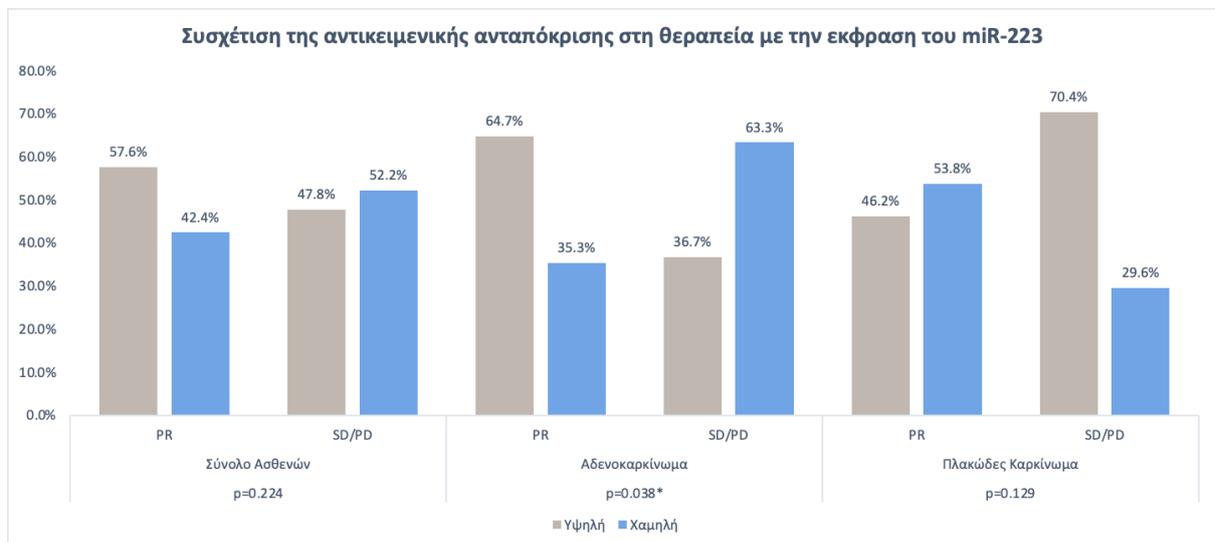
Τέλος, στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα (N=40) ως ιστολογική εκτίμηση, χαμηλή έκφραση του miR-200b παρουσίασε το 75% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως PR, ενώ υψηλή έκφραση του miR-200b παρουσίασε το 60.9% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως SD/PD ($p=0.047$, Εικόνα 40).

Δεν παρατηρήθηκαν άλλες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις της αντικειμενικής ανταπόκρισης στη θεραπεία με την έκφραση των miRNAs-στόχων.



Εικόνα 38: Συσχέτιση της αντικειμενικής ανταπόκρισης στη θεραπεία των ασθενών με την έκφραση του miR- 146a στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.



Εικόνα 39: Συσχέτιση της αντικειμενικής ανταπόκρισης στη θεραπεία των ασθενών με την έκφραση του miR- 223 στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.



Εικόνα 40: Συσχέτιση της αντικειμενικής ανταπόκρισης στη θεραπεία των ασθενών με την έκφραση του miR-200b στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.

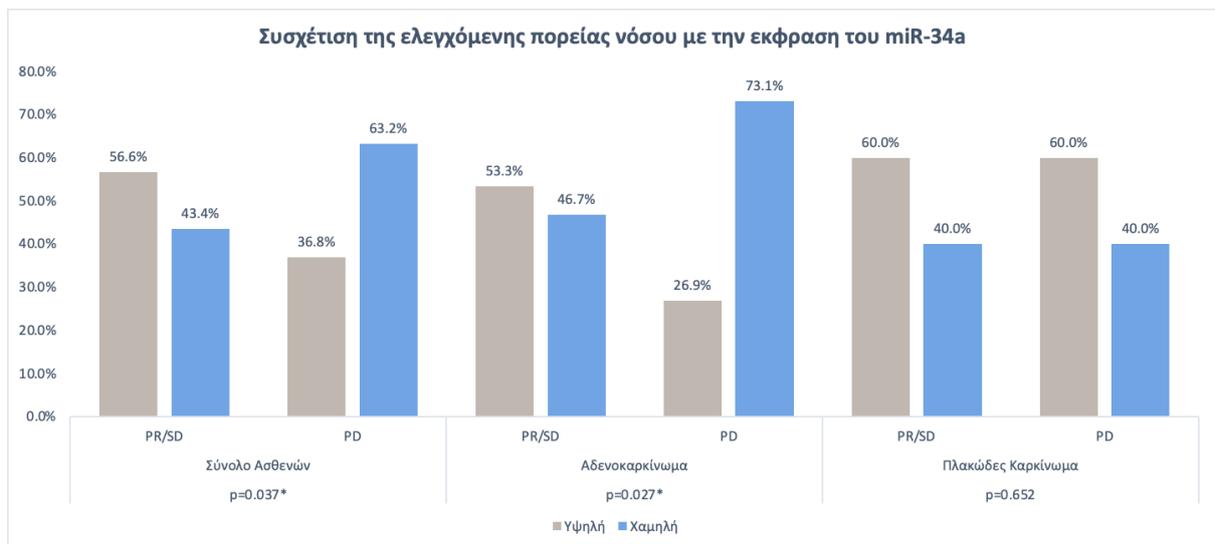
- Συσχέτιση της ελεγχόμενης πορείας νόσου με την έκφραση των miRNAs-στόχων

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την ελεγχόμενη πορεία νόσου σε 2 επιμέρους ομάδες (PR/SD vs. PD) και ελέγχθηκε η συσχέτιση με την έκφραση των miRNAs-στόχων (υψηλή vs. χαμηλή), αρχικά στο σύνολο των ασθενών (N=125) και κατόπιν στους 2 βασικούς ιστολογικούς υπότυπους (αδενοκαρκίνωμα, N=77 και πλακώδες καρκίνωμα, N=40).

Από την ανάλυση προέκυψε ότι στο σύνολο των ασθενών (N=125), υψηλή έκφραση του miR-34a παρουσίασε το 56.6% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως PR/SD, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-34a παρουσίασε το 63.2% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως PD ($p=0.037$, Εικόνα 41) και παράλληλα, χαμηλή έκφραση του miR-202 παρουσίασε το 55.1% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως PR/SD, ενώ υψηλή έκφραση του miR-202 παρουσίασε το 63.9% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως PD ($p=0.045$, Εικόνα 42).

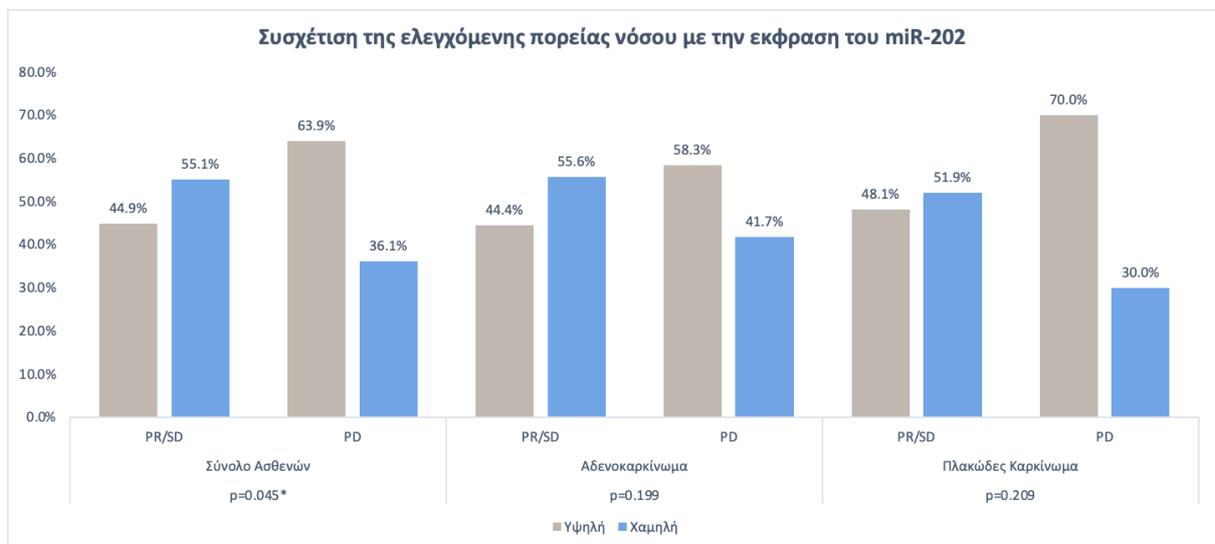
Στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα (N=77) ως ιστολογική εκτίμηση, υψηλή έκφραση του miR-34a παρουσίασε το 53.3% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως PR/SD, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-34a παρουσίασε το 73.1% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως PD ($p=0.027$, Εικόνα 41).

Δεν παρατηρήθηκαν άλλες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις της ελεγχόμενης πορείας νόσου με την έκφραση των miRNAs-στόχων.



Εικόνα 41: Συσχέτιση της ελεγχόμενης πορείας νόσου των ασθενών με την έκφραση του miR-34a στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.



Εικόνα 42: Συσχέτιση της ελεγχόμενης πορείας νόσου των ασθενών με την έκφραση του miR-202 στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.

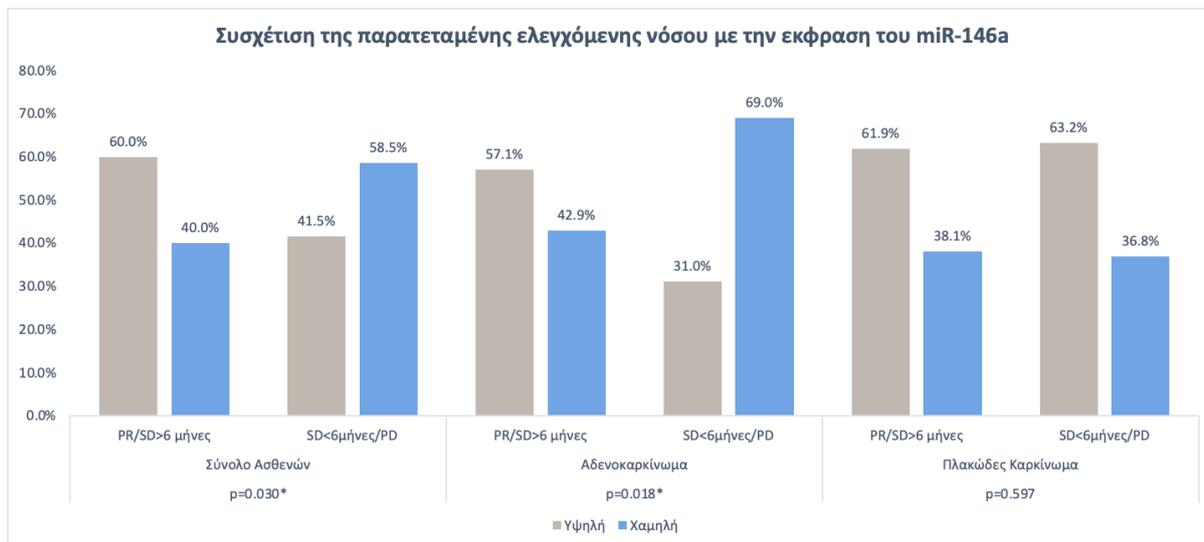
- Συσχέτιση της παρατεταμένης ελεγχόμενης νόσου με την έκφραση των miRNAs-στόχων

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την παρατεταμένη ελεγχόμενη νόσο σε 2 επιμέρους ομάδες (PR/SD>6μήνες vs. SD<6μήνες/PD) και ελέγχθηκε η συσχέτιση με την έκφραση των miRNAs-στόχων (υψηλή vs. χαμηλή), αρχικά στο σύνολο των ασθενών (N=125) και κατόπιν στους 2 βασικούς ιστολογικούς υπότυπους (αδενοκαρκίνωμα, N=77 και πλακώδες καρκίνωμα, N=40).

Από την ανάλυση προέκυψε ότι στο σύνολο των ασθενών (N=125), υψηλή έκφραση του miR-146a παρουσίασε το 60% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως PR/SD>6μήνες, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-146a παρουσίασε το 58.5% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως SD<6μήνες/PD ($p=0.030$, Εικόνα 43).

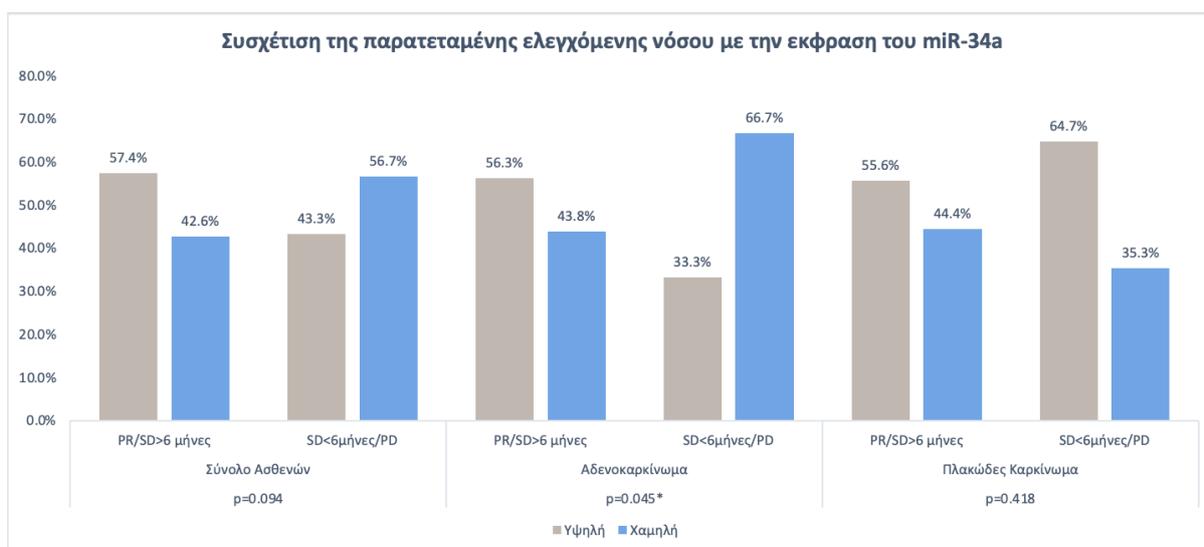
Στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα (N=77) ως ιστολογική εκτίμηση, υψηλή έκφραση του miR-34a παρουσίασε το 56.3% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως PR/SD>6μήνες, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-34a παρουσίασε το 66.7% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως SD<6μήνες/PD ($p=0.045$, Εικόνα 44). Τέλος, υψηλή έκφραση του miR-146a παρουσίασε το 57.1% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως PR/SD>6μήνες, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-146a παρουσίασε το 69% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως SD<6μήνες/PD ($p=0.018$, Εικόνα 43).

Δεν παρατηρήθηκαν άλλες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις της παρατεταμένης ελεγχόμενης νόσου με την έκφραση των miRNAs-στόχων.



Εικόνα 43: Συσχέτιση της παρατεταμένης ελεγχόμενης νόσου των ασθενών με την έκφραση του miR-146a στο σύνολο του πληθυσμού, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.



Εικόνα 44: Συσχέτιση της παρατεταμένης ελεγχόμενης νόσου των ασθενών με την έκφραση του miR-34a στο σύνολο του πληθυσμού, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.

3.1.3 Συσχέτιση του κινδύνου ανάπτυξης προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία των ασθενών με προγνωστικές μεταβλητές

Όπως αναλύθηκε στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι» στην παράγραφο 2.8, οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την έκφραση των μορίων που μελετήθηκαν σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Πιο συγκεκριμένα, τιμές έκφρασης μεγαλύτερες ή ίσες της διάμεσης για κάθε miRNA χαρακτηρίστηκαν ως υψηλής έκφρασης, ενώ τιμές μικρότερες της διάμεσης για κάθε miRNA χαρακτηρίστηκαν ως χαμηλής έκφρασης, αντιστοίχως. Η συσχέτιση της έκφρασης των miRNAs-στόχων με τον κίνδυνο ανάπτυξης προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία αναλύθηκε στο σύνολο των ασθενών, καθώς και στους δύο βασικούς ιστολογικούς υποτύπους του ΜΜΚΠ, δηλαδή για τους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και για τους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα. Η στατιστική σημασία ορίστηκε στο $p < 0.05$ (δοκιμή διπλής όψης, two-sided test).

Στο σύνολο των ασθενών ($N=125$), η μονοπαραγοντική Binary Logistic regression ανάλυση έδειξε ότι η χαμηλή έκφραση του miR-146a (OR: 6.028; 95% CI: 1.192-30.473; $p=0.030$) και η υψηλή έκφραση του miR-200c (OR: 8.010; 95% CI: 1.561-41.097; $p=0.013$) σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία (Πίνακας 10). Εφαρμόζοντας πολυπαραγοντική ανάλυση, και η χαμηλή έκφραση του miR-146a (OR: 5.228; 95% CI: 1.348-20.275; $p=0.017$), καθώς και η υψηλή έκφραση του miR-200c (OR: 4.563; 95% CI: 1.190-17.498; $p=0.027$) αναδείχθηκαν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες του κινδύνου προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία (Πίνακας 10).

Στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα ($N=77$) ως ιστολογική εκτίμηση, η μονοπαραγοντική Binary Logistic regression ανάλυση έδειξε ότι η χαμηλή έκφραση του miR-34a (OR: 5.880; 95% CI: 1.231-28.086; $p=0.026$) και η υψηλή έκφραση του miR-200c (OR: 19.825; 95% CI: 1.663-236.341; $p=0.018$) σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία (Πίνακας 11). Εφαρμόζοντας πολυπαραγοντική ανάλυση, και η χαμηλή έκφραση του miR-34a (OR: 6.826; 95% CI: 1.534-30.368; $p=0.012$), καθώς και η υψηλή έκφραση του miR-200c (OR: 4.571; 95% CI: 1.051-19.887; $p=0.043$) αναδείχθηκαν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες του κινδύνου προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία (Πίνακας 11).

Στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα ($N=40$) ως ιστολογική εκτίμηση, δε παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση των παραγόντων με τον κίνδυνο ανάπτυξης προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία (Πίνακας 11).

Πίνακας 10: Μοντέλα Δυαδικής Λογιστικής Παλινδρόμησης (Binary Logistic Regression) για τον κίνδυνο ανάπτυξης προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία σε ασθενείς με ΜΜΚΠ (N=125), που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.

Μεταβλητή Παράμετρος	Σύνολο Ασθενών (N=125)			
	Μονοπαραγοντική Ανάλυση		Πολυπαραγοντική Ανάλυση	
	OR (95% CI)	p Value	OR (95% CI)	p Value
Ηλικία (<60 vs. ≥60)	2.329 (0.781-6.950)	0.130	-	-
Φύλο (άρρεν vs. θήλυ)	2.969 (0.657-13.423)	0.157	-	-
ECOG PS (≥2 vs. 0-1)	2.558 (0.525-12.466)	0.245	-	-
Ιστολογία (Αδενοκαρκίνωμα vs. Πλακώδες καρκίνωμα)	3.299 (0.142-76.754)	0.457	-	-
Μεταστατικές Εστίες (≥3 vs. 0-2)	1.135 (0.237-5.437)	0.874	-	-
let-7c (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.601 (0.343-7.477)	0.550	-	-
miR-26a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.959 (0.159-24.148)	0.600	-	-
miR-30d (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	3.673 (0.453-29.746)	0.223	-	-
miR-34a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	2.768 (0.940-8.150)	0.065	-	-
miR-146a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	6.028 (1.192-30.473)	0.030*	5.228 (1.348-20.275)	0.017*
miR-155 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	2.354 (0.367-15.114)	0.367	-	-
miR-195 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.990 (0.478-8.290)	0.344	-	-
miR-200b (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.122 (0.170-7.417)	0.905	-	-
miR-200c (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	8.010 (1.561-41.097)	0.013*	4.563 (1.190-17.498)	0.027*
miR-202 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.387 (0.367-5.241)	0.630	-	-
miR-223 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.071 (0.021-55.184)	0.973	-	-

OR, Odds Ratio, (πιθανότητα κινδύνου); CI, Confidence Intervals (διάστημα εμπιστοσύνης); ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης με βάση τη διάμεση τιμή για το κάθε miRNA; Cox regression, * p < 0.05.

Πίνακας 11: Μοντέλα Δυαδικής Λογιστικής Παλινδρόμησης (Binary Logistic Regression) για τον κίνδυνο ανάπτυξης προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα (N=77) και σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα (N=40), που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.

Μεταβλητή Παράμετρος	Αδενοκαρκίνωμα (N=77)				Πλακώδες Καρκίνωμα (N=40)			
	Μονοπαραγοντική Ανάλυση		Πολυπαραγοντική Ανάλυση		Μονοπαραγοντική Ανάλυση		Πολυπαραγοντική Ανάλυση	
	OR (95% CI)	p Value	OR (95% CI)	p Value	OR (95% CI)	p Value	OR (95% CI)	p Value
Ηλικία (<60 vs. ≥60)	2.049 (0.390-10.771)	0.397	-	-	-	0.999	-	-
Φύλο (άρρεν vs. θήλυ)	2.475 (0.430-14.236)	0.310	-	-	-	-	-	-
ECOG PS (≥2 vs. 0-1)	5.864 (0.575-59.846)	0.136	-	-	-	0.999	-	-
Μεταστατικές Εστίες (≥3 vs. 0-2)	2.241 (0.361-13.910)	0.386	-	-	-	0.999	-	-
let-7c (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.610 (0.164-15.754)	0.683	-	-	-	0.999	-	-
miR-26a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	2.574 (0.127-52.240)	0.538	-	-	-	0.999	-	-
miR-30d (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	4.402 (0.382-50.773)	0.235	-	-	-	0.999	-	-
miR-34a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	5.880 (1.231-28.086)	0.026*	6.826 (1.534-30.368)	0.012*	2.400 (0.261-22.105)	0.440	-	-
miR-146a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	7.303 (0.741-71.972)	0.089	-	-	-	0.999	-	-
miR-155 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	2.076 (0.041-105.573)	0.715	-	-	-	0.999	-	-
miR-195 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	2.984 (0.391-22.764)	0.292	-	-	-	0.999	-	-
miR-200b (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.323 (0.001-1170.948)	0.936	-	-	-	0.999	-	-
miR-200c (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	19.825 (1.663-236.341)	0.018*	4.571 (1.051-19.887)	0.043*	-	0.999	-	-
miR-202 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	2.109 (0.396-11.237)	0.382	-	-	1.377 (0.141-13.406)	0.783	-	-
miR-223 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.475 (0.003-796.014)	0.904	-	-	8.500 (0.609-118.637)	0.112	-	-

OR, Odds Ratio, (πιθανότητα κινδύνου); CI, Confidence Intervals (διάστημα εμπιστοσύνης); ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status;

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης με βάση τη διάμεση τιμή για το κάθε miRNA; Cox regression, * p < 0.05.

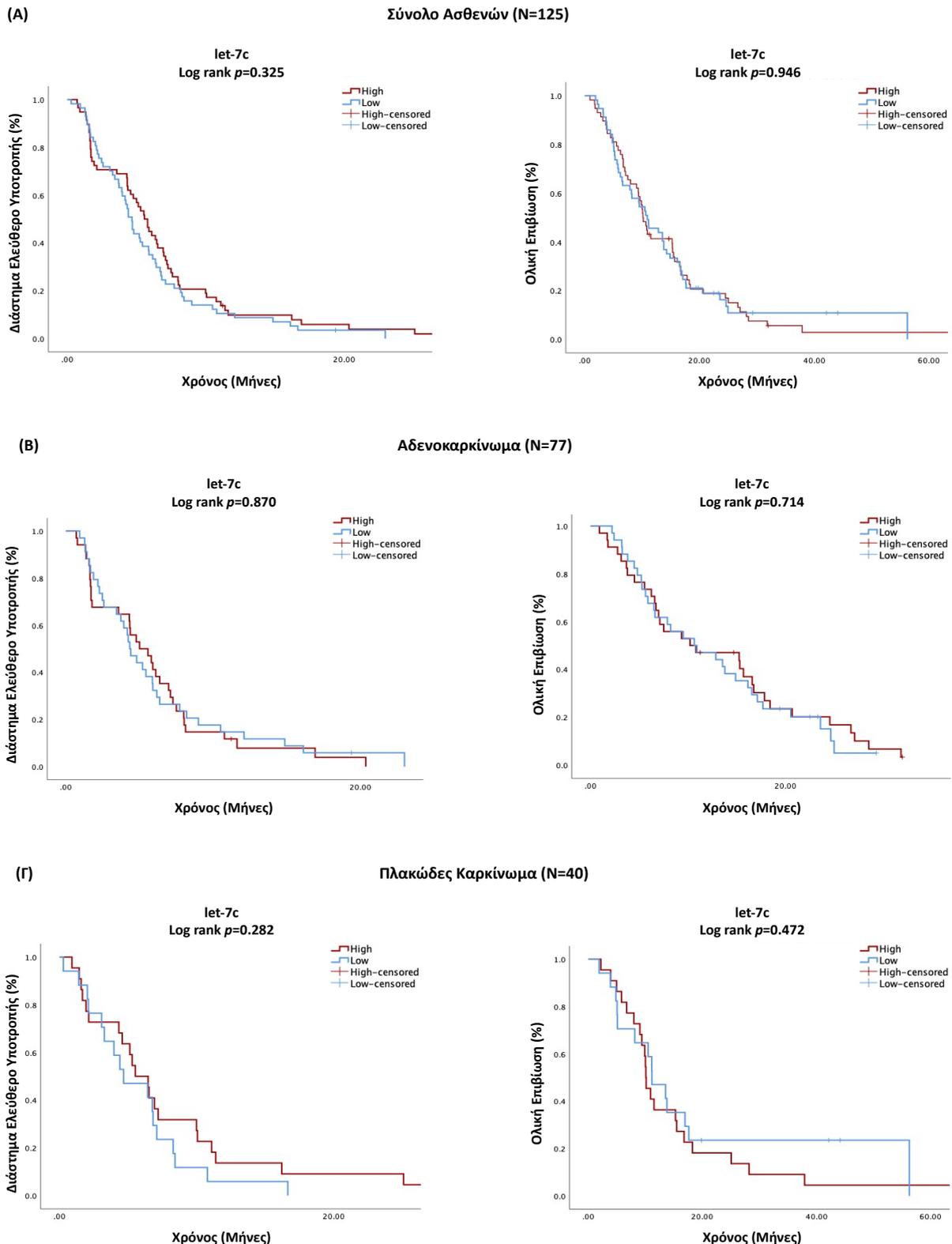
3.1.4 Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (Progression Free Survival, PFS) και της ολικής επιβίωσης (Overall Survival, OS) με την έκφραση των miRNAs-στόχων

Όπως αναλύθηκε στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι» στην παράγραφο 2.8, οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την έκφραση των μορίων που μελετήθηκαν σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Πιο συγκεκριμένα, τιμές έκφρασης μεγαλύτερες ή ίσες της διάμεσης για κάθε miRNA χαρακτηρίστηκαν ως υψηλής έκφρασης, ενώ τιμές μικρότερες της διάμεσης για κάθε miRNA χαρακτηρίστηκαν ως χαμηλής έκφρασης, αντιστοίχως. Η συσχέτιση της έκφρασης των miRNAs-στόχων με το διάστημα ελεύθερο υποτροπής (Progression Free Survival, PFS) και την ολική επιβίωση (Overall Survival, OS) αναλύθηκε στο σύνολο των ασθενών, καθώς και στους δύο βασικούς ιστολογικούς υποτύπους του ΜΜΚΠ, δηλαδή για τους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και για τους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα. Η στατιστική σημασία ορίστηκε στο $p < 0.05$ (δοκιμή διπλής όψης, two-sided test).

Στο σύνολο των ασθενών (N=125), ο μέσος χρόνος διαστήματος ελεύθερου υποτροπής ήταν οι 5.13 μήνες (εύρος: 4.4-5.57) και ο μέση ολική επιβίωση ήταν 10.20 μήνες (εύρος: 7.87-13.53). Η υψηλή έκφραση του miR-200c συσχετίστηκε με μικρότερη ολική επιβίωση (7.5 vs. 11.5 μήνες, $p=0.013$, Εικόνα 53 A) και η υψηλή έκφραση του miR-202 συσχετίστηκε και με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής (4.4 vs. 5.57 μήνες, $p=0.048$, Εικόνα 54 A) και με μικρότερη ολική επιβίωση (7.87 vs. 13.53 μήνες, $p=0.022$, Εικόνα 54 A). Η έκφραση των let-7c (Εικόνα 45 A), miR-26a (Εικόνα 46 A), miR-30d (Εικόνα 47 A), miR-34a (Εικόνα 48 A), miR-146a (Εικόνα 49 A), miR-155 (Εικόνα 50 A), miR-195 (Εικόνα 51 A), miR-200b (Εικόνα 52 A) και miR-223 (Εικόνα 55 A) δεν παρουσίασε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ούτε με το διάστημα ελεύθερο υποτροπής, ούτε με την ολική επιβίωση στο σύνολο του πληθυσμού.

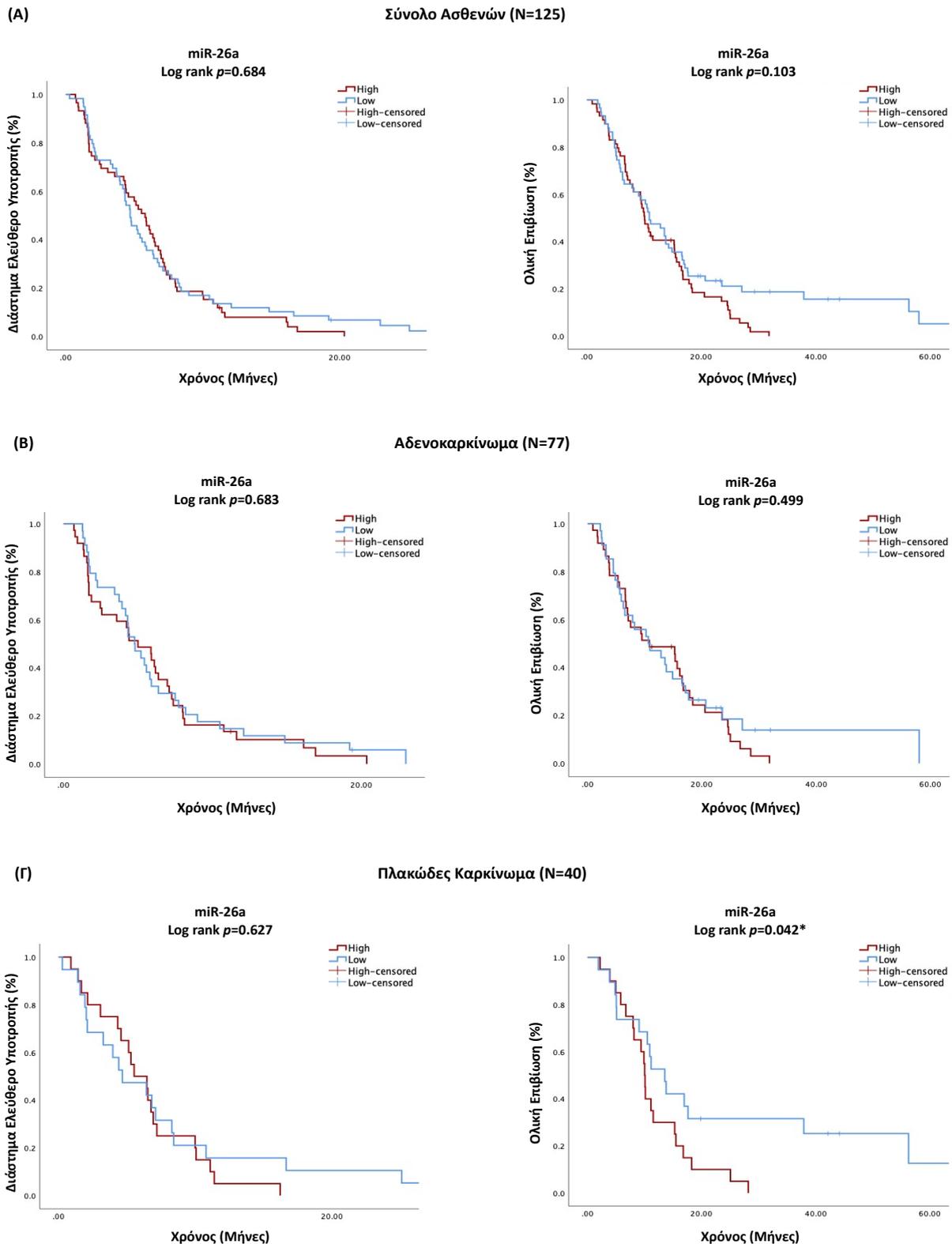
Στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα (N=77) ως ιστολογική εκτίμηση, ο μέσος χρόνος διαστήματος ελεύθερου υποτροπής ήταν οι 4.77 μήνες (εύρος: 4.17-5.57) και ο μέση ολική επιβίωση ήταν 10.63 μήνες (εύρος: 6.27-15.30). Από την ανάλυση, μόνο η υψηλή έκφραση του miR-202 συσχετίστηκε με μικρότερη ολική επιβίωση (6.27 vs. 15.30 μήνες, $p=0.012$, Εικόνα 54 B). Η έκφραση των let-7c (Εικόνα 45 B), miR-26a (Εικόνα 46 B), miR-30d (Εικόνα 47 B), miR-34a (Εικόνα 48 B), miR-146a (Εικόνα 49 B), miR-155 (Εικόνα 50 B), miR-195 (Εικόνα 51 B), miR-200b (Εικόνα 52 B), miR-200c (Εικόνα 53 B) και miR-223 (Εικόνα 55 B) δεν παρουσίασε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ούτε με το διάστημα ελεύθερο υποτροπής, ούτε με την ολική επιβίωση στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα.

Στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα (N=40) ως ιστολογική εκτίμηση, ο μέσος χρόνος διαστήματος ελεύθερου υποτροπής ήταν οι 6.43 μήνες (εύρος: 5.13-8.30) και ο μέση ολική επιβίωση ήταν 10.90 μήνες (εύρος: 9.87-13.77). Η υψηλή έκφραση του miR-26a συσχετίστηκε με μικρότερη ολική επιβίωση (10.0 vs. 13.53 μήνες, $p=0.042$, Εικόνα 46 Γ) και η υψηλή έκφραση του miR-155 συσχετίστηκε και με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής (5.13 vs. 8.30 μήνες, $p=0.034$, Εικόνα 50 Γ) και με μικρότερη ολική επιβίωση (9.87 vs. 13.77 μήνες, $p=0.028$, Εικόνα 50 Γ). Η έκφραση των let-7c (Εικόνα 45 Γ), miR-30d (Εικόνα 47 Γ), miR-34a (Εικόνα 48 Γ), miR-146a (Εικόνα 49 Γ), miR-195 (Εικόνα 51 Γ), miR-200b (Εικόνα 50 Γ), miR-200c (Εικόνα 53 Γ), miR-202 (Εικόνα 54 Γ) και miR-223 (Εικόνα 55 Γ) δεν παρουσίασε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το διάστημα ελεύθερο υποτροπής, αλλά ούτε και με την ολική επιβίωση στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα.



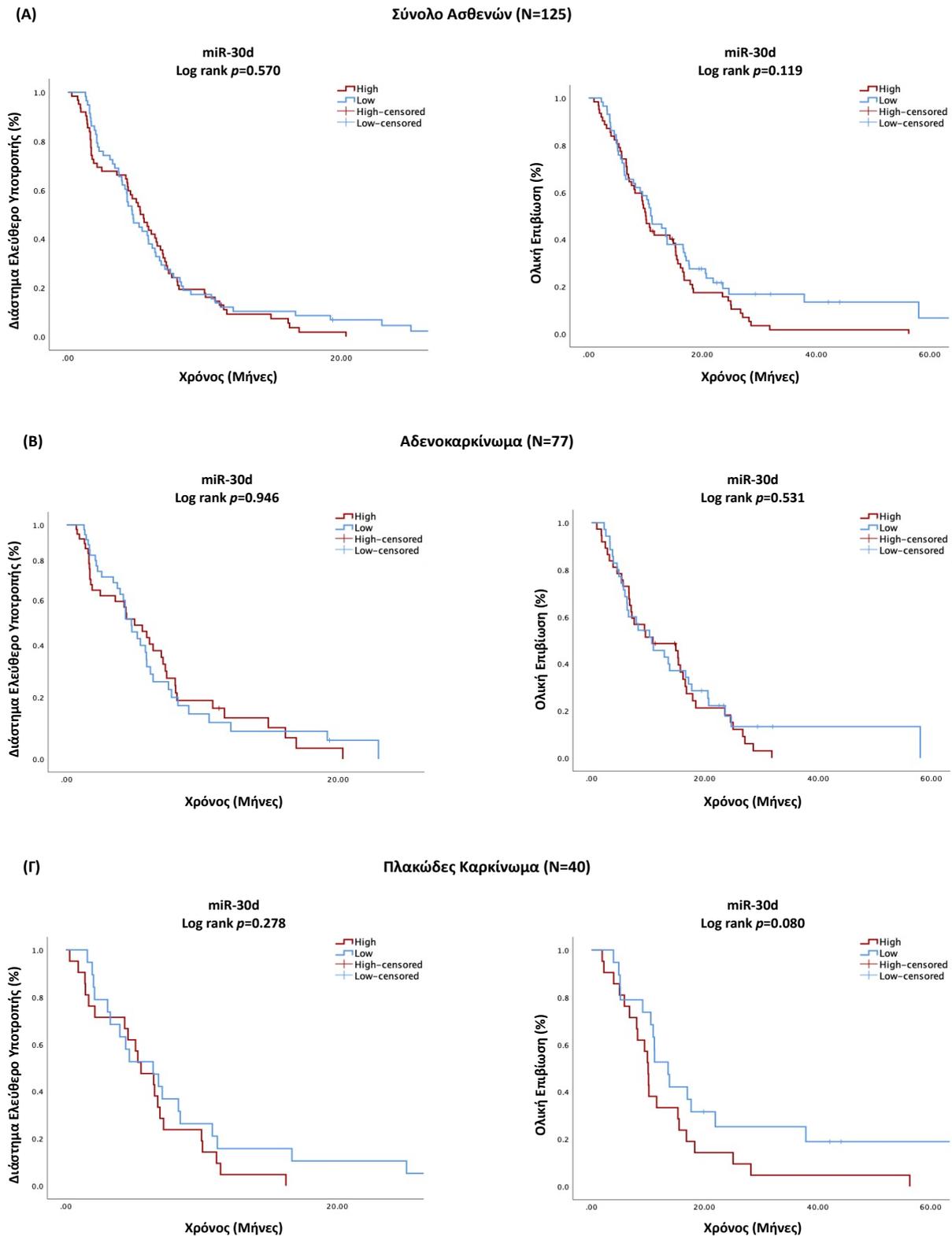
Εικόνα 45: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του *let-7c* στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.

Σύνολο του πληθυσμού (N=125) (Α), Αδενοκαρκίνωμα (N=77) (Β), Πλακώδες καρκίνωμα (N=40) (Γ). Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των καμπυλών διεξήχθη με την εφαρμογή του log rank test. Αναγράφονται οι τιμές p values.



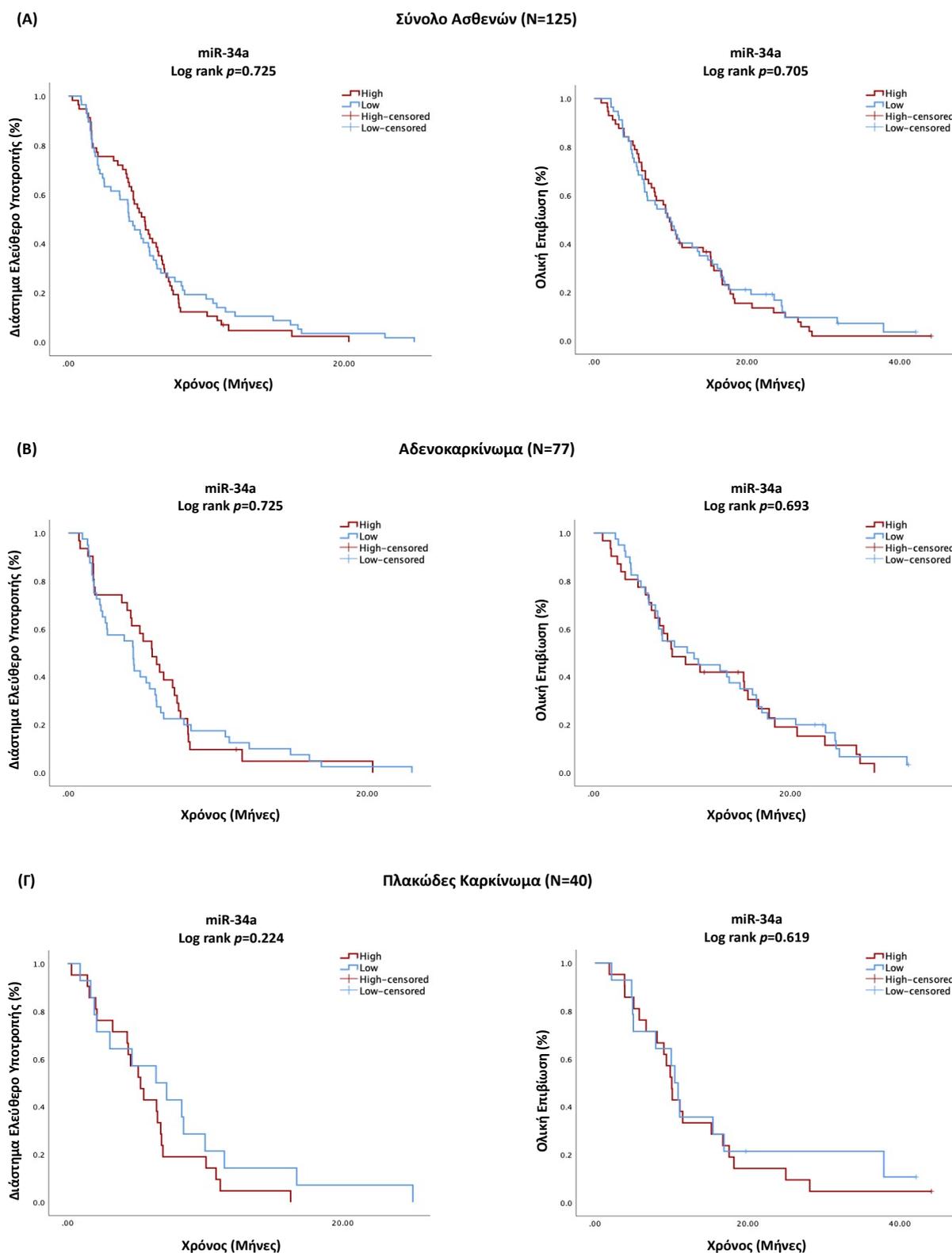
Εικόνα 46: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-26a στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.

Σύνολο του πληθυσμού (N=125) (Α), Αδενοκαρκίνωμα (N=77) (Β), Πλακώδες καρκίνωμα (N=40) (Γ). Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των καμπυλών διεξήχθη με την εφαρμογή του log rank test. Αναγράφονται οι τιμές p values.



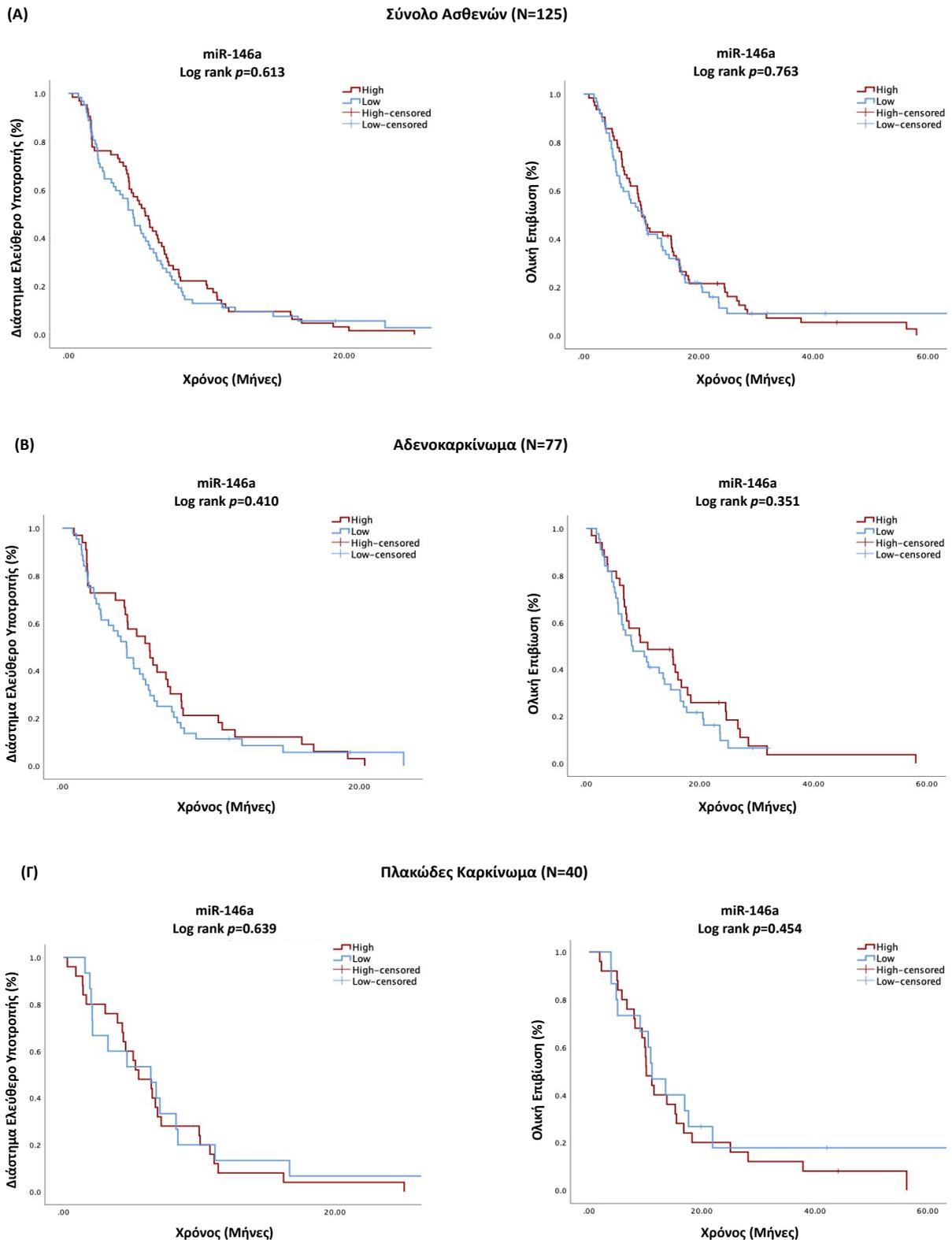
Εικόνα 47: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-30d στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.

Σύνολο του πληθυσμού (N=125) (Α), Αδενοκαρκίνωμα (N=77) (Β), Πλακώδες καρκίνωμα (N=40) (Γ). Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των καμπυλών διεξήχθη με την εφαρμογή του log rank test. Αναγράφονται οι τιμές p values.



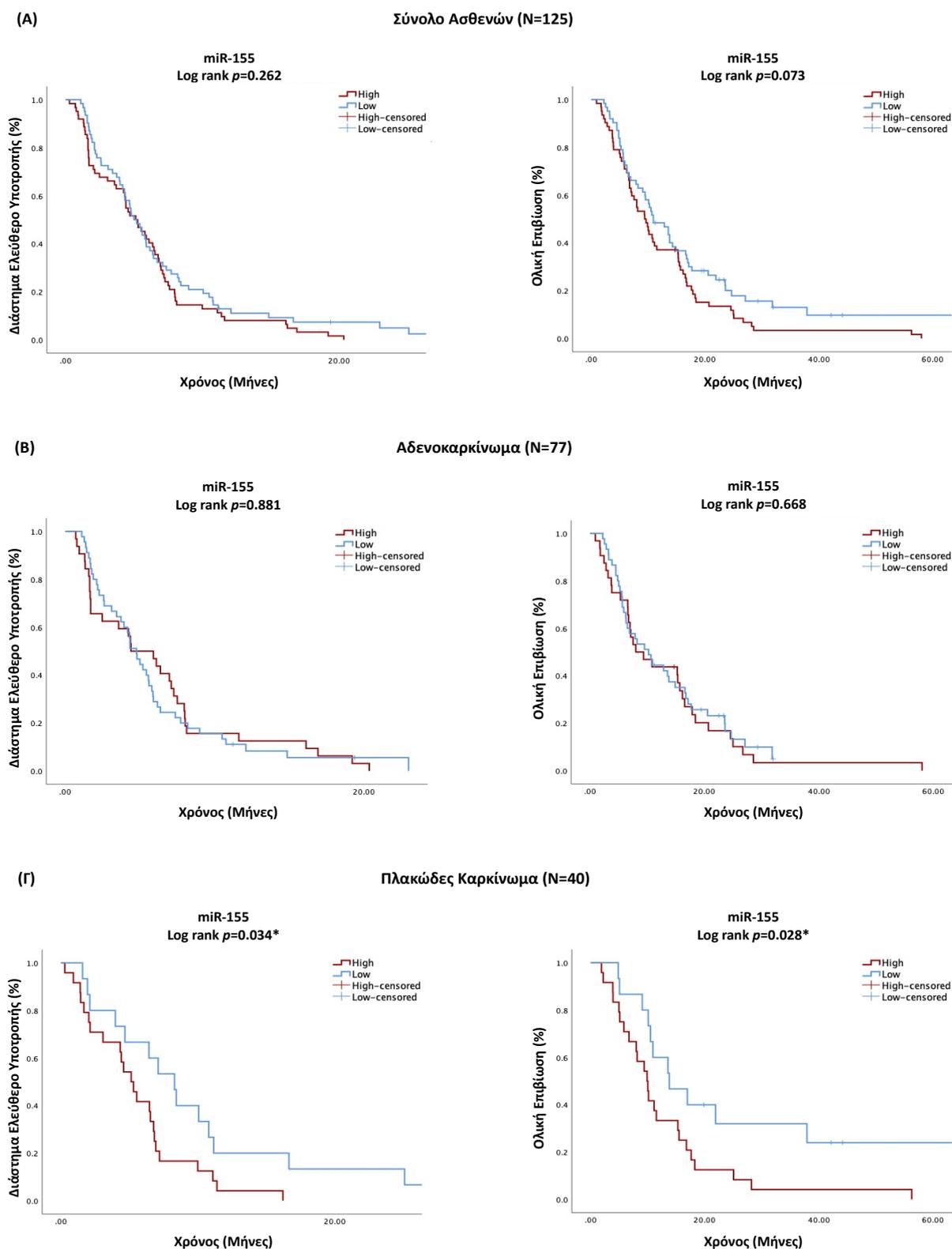
Εικόνα 48: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-34a στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.

Σύνολο του πληθυσμού (N=125) (Α), Αδενοκαρκίνωμα (N=77) (Β), Πλακώδες καρκίνωμα (N=40) (Γ). Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των καμπυλών διεξήχθη με την εφαρμογή του log rank test. Αναγράφονται οι τιμές p values.



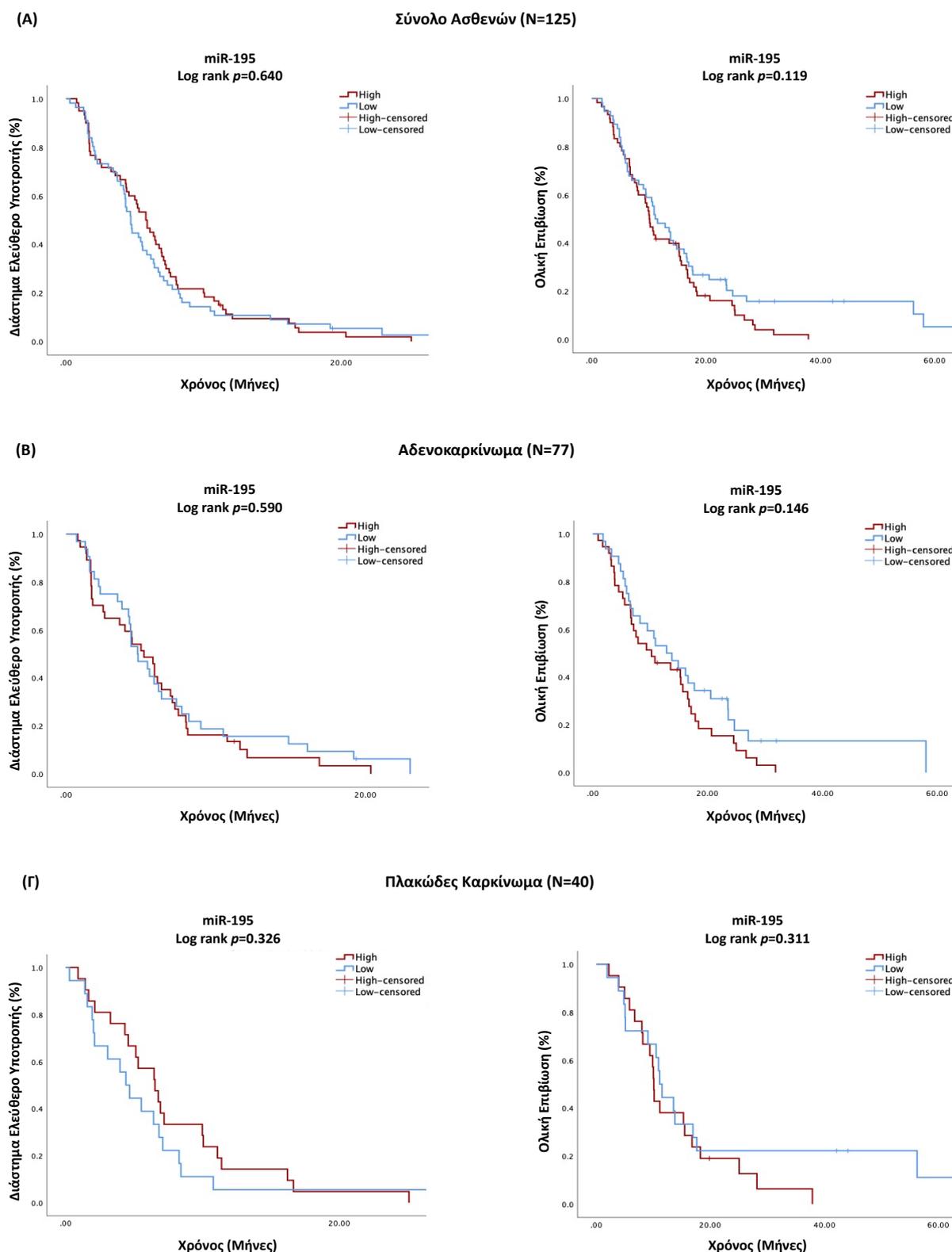
Εικόνα 49: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-146a στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.

Σύνολο του πληθυσμού (N=125) (Α), Αδενοκαρκίνωμα (N=77) (Β), Πλακώδες καρκίνωμα (N=40) (Γ). Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των καμπυλών διεξήχθη με την εφαρμογή του log rank test. Αναγράφονται οι τιμές p values.



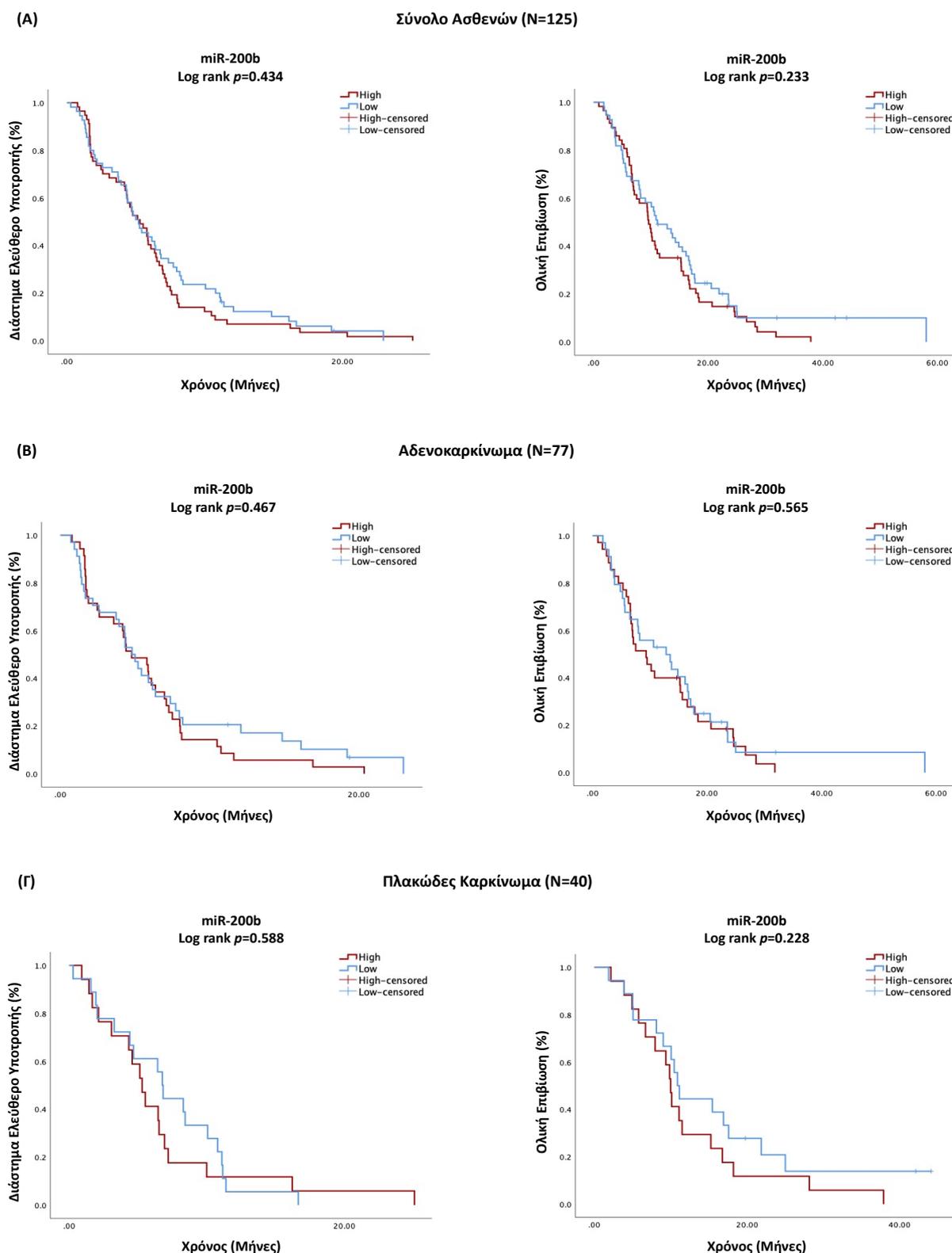
Εικόνα 50: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-155 στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.

Σύνολο του πληθυσμού (N=125) (A), Αδενοκαρκίνωμα (N=77) (B), Πλακώδες καρκίνωμα (N=40) (Γ). Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των καμπυλών διεξήχθη με την εφαρμογή του log rank test. Αναγράφονται οι τιμές p values.



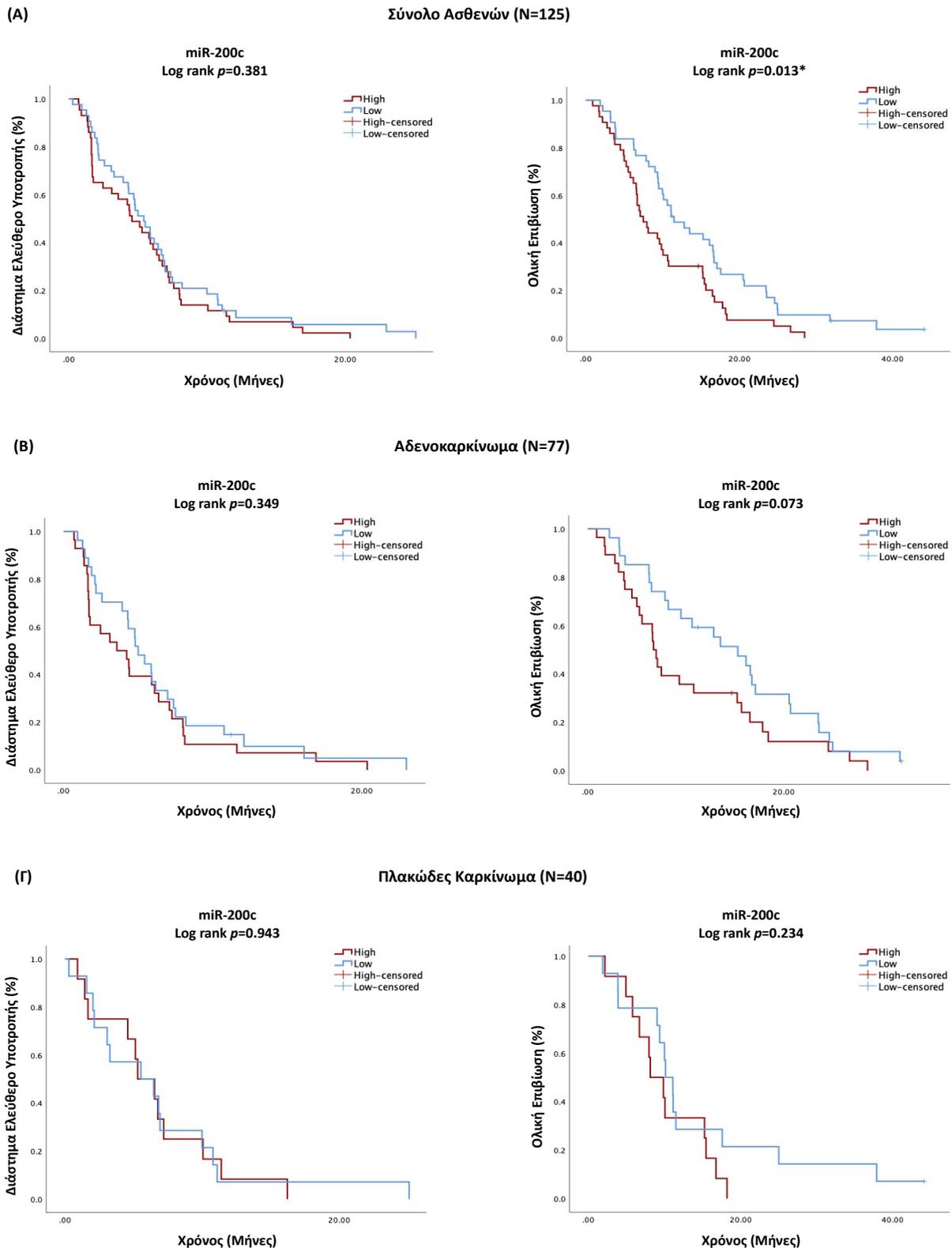
Εικόνα 51: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-195 στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.

Σύνολο του πληθυσμού (N=125) (Α), Αδενοκαρκίνωμα (N=77) (Β), Πλακώδες καρκίνωμα (N=40) (Γ). Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των καμπυλών διεξήχθη με την εφαρμογή του log rank test. Αναγράφονται οι τιμές p values.



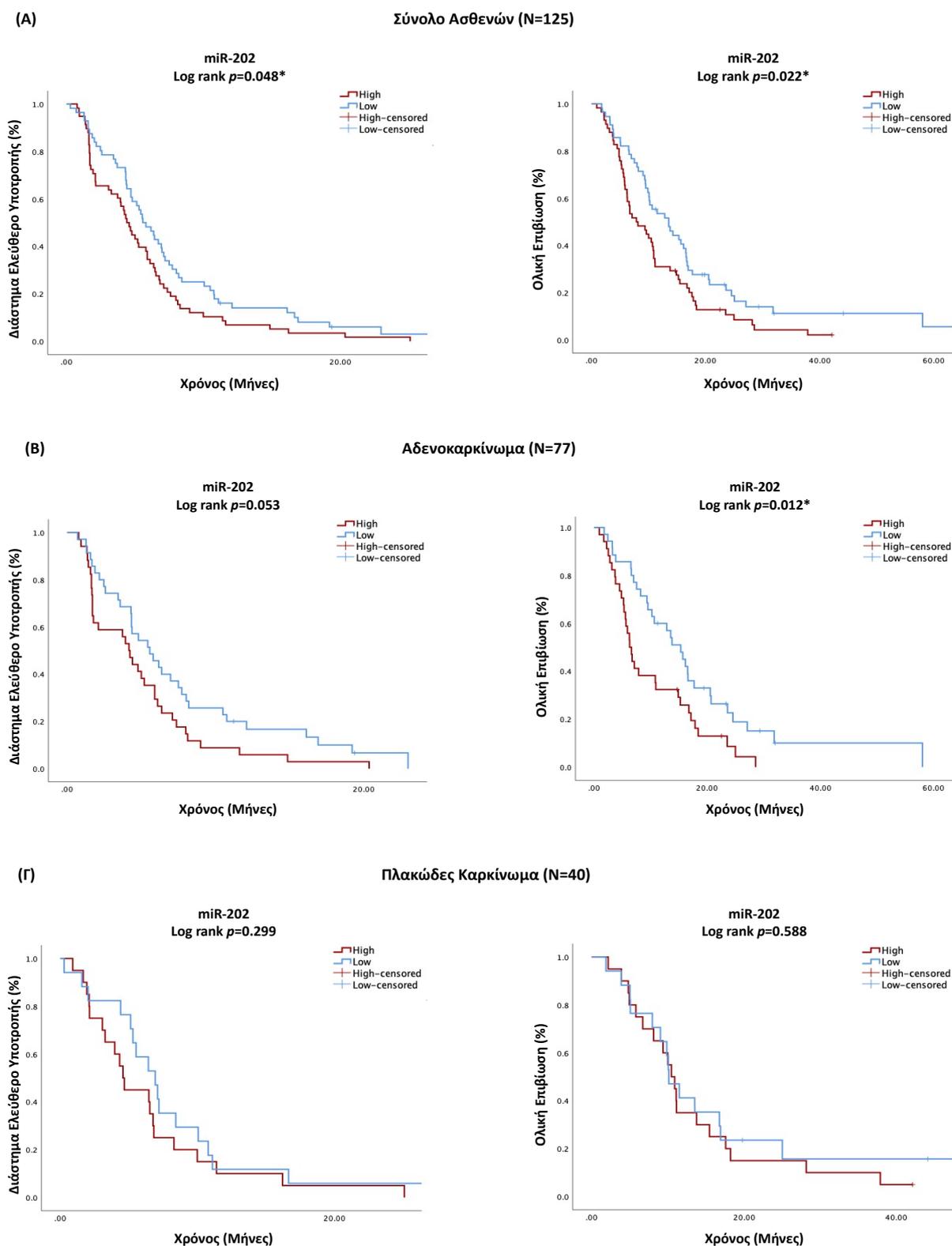
Εικόνα 52: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-200b στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.

Σύνολο του πληθυσμού (N=125) (Α), Αδενοκαρκίνωμα (N=77) (Β), Πλακώδες καρκίνωμα (N=40) (Γ). Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των καμπυλών διεξήχθη με την εφαρμογή του log rank test. Αναγράφονται οι τιμές p values.



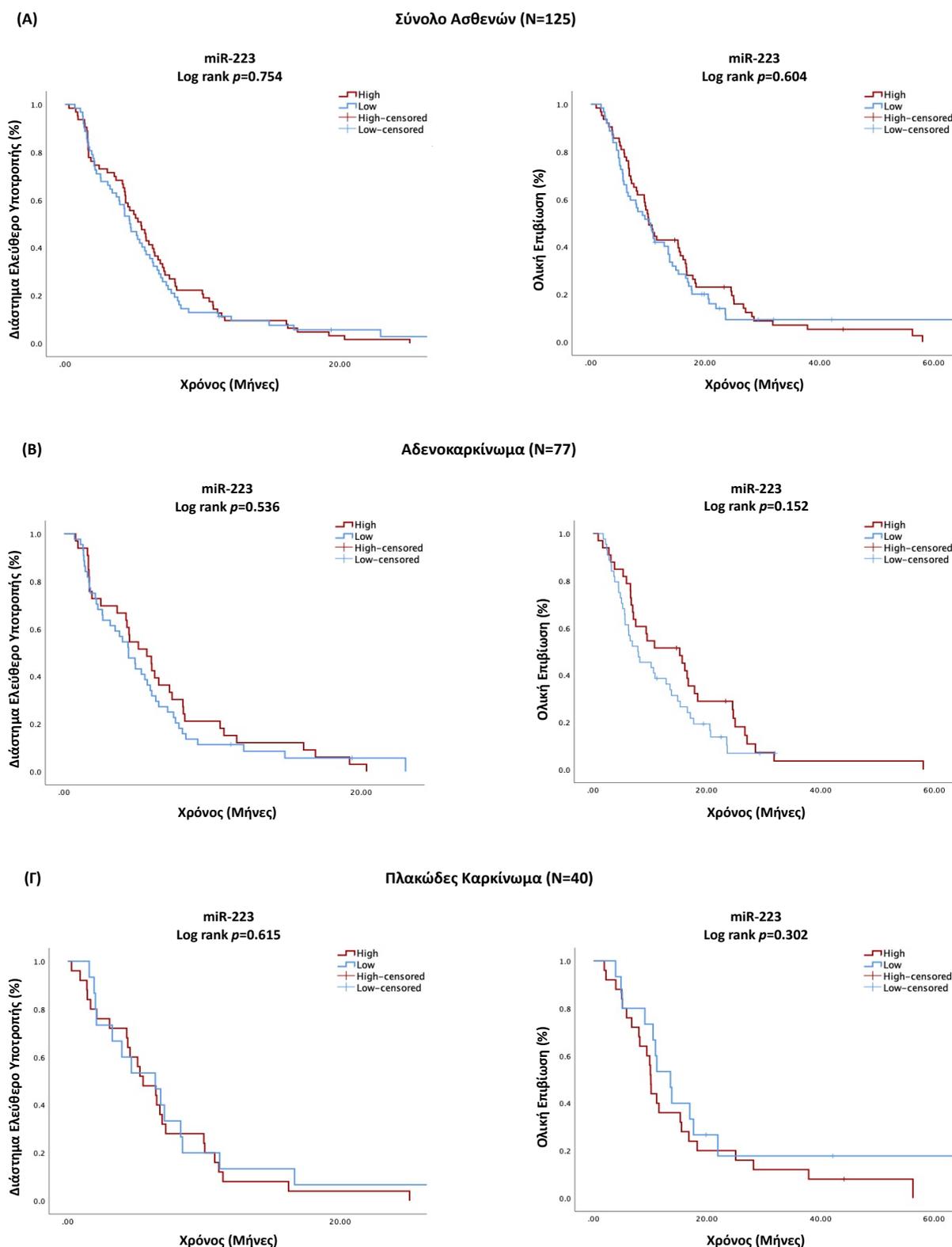
Εικόνα 53: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-200c στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.

Σύνολο του πληθυσμού (N=125) (Α), Αδενοκαρκίνωμα (N=77) (Β), Πλακώδες καρκίνωμα (N=40) (Γ). Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των καμπυλών διεξήχθη με την εφαρμογή του log rank test. Αναγράφονται οι τιμές p values.



Εικόνα 54: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-202 στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.

Σύνολο του πληθυσμού (N=125) (Α), Αδενοκαρκίνωμα (N=77) (Β), Πλακώδες καρκίνωμα (N=40) (Γ). Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των καμπυλών διεξήχθη με την εφαρμογή του log rank test. Αναγράφονται οι τιμές p values.



Εικόνα 55: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-223 στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.

Σύνολο του πληθυσμού (N=125) (Α), Αδενοκαρκίνωμα (N=77) (Β), Πλακώδες καρκίνωμα (N=40) (Γ). Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των καμπυλών διεξήχθη με την εφαρμογή του log rank test. Αναγράφονται οι τιμές p values.

3.1.5 Συσχέτιση του Διαστήματος Ελεύθερου Υποτροπής και της Ολικής Επιβίωσης με Προγνωστικές Μεταβλητές

Όπως αναλύθηκε στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι» στην παράγραφο 2.8, οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν ως χαμηλής ή υψηλής έκφρασης ως προς το αν η έκφραση των μελετώμενων μορίων ήταν μικρότερη ή μεγαλύτερη της διάμεσης τιμής έκφρασης. Πιο αναλυτικά, τιμές έκφρασης μεγαλύτερες ή ίσες της διάμεσης τιμής έκφρασης για κάθε miRNA χαρακτηρίστηκαν ως υψηλής έκφρασης, ενώ τιμές μικρότερες της διάμεσης τιμής των επιπέδων έκφρασης για κάθε miRNA χαρακτηρίστηκαν ως χαμηλής έκφρασης. Η συσχέτιση της έκφρασης των miRNAs-στόχων με το διάστημα ελεύθερο υποτροπής (Progression Free Survival, PFS) και την ολική επιβίωση (Overall Survival, OS) αναλύθηκε στο σύνολο των ασθενών, καθώς και στους δύο βασικούς ιστολογικούς υποτύπους του ΜΜΚΠ, δηλαδή για τους ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα και για τους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε ως το $p < 0.05$ (δοκιμή διπλής όψης, two-sided test).

Στο σύνολο των ασθενών (N=125), η μονοπαραγοντική Cox regression ανάλυση έδειξε την προγνωστική αξία των miR-202 και miR-200c ως μοριακών δεικτών δυσμενούς πρόγνωσης. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αυξημένος κίνδυνος υποτροπής (HR: 1.455; 95% CI: 1.000-2.118; $p=0.050$) και θανάτου (HR: 1.572; 95% CI: 1.063-2.326; $p=0.023$) για τους ασθενείς με υψηλή έκφραση του miR-202 και αυξημένος κίνδυνος θανάτου (HR: 1.750; 95% CI: 1.121-2.730; $p=0.014$) για τους ασθενείς με υψηλή έκφραση του miR-200c (Πίνακας 12). Μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής συσχετίστηκε επίσης με το ανδρικό φύλο (HR: 1.831; 95% CI: 1.089-3.078; $p=0.023$) και με πολλαπλές (≥ 3) μεταστατικές εστίες (HR: 2.014; 95% CI: 1.301-3.118; $p=0.002$) (Πίνακας 12). Ακόμη, μικρότερη ολική επιβίωση συσχετίστηκε με $PS \geq 2$ (HR: 2.355; 95% CI: 1.390-3.991; $p=0.001$) και με πολλαπλές (≥ 3) μεταστατικές εστίες (HR: 1.626; 95% CI: 1.042-2.537; $p=0.032$) (Πίνακας 12).

Εφαρμόζοντας πολυπαραγοντική ανάλυση στο σύνολο του πληθυσμού (N=125), η υψηλή έκφραση του miR-202 αναδείχτηκε ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής (HR: 1.616; 95% CI: 1.103-2.367; $p=0.014$), ενώ η υψηλή έκφραση του miR-200c αναδείχτηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μικρότερη ολική επιβίωση (HR: 1.663; 95% CI: 1.022-2.706; $p=0.041$) (Πίνακας 12). Επιπλέον, το αντρικό φύλο βρέθηκε να αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής (HR: 2.127; 95% CI: 1.204-3.758; $p=0.009$) και οι πολλαπλές (≥ 3) μεταστατικές εστίες ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα και για μικρότερο διάστημα

ελεύθερο υποτροπής (HR: 1.943; 95% CI: 1.215-3.109; $p=0.006$) και για μικρότερη ολική επιβίωση (HR: 1.861; 95% CI: 1.037-3.338; $p=0.037$) (Πίνακας 12).

Στο υποσύνολο των ασθενών με αδenoκαρκίνωμα (N=77) ως ιστολογική εκτίμηση, η μονοπαραγοντική Cox regression ανάλυση έδειξε ότι μόνο οι πολλαπλές (≥ 3) μεταστατικές εστίες σχετίζονται με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής (HR: 2.307; 95% CI: 1.363-3.905; $p=0.002$) (Πίνακας 13). Ωστόσο, βρέθηκε ότι η υψηλή έκφραση του miR-202 σχετίζεται με μικρότερη ολική επιβίωση (HR: 1.909; 95% CI: 1.142-3.192; $p=0.014$) (Πίνακας 13). Επιπλέον, μικρότερη ολική επιβίωση συσχετίστηκε με $PS \geq 2$ (HR: 2.459; 95% CI: 1.162-5.203; $p=0.019$) και με πολλαπλές (≥ 3) μεταστατικές εστίες (HR: 1.816; 95% CI: 1.054-3.130; $p=0.032$) (Πίνακας 13).

Εφαρμόζοντας πολυπαραγοντική ανάλυση στο υποσύνολο των ασθενών με αδenoκαρκίνωμα (N=77), η υψηλή έκφραση του miR-202 αναδείχθηκε ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μικρότερη ολική επιβίωση (HR: 1.953; 95% CI: 1.162-3.282; $p=0.012$) (Πίνακας 13). Επιπλέον, $PS \geq 2$ βρέθηκε να αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για μικρότερη ολική επιβίωση (HR: 2.552; 95% CI: 1.187-5.485; $p=0.016$) (Πίνακας 13).

Στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα (N=40) ως ιστολογική εκτίμηση, η μονοπαραγοντική Cox regression ανάλυση έδειξε ότι η υψηλή έκφραση του miR-26a σχετίζεται με μικρότερη ολική επιβίωση (HR: 2.062; 95% CI: 1.012-4.203; $p=0.046$) και η υψηλή έκφραση του miR-155 σχετίζεται και με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής (HR: 2.119; 95% CI: 1.044-4.300; $p=0.038$) και με μικρότερη ολική επιβίωση (HR: 2.210; 95% CI: 1.071-4.563; $p=0.032$) (Πίνακας 14). Επίσης, μικρότερη ολική επιβίωση συσχετίστηκε με $PS \geq 2$ (HR: 2.401; 95% CI: 1.007-5.725; $p=0.048$) (Πίνακας 14). Παρόλα αυτά κανένας από τους παραπάνω παράγοντες δεν βρέθηκε να αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη για το διάστημα ελεύθερο υποτροπής ή για την ολική επιβίωση.

Πίνακας 12: Μοντέλα Αναλογικής Παλινδρόμησης Κινδύνου Cox (Cox Proportional Hazard Regression Models) για το Διάστημα Ελεύθερο Υποτροπής και την Ολική Επιβίωση σε ασθενείς με ΜΜΚΠ (N=125), που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.

Μεταβλητή Παράμετρος	Διάστημα Ελεύθερο Υποτροπής				Ολική Επιβίωση			
	Μονοπαραγοντική Ανάλυση		Πολυπαραγοντική Ανάλυση		Μονοπαραγοντική Ανάλυση		Πολυπαραγοντική Ανάλυση	
	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value
Ηλικία (<60 vs. ≥60)	1.071 (0.724-1.584)	0.732	-	-	1.230 (0.822-1.842)	0.314	-	-
Φύλο (άρρεν vs. θήλυ)	1.831 (1.089-3.078)	0.023*	2.127 (1.204-3.758)	0.009*	1.439 (0.833-2.484)	0.192	-	-
ECOG PS (≥2 vs. 0-1)	1.210 (0.724-2.025)	0.467	-	-	2.355 (1.390-3.991)	0.001*	1.485 (0.779-2.829)	0.230
Στάδιο νόσου (IV vs. I-III)	1.069 (0.435-2.625)	0.884	-	-	1.693 (0.623-4.602)	0.302	-	-
Ιστολογία (Αδενοκαρκίνωμα vs. Πλακώδες καρκίνωμα)	1.300 (0.621-2.720)	0.486	-	-	1.576 (0.751-3.308)	0.229	-	-
Μεταστατικές Εστίες (≥3 vs. 0-2)	2.014 (1.301-3.118)	0.002*	1.943 (1.215-3.109)	0.006*	1.626 (1.042-2.537)	0.032*	1.861 (1.037-3.338)	0.037*
let-7c (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.206 (0.830-1.752)	0.327	-	-	1.014 (0.689-1.491)	0.946	-	-
miR-26a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.080 (0.745-1.567)	0.685	-	-	1.381 (0.935-2.039)	0.105	-	-
miR-30d (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.113 (0.769-1.610)	0.571	-	-	1.354 (0.924-1.984)	0.121	-	-
miR-34a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.070 (0.734-1.561)	0.726	-	-	1.077 (0.734-1.578)	0.705	-	-
miR-146a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.096 (0.768-1.565)	0.614	-	-	1.058 (0.731-1.532)	0.763	-	-
miR-155 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.229 (0.856-1.763)	0.264	-	-	1.403 (0.967-2.035)	0.074	-	-
miR-195 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.092 (0.754-1.583)	0.641	-	-	1.363 (0.921-2.015)	0.121	-	-
miR-200b (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.163 (0.796-1.698)	0.436	-	-	1.268 (0.858-1.875)	0.234	-	-
miR-200c (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.212 (0.787-1.866)	0.383	-	-	1.750 (1.121-2.730)	0.014*	1.663 (1.022-2.706)	0.041*
miR-202 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.455 (1.000-2.118)	0.050*	1.616 (1.103-2.367)	0.014*	1.572 (1.063-2.326)	0.023*	1.251 (0.788-1.986)	0.343
miR-223 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.059 (0.742-1.511)	0.754	-	-	1.103 (0.762-1.597)	0.605	-	-

HR, Hazard Ratio, (αναλογία κινδύνου); CI, Confidence Intervals (διάστημα εμπιστοσύνης); ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status;

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης με βάση τη διάμεση τιμή για το κάθε miRNA; Cox regression, * $p < 0.05$.

Πίνακας 13: Μοντέλα Αναλογικής Παλινδρόμησης Κινδύνου Cox (Cox Proportional Hazard Regression Models) για το Διάστημα Ελεύθερο Υποτροπής και την Ολική Επιβίωση σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα (N=77), που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.

Μεταβλητή Παράμετρος	Διάστημα Ελεύθερο Υποτροπής				Ολική Επιβίωση			
	Μονοπαραγοντική Ανάλυση		Πολυπαραγοντική Ανάλυση		Μονοπαραγοντική Ανάλυση		Πολυπαραγοντική Ανάλυση	
	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value
Ηλικία (<60 vs. ≥60)	1.148 (0.705-1.871)	0.579	-	-	1.147 (0.703-1.873)	0.583	-	-
Φύλο (άρρεν vs. θήλυ)	1.685 (0.959-2.960)	0.070	-	-	1.305 (0.723-2.353)	0.377	-	-
ECOG PS (≥2 vs. 0-1)	1.535 (0.729-3.233)	0.259	-	-	2.459 (1.162-5.203)	0.019*	2.552 (1.187-5.485)	0.016*
Μεταστατικές Εστίες (≥3 vs. 0-2)	2.307 (1.363-3.905)	0.002*	-	-	1.816 (1.054-3.130)	0.032*	1.671 (0.923-3.023)	0.090
let-7c (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.042 (0.639-1.699)	0.870	-	-	1.101 (0.659-1.837)	0.714	-	-
miR-26a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.104 (0.684-1.783)	0.685	-	-	0.842 (0.511-1.387)	0.499	-	-
miR-30d (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.017 (0.632-1.635)	0.946	-	-	1.171 (0.714-1.919)	0.532	-	-
miR-34a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.090 (0.673-1.767)	0.726	-	-	1.104 (0.676-1.802)	0.693	-	-
miR-146a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.213 (0.765-1.922)	0.412	-	-	1.257 (0.777-2.033)	0.352	-	-
miR-155 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.036 (0.651-1.648)	0.881	-	-	1.110 (0.689-1.788)	0.668	-	-
miR-195 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.143 (0.701-1.863)	0.592	-	-	1.456 (0.874-2.425)	0.149	-	-
miR-200b (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.198 (0.735-1.952)	0.468	-	-	1.158 (0.702-1.910)	0.566	-	-
miR-200c (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.294 (0.753-2.224)	0.351	-	-	1.653 (0.950-2.878)	0.076	-	-
miR-202 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.613 (0.989-2.632)	0.055	-	-	1.909 (1.142-3.192)	0.014*	1.953 (1.162-3.282)	0.012*
miR-223 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.156 (0.729-1.832)	0.537	-	-	1.422 (0.876-2.308)	0.154	-	-

HR, Hazard Ratio, (αναλογία κινδύνου); CI, Confidence Intervals (διάστημα εμπιστοσύνης); ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status;

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης με βάση τη διάμεση τιμή για το κάθε miRNA; Cox regression, * $p < 0.05$.

Πίνακας 14: Μοντέλα Αναλογικής Παλινδρόμησης Κινδύνου Cox (Cox Proportional Hazard Regression Models) για το Διάστημα Ελεύθερο Υποτροπής και την Ολική Επιβίωση σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα (N=40), που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα.

Μεταβλητή Παράμετρος	Διάστημα Ελεύθερο Υποτροπής				Ολική Επιβίωση			
	Μονοπαραγοντική Ανάλυση		Πολυπαραγοντική Ανάλυση		Μονοπαραγοντική Ανάλυση		Πολυπαραγοντική Ανάλυση	
	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value
Ηλικία (<60 vs. ≥60)	1.486 (0.669-3.298)	0.331	-	-	1.459 (0.634-3.356)	0.374	-	-
ECOG PS (≥2 vs. 0-1)	1.077 (0.471-2.464)	0.860	-	-	2.401 (1.007-5.725)	0.048*	2.018 (0.834-4.887)	0.120
Στάδιο νόσου (IV vs. I-III)	1.326 (0.511-3.444)	0.562	-	-	1.558 (0.548-4.427)	0.405	-	-
Μεταστατικές Εστίες (≥3 vs. 0-2)	1.385 (0.479-4.001)	0.548	-	-	1.421 (0.487-4.149)	0.520	-	-
let-7c (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.431 (0.743-2.756)	0.284	-	-	1.282 (0.650-2.529)	0.473	-	-
miR-26a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.178 (0.607-2.286)	0.628	-	-	2.062 (1.012-4.203)	0.046*	1.389 (0.489-4.000)	0.532
miR-30d (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.435 (0.745-2.766)	0.280	-	-	1.804 (0.923-3.526)	0.084	-	-
miR-34a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.562 (0.758-3.219)	0.227	-	-	1.200 (0.584-2.466)	0.620	-	-
miR-146a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.171 (0.605-2.265)	0.639	-	-	1.303 (0.650-2.613)	0.455	-	-
miR-155 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	2.119 (1.044-4.300)	0.038*	-	-	2.210 (1.071-4.563)	0.032*	1.628 (0.553-4.793)	0.376
miR-195 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.382 (0.723-2.644)	0.328	-	-	1.427 (0.715-2.848)	0.314	-	-
miR-200b (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.208 (0.610-2.394)	0.588	-	-	1.533 (0.762-3.085)	0.231	-	-
miR-200c (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.029 (0.468-2.265)	0.943	-	-	1.646 (0.718-3.771)	0.239	-	-
miR-202 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.418 (0.731-2.752)	0.301	-	-	1.210 (0.606-2.416)	0.589	-	-
miR-223 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.184 (0.612-2.290)	0.615	-	-	1.440 (0.718-2.889)	0.304	-	-

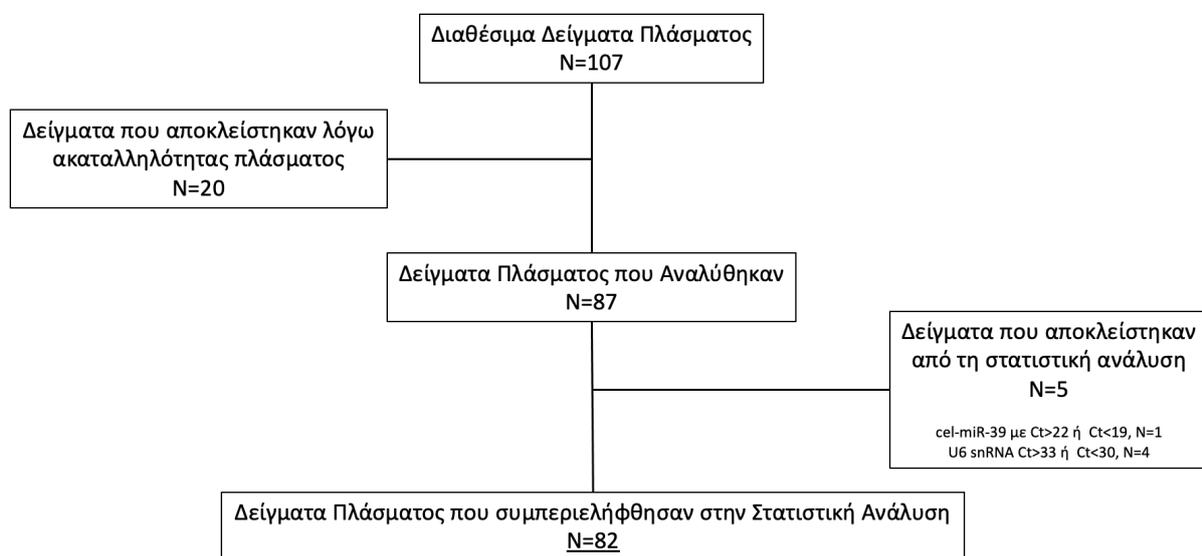
HR, Hazard Ratio, (αναλογία κινδύνου); CI, Confidence Intervals (διάστημα εμπιστοσύνης); ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status;

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης με βάση τη διάμεση τιμή για το κάθε miRNA; Cox regression, * $p < 0.05$.

3.2 Ο ρόλος των κυκλοφορούντων miRNAs σε ασθενείς με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1

Στο κεφάλαιο αυτό μελετήθηκε η έκφραση των κυκλοφορούντων miRNAs στο πλάσμα ασθενών με προχωρημένο ή μεταστατικό ΜΜΚΠ, οι οποίοι έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1 στην Παθολογική-Ογκολογική κλινική του ΠΑΓΝΗ κατά το χρονικό διάστημα 2017-2021 και συσχετίστηκε με την ανταπόκριση στη θεραπεία, το διάστημα ελεύθερο υποτροπής, την ολική επιβίωση και τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Η εύρεση και η επιλογή του δείγματος των ασθενών, καθώς επίσης και τα κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού περιγράφονται στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι» στην παράγραφο 2.2.

Συνολικά, στη μελέτη αυτή αναλύθηκαν 82 ασθενείς με ΜΜΚΠ, εκ των οποίων 15 ήταν γυναίκες (18.3%) και 67 άνδρες (81.7%). Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών ήταν τα 69 έτη (εύρος: 39-82), το 70.8% των ασθενών τη στιγμή της διάγνωσης βρίσκονταν ήδη σε μεταστατικό στάδιο και τέλος, το 48.8% των ασθενών είχε αδενοκαρκίνωμα ως ιστολογική εκτίμηση. Η ροή της μελέτης που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην Εικόνα 56 και τα χαρακτηριστικά των ασθενών συνοψίζονται στον Πίνακα 15.



Εικόνα 56: Σχηματική απεικόνιση της ροής της μελέτης της έκφρασης των κυκλοφορούντων miRNAs στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.

(N=αριθμός δείγματος, Ct=Cycle threshold, κατώφλι θετικότητας, cel-miR-39= εξωγενές γονίδιο αναφοράς, U6 snRNA= ενδογενές γονίδιο αναφοράς)

Πίνακας 15: Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με προχωρημένο ή μεταστατικό ΜΜΚΠ (N=82), που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.

Κλινικά Χαρακτηριστικά		Σύνολο Ασθενών		Αδενοκαρκίνωμα		Πλακώδες Καρκίνωμα		Άλλο		p value
		N	%	N	%	N	%	N	%	
Αριθμός Ασθενών		82	100	40	48.8	37	45.1	5	6.1	
Φύλο	Άρρεν	67	81.7	27	67.5	36	97.3	4	80.0	0.003 ^a
	Θήλυ	15	18.3	13	32.5	1	2.7	1	20.0	
Ηλικία	(έτη)	69 (39-82)		68.5 (39-82)		71 (55-81)		63 (50-72)		0.116 ^a
Λειτουργική Κατάσταση (ECOG PS)	0	26	31.7	16	40.0	9	24.3	1	20.0	0.447 ^a
	1	39	47.6	16	40.0	19	51.4	4	80.0	
	2	17	20.7	8	20.0	9	24.3	0	0	
Στάδιο Νόσου (Διάγνωση)	I	1	1.2	0	0	1	2.7	0	0	0.632 ^a
	II	2	2.4	2	5.0	0	0	0	0	
	III	21	25.6	11	27.5	8	21.6	2	40.0	
	IV	58	70.8	27	67.5	28	75.7	3	60.0	
Ιστολογική Ταξινόμηση	Αδενοκαρκίνωμα	40	48.8							ns ^a
	Πλακώδες Καρκίνωμα	37	45.1							
	Άλλο	5	6.1							
Ανοσοθεραπευτικό Σχήμα	Nivolumab	72	87.8	35	87.5	33	89.2	4	80.0	0.621 ^a
	Pembrolizumab	6	7.3	2	5.0	3	8.1	1	20.0	
	Atezolizumab	4	4.9	3	7.5	1	2.7	0	0	
Αριθμός Μεταστατικών Εστιών	0	2	2.4	1	2.5	1	2.7	0	0	0.032 ^a
	1	9	11.0	4	10.0	5	13.5	0	0	
	2	35	42.7	14	35.0	20	54.1	1	20.0	
	≥3	36	43.9	21	52.5	11	29.7	4	80.0	
Ανταπόκριση στη θεραπεία	Μερική Ανταπόκριση (PR)	8	9.8	6	15.0	2	5.4	0	0	0.480 ^a
	Σταθερή Νόσος (SD)	26	31.7	10	25.0	14	37.8	2	40.0	
	Πρόοδος Νόσου (PD)	48	58.5	24	60.0	21	56.8	3	60.0	

ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; PR, partial response; SD, stable disease; PD, progressive disease; ns, non-significant; ^aPearson's chi-squared test. Η ανταπόκριση στη θεραπεία εκτιμήθηκε με βάση τα «Response Evaluation Criteria in Solid Tumors» (RECIST 1.1 criteria) [487]; Ο αριθμός των μεταστατικών εστιών αφορά στα όργανα που έχουν προσβληθεί.

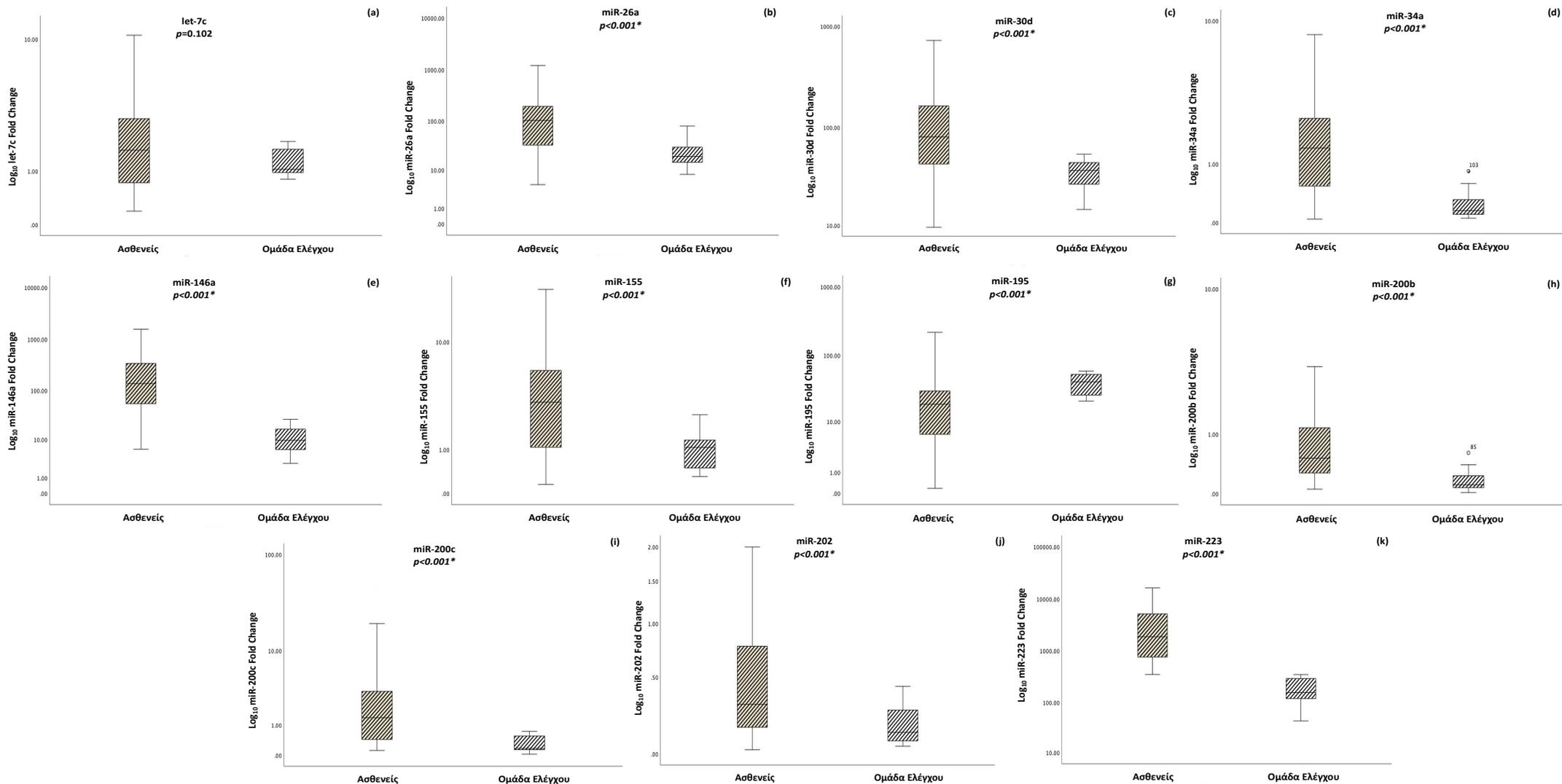
3.2.1 Ανάλυση της διαφορικής έκφρασης των miRNAs-στόχων στα δείγματα των ασθενών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου

Ο έλεγχος της διαφοροποίησης της έκφρασης των miRNAs-στόχων μεταξύ των δειγμάτων των ασθενών σε σχέση με τα δείγματα της ομάδας ελέγχου, πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμή Mann-Whitney U τεστ. Από την ανάλυση προέκυψε ότι στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση μεταξύ των δύο ομάδων παρουσίασε το miR-26a, το miR-30d, το miR-34a, το miR-146a, το miR-155, miR-195, το miR-200b, το miR-200c, το miR-202 και το miR-223. Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση των miR-26a ($p<0.001$), miR-30d ($p<0.001$), miR-34a ($p<0.001$), miR-146a ($p<0.001$), miR-155 ($p<0.001$), miR-200b ($p<0.001$), miR-200c ($p<0.001$), miR-202 ($p<0.001$) και miR-223 ($p<0.001$) ήταν υψηλότερη στα δείγματα των ασθενών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ αντίθετα η έκφραση του miR-195 ($p<0.001$) ήταν χαμηλότερη στα δείγματα των ασθενών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Μόνο για το let-7c δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην έκφραση μεταξύ της ομάδας των ασθενών και της ομάδας ελέγχου. Η μέση τιμή έκφρασης για το κάθε miRNA-στόχο, καθώς και η σχετική έκφραση για τα δείγματα των ασθενών και της ομάδας ελέγχου καταγράφονται στον Πίνακα 16. Στην Εικόνα 57 συγκεντρώνονται τα παραπάνω αποτελέσματα υπό μορφή διαγραμμάτων box plot.

Πίνακας 16: Μέση τιμή έκφρασης (Ct), τυπική απόκλιση (SD*) και σχετική έκφραση για κάθε miRNA-στόχο στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ (N=82), που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1, και της ομάδας ελέγχου (N=33).

	Ασθενείς με ΜΜΚΠ (N=82)			Ομάδα Ελέγχου (N=33)	
	Ct	SD*	Σχετική Έκφραση	Ct	SD*
<i>let-7c</i>	32.23	± 1.16	1.40	31.56	± 1.27
<i>miR-26a</i>	26.54	± 1.64	4.38	27.75	± 0.84
<i>miR-30d</i>	26.63	± 1.43	2.35	26.83	± 1.07
<i>miR-34a</i>	32.77	± 1.57	7.01	34.55	± 1.15
<i>miR-146a</i>	26.06	± 1.33	8.78	28.50	± 0.99
<i>miR-155</i>	31.52	± 1.19	2.70	32.02	± 0.77
<i>miR-195</i>	29.15	± 1.52	0.43	26.84	± 1.72
<i>miR-200b</i>	34.03	± 2.01	3.81	34.76	± 1.47
<i>miR-200c</i>	32.60	± 2.26	6.04	34.26	± 1.12
<i>miR-202</i>	33.95	± 1.77	2.30	34.39	± 1.55
<i>miR-223</i>	21.91	± 1.32	10.69	24.61	± 1.23

Ct, cycle threshold; SD*, standard deviation; η σχετική ποσοτικοποίηση για το κάθε miRNA-στόχο υπολογίστηκε με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Ct}$.



Εικόνα 57: Διαφορική έκφραση των *let-7c* (a), *miR-26a* (b), *miR-30d* (c), *miR-34a* (d), *miR-146a* (e), *miR-155* (f), *miR-195* (g), *miR-200b* (h), *miR-200c* (i), *miR-202* (j) και *miR-223* (k), μεταξύ των ασθενών με ΜΜΚΠ (N=82), που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1, και της ομάδας ελέγχου (N=33).

Η οριζόντια γραμμή απεικονίζει τη διάμεσο, ενώ το μήκος των πλαισίων είναι το διατεταρτημόριο που αντιπροσωπεύει τιμές μεταξύ του 75^{ου} και του 25^{ου} εκατοστημόριου των μεμονωμένων τιμών έκφρασης αλλαγής πτυχής. Οι σχετικές τιμές έκφρασης στον άξονα y απεικονίζονται σε κλίμακα \log_{10} . Τα επίπεδα έκφρασης υπολογίστηκαν με τη μέθοδο $2^{-\Delta C_t}$.

3.2.2 Συσχέτιση των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών με την έκφραση των miRNAs-στόχων

Όπως αναλύθηκε στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι» στην παράγραφο 2.8, οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την έκφραση των μορίων που μελετήθηκαν σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Πιο συγκεκριμένα, τιμές έκφρασης μεγαλύτερες ή ίσες της διάμεσης για κάθε miRNA χαρακτηρίστηκαν ως υψηλής έκφρασης, ενώ τιμές μικρότερες της διάμεσης για κάθε miRNA χαρακτηρίστηκαν ως χαμηλής έκφρασης, αντιστοίχως. Ο έλεγχος της συσχέτισης των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών με την έκφραση των miRNAs-στόχων πραγματοποιήθηκε στο σύνολο των ασθενών, καθώς και στους δύο βασικούς ιστολογικούς υποτύπους του ΜΜΚΠ, δηλαδή για τους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και για τους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα. Η στατιστική σημασία ορίστηκε στο $p < 0.05$ (δοκιμή διπλής όψης, two-sided test).

Οι παράμετροι οι οποίοι ελέγχθηκαν ήταν η ηλικία (>60 vs. <60), το φύλο (άρρεν vs. θήλυ), η λειτουργική κατάσταση (PS, 0-1 vs. ≥ 2), το στάδιο νόσου (I-III vs. IV), ο ιστολογικός υπότυπος (αδενοκαρκίνωμα vs. πλακώδες καρκίνωμα), ο αριθμός των μεταστατικών εστιών (0-2 vs. ≥ 3), η παρουσία εγκεφαλικών μεταστάσεων (ναι vs. όχι), η παρουσία ηπατικών μεταστάσεων (ναι vs. όχι), η παρουσία οστικών μεταστάσεων (ναι vs. όχι), η αντικειμενική ανταπόκριση στη θεραπεία (ORR, PR vs. SD/PD), η ελεγχόμενη πορεία νόσου (DCR, PR/SD vs. PD) και η παρατεταμένη ελεγχόμενη νόσος (PDDC, PR/SD > 6 μήνες vs. SD < 6 μήνες/PD).

Από την ανάλυση προέκυψε ότι όλα τα προαναφερθέντα κλινικά χαρακτηριστικά παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την έκφραση των miRNAs-στόχων, εκτός από την ηλικία, το φύλο, την παρουσία εγκεφαλικών μεταστάσεων και την αντικειμενική ανταπόκριση στη θεραπεία. Λόγω πολύ μεγάλου όγκου πληροφοριών, απεικονίζονται μόνο οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις.

- Συσχέτιση της κλίμακας λειτουργικής κατάστασης με την έκφραση των miRNAs-στόχων

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την κλίμακα λειτουργικής κατάστασης σε 2 επιμέρους ομάδες (0-1 vs. ≥ 2) και ελέγχθηκε η συσχέτιση με την έκφραση των miRNAs-στόχων (υψηλή vs. χαμηλή), αρχικά στο σύνολο του πληθυσμού (N=82) και κατόπιν στους 2 βασικούς ιστολογικούς υπότυπους (αδενοκαρκίνωμα, N=40 και πλακώδες καρκίνωμα, N=37).

Από την ανάλυση προέκυψε ότι στο σύνολο των ασθενών (N=82), υψηλή έκφραση του let-7c παρουσίασε το 58.5% των ασθενών με PS:0-1, ενώ χαμηλή έκφραση του let-7c παρουσίασε το 81.3% των ασθενών με PS ≥ 2 ($p=0.004$, Εικόνα 58). Επίσης, υψηλή έκφραση του miR-26a παρουσίασε το 55.4% των ασθενών με PS:0-1, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-26a παρουσίασε το 70.6% των ασθενών με PS ≥ 2 ($p=0.050$, Εικόνα 59). Τέλος, υψηλή έκφραση του miR-30d παρουσίασε το 60.0% των ασθενών με PS:0-1, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-30d παρουσίασε το 88.2% των ασθενών με PS ≥ 2 ($p<0.001$, Εικόνα 60).

Στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα (N=37) ως ιστολογική εκτίμηση, υψηλή έκφραση του miR-30d παρουσίασε το 53.6% των ασθενών με PS:0-1, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-30d παρουσίασε το 100% των ασθενών με PS ≥ 2 ($p=0.004$, Εικόνα 60).

Δεν παρατηρήθηκαν άλλες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις της κλίμακας λειτουργικής κατάστασης με την έκφραση των miRNAs-στόχων.



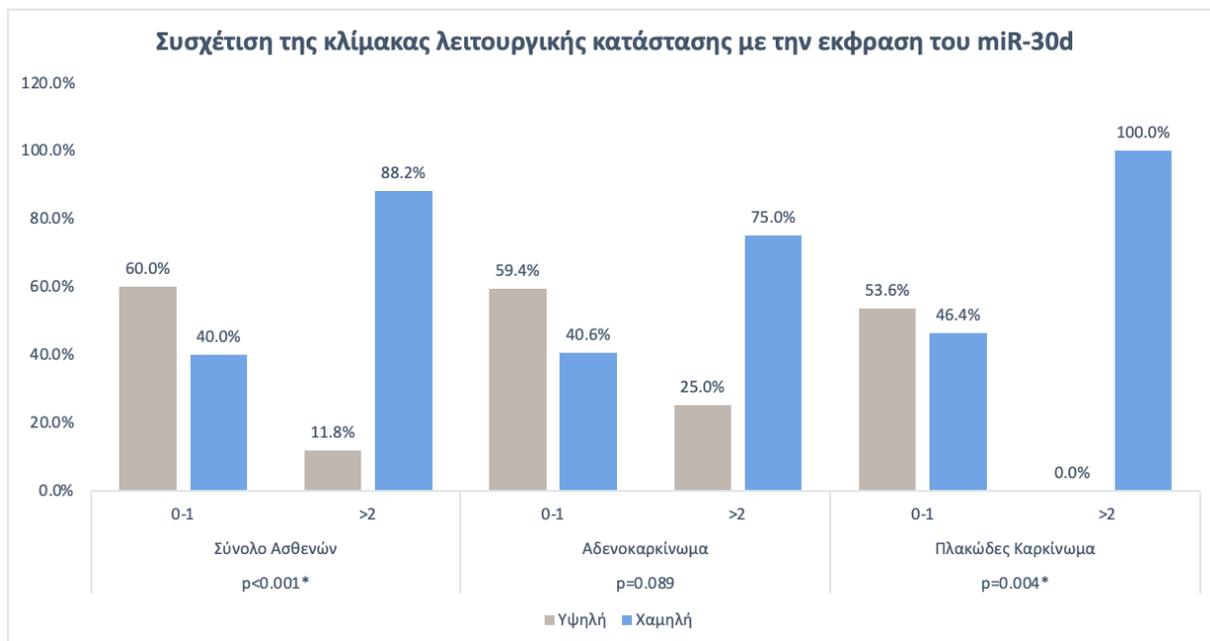
Εικόνα 58: Συσχέτιση της κλίμακας λειτουργικής κατάστασης των ασθενών με την έκφραση του let-7c, στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.



Εικόνα 59: Συσχέτιση της κλίμακας λειτουργικής κατάστασης των ασθενών με την έκφραση του miR-26a, στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.



Εικόνα 60: Συσχέτιση της κλίμακας λειτουργικής κατάστασης των ασθενών με την έκφραση του miR-26a, στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.

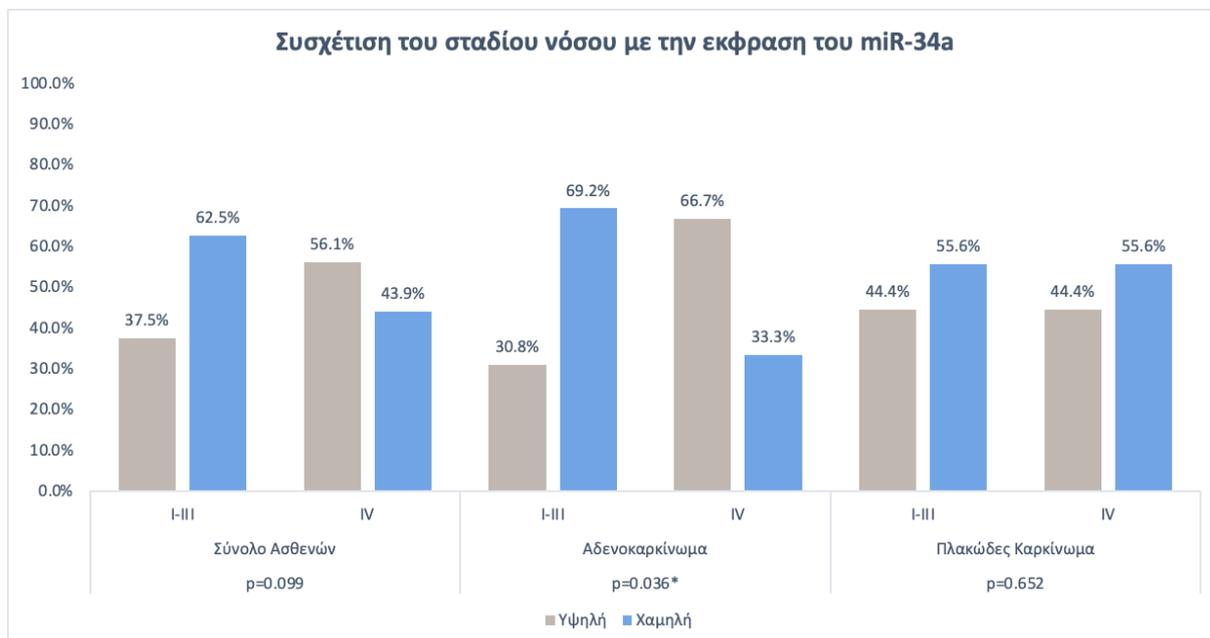
- Συσχέτιση του σταδίου νόσου με την έκφραση των miRNAs-στόχων

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση το στάδιο νόσου κατά τη διάγνωση σε 2 επιμέρους ομάδες (I-III vs. IV) και ελέγχθηκε η συσχέτιση με την έκφραση των miRNAs-στόχων (υψηλή vs. χαμηλή), στο σύνολο του πληθυσμού (N=82) και κατόπιν στους 2 βασικούς ιστολογικούς υπότυπους (αδενοκαρκίνωμα, N=40 και πλακώδες καρκίνωμα, N=37).

Από την ανάλυση προέκυψε ότι στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα (N=40) ως ιστολογική εκτίμηση, χαμηλή έκφραση του miR-34a παρουσίασε το 69.2% των ασθενών σταδίου I-III, ενώ υψηλή έκφραση του miR-34a παρουσίασε το 66.7% των ασθενών σταδίου IV ($p=0.036$, Εικόνα 61).

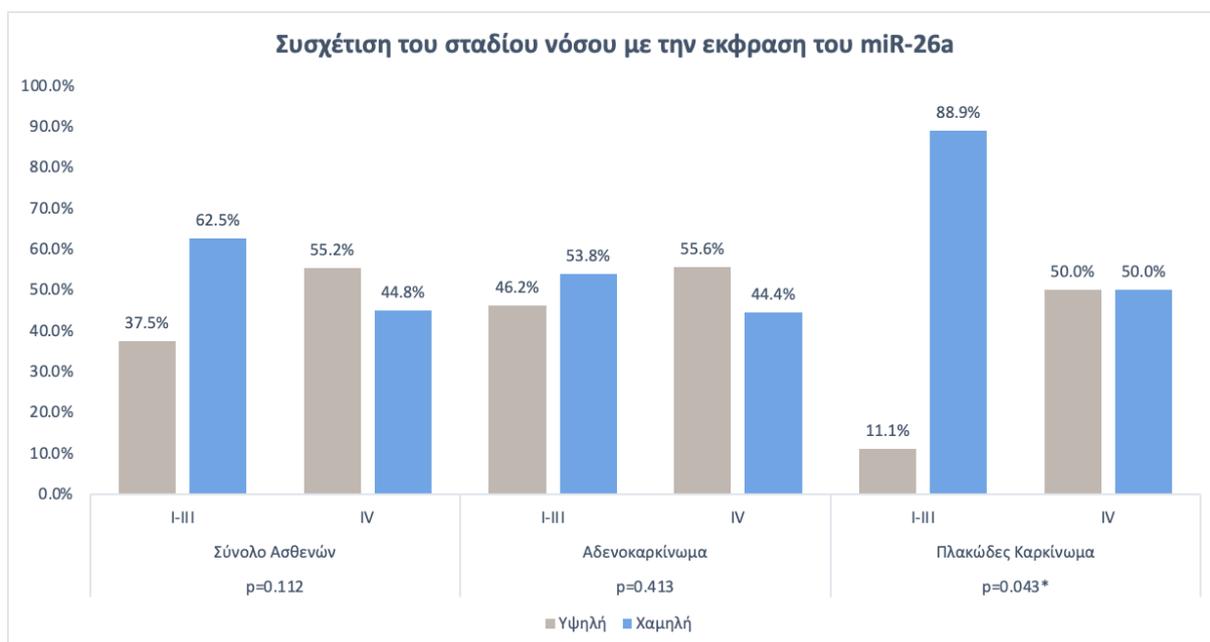
Στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα (N=37) ως ιστολογική εκτίμηση, χαμηλή έκφραση του miR-26a παρουσίασε το 88.9% των ασθενών σταδίου I-III, ενώ υψηλή έκφραση του miR-26a παρουσίασε το 50.0% των ασθενών σταδίου IV ($p=0.043$, Εικόνα 62).

Δεν παρατηρήθηκαν άλλες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις του σταδίου νόσου με την έκφραση των miRNAs-στόχων.



Εικόνα 61: Συσχέτιση του σταδίου νόσου με την έκφραση του miR-34a, στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.



Εικόνα 62: Συσχέτιση του σταδίου νόσου με την έκφραση του miR-26a, στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

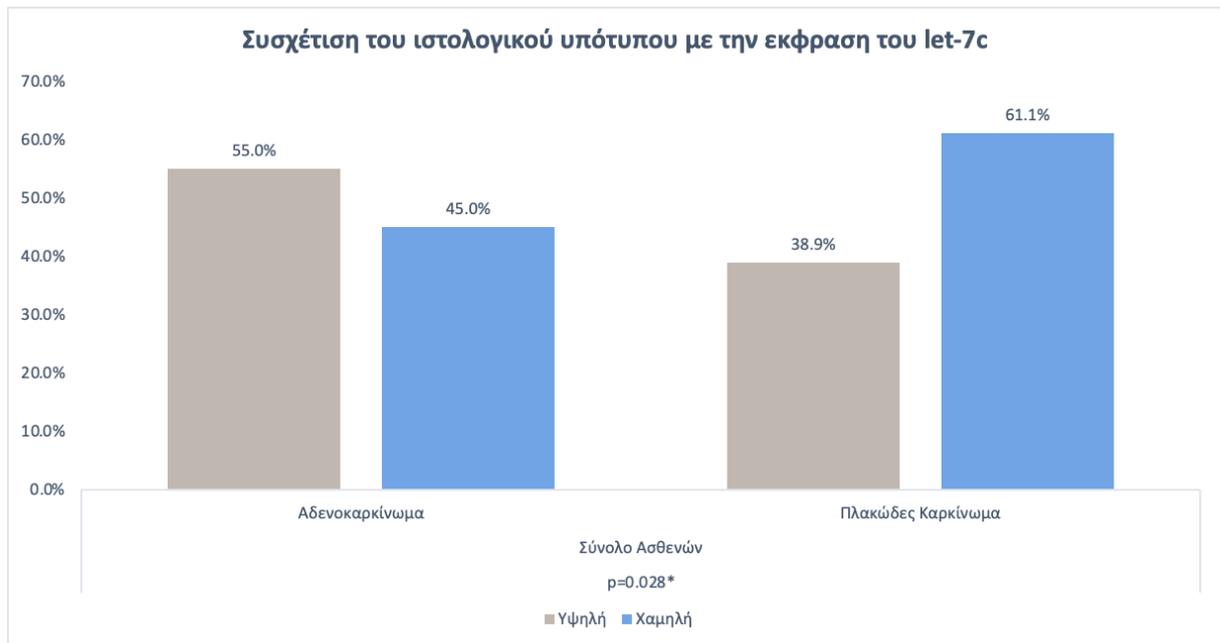
Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.

- Συσχέτιση της ιστολογικής ταξινόμησης με την έκφραση των miRNAs-στόχων

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τον ιστολογικό τους υπότυπο σε 2 επιμέρους ομάδες (αδενοκαρκίνωμα vs. πλακώδες καρκίνωμα) και ελέγχθηκε η συσχέτιση με την έκφραση των miRNAs-στόχων (υψηλή vs. χαμηλή), στο σύνολο του πληθυσμού (N=82).

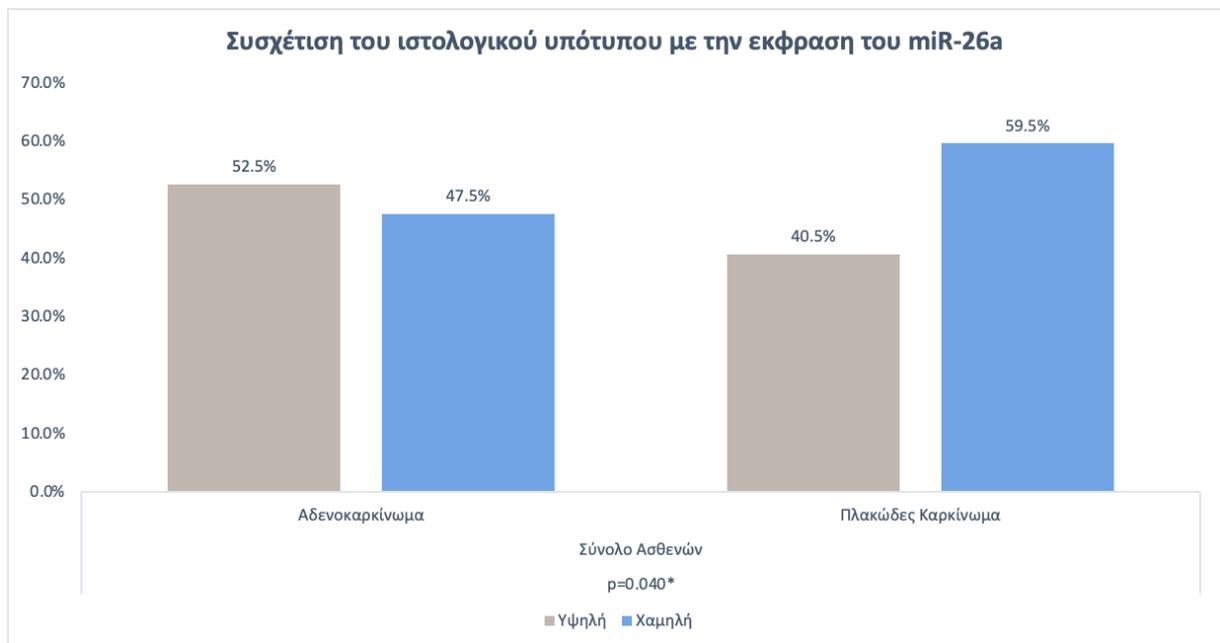
Από την ανάλυση προέκυψε ότι υψηλή έκφραση του let-7c παρουσίασε το 55.0% των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα, ενώ χαμηλή έκφραση του let-7c παρουσίασε το 61.1% των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα ($p=0.028$, Εικόνα 63). Επίσης, υψηλή έκφραση του miR-26a παρουσίασε το 52.5% των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-26a παρουσίασε το 59.5% των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα ($p=0.040$, Εικόνα 64). Υψηλή έκφραση του miR-30d παρουσίασε το 52.5% των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-30d παρουσίασε το 59.5% των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα ($p=0.040$, Εικόνα 65). Επιπρόσθετα, υψηλή έκφραση του miR-146a παρουσίασε το 55.0% των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-146a παρουσίασε το 62.2% των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα ($p=0.022$, Εικόνα 66). Τέλος, υψηλή έκφραση του miR-200b παρουσίασε το 64.1% των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-200b παρουσίασε το 67.5% των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα ($p=0.009$, Εικόνα 67).

Δεν παρατηρήθηκαν άλλες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις του ιστολογικού υπότυπου με την έκφραση των miRNAs-στόχων.



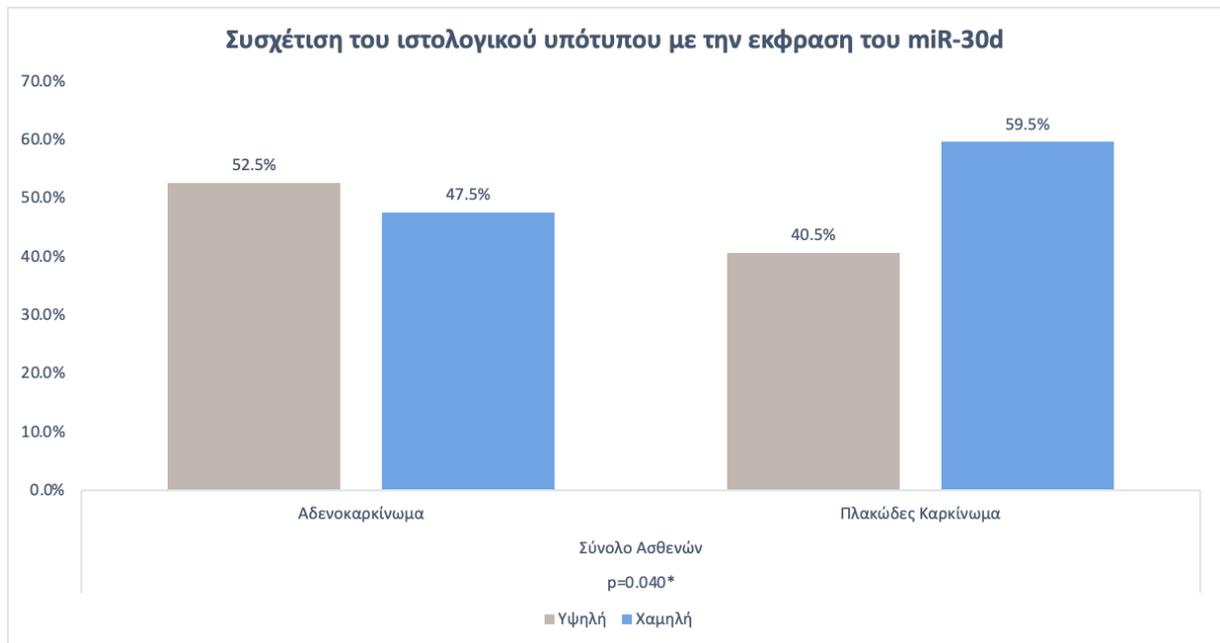
Εικόνα 63: Συσχέτιση του ιστολογικού υπότυπου των ασθενών με την έκφραση του let-7c στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.



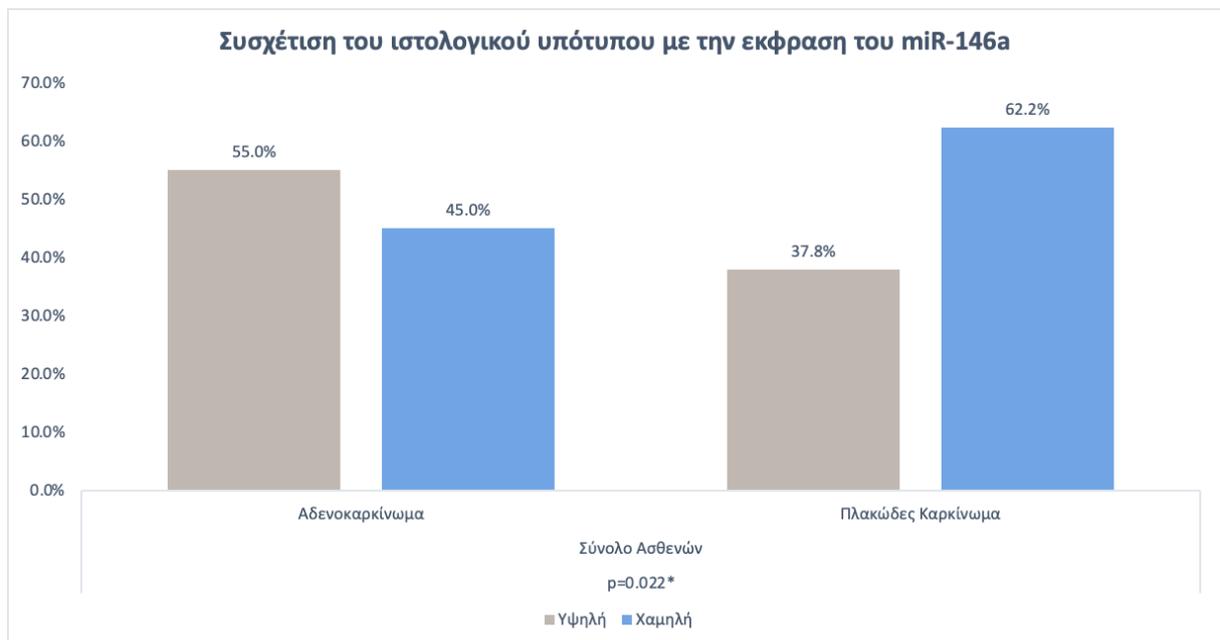
Εικόνα 64: Συσχέτιση του ιστολογικού υπότυπου των ασθενών με την έκφραση του miR-26a στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.



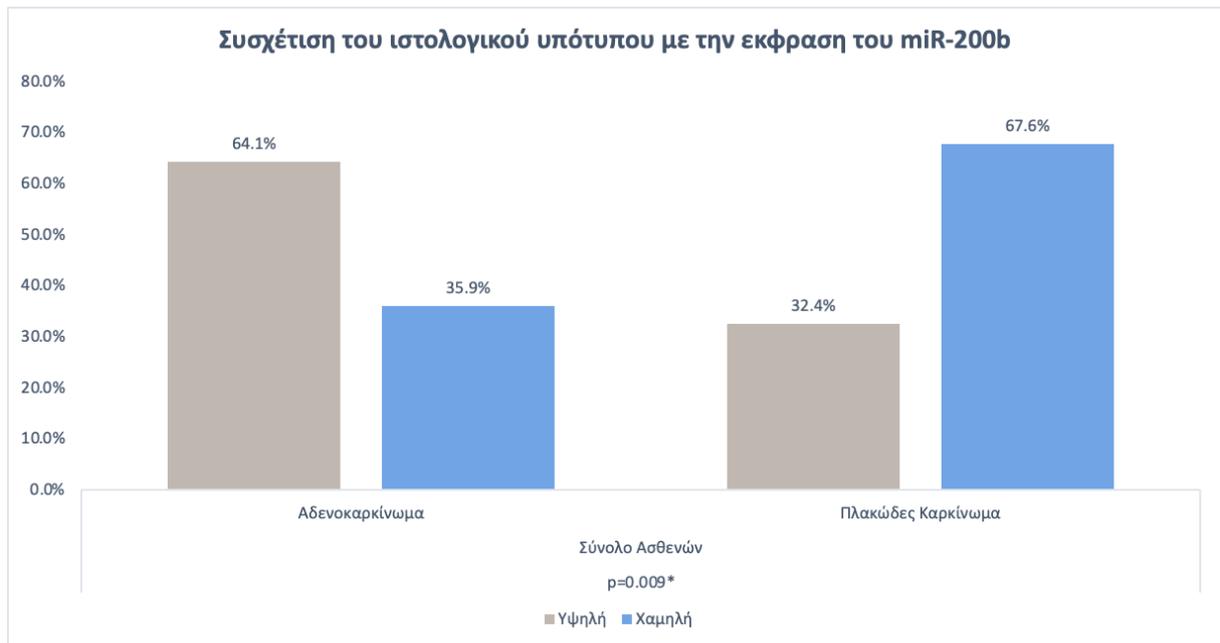
Εικόνα 65: Συσχέτιση του ιστολογικού υπότυπου των ασθενών με την έκφραση του miR-30d στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.



Εικόνα 66: Συσχέτιση του ιστολογικού υπότυπου των ασθενών με την έκφραση του miR-146a στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.



Εικόνα 67: Συσχέτιση του ιστολογικού υπότυπου των ασθενών με την έκφραση του miR-30d στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.

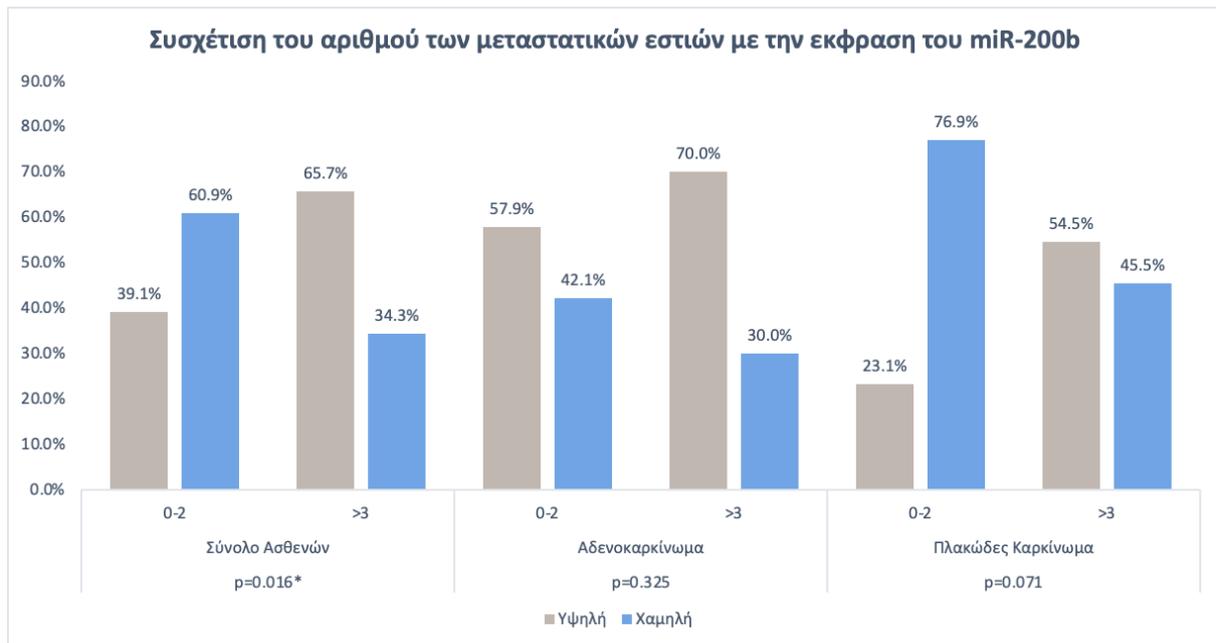
- Συσχέτιση του αριθμού των μεταστατικών εστιών με την έκφραση των miRNAs-στόχων

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τον αριθμό των μεταστατικών εστιών σε 2 επιμέρους ομάδες (0-2 vs. ≥ 3) και ελέγχθηκε η συσχέτιση με την έκφραση των miRNAs-στόχων (υψηλή vs. χαμηλή), αρχικά στο σύνολο των ασθενών (N=82) και κατόπιν στους 2 βασικούς ιστολογικούς υπότυπους (αδenoκαρκίνωμα, N=40 και πλακώδες καρκίνωμα, N=37).

Από την ανάλυση προέκυψε ότι στο σύνολο των ασθενών (N=82), χαμηλή έκφραση του miR-200b παρουσίασε το 60.9% των ασθενών με 0-2 μεταστατικές εστίες, ενώ υψηλή έκφραση του miR-200b παρουσίασε το 65.7% των ασθενών με ≥ 3 μεταστατικές εστίες ($p=0.016$, Εικόνα 68).

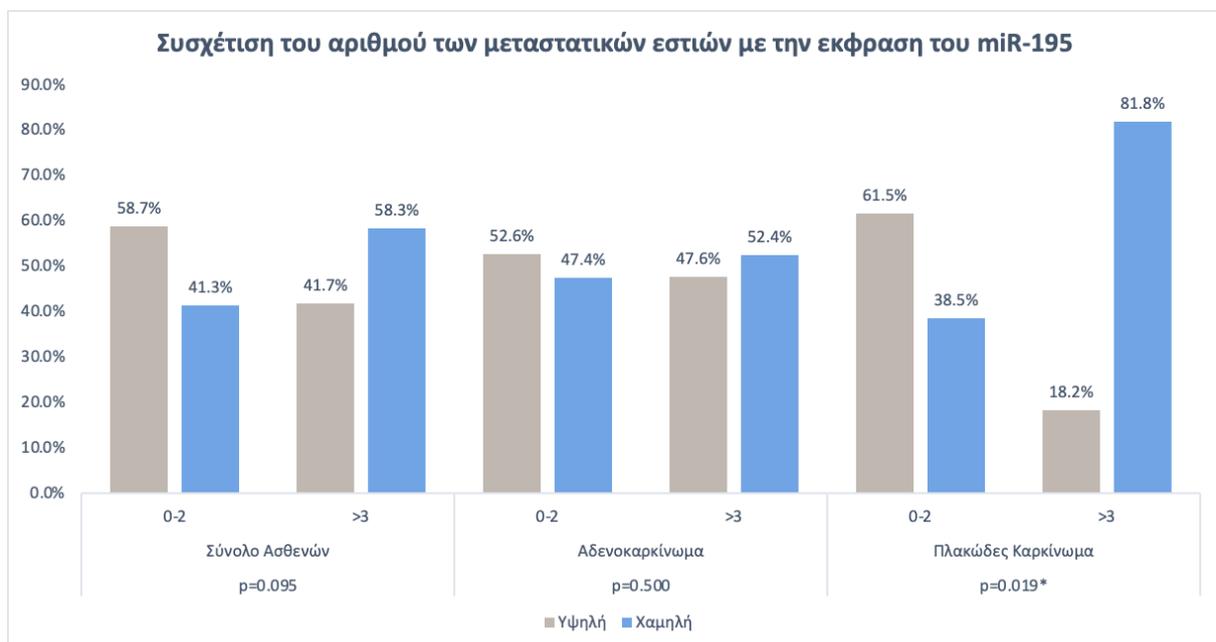
Στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα (N=37) ως ιστολογική εκτίμηση, υψηλή έκφραση του miR-195 παρουσίασε το 61.5% των ασθενών με 0-2 μεταστατικές εστίες, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-195 παρουσίασε το 81.8% των ασθενών με ≥ 3 μεταστατικές εστίες ($p=0.019$, Εικόνα 69).

Δεν παρατηρήθηκαν άλλες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις του αριθμού των μεταστατικών εστιών με την έκφραση των miRNAs-στόχων.



Εικόνα 68: Συσχέτιση του αριθμού των μεταστατικών εστιών των ασθενών με την έκφραση του miR-200b στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.



Εικόνα 69: Συσχέτιση του αριθμού των μεταστατικών εστιών των ασθενών με την έκφραση του miR-195 στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.

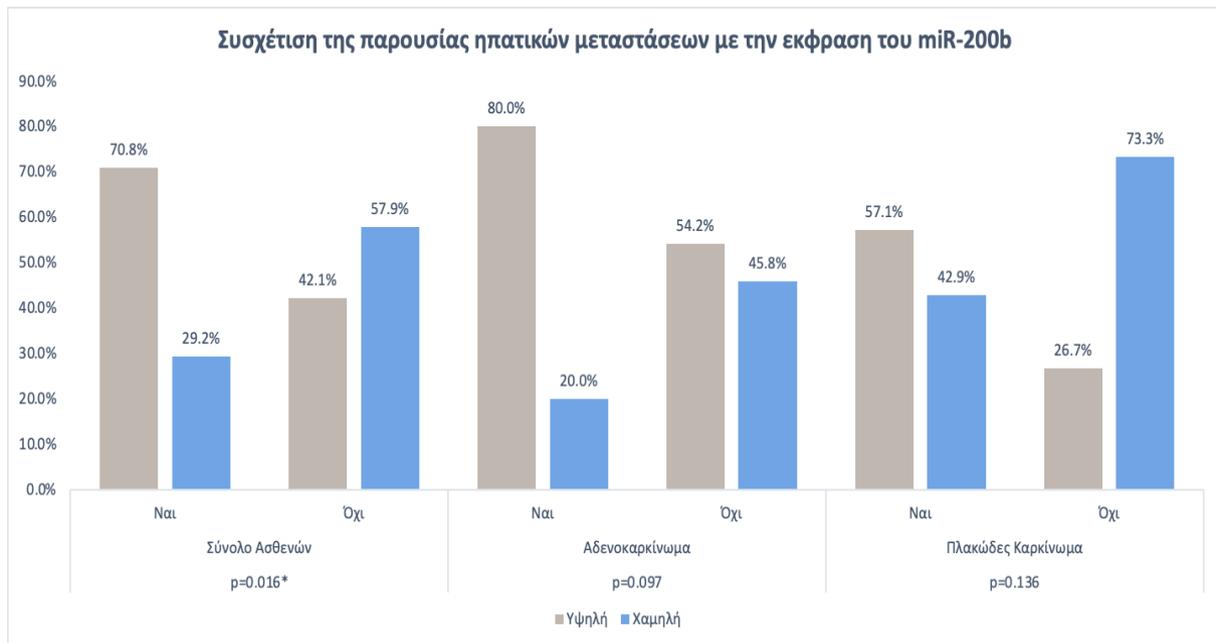
- Συσχέτιση της παρουσίας ηπατικών μεταστάσεων με την έκφραση των miRNAs-στόχων

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την παρουσία ηπατικών μεταστάσεων σε 2 επιμέρους ομάδες (ναι vs. όχι) και ελέγχθηκε η συσχέτιση με την έκφραση των miRNAs-στόχων (υψηλή vs. χαμηλή), αρχικά στο σύνολο των ασθενών (N=82) και κατόπιν στους 2 βασικούς ιστολογικούς υπότυπους (αδενοκαρκίνωμα, N=40 και πλακώδες καρκίνωμα, N=37).

Από την ανάλυση προέκυψε ότι στο σύνολο των ασθενών (N=82), υψηλή έκφραση του miR-200b παρουσίασε το 70.8% των ασθενών με παρουσία ηπατικών μεταστάσεων, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-200b παρουσίασε το 57.9% των ασθενών με απουσία ηπατικών μεταστάσεων ($p=0.016$, Εικόνα 70). Ακόμη, υψηλή έκφραση του miR-200c παρουσίασε το 72.7% των ασθενών με παρουσία ηπατικών μεταστάσεων, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-200c παρουσίασε το 60.9% των ασθενών με απουσία ηπατικών μεταστάσεων ($p=0.009$, Εικόνα 71). Τέλος, χαμηλή έκφραση του miR-202 παρουσίασε το 68.2% των ασθενών με παρουσία ηπατικών μεταστάσεων, ενώ υψηλή έκφραση του miR-202 παρουσίασε το 58.2% των ασθενών με απουσία ηπατικών μεταστάσεων ($p=0.032$, Εικόνα 72).

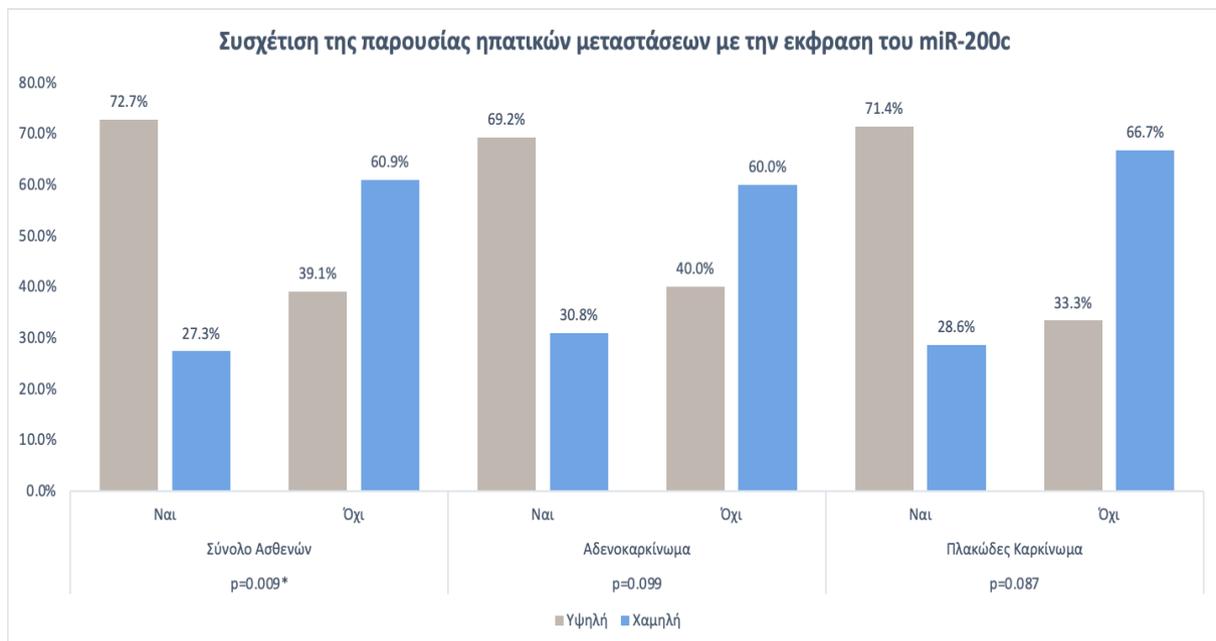
Στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα (N=37) ως ιστολογική εκτίμηση, χαμηλή έκφραση του miR-202 παρουσίασε το 83.3% των ασθενών με παρουσία ηπατικών μεταστάσεων, ενώ υψηλή έκφραση του miR-202 παρουσίασε το 65.5% των ασθενών με απουσία ηπατικών μεταστάσεων ($p=0.040$, Εικόνα 72).

Δεν παρατηρήθηκαν άλλες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις της παρουσίας ηπατικών μεταστάσεων με την έκφραση των miRNAs-στόχων.



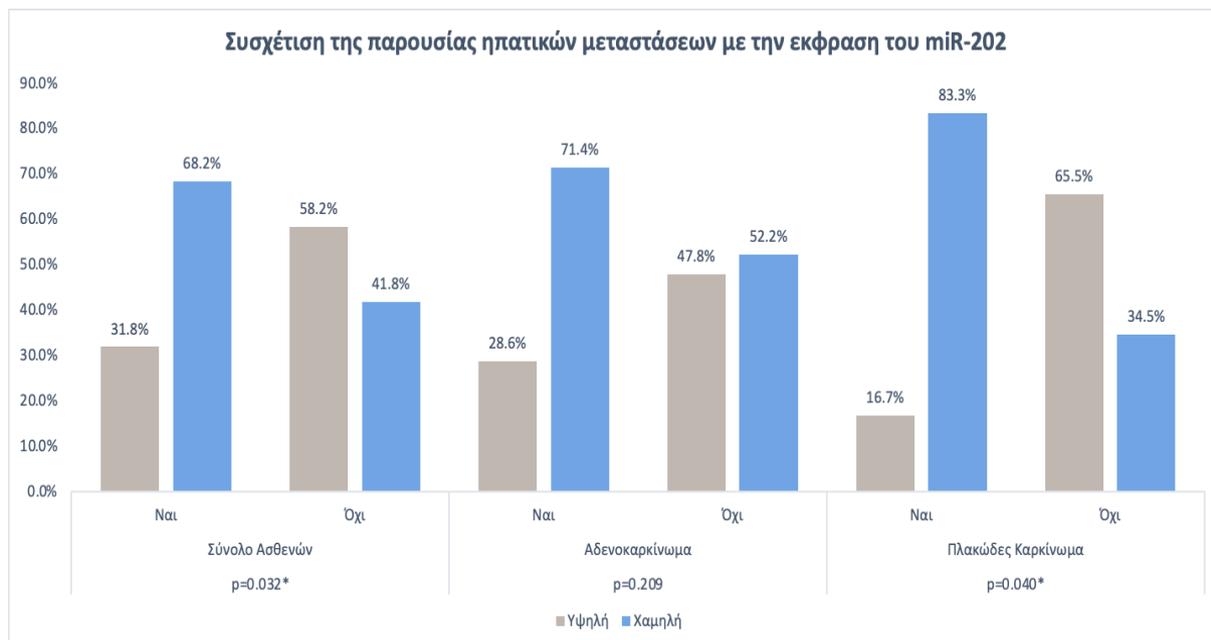
Εικόνα 70: Συσχέτιση της παρουσίας ηπατικών μεταστάσεων των ασθενών με την έκφραση του miR-200b στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.



Εικόνα 71: Συσχέτιση της παρουσίας ηπατικών μεταστάσεων των ασθενών με την έκφραση του miR-200c στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.



Εικόνα 72: Συσχέτιση της παρουσίας ηπατικών μεταστάσεων των ασθενών με την έκφραση του miR-202 στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.

- Συσχέτιση της παρουσίας οστικών μεταστάσεων με την έκφραση των miRNAs-στόχων

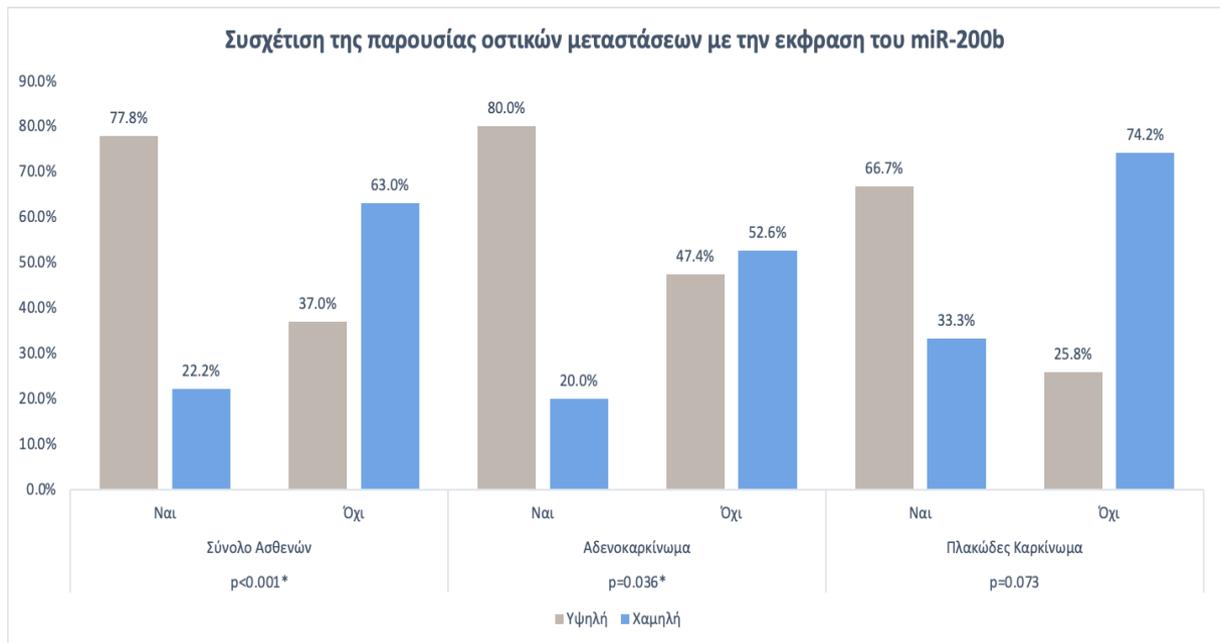
Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την παρουσία οστικών μεταστάσεων σε 2 επιμέρους ομάδες (ναι vs. όχι) και ελέγχθηκε η συσχέτιση με την έκφραση των miRNAs-στόχων (υψηλή vs. χαμηλή), αρχικά στο σύνολο των ασθενών (N=82) και κατόπιν στους 2 βασικούς ιστολογικούς υπότυπους (αδενοκαρκίνωμα, N=40 και πλακώδες καρκίνωμα, N=37).

Από την ανάλυση προέκυψε ότι στο σύνολο των ασθενών (N=82), υψηλή έκφραση του miR-200b παρουσίασε το 77.8% των ασθενών με παρουσία οστικών μεταστάσεων, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-200b παρουσίασε το 63.0% των ασθενών με απουσία οστικών μεταστάσεων ($p < 0.001$, Εικόνα 73). Ακόμη, υψηλή έκφραση του miR-200c παρουσίασε το 70.8% των ασθενών με παρουσία οστικών μεταστάσεων, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-200c παρουσίασε το 61.4% των ασθενών με απουσία οστικών μεταστάσεων ($p = 0.011$, Εικόνα 74).

Στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα (N=40) ως ιστολογική εκτίμηση, υψηλή έκφραση του miR-200b παρουσίασε το 80.0% των ασθενών με παρουσία οστικών μεταστάσεων, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-200b παρουσίασε το 52.6% των ασθενών με απουσία οστικών μεταστάσεων ($p = 0.036$, Εικόνα 73).

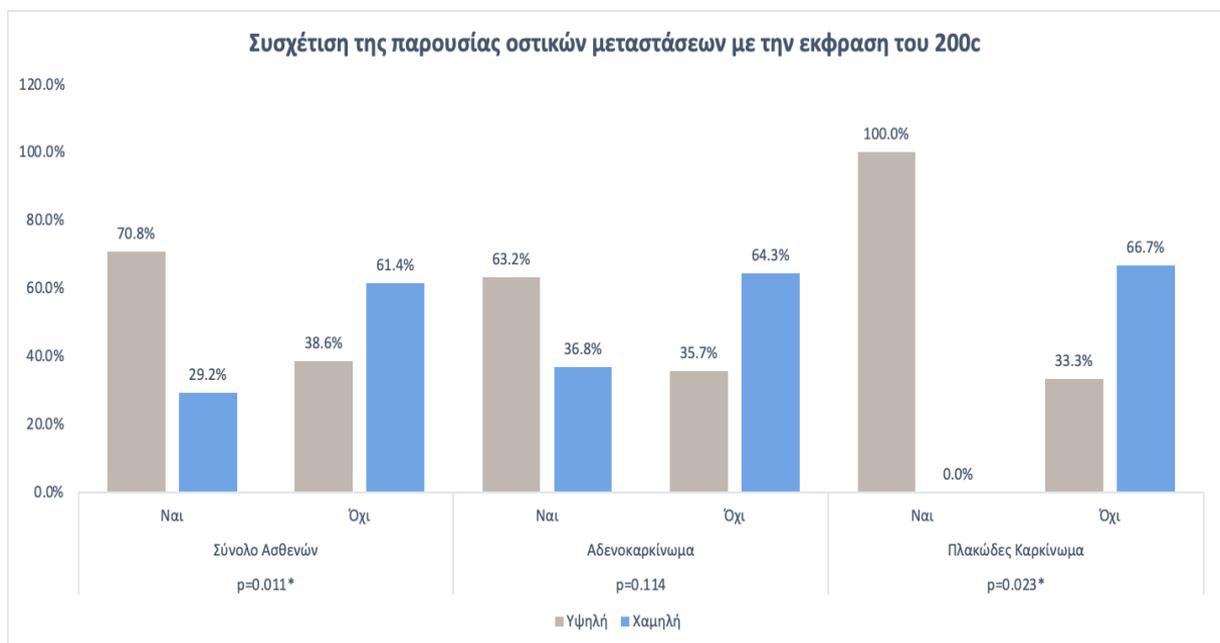
Στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα (N=37) ως ιστολογική εκτίμηση, υψηλή έκφραση του miR-200c παρουσίασε το 100% των ασθενών με παρουσία οστικών μεταστάσεων, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-200c παρουσίασε το 66.7% των ασθενών με απουσία οστικών μεταστάσεων ($p = 0.023$, Εικόνα 74).

Δεν παρατηρήθηκαν άλλες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις της παρουσίας οστικών μεταστάσεων με την έκφραση των miRNAs-στόχων.



Εικόνα 73: Συσχέτιση της παρουσίας οστικών μεταστάσεων των ασθενών με την έκφραση του miR- 200b στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.



Εικόνα 74: Συσχέτιση της παρουσίας οστικών μεταστάσεων των ασθενών με την έκφραση του miR- 200c στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.

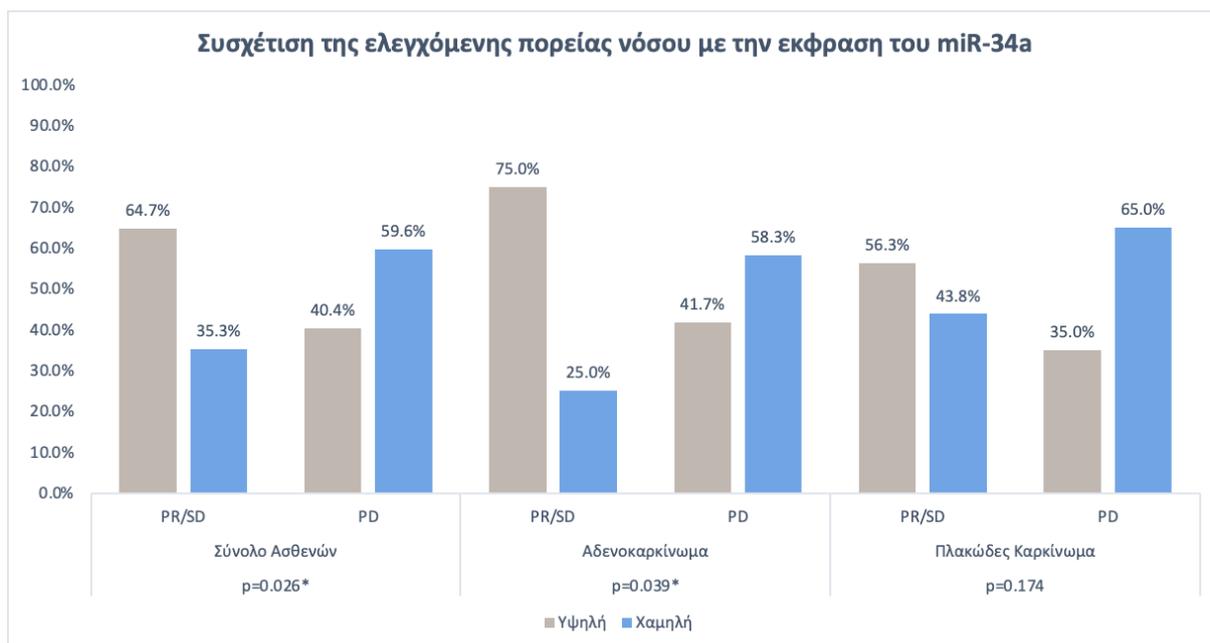
- Συσχέτιση της ελεγχόμενης πορείας νόσου με την έκφραση των miRNAs-στόχων

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την ελεγχόμενη πορεία νόσου σε 2 επιμέρους ομάδες (PR/SD vs. PD) και ελέγχθηκε η συσχέτιση με την έκφραση των miRNAs-στόχων (υψηλή vs. χαμηλή), αρχικά στο σύνολο των ασθενών (N=82) και κατόπιν στους 2 βασικούς ιστολογικούς υπότυπους (αδενοκαρκίνωμα, N=40 και πλακώδες καρκίνωμα, N=37).

Από την ανάλυση προέκυψε ότι στο σύνολο των ασθενών (N=82), υψηλή έκφραση του miR-34a παρουσίασε το 64.7% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως PR/SD, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-34a παρουσίασε το 35.3% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως PD ($p=0.026$, Εικόνα 75).

Στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα (N=40) ως ιστολογική εκτίμηση, υψηλή έκφραση του miR-34a παρουσίασε το 75.0% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως PR/SD, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-34a παρουσίασε το 25.0% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως PD ($p=0.039$, Εικόνα 75).

Δεν παρατηρήθηκαν άλλες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις της ελεγχόμενης πορείας νόσου με την έκφραση των miRNAs-στόχων.



Εικόνα 75: Συσχέτιση της ελεγχόμενης πορείας νόσου των ασθενών με την έκφραση του miR-34a στο σύνολο των ασθενών, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.

- Συσχέτιση της παρατεταμένης ελεγχόμενης νόσου με την έκφραση των miRNAs-στόχων

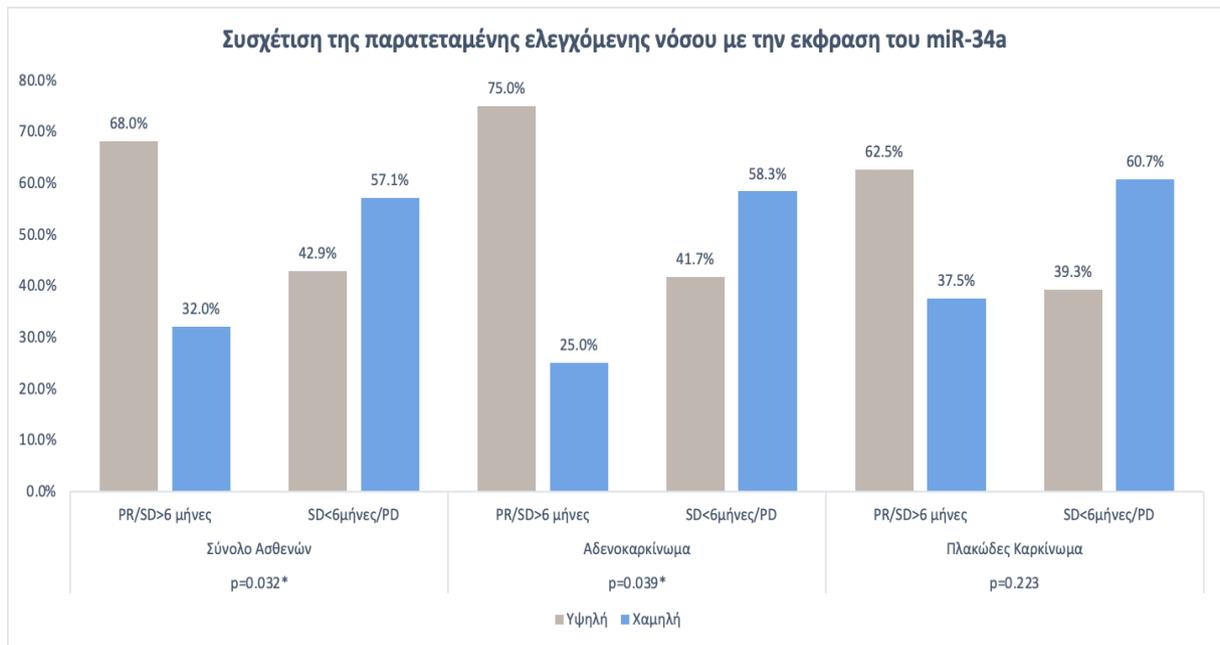
Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την παρατεταμένη ελεγχόμενη νόσο σε 2 επιμέρους ομάδες (PR/SD>6μήνες vs. SD<6μήνες/PD) και ελέγχθηκε η συσχέτιση με την έκφραση των miRNAs-στόχων (υψηλή vs. χαμηλή), αρχικά στο σύνολο των ασθενών (N=82) και κατόπιν στους 2 βασικούς ιστολογικούς υπότυπους (αδενοκαρκίνωμα, N=40 και πλακώδες καρκίνωμα, N=37).

Από την ανάλυση προέκυψε ότι στο σύνολο των ασθενών (N=82), υψηλή έκφραση του miR-34a παρουσίασε το 68.0% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως PR/SD>6μήνες, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-34a παρουσίασε το 57.1% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως SD<6μήνες/PD ($p=0.032$, Εικόνα 76) και παράλληλα, υψηλή έκφραση του miR-195 παρουσίασε το 68.0% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως PR/SD>6μήνες, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-195 παρουσίασε το 56.1% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως SD<6μήνες/PD ($p=0.037$, Εικόνα 77).

Στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα (N=40) ως ιστολογική εκτίμηση, υψηλή έκφραση του miR-34a παρουσίασε το 75.0% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως PR/SD>6μήνες, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-34a παρουσίασε το 58.3% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως SD<6μήνες/PD ($p=0.039$, Εικόνα 76).

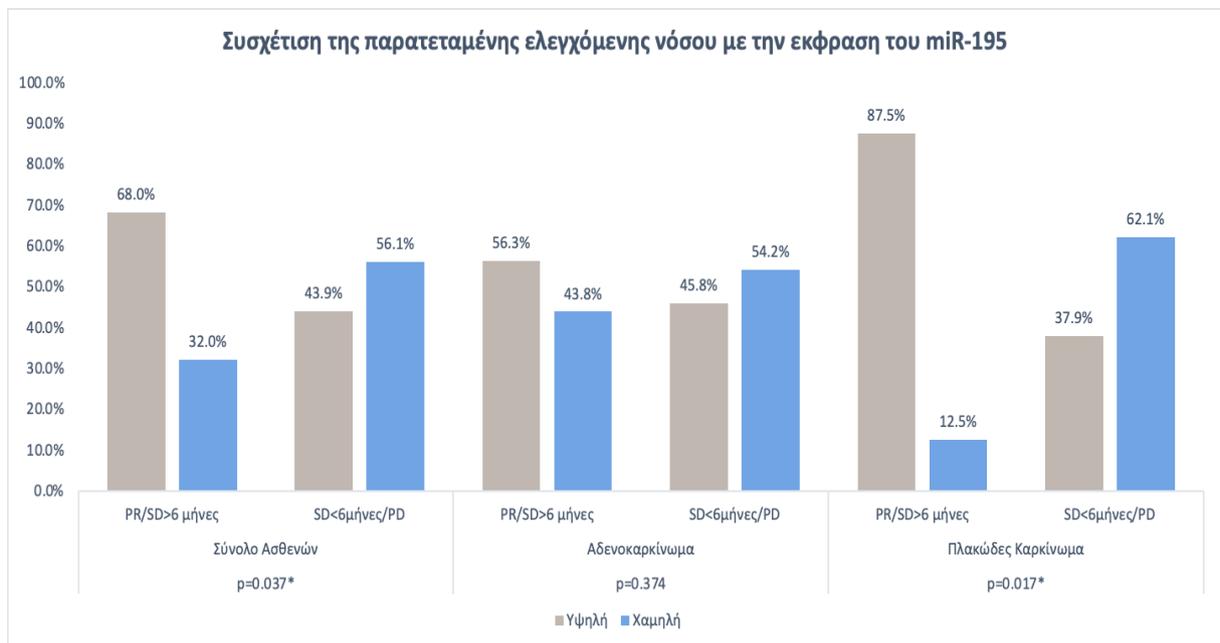
Στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα (N=37) ως ιστολογική εκτίμηση, υψηλή έκφραση του miR-30d παρουσίασε το 75.0% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως PR/SD>6μήνες, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-30d παρουσίασε το 69.0% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως SD<6μήνες/PD ($p=0.034$, Εικόνα 78). Επιπλέον, υψηλή έκφραση του miR-146a παρουσίασε το 75.0% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως PR/SD>6μήνες, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-146a παρουσίασε το 72.4% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως SD<6μήνες/PD ($p=0.022$, Εικόνα 79). Ακόμη, υψηλή έκφραση του miR-195 παρουσίασε το 87.5% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως PR/SD>6μήνες, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-195 παρουσίασε το 62.1% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως SD<6μήνες/PD ($p=0.017$, Εικόνα 77). Τέλος, υψηλή έκφραση του miR-223 παρουσίασε το 75.0% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως PR/SD>6μήνες, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-223 παρουσίασε το 72.4% των ασθενών που εκτιμήθηκαν ως SD<6μήνες/PD ($p=0.022$, Εικόνα 80).

Δεν παρατηρήθηκαν άλλες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις της παρατεταμένης ελεγχόμενης νόσου με την έκφραση των miRNAs-στόχων.



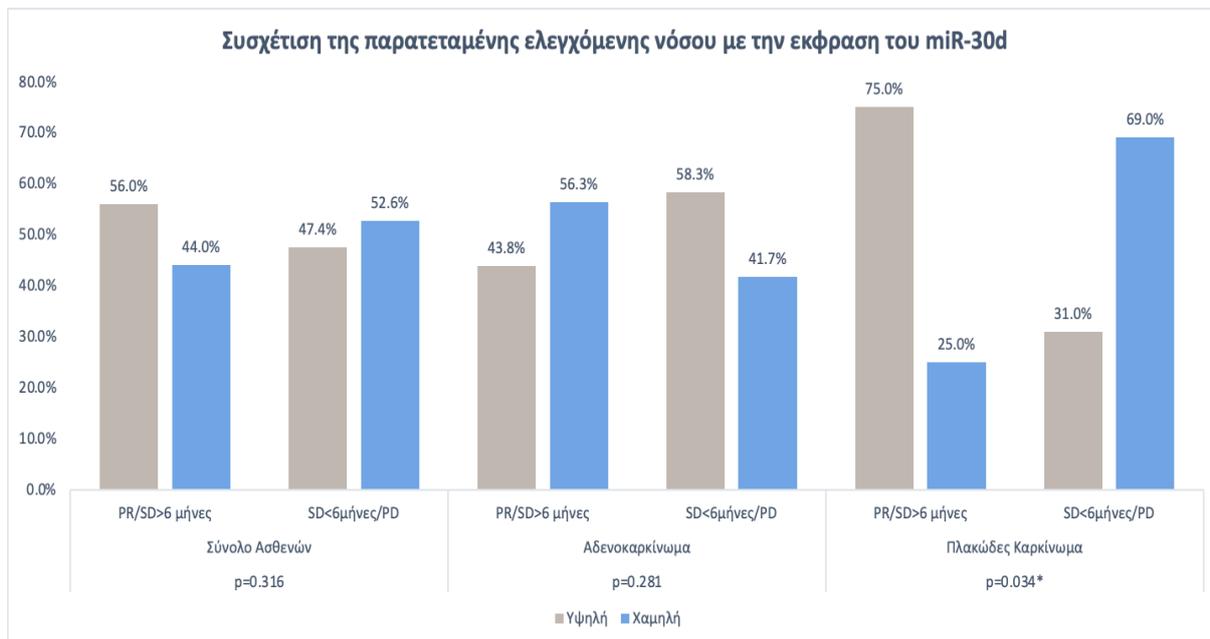
Εικόνα 76: Συσχέτιση της παρατεταμένης ελεγχόμενης νόσου των ασθενών με την έκφραση του miR-34a στο σύνολο του πληθυσμού, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.



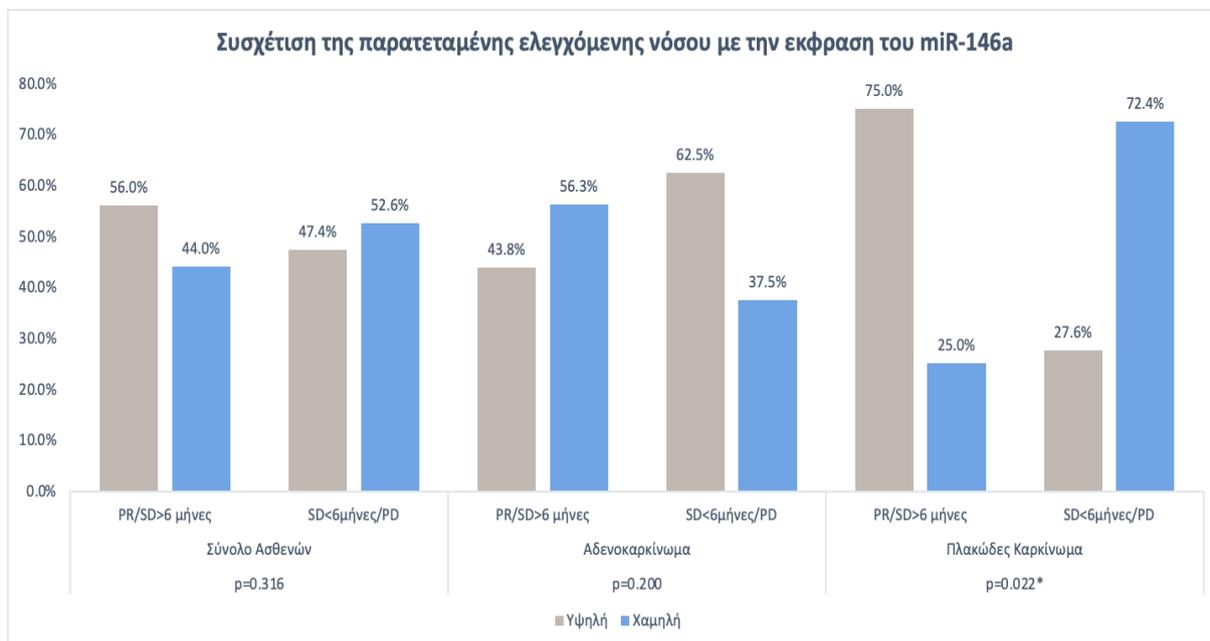
Εικόνα 77: Συσχέτιση της παρατεταμένης ελεγχόμενης νόσου των ασθενών με την έκφραση του miR-195 στο σύνολο του πληθυσμού, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.



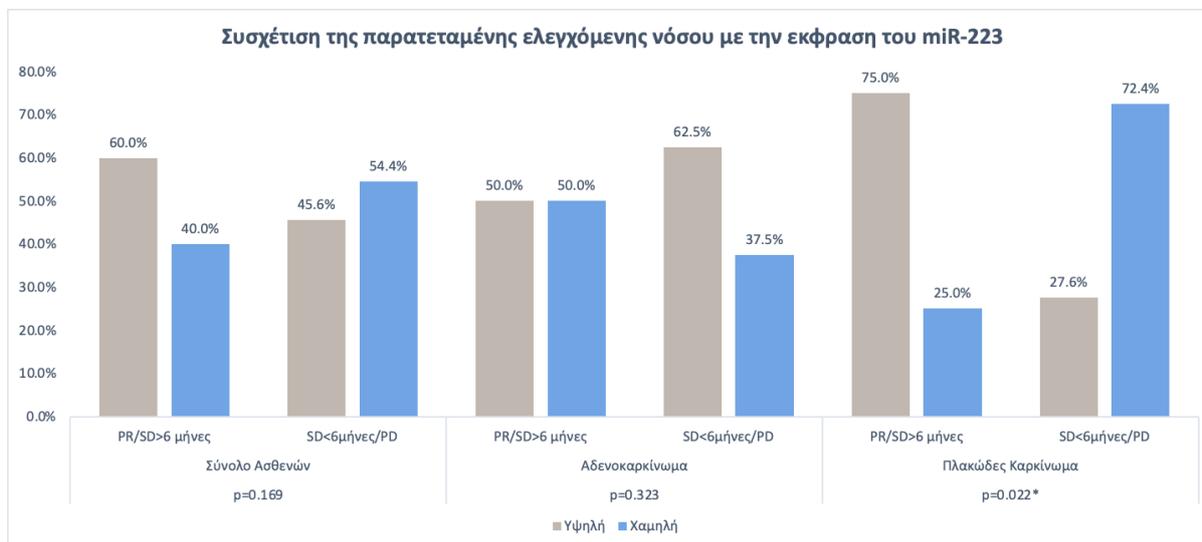
Εικόνα 78: Συσχέτιση της παρατεταμένης ελεγχόμενης νόσου των ασθενών με την έκφραση του miR-30d στο σύνολο του πληθυσμού, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.



Εικόνα 79: Συσχέτιση της παρατεταμένης ελεγχόμενης νόσου των ασθενών με την έκφραση του miR-146a στο σύνολο του πληθυσμού, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.



Εικόνα 80: Συσχέτιση της παρατεταμένης ελεγχόμενης νόσου των ασθενών με την έκφραση του miR-223 στο σύνολο του πληθυσμού, στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα.

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. * $p < 0.05$.

3.2.3 Συσχέτιση του κινδύνου ανάπτυξης προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία των ασθενών με προγνωστικές μεταβλητές

Όπως αναλύθηκε στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι» στην παράγραφο 2.8, οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την έκφραση των μορίων που μελετήθηκαν σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Πιο συγκεκριμένα, τιμές έκφρασης μεγαλύτερες ή ίσες της διάμεσης για κάθε miRNA χαρακτηρίστηκαν ως υψηλής έκφρασης, ενώ τιμές μικρότερες της διάμεσης για κάθε miRNA χαρακτηρίστηκαν ως χαμηλής έκφρασης, αντιστοίχως. Η συσχέτιση της έκφρασης των miRNAs-στόχων με τον κίνδυνο ανάπτυξης προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία αναλύθηκε στο σύνολο των ασθενών, καθώς και στους δύο βασικούς ιστολογικούς υποτύπους του ΜΜΚΠ, δηλαδή για τους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και για τους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα. Η στατιστική σημασία ορίστηκε στο $p < 0.05$ (δοκιμή διπλής όψης, two-sided test).

Στο σύνολο των ασθενών (N=82), δε παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση των παραγόντων με τον κίνδυνο ανάπτυξης προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία (Πίνακας 17).

Στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα (N=40) ως ιστολογική εκτίμηση, η μονοπαραγοντική Binary Logistic regression ανάλυση έδειξε ότι η χαμηλή έκφραση του miR-34a (OR: 17.162; 95% CI: 1.511-194.868; $p=0.022$) και οι πολλαπλές (≥ 3) μεταστατικές εστίες (OR: 4.400; 95% CI: 1.134-17.069; $p=0.032$) σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία (Πίνακας 18). Εφαρμόζοντας πολυπαραγοντική ανάλυση, και η χαμηλή έκφραση του miR-34a (OR: 6.071; 95% CI: 1.223-30.132; $p=0.027$), καθώς και οι πολλαπλές (≥ 3) μεταστατικές εστίες (OR: 6.260; 95% CI: 1.318-29.739; $p=0.021$) αναδείχτηκαν ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες του κινδύνου προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία (Πίνακας 18).

Στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα (N=37) ως ιστολογική εκτίμηση, δε παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση των παραγόντων με τον κίνδυνο ανάπτυξης προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία (Πίνακας 18).

Πίνακας 17: Μοντέλα Δυαδικής Λογιστικής Παλινδρόμησης (Binary Logistic Regression) για τον κίνδυνο ανάπτυξης προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία σε ασθενείς με ΜΜΚΠ (N=82), που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.

Μεταβλητή Παράμετρος	Σύνολο Ασθενών (N=82)			
	Μονοπαραγοντική Ανάλυση		Πολυπαραγοντική Ανάλυση	
	OR (95% CI)	p Value	OR (95% CI)	p Value
Ηλικία (<60 vs. ≥60)	1.984 (0.345-11.405)	0.443	-	-
Φύλο (άρρεν vs. θήλυ)	1.144 (0.182-7.174)	0.886	-	-
ECOG PS (≥2 vs. 0-1)	1.269 (0.267-6.036)	0.764	-	-
Ιστολογία (Αδενοκαρκίνωμα vs. Πλακώδες καρκίνωμα)	2.716 (0.186-39.608)	0.465	-	-
Μεταστατικές Εστίες (≥3 vs. 0-2)	1.717 (0.552-5.342)	0.351	-	-
let-7c (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.005 (0.167-6.056)	0.996	-	-
miR-26a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.901 (0.473-7.642)	0.366	-	-
miR-30d (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.102 (0.211-5.761)	0.908	-	-
miR-34a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	2.071 (0.679-6.317)	0.201	-	-
miR-146a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.685 (0.256-11.105)	0.587	-	-
miR-155 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	2.160 (0.769-6.068)	0.144	-	-
miR-195 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.179 (0.301-4.622)	0.813	-	-
miR-200b (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.510 (0.311-7.334)	0.609	-	-
miR-200c (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	2.642 (0.797-8.760)	0.112	-	-
miR-202 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.713 (0.443-6.626)	0.435	-	-
miR-223 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	2.233 (0.297-16.772)	0.435	-	-

OR, Odds Ratio, (πιθανότητα κινδύνου); CI, Confidence Intervals (διάστημα εμπιστοσύνης); ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης με βάση τη διάμεση τιμή για το κάθε miRNA; Cox regression, * $p < 0.05$

Πίνακας 18: Μοντέλα Δυαδικής Λογιστικής Παλινδρόμησης (Binary Logistic Regression) για τον κίνδυνο ανάπτυξης προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα (N=40) και σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα (N=37), που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.

Μεταβλητή Παράμετρος	Αδενοκαρκίνωμα (N=40)				Πλακώδες Καρκίνωμα (N=37)			
	Μονοπαραγοντική Ανάλυση		Πολυπαραγοντική Ανάλυση		Μονοπαραγοντική Ανάλυση		Πολυπαραγοντική Ανάλυση	
	OR (95% CI)	p Value	OR (95% CI)	p Value	OR (95% CI)	p Value	OR (95% CI)	p Value
Ηλικία (<60 vs. ≥60)	1.206 (0.235-6.197)	0.823	-	-	-	0.999	-	-
Φύλο (άρρεν vs. θήλυ)	2.550 (0.525-12.391)	0.246	-	-	-	0.999	-	-
ECOG PS (≥2 vs. 0-1)	1.040 (0.144-7.480)	0.969	-	-	2.659 (0.208-33.931)	0.452	-	-
Μεταστατικές Εστίες (≥3 vs. 0-2)	4.400 (1.134-17.069)	0.032*	6.260 (1.318-29.739)	0.021*	3.027 (0.210-43.683)	0.416	-	-
let-7c (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	3.225 (0.128-80.953)	0.476	-	-	2.890 (0.231-36.225)	0.411	-	-
miR-26a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	-	0.999	-	-	3.354 (0.142-79.052)	0.453	-	-
miR-30d (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	4.114 (0.394-43.004)	0.238	-	-	2.756 (0.315-24.092)	0.359	-	-
miR-34a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	17.162 (1.511-194.868)	0.022*	6.071 (1.223-30.137)	0.027*	2.329 (0.137-39.600)	0.559	-	-
miR-146a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	-	0.999	-	-	3.851 (0.173-85.562)	0.394	-	-
miR-155 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	3.600 (0.187-69.320)	0.396	-	-	3.333 (0.693-16.022)	0.133	-	-
miR-195 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	2.221 (0.141-34.940)	0.570	-	-	3.634 (0.305-43.244)	0.307	-	-
miR-200b (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	-	0.999	-	-	3.198 (0.246-41.626)	0.375	-	-
miR-200c (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	5.076 (0.691-37.282)	0.110	-	-	2.319 (0.017-311.682)	0.737	-	-
miR-202 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	9.282 (0.935-92.133)	0.057	-	-	4.894 (0.479-49.951)	0.180	-	-
miR-223 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	9.432 (0.393-226.309)	0.166	-	-	-	0.999	-	-

OR, Odds Ratio, (πιθανότητα κινδύνου); CI, Confidence Intervals (διάστημα εμπιστοσύνης); ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status;

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης με βάση τη διάμεση τιμή για το κάθε miRNA; Cox regression, * $p < 0.05$.

3.2.4 Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (Progression Free Survival, PFS) και της ολικής επιβίωσης (Overall Survival, OS) με την έκφραση των miRNAs-στόχων

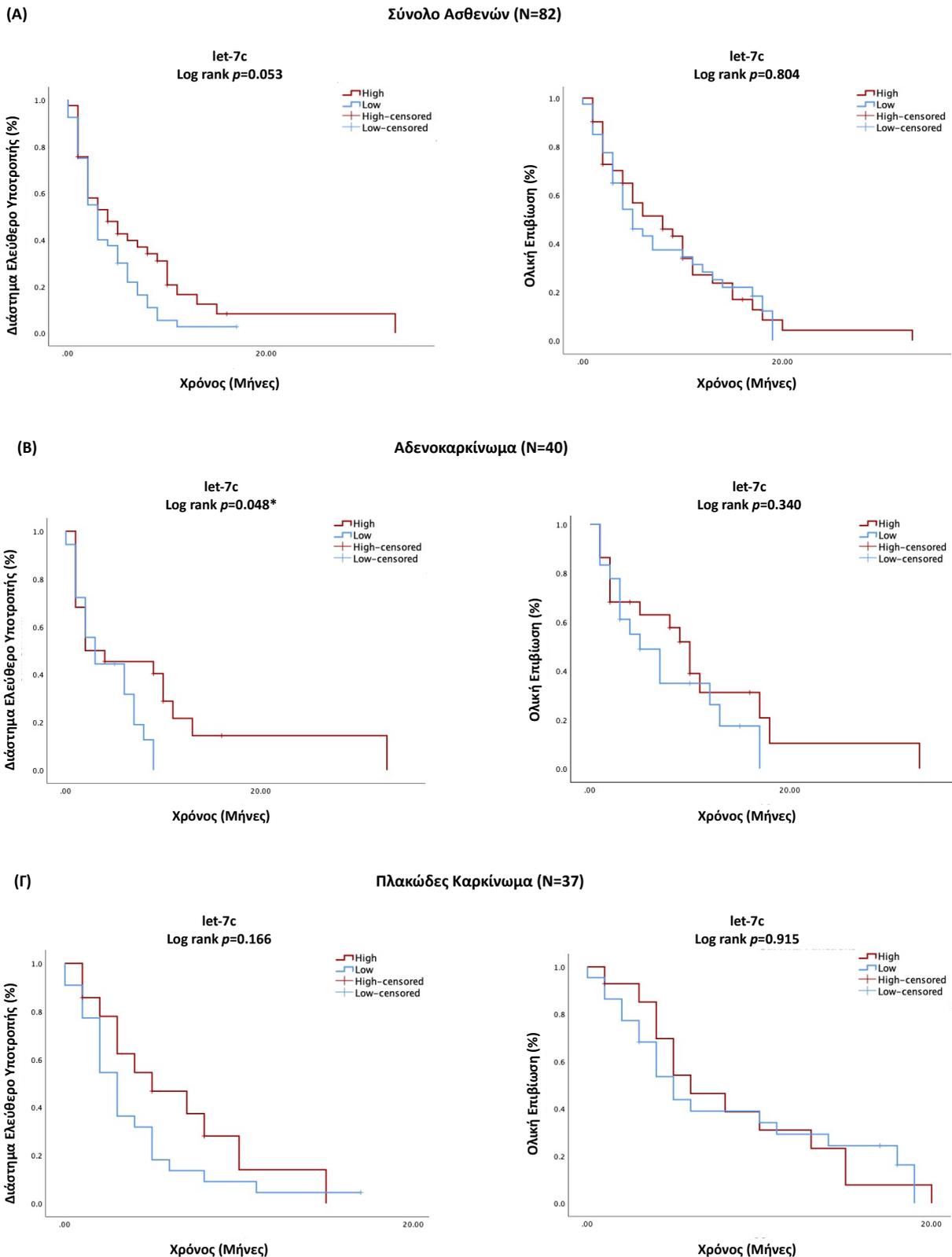
Της αναλύθηκε στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι» στην παράγραφο 2.8, οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την έκφραση των μορίων που μελετήθηκαν σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Πιο συγκεκριμένα, τιμές έκφρασης μεγαλύτερες ή ίσες της διάμεσης για κάθε miRNA χαρακτηρίστηκαν ως υψηλής έκφρασης, ενώ τιμές μικρότερες της διάμεσης για κάθε miRNA χαρακτηρίστηκαν ως χαμηλής έκφρασης, αντιστοίχως. Η συσχέτιση της έκφρασης των miRNAs-στόχων με το διάστημα ελεύθερο υποτροπής (Progression Free Survival, PFS) και την ολική επιβίωση (Overall Survival, OS) αναλύθηκε στο σύνολο των ασθενών, καθώς και της δύο βασικούς ιστολογικούς υποτύπους του ΜΜΚΠ, δηλαδή για της ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και για της ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα. Η στατιστική σημασία ορίστηκε στο $p < 0.05$ (δοκιμή διπλής όψης, two-sided test).

Στο σύνολο των ασθενών (N=82), ο μέσος χρόνος διαστήματος ελεύθερου υποτροπής ήταν οι 3.0 μήνες (εύρος: 2.0-5.0) και ο μέση ολική επιβίωση ήταν 6.0 μήνες (εύρος: 5.0-10.0). Η χαμηλή έκφραση του miR-34a συσχετίστηκε με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής (2.0 vs. 5.0 μήνες, $p=0.039$, Εικόνα 84 A) και η υψηλή έκφραση του miR-200c συσχετίστηκε με μικρότερη ολική επιβίωση (5.0 vs. 10.0 μήνες, $p=0.004$, Εικόνα 89 A). Η έκφραση των let-7c (Εικόνα 81 A), miR-26a (Εικόνα 82 A), miR-30d (Εικόνα 83 A), miR-146a (Εικόνα 85 A), miR-155 (Εικόνα 86 A), miR-195 (Εικόνα 87 A), miR-200b (Εικόνα 88 A), miR-202 (Εικόνα 90 A) και miR-223 (Εικόνα 91 A) δεν παρουσίασε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ούτε με το διάστημα ελεύθερο υποτροπής, ούτε με την ολική επιβίωση στο σύνολο του πληθυσμού.

Στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα (N=40) ως ιστολογική εκτίμηση, ο μέσος χρόνος διαστήματος ελεύθερου υποτροπής ήταν οι 3.0 μήνες (εύρος: 2.0-6.0) και η μέση ολική επιβίωση ήταν 8.0 μήνες (εύρος: 3.0-11.0). Η υψηλή έκφραση του let-7c (2.0 vs. 3.0 μήνες, $p=0.048$, Εικόνα 81 B) και χαμηλή έκφραση του miR-34a (2.0 vs. 6.0 μήνες, $p=0.024$, Εικόνα 84 B) σχετίστηκαν με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής, ενώ χαμηλή έκφραση του miR-34a (3.0 vs. 11.0 μήνες, $p=0.024$, Εικόνα 84 B) και η υψηλή έκφραση του miR-200c (3.0 vs. 11.0 μήνες, $p=0.021$, Εικόνα 89 B) σχετίστηκαν με μικρότερη ολική επιβίωση. Η έκφραση των miR-26a (Εικόνα 82 B), miR-30d (Εικόνα 83 B), miR-146a (Εικόνα 85 B), miR-155 (Εικόνα 86 B), miR-195 (Εικόνα 87 B), miR-200b (Εικόνα 88 B), miR-202 (Εικόνα 90 B) και miR-223 (Εικόνα 91 B) δεν παρουσίασε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση

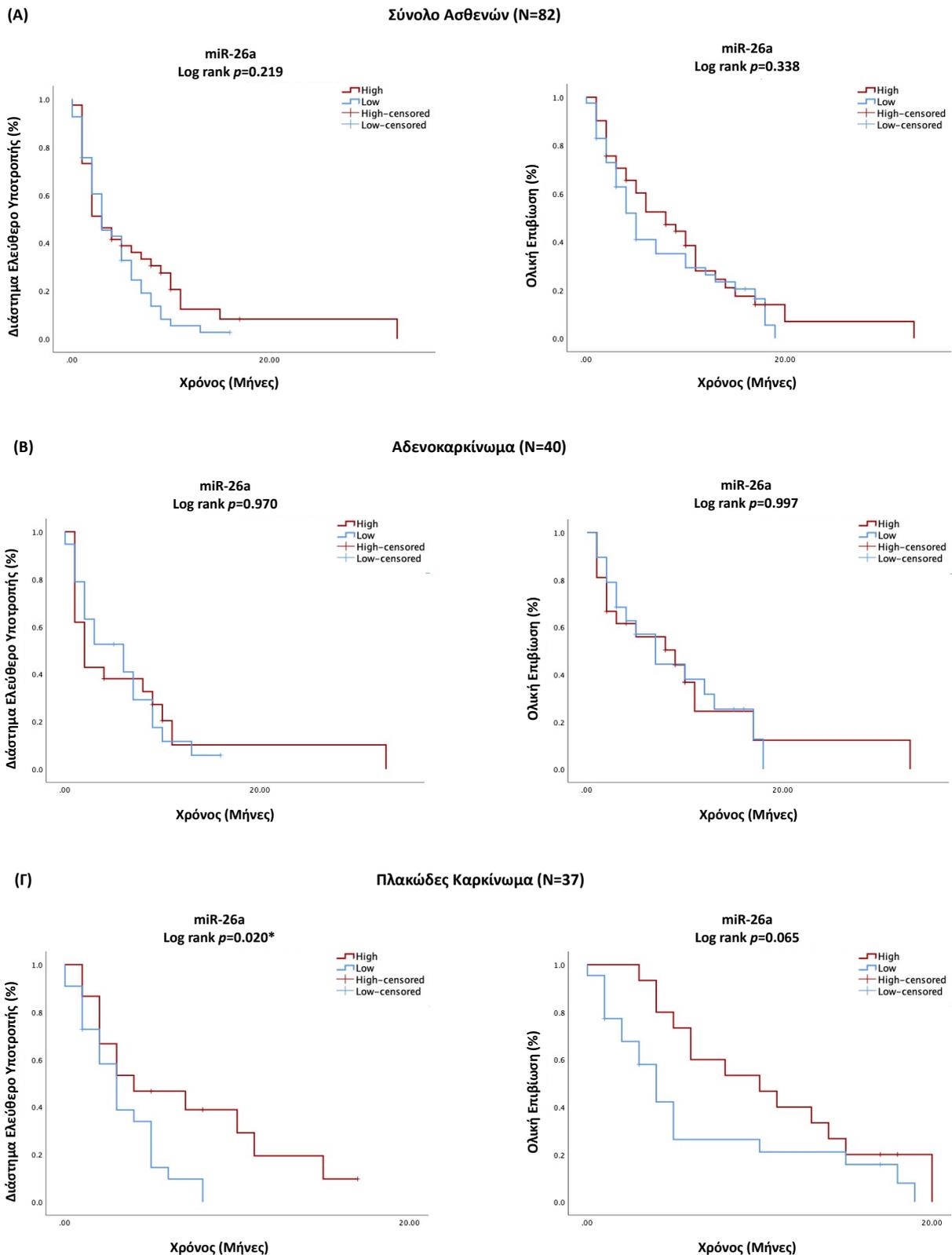
ούτε με το διάστημα ελεύθερο υποτροπής, ούτε με την ολική επιβίωση στο υποσύνολο των ασθενών με αδenoκαρκίνωμα.

Στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα (N=37) ως ιστολογική εκτίμηση, ο μέσος χρόνος διαστήματος ελεύθερου υποτροπής ήταν οι 3.0 μήνες (εύρος: 3-4) και ο μέση ολική επιβίωση ήταν 5.0 μήνες (εύρος: 4.0-10.0). Η χαμηλή έκφραση του miR-26a συσχετίστηκε με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής (3.0 vs. 4.0 μήνες, $p=0.020$, Εικόνα 82 Γ). Η έκφραση των let-7c (Εικόνα 81 Γ), miR-30d (Εικόνα 83 Γ), miR-34a (Εικόνα 84 Γ), miR-146a (Εικόνα 85 Γ), miR-155 (Εικόνα 86 Γ), miR-195 (Εικόνα 87 Γ), miR-200b (Εικόνα 88 Γ), miR-200c (Εικόνα 89 Γ), miR-202 (Εικόνα 90 Γ) και miR-223 (Εικόνα 91 Γ) δεν παρουσίασε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ούτε με το διάστημα ελεύθερο υποτροπής, ούτε με την ολική επιβίωση στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα.



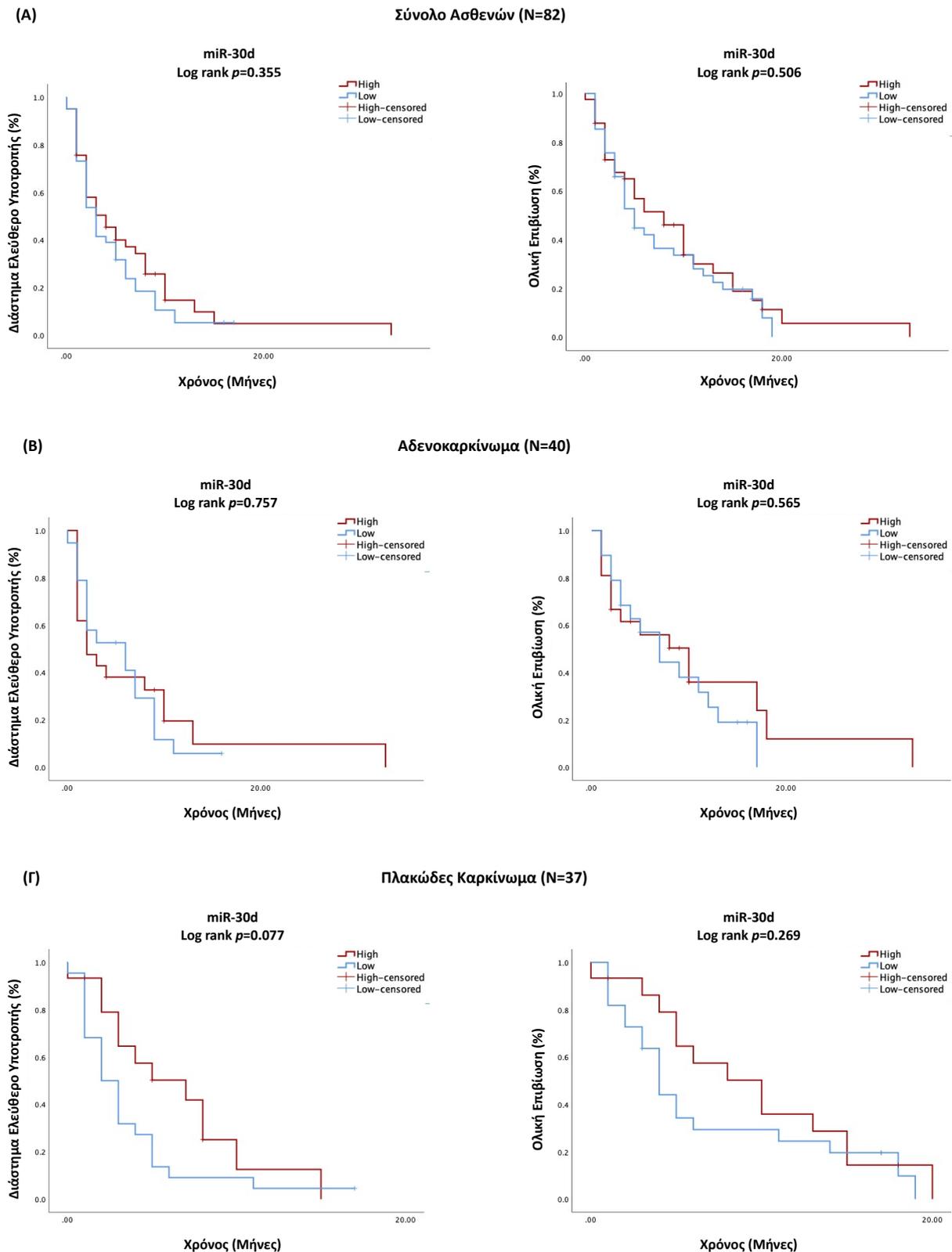
Εικόνα 81: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του *let-7c* στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.

Σύνολο του πληθυσμού (N=82) (Α), Αδενοκαρκίνωμα (N=40) (Β), Πλακώδες καρκίνωμα (N=37) (Γ). Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των καμπυλών διεξήχθη με την εφαρμογή του log rank test. Αναγράφονται οι τιμές p values.



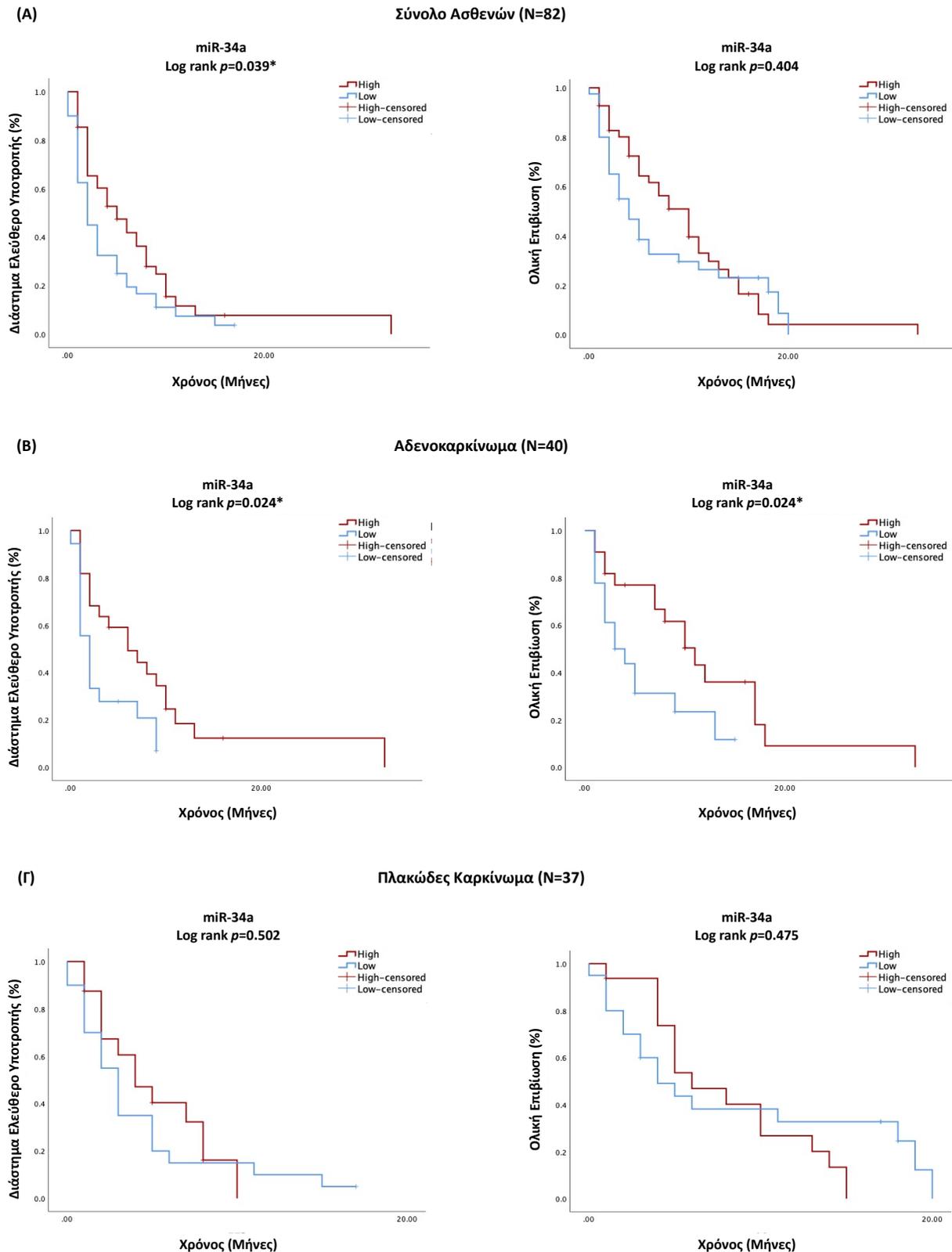
Εικόνα 82: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-26a στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.

Σύνολο του πληθυσμού (N=82) (Α), Αδενοκαρκίνωμα (N=40) (Β), Πλακώδες καρκίνωμα (N=37) (Γ). Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των καμπυλών διεξήχθη με την εφαρμογή του log rank test. Αναγράφονται οι τιμές p values.



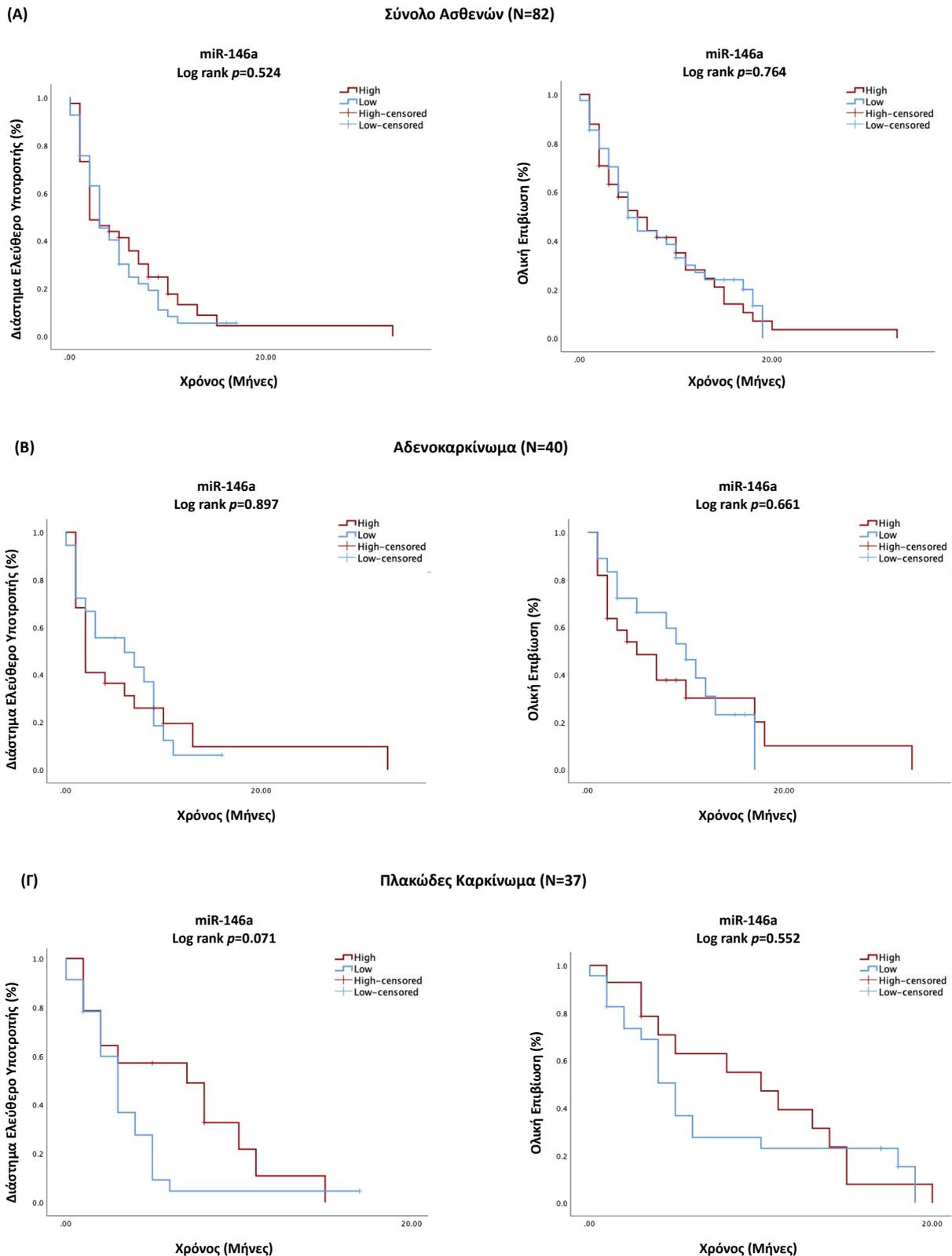
Εικόνα 83: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-30d στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.

Σύνολο του πληθυσμού (N=82) (A), Αδενοκαρκίνωμα (N=40) (B), Πλακώδες καρκίνωμα (N=37) (Γ). Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των καμπυλών διεξήχθη με την εφαρμογή του log rank test. Αναγράφονται οι τιμές p values.



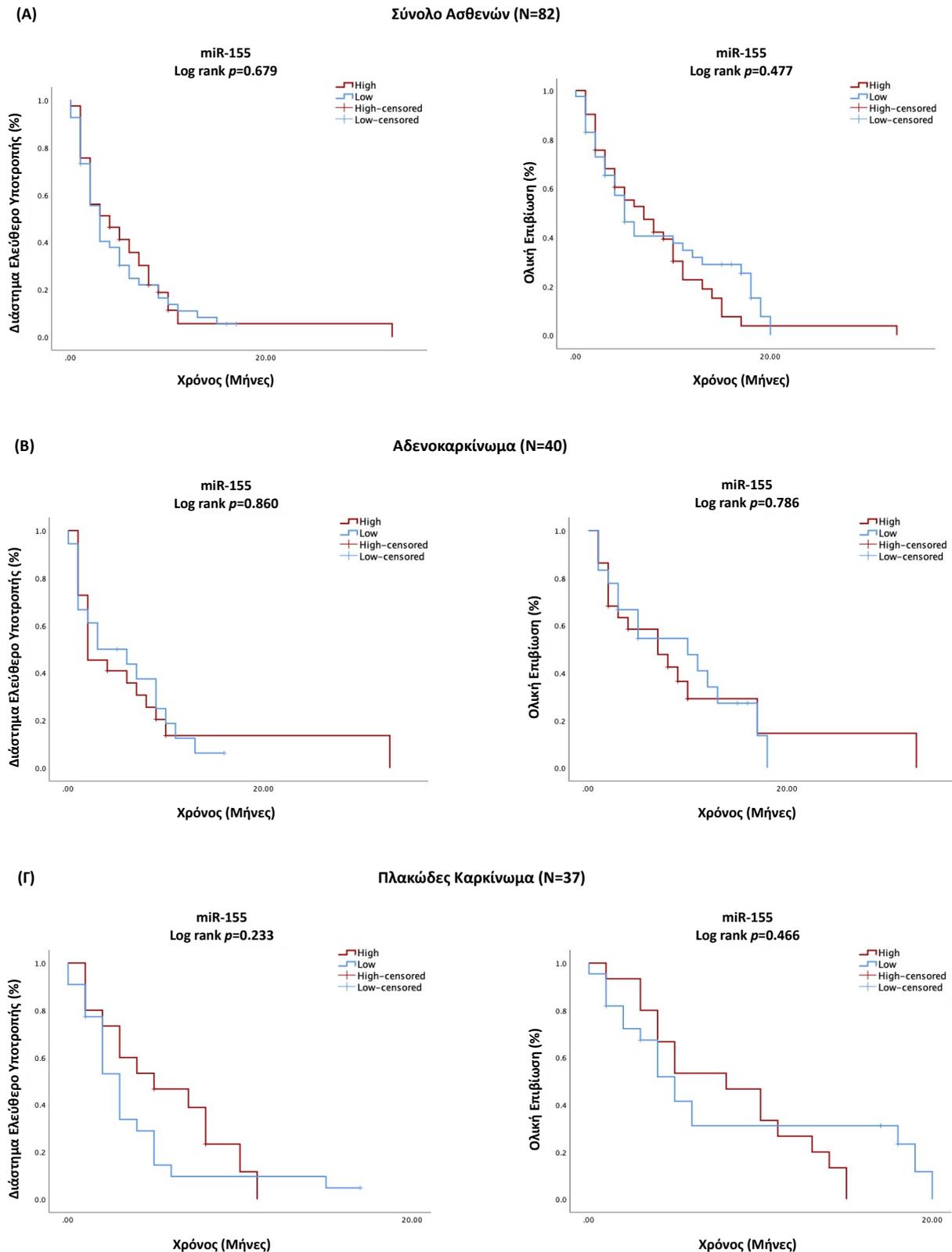
Εικόνα 84: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-34a στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.

Σύνολο του πληθυσμού (N=82) (Α), Αδενοκαρκίνωμα (N=40) (Β), Πλακώδες καρκίνωμα (N=37) (Γ). Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των καμπυλών διεξήχθη με την εφαρμογή του log rank test. Αναγράφονται οι τιμές p values.



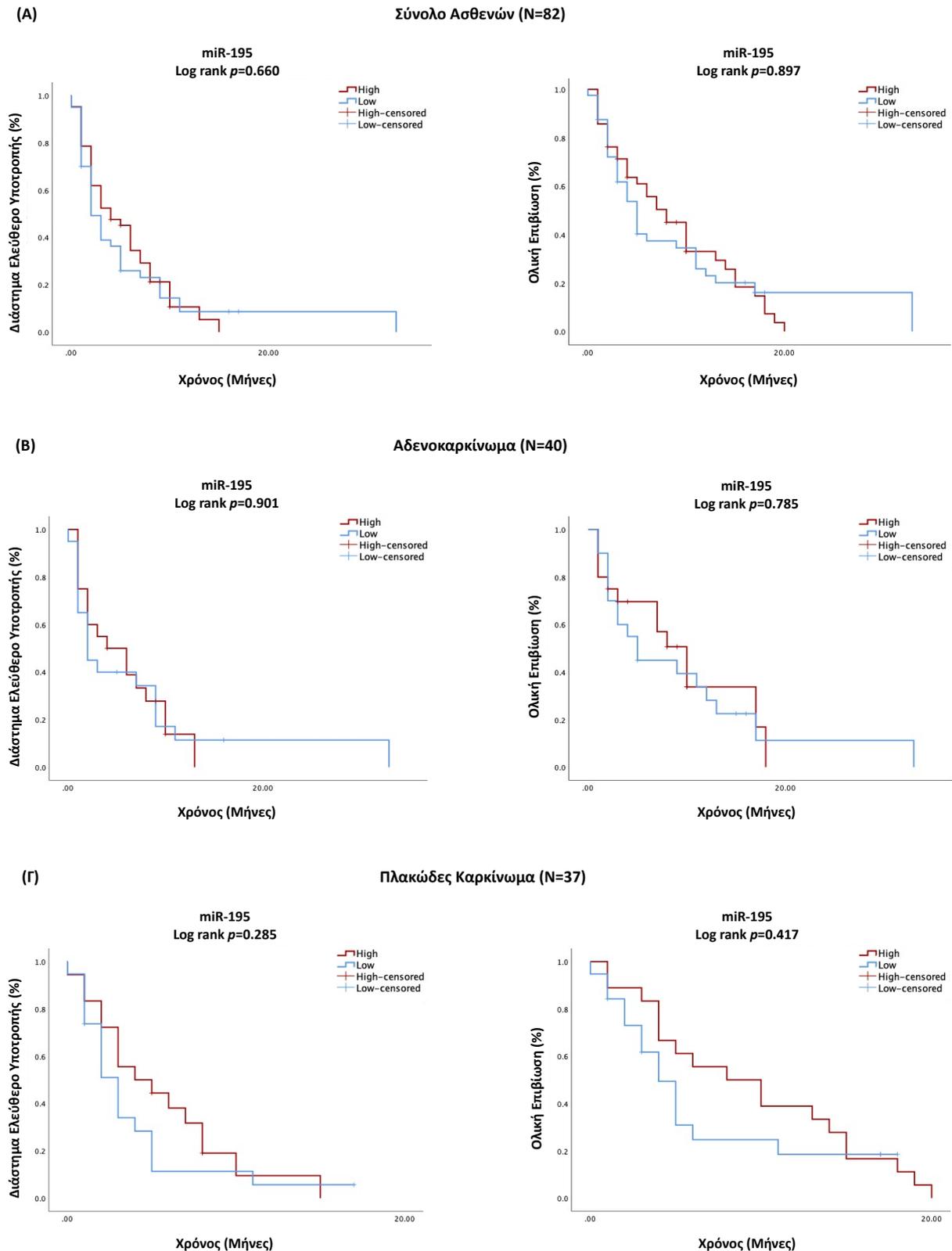
Εικόνα 85: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-146a στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.

Σύνολο του πληθυσμού (N=82) (Α), Αδενοκαρκίνωμα (N=40) (Β), Πλακώδες καρκίνωμα (N=37) (Γ). Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των καμπυλών διεξήχθη με την εφαρμογή του log rank test. Αναγράφονται οι τιμές p values.



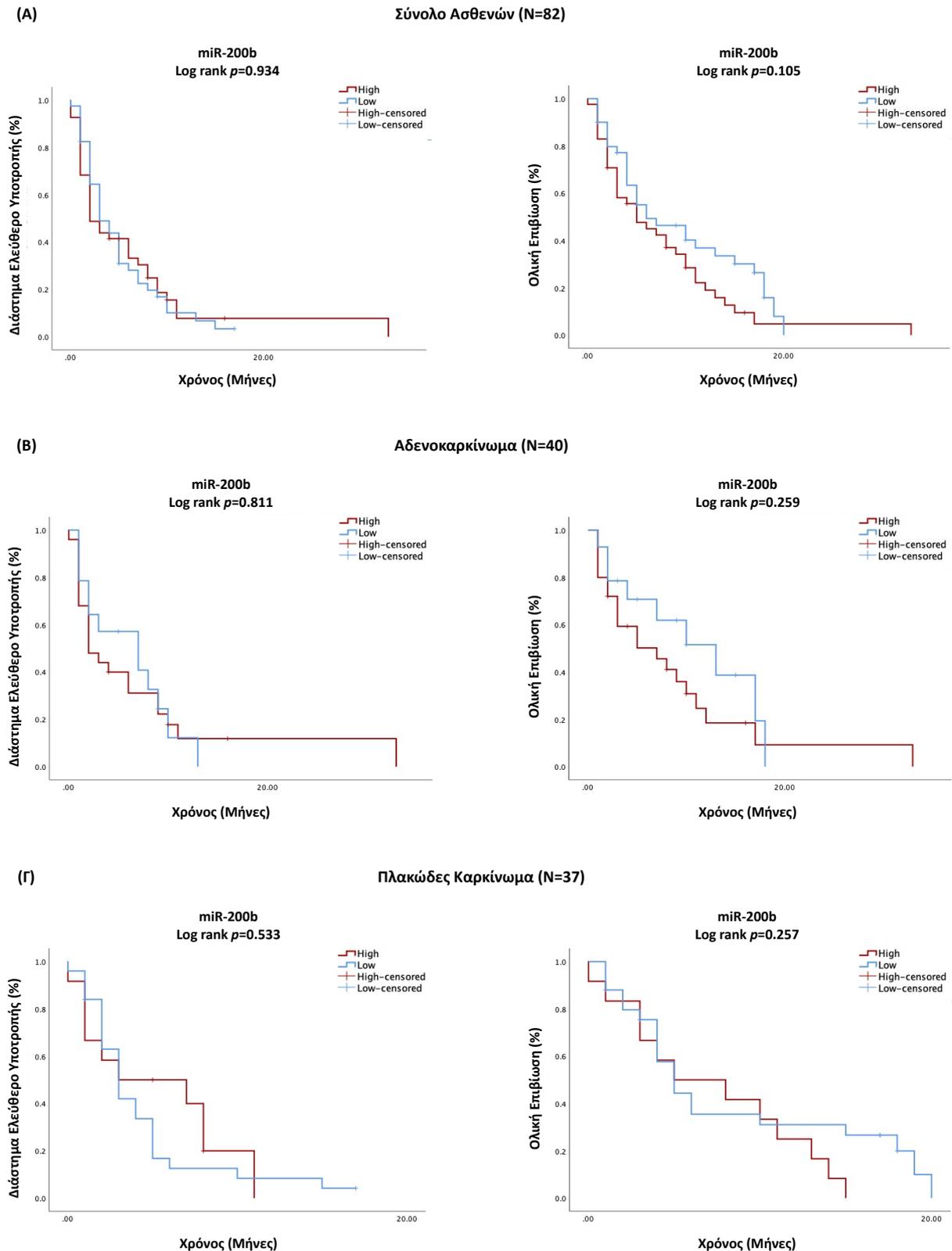
Εικόνα 86: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-155 στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.

Σύνολο του πληθυσμού (N=82) (Α), Αδενοκαρκίνωμα (N=40) (Β), Πλακώδες καρκίνωμα (N=37) (Γ). Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των καμπυλών διεξήχθη με την εφαρμογή του log rank test. Αναγράφονται οι τιμές p values.



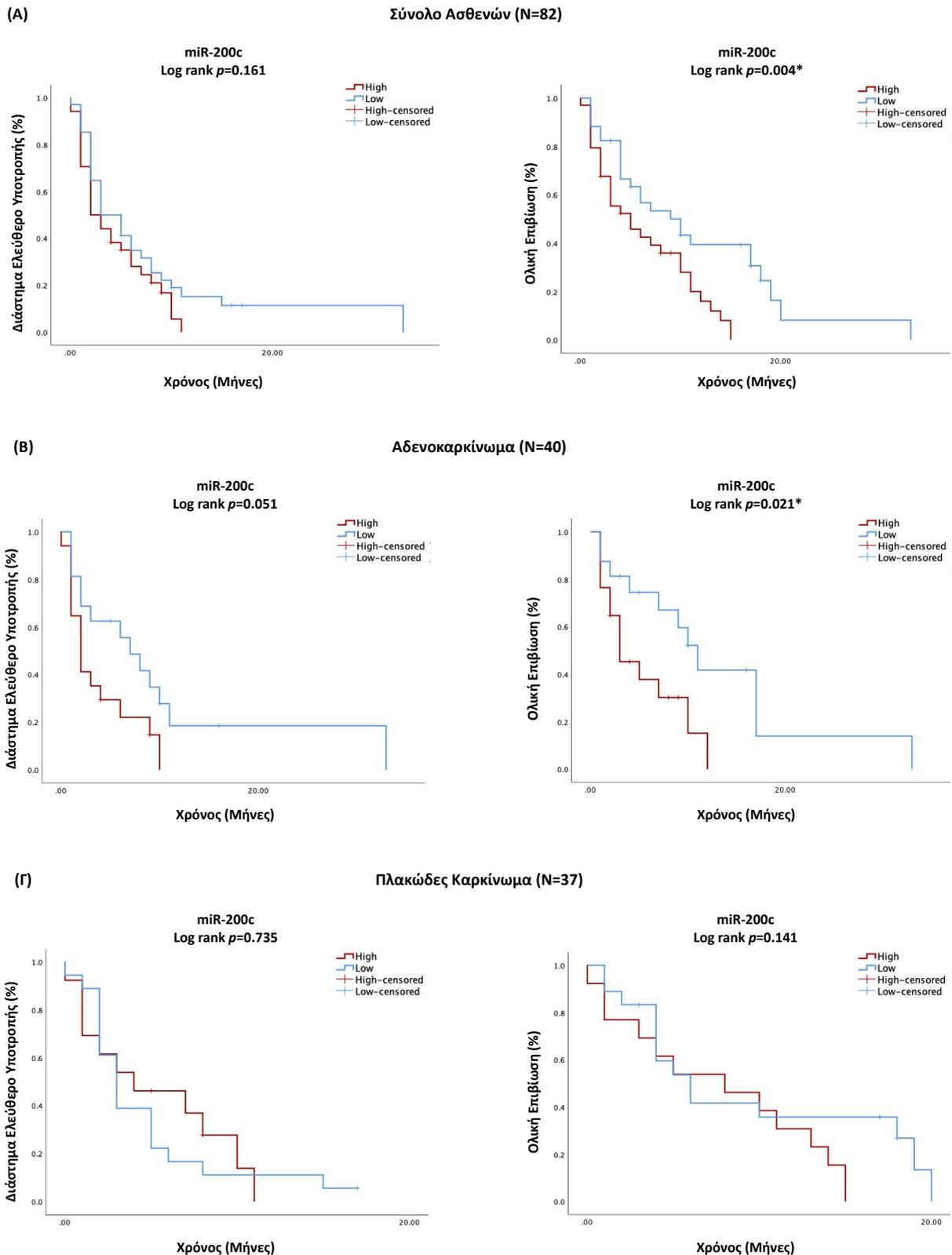
Εικόνα 87: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-195 στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.

Σύνολο του πληθυσμού (N=82) (A), Αδενοκαρκίνωμα (N=40) (B), Πλακώδες καρκίνωμα (N=37) (Γ). Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των καμπυλών διεξήχθη με την εφαρμογή του log rank test. Αναγράφονται οι τιμές p values.



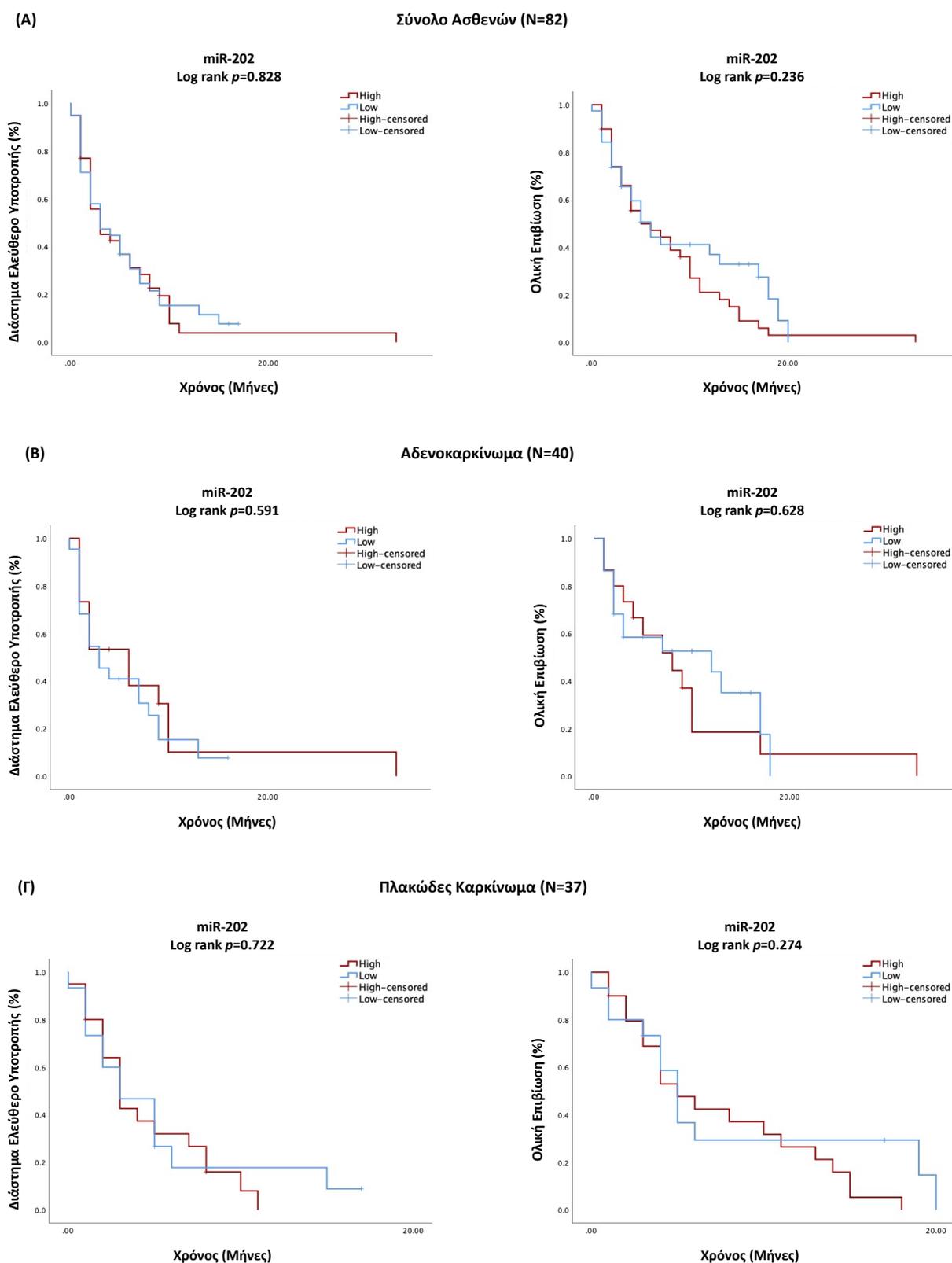
Εικόνα 88: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-200b στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.

Σύνολο του πληθυσμού (N=82) (Α), Αδενοκαρκίνωμα (N=40) (Β), Πλακώδες καρκίνωμα (N=37) (Γ). Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των καμπυλών διεξήχθη με την εφαρμογή του log rank test. Αναγράφονται οι τιμές p values.



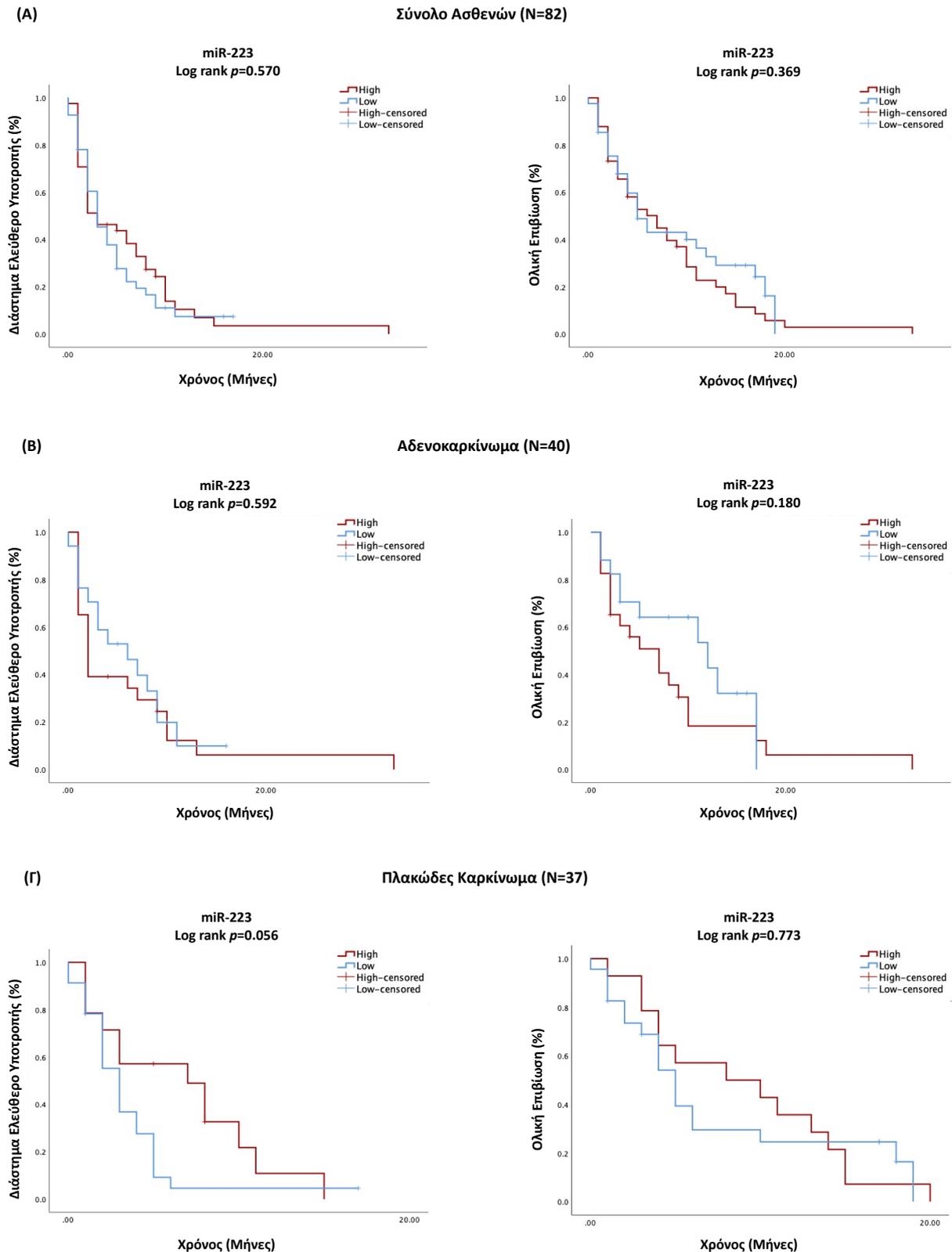
Εικόνα 89: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-200c στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.

Σύνολο του πληθυσμού (N=82) (Α), Αδενοκαρκίνωμα (N=40) (Β), Πλακώδες καρκίνωμα (N=37) (Γ). Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των καμπυλών διεξήχθη με την εφαρμογή του log rank test. Αναγράφονται οι τιμές p values.



Εικόνα 90: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-202 στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.

Σύνολο του πληθυσμού (N=82) (Α), Αδενοκαρκίνωμα (N=40) (Β), Πλακώδες καρκίνωμα (N=37) (Γ). Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των καμπυλών διεξήχθη με την εφαρμογή του log rank test. Αναγράφονται οι τιμές p values.



Εικόνα 91: Συσχέτιση του διαστήματος ελεύθερου υποτροπής (αριστερά) και της ολικής επιβίωσης (δεξιά) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του miR-223 στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.

Σύνολο του πληθυσμού (N=82) (A), Αδενοκαρκίνωμα (N=40) (B), Πλακώδες καρκίνωμα (N=37) (Γ). Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη διάμεση τιμή σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των καμπυλών διεξήχθη με την εφαρμογή του log rank test. Αναγράφονται οι τιμές p values.

3.2.5 Συσχέτιση του Διαστήματος Ελεύθερου Υποτροπής και της Ολικής Επιβίωσης με Προγνωστικές Μεταβλητές

Όπως αναλύθηκε στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι» στην παράγραφο 2.8, οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την έκφραση των μορίων που μελετήθηκαν σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης. Πιο συγκεκριμένα, τιμές έκφρασης μεγαλύτερες ή ίσες της διάμεσης για κάθε miRNA χαρακτηρίστηκαν ως υψηλής έκφρασης, ενώ τιμές μικρότερες της διάμεσης για κάθε miRNA χαρακτηρίστηκαν ως χαμηλής έκφρασης, αντιστοίχως. Η συσχέτιση της έκφρασης των miRNAs-στόχων με το διάστημα ελεύθερο υποτροπής (Progression Free Survival, PFS) και την ολική επιβίωση (Overall Survival, OS) αναλύθηκε στο σύνολο των ασθενών, καθώς και στους δύο βασικούς ιστολογικούς υποτύπους του ΜΜΚΠ, δηλαδή για τους ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα και για τους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα. Η στατιστική σημασία ορίστηκε στο $p < 0.05$ (δοκιμή διπλής όψης, two-sided test).

Στο σύνολο των ασθενών (N=82), δε βρέθηκε κανένας παράγοντας που να σχετίζεται με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής (Πίνακας 19). Ωστόσο, η υψηλή έκφραση του miR-200c συσχετίστηκε με μικρότερη ολική επιβίωση (HR: 2.228; 95% CI: 1.243-3.993; $p=0.007$). Ακόμη, μικρότερη ολική επιβίωση συσχετίστηκε με $PS \geq 2$ (HR: 2.040; 95% CI: 1.160-3.587; $p=0.013$) (Πίνακας 19). Εφαρμόζοντας πολυπαραγοντική ανάλυση στο σύνολο του πληθυσμού (N=82), η υψηλή έκφραση του miR-200c αναδείχτηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μικρότερη ολική επιβίωση (HR: 2.113; 95% CI: 1.174-3.806; $p=0.013$) (Πίνακας 19).

Στο υποσύνολο των ασθενών με αδenoκαρκίνωμα (N=40) ως ιστολογική εκτίμηση, η μονοπαραγοντική Cox regression ανάλυση έδειξε ότι μόνο η χαμηλή έκφραση του miR-34a σχετίζεται με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής (HR: 2.095; 95% CI: 1.013-4.333; $p=0.046$) (Πίνακας 20). Ωστόσο, βρέθηκε ότι η χαμηλή έκφραση του miR-34a (HR: 2.339; 95% CI: 1.059-5.168; $p=0.036$) και η υψηλή έκφραση του miR-200c (HR: 2.695; 95% CI: 1.079-6.730; $p=0.034$) σχετίζονται με μικρότερη ολική επιβίωση (Πίνακας 20). Εφαρμόζοντας πολυπαραγοντική ανάλυση στο υποσύνολο των ασθενών με αδenoκαρκίνωμα (N=40), η χαμηλή έκφραση του miR-34a αναδείχτηκε ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μικρότερη ολική επιβίωση (HR: 3.482; 95% CI: 1.230-9.860; $p=0.019$) (Πίνακας 20).

Στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα (N=37) ως ιστολογική εκτίμηση, η μονοπαραγοντική Cox regression ανάλυση έδειξε ότι η χαμηλή έκφραση του miR-26a σχετίζεται με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής (HR: 2.323; 95% CI: 1.048-5.149; $p=0.038$) (Πίνακας 21). Επίσης, με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής συσχετίστηκε η

ηλικία ≥ 60 ετών (HR: 3.281; 95% CI: 1.088-9.893; $p=0.035$) (Πίνακας 21). Μικρότερη ολική επιβίωση συσχετίστηκε μόνο με $PS \geq 2$ (HR: 3.694; 95% CI: 1.592-8.571; $p=0.002$) (Πίνακας 21). Εφαρμόζοντας πολυπαραγοντική ανάλυση στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα (N=37) ως ιστολογική εκτίμηση, η χαμηλή έκφραση του miR-26a αναδείχτηκε ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής (HR: 2.229; 95% CI: 1.001-4.962; $p=0.050$) (Πίνακας 21).

Πίνακας 19: Μοντέλα Αναλογικής Παλινδρόμησης Κινδύνου Cox (Cox Proportional Hazard Regression Models) για το Διάστημα Ελεύθερο Υποτροπής και την Ολική Επιβίωση σε ασθενείς με ΜΜΚΠ (N=82), που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.

Μεταβλητή Παράμετρος	Διάστημα Ελεύθερο Υποτροπής				Ολική Επιβίωση			
	Μονοπαραγοντική Ανάλυση		Πολυπαραγοντική Ανάλυση		Μονοπαραγοντική Ανάλυση		Πολυπαραγοντική Ανάλυση	
	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value
Ηλικία (<60 vs. ≥60)	1.320 (0.755-2.307)	0.330	-	-	1.210 (0.669-2.191)	0.528	-	-
Φύλο (άρρεν vs. θήλυ)	1.051 (0.576-1.918)	0.871	-	-	1.199 (0.635-2.262)	0.576	-	-
ECOG PS (≥2 vs. 0-1)	1.651 (0.952-2.861)	0.074	-	-	2.040 (1.160-3.587)	0.013*	1.775 (0.950-3.316)	0.072
Στάδιο νόσου (IV vs. I-III)	1.044 (0.622-1.750)	0.871	-	-	1.110 (0.636-1.939)	0.713	-	-
Ιστολογία (Αδενοκαρκίνωμα vs. Πλακώδες καρκίνωμα)	1.837 (0.708-4.766)	0.211	-	-	2.004 (0.769-5.222)	0.155	-	-
Μεταστατικές Εστίες (≥3 vs. 0-2)	1.278 (0.801-2.038)	0.303	-	-	1.311 (0.796-2.157)	0.287	-	-
let-7c (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.532 (0.952-2.466)	0.079	-	-	1.061 (0.649-1.735)	0.814	-	-
miR-26a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.307 (0.818-2.087)	0.263	-	-	1.254 (0.769-2.045)	0.363	-	-
miR-30d (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.222 (0.768-1.944)	0.398	-	-	1.171 (0.718-1.910)	0.527	-	-
miR-34a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.565 (0.979-2.502)	0.061	-	-	1.220 (0.746-1.997)	0.428	-	-
miR-146a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.148 (0.722-1.825)	0.561	-	-	1.074 (0.659-1.748)	0.775	-	-
miR-155 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.094 (0.686-1.745)	0.705	-	-	1.186 (0.724-1.942)	0.499	-	-
miR-195 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.100 (0.690-1.755)	0.688	-	-	1.031 (0.634-1.676)	0.901	-	-
miR-200b (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.018 (0.638-1.624)	0.939	-	-	1.475 (0.898-2.423)	0.124	-	-
miR-200c (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.403 (0.834-2.361)	0.202	-	-	2.228 (1.243-3.993)	0.007*	2.113 (1.174-3.806)	0.013*
miR-202 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.050 (0.649-1.700)	0.842	-	-	1.336 (0.806-2.214)	0.261	-	-
miR-223 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.131 (0.711-1.801)	0.604	-	-	1.238 (0.758-2.021)	0.393	-	-

HR, Hazard Ratio, (αναλογία κινδύνου); CI, Confidence Intervals (διάστημα εμπιστοσύνης); ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status;

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης με βάση τη διάμεση τιμή για το κάθε miRNA; Cox regression, * $p < 0.05$.

Πίνακας 20: Μοντέλα Αναλογικής Παλινδρόμησης Κινδύνου Cox (Cox Proportional Hazard Regression Models) για το Διάστημα Ελεύθερο Υποτροπής και την Ολική Επιβίωση σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα (N=40), που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.

Μεταβλητή Παράμετρος	Διάστημα Ελεύθερο Υποτροπής				Ολική Επιβίωση			
	Μονοπαραγοντική Ανάλυση		Πολυπαραγοντική Ανάλυση		Μονοπαραγοντική Ανάλυση		Πολυπαραγοντική Ανάλυση	
	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value
Ηλικία (<60 vs. ≥60)	1.142 (0.554-2.351)	0.719	-	-	1.299 (0.599-2.819)	0.508	-	-
Φύλο (άρρεν vs. θήλυ)	1.026 (0.499-2.110)	0.944	-	-	1.223 (0.554-2.700)	0.618	-	-
ECOG PS (≥2 vs. 0-1)	1.576 (0.695-3.573)	0.276	-	-	1.544 (0.677-3.522)	0.301	-	-
Στάδιο νόσου (IV vs. I-III)	1.347 (0.642-2.827)	0.431	-	-	1.445 (0.606-3.443)	0.406	-	-
Μεταστατικές Εστίες (≥3 vs. 0-2)	1.773 (0.877-3.584)	0.111	-	-	1.801 (0.833-3.897)	0.135	-	-
let-7c (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.940 (0.928-4.055)	0.078	-	-	1.413 (0.669-2.986)	0.365	-	-
miR-26a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.012 (0.515-1.990)	0.973	-	-	1.001 (0.480-2.090)	0.997	-	-
miR-30d (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.102 (0.559-2.173)	0.778	-	-	1.234 (0.581-2.621)	0.584	-	-
miR-34a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	2.095 (1.013-4.333)	0.046*	-	-	2.339 (1.059-5.168)	0.036*	3.482 (1.230-9.860)	0.019*
miR-146a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.042 (0.529-2.053)	0.906	-	-	1.175 (0.552-2.501)	0.676	-	-
miR-155 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.057 (0.535-2.089)	0.873	-	-	1.103 (0.525-2.316)	0.796	-	-
miR-195 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.040 (0.528-2.048)	0.910	-	-	1.103 (0.525-2.316)	0.796	-	-
miR-200b (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.083 (0.531-2.209)	0.826	-	-	1.546 (0.696-3.433)	0.284	-	-
miR-200c (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	2.049 (0.922-4.557)	0.078	-	-	2.695 (1.079-6.730)	0.034*	2.278 (0.894-5.806)	0.084
miR-202 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.198 (0.580-2.473)	0.625	-	-	1.200 (0.552-2.611)	0.645	-	-
miR-223 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.186 (0.597-2.357)	0.626	-	-	1.660 (0.757-3.641)	0.206	-	-

HR, Hazard Ratio, (αναλογία κινδύνου); CI, Confidence Intervals (διάστημα εμπιστοσύνης); ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status;

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης με βάση τη διάμεση τιμή για το κάθε miRNA; Cox regression, * $p < 0.05$.

Πίνακας 21: Μοντέλα Αναλογικής Παλινδρόμησης Κινδύνου Cox (Cox Proportional Hazard Regression Models) για το Διάστημα Ελεύθερο Υποτροπής και την Ολική Επιβίωση σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα (N=37), που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.

Μεταβλητή Παράμετρος	Διάστημα Ελεύθερο Υποτροπής				Ολική Επιβίωση			
	Μονοπαραγοντική Ανάλυση		Πολυπαραγοντική Ανάλυση		Μονοπαραγοντική Ανάλυση		Πολυπαραγοντική Ανάλυση	
	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value
Ηλικία (<60 vs. ≥60)	3.281 (1.088-9.893)	0.035*	2.956 (0.980-8.920)	0.054	1.262 (0.377-4.229)	0.706	-	-
Φύλο (άρρεν vs. θήλυ)	1.426 (0.190-10.672)	0.730	-	-	3.521 (0.446-27.823)	0.233	-	-
ECOG PS (≥2 vs. 0-1)	2.081 (0.947-4.571)	0.068	-	-	3.694 (1.592-8.571)	0.002*	-	-
Στάδιο νόσου (IV vs. I-III)	1.775 (0.785-4.013)	0.168	-	-	1.361 (0.603-3.073)	0.458	-	-
Μεταστατικές Εστίες (≥3 vs. 0-2)	1.057 (0.479-2.333)	0.890	-	-	1.032 (0.458-2.325)	0.940	-	-
let-7c (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.610 (0.772-3.360)	0.204	-	-	1.039 (0.499-2.163)	0.919	-	-
miR-26a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	2.323 (1.048-5.149)	0.038*	2.229 (1.001-4.962)	0.050*	1.911 (0.920-3.970)	0.083	-	-
miR-30d (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.811 (0.878-3.736)	0.108	-	-	1.476 (0.713-3.054)	0.294	-	-
miR-34a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.257 (0.608-2.602)	0.537	-	-	1.299 (0.611-2.762)	0.497	-	-
miR-146a (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.881 (0.885-4.001)	0.101	-	-	1.235 (0.596-2.559)	0.571	-	-
miR-155 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.494 (0.727-3.070)	0.275	-	-	1.297 (0.621-2.710)	0.489	-	-
miR-195 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.417 (0.707-2.839)	0.326	-	-	1.330 (0.644-2.749)	0.441	-	-
miR-200b (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.250 (0.583-2.679)	0.566	-	-	1.506 (0.713-3.182)	0.283	-	-
miR-200c (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.132 (0.521-2.461)	0.754	-	-	1.777 (0.791-3.990)	0.164	-	-
miR-202 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.131 (0.540-2.368)	0.744	-	-	1.502 (0.694-3.253)	0.302	-	-
miR-223 (υψηλή vs. χαμηλή έκφραση)	1.945 (0.917-4.128)	0.083	-	-	1.106 (0.539-2.271)	0.783	-	-

HR, Hazard Ratio, (αναλογία κινδύνου); CI, Confidence Intervals (διάστημα εμπιστοσύνης); ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status;

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε υψηλής ή χαμηλής έκφρασης με βάση τη διάμεση τιμή για το κάθε miRNA; Cox regression, * $p < 0.05$.

3.3 Σύγκριση της έκφρασης των miRNAs στο πλάσμα και στα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMCs) σε αντιστοιχισμένα δείγματα ασθενών με ΜΜΚΠ, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1

Στο κεφάλαιο αυτό μελετήθηκε η έκφραση των miRNAs των μονοπύρρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος ασθενών με προχωρημένο ή μεταστατικό ΜΜΚΠ, οι οποίοι έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1 στην Παθολογική-Ογκολογική κλινική του ΠΑΓΝΗ κατά το χρονικό διάστημα 2017-2021 και πραγματοποιήθηκε σύγκριση της έκφρασης των miRNAs μεταξύ αντιστοιχισμένων δειγμάτων ασθενών στο πλάσμα και στα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος. Η εύρεση και η επιλογή του δείγματος των ασθενών, καθώς επίσης και τα κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού περιγράφονται στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι» στην παράγραφο 2.2. Δε πραγματοποιήθηκε μελέτη των miRNAs των μονοπύρρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος των ασθενών με προχωρημένο ή μεταστατικό ΜΜΚΠ, οι οποίοι έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα, λόγω μη διαθεσιμότητας των αντίστοιχων δειγμάτων.

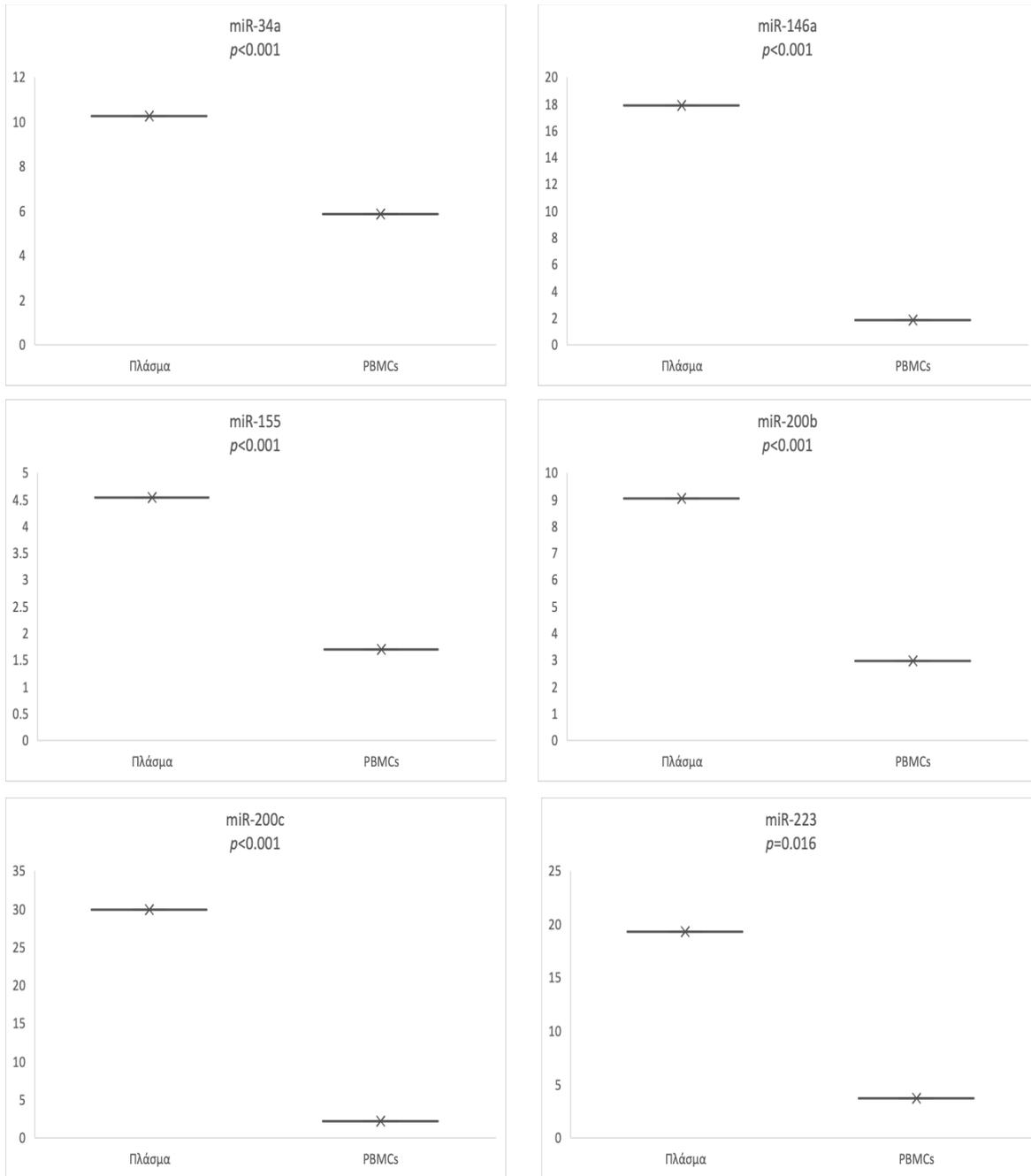
Στο κεφάλαιο αυτό μελετήθηκαν μόνο τα miRNAs που σχετίζονται με τη ρύθμιση των σημείων ελέγχου (miR-34a, miR-200b, miR-200c), που ελέγχουν τη ρύθμιση των T ρυθμιστικών κυττάρων Tregs (miR-155, miR-146) και των κατασταλτικών κυττάρων μυελοειδούς προέλευσης (MDSCs) (miR-223), ενώ δε μελετήθηκαν τα miRNAs που ρυθμίζουν την διαφοροποίηση των μακροφάγων (let-7c, miR-26a, miR-30d, miR-195, miR-202).

Συνολικά, στη μελέτη αυτή αναλύθηκαν 82 ασθενείς με ΜΜΚΠ, εκ των οποίων 15 ήταν γυναίκες (18.3%) και 67 άνδρες (81.7%). Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών ήταν τα 69 έτη (εύρος: 39-82), το 70.8% των ασθενών τη στιγμή της διάγνωσης βρίσκονταν ήδη σε μεταστατικό στάδιο και τέλος, το 48.8% των ασθενών είχε αδενοκαρκίνωμα ως ιστολογική εκτίμηση. Η ροή της μελέτης που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην Εικόνα 56 και τα χαρακτηριστικά των ασθενών συνοψίζονται στον Πίνακα 15.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί σύγκριση της έκφρασης των miRNAs που αναφέρθηκαν παραπάνω μεταξύ αντιστοιχισμένων δειγμάτων ασθενών (matched samples) στο πλάσμα και

στα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία κατάταξης Wilcoxon (Wilcoxon Signed Rank Test). Το αποτέλεσμα της στατιστικής τιμής της δοκιμής Wilcoxon αφορά στην πιθανότητα η μηδενική υπόθεση (null hypothesis), δηλαδή η πιθανότητα δύο πληθυσμοί/μεταβλητές να ανήκουν στο ίδιο δείγμα, να είναι αληθής. Όσο χαμηλότερη η τιμή p , τόσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά μεταξύ των πληθυσμών. Κατά συνέπεια, η μηδενική υπόθεση απορρίπτεται.

Από την ανάλυση της έκφρασης των miRNAs μεταξύ αντιστοιχισμένων δειγμάτων πλάσματος και μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος, βρέθηκε ότι η στατιστική τιμή της δοκιμής Wilcoxon για το miR-34a ήταν $p<0.001$, για το miR-146a ήταν $p<0.001$, για το miR-155 ήταν $p<0.001$, για το miR-200b ήταν $p<0.001$, για το miR-200c ήταν $p<0.001$ και για το miR-223 ήταν $p=0.016$ (Εικόνα 92). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η μηδενική υπόθεση απορρίπτεται, άρα η έκφραση των miRNAs στο πλάσμα είναι ανεξάρτητη και δε σχετίζεται με την αντίστοιχη έκφραση στα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος.



Εικόνα 92: Σύγκριση της έκφρασης των *miR-34a*, *miR-146a*, *miR-155*, *miR-200b*, *miR-200c* και *miR-223* σε αντιστοιχισμένα δείγματα πλάσματος και μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (PBMCs) σε ασθενείς (N=82) που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.

Ο έλεγχος της στατιστικής σημαντικότητας των καμπυλών διεξήχθη με την δοκιμασία κατάταξης Wilcoxon (Wilcoxon Signed Rank Test). Τα επίπεδα έκφρασης υπολογίστηκαν με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Αναγράφονται οι τιμές p values.

Κεφάλαιο IV

Συζήτηση

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή στόχος ήταν η ανάλυση της έκφρασης κυκλοφορούντων miRNAs, που συμμετέχουν στη ρύθμιση των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος (miR-34a, miR-200b, miR-200c), που ελέγχουν τη ρύθμιση των T ρυθμιστικών κυττάρων Tregs (T regulatory cells) (miR-146a, miR-155), των κατασταλτικών κυττάρων μυελοειδούς προέλευσης (Myeloid Derived Suppressor Cells, MDSCs) (miR-223) και τέλος των miRNAs που συμμετέχουν στη ρύθμιση του φαινοτύπου των μακροφάγων (Μφ) προς M1 ή M2 κυτταρική μοίρα (let-7c, miR-26a, miR-30d, miR-195, miR-202), σε ασθενείς με ΜΜΚΠ προχωρημένου ή μεταστατικού σταδίου. Μέσω αυτών των αναλύσεων ελέγχθηκε η συσχέτιση της έκφρασης των παραπάνω κυκλοφορούντων miRNAs στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ, με το διάστημα ελεύθερο υποτροπής (progression free survival, PFS), με την ολική επιβίωση (overall survival, OS), με την ανταπόκριση στη χορηγηθείσα θεραπεία, με τα διάφορα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών και τέλος, σε σχέση με τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ παθολογικής και φυσιολογικής κατάστασης. Επιπροσθέτως, έγινε προσπάθεια αποσαφήνισης της προέλευσης των κυκλοφορούντων miRNAs συγκρίνοντας την έκφραση τους στο πλάσμα και τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος.

Για την επίτευξη των στόχων της παρούσας ερευνητικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητες ομάδες ασθενών. Στην 1^η ομάδα συμπεριελήφθησαν ασθενείς (N=125) με ΜΜΚΠ, προχωρημένου ή μεταστατικού σταδίου, οι οποίοι είχαν λάβει χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα. Στη 2^η ομάδα συμπεριελήφθησαν ασθενείς (N=82) με ΜΜΚΠ, προχωρημένου ή μεταστατικού σταδίου, οι οποίοι είχαν λάβει ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1. Το πρώτο στάδιο της μελέτης αφορούσε στην εύρεση των ασθενών που θα εντάσσονταν στην προκείμενη μελέτη, σύμφωνα με τα κριτήρια ένταξης και αποκλεισμού, όπως αναφέρονται στην παράγραφο 2.2 της ενότητας «Υλικά και Μέθοδοι».

Με την εύρεση των ασθενών ακολούθησε εκτενής καταγραφή των κλινικοπαθολογικών τους χαρακτηριστικών, των χορηγούμενων θεραπειών και της ανταπόκρισης στη θεραπεία,

όπως προέκυψαν από τον ιατρικό τους φάκελο. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εύρεση και διαλογή των δειγμάτων πλάσματος καθώς και των δειγμάτων μονοπύρηνων κυττάρων μυελοειδούς προέλευσης (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs, μόνο για τους ασθενείς που έλαβαν ανοσοθεραπεία). Έπειτα, έγινε απομόνωση του ολικού RNA από τα δείγματα των ασθενών και των υγιών αιμοδοτών (ομάδα ελέγχου) και αναλύθηκε η σχετική έκφραση των miRNA-στόχων μέσω PCR σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR) με τη χρήση ειδικών σημασμένων ανιχνευτών (Taqman probes). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν, υποβλήθηκαν σε λεπτομερή στατιστική ανάλυση μέσω του στατιστικού πακέτου SPSS, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.9 της ενότητας «Υλικά και Μέθοδοι», για τη διερεύνηση της προγνωστικής και προβλεπτικής σημασίας των miRNAs, ως πιθανοί βιοδείκτες στον ΜΜΚΠ.

Ο καρκίνος του πνεύμονα παραμένει μέχρι και σήμερα μια από τις σημαντικότερες προκλήσεις της δημόσιας υγείας σε παγκόσμια κλίμακα. Σύμφωνα με τα επιδημιολογικά δεδομένα για το έτος 2020, καταγράφηκαν περισσότερο από 2 εκατομμύρια νέα περιστατικά, ενώ οι θάνατοι οφειλόμενοι στον καρκίνο του πνεύμονα ξεπέρασαν τα 1.8 εκατομμύρια, κατατάσσοντας τη νόσο ως τη δεύτερη πιο κοινή μορφή κακοήθειας και την πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως, και για τα δύο φύλα (GLOBOCAN 2020. Global Cancer Observatory, <http://gco.iarc.fr/>). Ο δείκτης της πενταετούς επιβίωσης στον καρκίνο του πνεύμονα κυμαίνεται στο 21.7%, καθότι η πλειονότητα των ασθενών (56%) τη στιγμή της διάγνωσης παρουσιάζουν ήδη προχωρημένη ή μεταστατική νόσο, γεγονός που περιορίζει τις θεραπευτικές επιλογές του ασθενή και μειώνει σημαντικά την πιθανότητα να ξεπεράσει σε επιβίωση τα πέντε έτη.

Μέχρι και σήμερα, η πρόγνωση και ο σχεδιασμός του βέλτιστου θεραπευτικού σχήματος για τον εκάστοτε ασθενή βασίζονται ως επί το πλείστον σε παθολογοανατομικούς παράγοντες, όπως είναι το στάδιο της νόσου κατά TNM [489], η λεμφαγγειακή διήθηση, το μέγεθος και η ανατομική θέση του όγκου, η προσβολή του υπεζωκότα [5], καθώς και σε ορισμένους μοριακούς δείκτες στα πλαίσια των στοχευμένων θεραπειών [70]. Οι πιο κοινές θεραπευτικές προσεγγίσεις που περιλαμβάνουν τη χημειοθεραπεία, την ακτινοθεραπεία και το χειρουργείο, παρατείνουν

την επιβίωση των ασθενών, χωρίς όμως να παρέχουν σημαντικά και μακροχρόνια θεραπευτικά αποτελέσματα.

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που παρουσιάζει ο ΜΜΚΠ, ο συχνότερα εμφανιζόμενος ιστολογικά κυτταρικός τύπος, απαρτίζοντας το 85% του συνόλου των περιστατικών με καρκίνο του πνεύμονα, είναι το ανοσοκατασταλτικό μικροπεριβάλλον που δημιουργείται στη θέση του όγκου, το οποίο ευνοεί την ανάπτυξη και εξάπλωση της νόσου [179-181], ενώ παράλληλα περιορίζει την αποτελεσματικότητα της αντικαρκινικής ανοσολογικής απόκρισης [182]. Ως εκ τούτου, η σύγχρονη ερευνητική δραστηριότητα στοχεύει στην εύρεση και αναγνώριση νέων και περισσότερο αξιόπιστων μοριακών βιοδεικτών σχετιζόμενων με καρκίνο, ανάμεσα σε βιομόρια που έχουν καίριο ρόλο στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης και της αντικαρκινικής ανοσίας.

Τα microRNAs (miRNAs) είναι μια οικογένεια μικρών μη-κωδικών μορίων RNA (19-24 νουκλεοτίδια), τα οποία συμμετέχουν στη ρύθμιση μιας πληθώρας βιολογικών μονοπατιών, ελέγχοντας τη γονιδιακή ρύθμιση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, στοχεύοντας mRNA και καταστέλλοντας τη μετάφρασή τους. Λόγω της συμμετοχής των miRNAs στα διάφορα στάδια της δημιουργίας και της εξέλιξης του όγκου, τα μόρια αυτά μελετώνται ως πιθανοί προγνωστικοί και προβλεπτικοί βιοδείκτες στον καρκίνο. Ο λόγος που τα μόρια αυτά χαρακτηρίζονται ως αποτελεσματικοί βιοδείκτες έγκειται στην υψηλή ειδικότητα τους και στο μοτίβο έκφρασης τους, που διαφέρει μεταξύ παθολογικής και φυσιολογικής κατάστασης. Ταυτόχρονα, ολοένα και περισσότερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα miRNAs μπορούν να ρυθμίσουν την ανοσολογική απόκριση κατά του όγκου, επηρεάζοντας την έκφραση ανοσορυθμιστικών μορίων στον όγκο και τα ανοσοκύτταρα. Σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, η έκφραση των miRNAs έχει βρεθεί απορυθμισμένη, ενώ έρευνες έχουν δείξει ότι εντοπίζονται και στο περιφερικό αίμα ασθενών με ΜΜΚΠ.

Στα πλαίσια της υγρής βιοψίας, τα κυκλοφορούντα miRNAs εμφανίζουν σημαντικά πλεονεκτήματα λόγω της ευκολίας συλλογής και επαναληψιμότητας. Το πλάσμα αποτελεί μια δεξαμενή miRNAs που εκκρίνονται από διαφορετικά σημεία του πρωτοπαθούς όγκου ή/και των μεταστατικών εστιών, ανακλώντας με τον τρόπο αυτό την ετερογένεια του όγκου. Ως

αποτέλεσμα, αλλαγές στη έκφραση των κυκλοφορούντων miRNAs προτείνουν ένα χρήσιμο εργαλείο για έγκαιρη διάγνωση και πρόγνωση της έκβασης και παρακολούθηση της πορείας των ασθενών με καρκίνο.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, όπως αναφέρθηκε, οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο διακριτές ομάδες. Στην 1^η ομάδα εντάχθηκαν ασθενείς με ΜΜΚΠ, οι οποίοι είχαν λάβει χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα και στη 2^η ομάδα εντάχθηκαν ασθενείς με ΜΜΚΠ, οι οποίοι είχαν λάβει ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανάλυση και συσχέτιση της έκφρασης των προαναφερθέντων κυκλοφορούντων miRNAs με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά, καθώς και την προβλεπτική τους σημασία στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ. Στην 1^η ομάδα των ασθενών βρέθηκε ότι τα miR-146a ($p < 0.001$), miR-195 ($p < 0.001$), miR-200c ($p = 0.022$) και miR-223 ($p < 0.001$) παρουσίασαν διαφορετική έκφραση μεταξύ των ασθενών και της ομάδας ελέγχου, γεγονός το οποίο προτείνει ότι τα συγκεκριμένα miRNAs μπορούν να διαχωρίσουν την παθολογική από τη υγιή κατάσταση. Πιο συγκεκριμένα τα miR-146a, miR-200c και miR-223 παρουσίασαν υψηλότερη έκφραση στα δείγματα των ασθενών, ενώ το miR-195 είχε υψηλότερη έκφραση στα δείγματα των ατόμων της ομάδας ελέγχου.

Στην 2^η ομάδα των ασθενών βρέθηκε ότι τα miR-26a ($p < 0.001$), miR-30d ($p < 0.001$), miR-34a ($p < 0.001$), miR-146a ($p < 0.001$), miR-155 ($p < 0.001$), miR-105 ($p < 0.001$), miR-200b ($p < 0.001$), miR-200c ($p < 0.001$), miR-202 ($p < 0.001$) και miR-223 ($p < 0.001$) παρουσίασαν διαφορετική έκφραση μεταξύ της ομάδας των ασθενών και της ομάδας ελέγχου. Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση των ανωτέρω miRNAs ήταν υψηλότερη στα δείγματα των ασθενών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, πλην του miR-195, η έκφραση του οποίου ήταν υψηλότερη στα δείγματα της ομάδας ελέγχου σε σχέση με τους ασθενείς.

Η απορυθμισμένη έκφραση των miRNAs στον καρκίνο πολλές φορές σχετίζεται με το είδος του καρκίνου διαμορφώνοντας ένα συγκεκριμένο προφίλ έκφρασης, το οποίο μπορεί να ωφελήσει στην έγκαιρη διάγνωση. Τα miRNAs που βοηθούν στην ανάπτυξη του όγκου συνήθως υπερεκφράζονται, ενώ αντίθετα εκείνα που καταστέλλουν την ανάπτυξη του όγκου

υποεκφράζονται [490]. Σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα βρίσκονται δεδομένα προηγούμενων μελετών τα οποία έδειξαν ότι τα κυκλοφορούντα miRNAs που εντοπίζονται στο πλάσμα ή στον ορό παρουσιάζουν συγκεκριμένο μοτίβο έκφρασης και μπορούν να διακρίνουν τους ασθενείς με καρκίνο από τα υγιή άτομα, όπως στον καρκίνο του μαστού [491], του παχέος εντέρου [492], του στομάχου [493], του πνεύμονα [494], του παγκρέατος [495], καθώς και στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα [496], συνηγορώντας ότι τα μόρια αυτά μπορεί να αποτελούν πιθανά εργαλεία για έγκαιρη διάγνωση.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν συσχετίσεις της έκφρασης των κυκλοφορούντων miRNAs στο πλάσμα με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών. Στην 1^η ομάδα βρέθηκε ότι στο σύνολο των ασθενών, η έκφραση του miR-34a ($p=0.021$) παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση με την ηλικία. Επιπρόσθετα, στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα η έκφραση του let-7c ($p=0.040$), miR-146a ($p=0.027$), και η έκφραση του miR-200b ($p=0.049$), βρέθηκαν να σχετίζονται αρνητικά. Δεν παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση της έκφρασης των κυκλοφορούντων miRNAs με την ηλικία στη 2^η ομάδα των ασθενών.

Παρόλο που δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις και δεδομένα αναφορικά με την ηλικία των ασθενών και την έκφραση των miRNAs, σε μια μελέτη που δημοσιεύτηκε το 2018 βρέθηκε να υπάρχει συσχέτιση της έκφρασης των miRNAs με την ηλικία, καθώς και με κλινικές εκβάσεις σχετιζόμενες με την ηλικία [497]. Περαιτέρω έρευνα στο συγκεκριμένο αντικείμενο θα δώσει περισσότερες πληροφορίες και θα αποσαφηνίσει κατά πόσο υπάρχει κάποια αξιολογήσιμη συσχέτιση με τον καρκίνο.

Η κλίμακα λειτουργικής κατάστασης ενός ασθενή έχει σημαντικές επιρροές στην κλινική του πορεία και είναι μια συνιστώσα που απασχολεί κυρίως την κλινική πρακτική. Πειραματικά δεδομένα που να συσχετίζουν την κλίμακα λειτουργικής κατάστασης με την έκφραση των κυκλοφορούντων miRNAs, δεν έχει ακόμα ελεγχθεί μέχρι σήμερα. Στην παρούσα διατριβή, από τη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ λειτουργικής κατάστασης των ασθενών βρέθηκε ότι στην 1^η ομάδα ασθενών, και στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα, η έκφραση του miR-195 ($p=0.019$) ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένη σε ασθενείς με κλίμακα λειτουργικής κατάστασης PS \geq 2. Παρόμοια, στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα η έκφραση του

miR-146a ($p=0.026$) ήταν αυξημένη σε ασθενείς με $PS \geq 2$. Στη 2^η ομάδα, στο σύνολο των ασθενών η έκφραση του let-7c ($p=0.004$) και η έκφραση του miR-26a ($p=0.050$) παρουσίασαν αρνητική συσχέτιση με την κλίμακα λειτουργικής κατάστασης, ενώ η έκφραση του miR-30d παρουσίαζε αρνητική συσχέτιση με την κλίμακα λειτουργικής κατάστασης και στο σύνολο των ασθενών ($p < 0.001$) και στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα ($p=0.004$), όπου η έκφραση του miR-30d ήταν στατιστικώς σημαντικά αυξημένη σε ασθενείς με $PS=0-1$.

Για τους ασθενείς στην 1^η ομάδα, δε παρατηρήθηκε κάποια συσχέτιση της έκφρασης των κυκλοφορούντων miRNAs με το στάδιο της νόσου. Ωστόσο, στη 2^η ομάδα, η έκφραση του miR-34a ($p=0.036$) στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα και η έκφραση του miR-26a ($p=0.043$) στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα, βρέθηκε να είναι σημαντικά αυξημένη σε ασθενείς με προχωρημένο στάδιο της νόσου κατά TNM.

Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών, οι οποίες έδειξαν ότι η έκφραση των κυκλοφορούντων miRNAs στο πλάσμα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, παρουσίαζε διαφορική έκφραση μεταξύ των σταδίων I-III A [498].

Στην 1^η ομάδα των ασθενών, μόνο το miR-155 ($p=0.043$) παρουσίασε διαφορική έκφραση μεταξύ των δύο ιστολογικών υπότυπων, δηλαδή οι ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα παρουσίασαν χαμηλότερη έκφραση του miR-155 έναντι των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα που παρουσίασαν υψηλότερη έκφραση. Στη 2^η ομάδα, διαφορική έκφραση ανάλογα με την ιστολογική ταξινόμηση σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα παρουσίασαν τα let-7c ($p=0.028$), miR-26a ($p=0.040$), miR-30d ($p=0.040$), miR-146a ($p=0.022$) και miR-200b ($p=0.009$). Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση των παραπάνω μορίων ήταν υψηλότερη στους ασθενείς σε αδενοκαρκίνωμα, σε σχέση με τους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα, στους οποίους η έκφραση ήταν χαμηλότερη.

Όσον αφορά στη διαφοροποίηση της έκφρασης μεταξύ των δύο διακριτών ιστολογικών υπότυπων του MMKP αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών δείχνουν ότι το προφίλ έκφρασης των miRNAs παρουσιάζει σημαντικές διαφορές μεταξύ αδενοκαρκινώματος και καρκινώματος πλακωδών κυττάρων, υποδηλώνοντας ότι διαφορετικά miRNAs συμμετέχουν στην παθογένεση

των δύο υπότυπων, ενώ παράλληλα προτείνουν τα μόρια αυτά θα μπορούσαν πιθανά να αποτελέσουν θεραπευτικούς στόχους [273, 274, 499-502].

Στην 1^η ομάδα, στο σύνολο των ασθενών, το πλήθος των μεταστατικών εστιών συσχετίστηκε αρνητικά και με την έκφραση του miR-26a ($p=0.031$) και με την έκφραση του miR-223 ($p=0.013$). Στη 2^η ομάδα, το πλήθος των μεταστατικών εστιών, στο σύνολο των ασθενών συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση του miR-200b ($p=0.016$), ενώ στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα συσχετίστηκε αρνητικά με την έκφραση του miR-195 ($p=0.019$).

Στην 1^η ομάδα, η έκφραση του miR-155 ($p=0.004$) στο σύνολο των ασθενών και η έκφραση του miR-26a και του miR-155 ($p=0.020$) στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα βρέθηκε να είναι αυξημένη σε ασθενείς οι οποίοι δεν είχαν εγκεφαλικές μεταστάσεις. Επιπροσθέτως, στη 2^η ομάδα, η έκφραση του miR-200b ($p=0.016$) και του miR-200c ($p=0.009$) συσχετίστηκαν θετικά με την παρουσία ηπατικών μεταστάσεων στο σύνολο των ασθενών, ενώ η έκφραση του miR-202 συσχετίστηκε αρνητικά με την παρουσία ηπατικών μεταστάσεων και στο σύνολο των ασθενών ($p=0.032$) και στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα ($p=0.040$).

Στην 1^η ομάδα, στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα, η έκφραση του miR-34a ($p=0.019$) συσχετίστηκε αρνητικά με την παρουσία οστικών μεταστάσεων. Όσων αφορά στους ασθενείς που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής της 2^{ης} ομάδας, η έκφραση του miR-200b βρέθηκε να είναι στατιστικώς σημαντικά αυξημένη σε ασθενείς με οστικές μεταστάσεις στο σύνολο των ασθενών ($p<0.001$) και στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα ($p=0.036$). Ομοίως, η έκφραση του miR-200c στο σύνολο των ασθενών ($p=0.011$) και στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα ($p=0.023$) είχε θετική σχέση με την παρουσία των οστικών μεταστάσεων.

Τα παραπάνω αποτελέσματα προτείνουν ότι η έκφραση των κυκλοφορούντων miRNAs σχετίζεται με το πλήθος και το είδος των μεταστατικών θέσεων στον ΜΜΚΠ. Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία υπάρχουν ήδη ενδείξεις που συσχετίζουν την έκφραση των miRNAs με μεταστατική δραστηριότητα σε πληθώρα νεοπλασιών, όπως για παράδειγμα στο

οστεοσάρκωμα [503], στον καρκίνο των ωοθηκών [504], στον καρκίνο του μαστού [505], και στον καρκίνο του πνεύμονα [506].

Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκε σύγκριση της έκφρασης των κυκλοφορούντων miRNAs με την ανταπόκριση στη θεραπεία. Στην 1^η ομάδα, στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα, τα miR-146a ($p=0.038$) και miR-223 ($p=0.038$) φαίνεται να υπερκεφράζονται σε ασθενείς με καλή αντικειμενική ανταπόκριση στη θεραπεία. Αντίθετα, στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα η έκφραση του miR-200b ($p=0.047$) συσχετίστηκε αρνητικά με την ανταπόκριση στη θεραπεία. Η ελεγχόμενη πορεία νόσου συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση του miR-34a και στο σύνολο των ασθενών ($p=0.037$) και στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα ($p=0.027$). Επίσης στην 1^η ομάδα, η ελεγχόμενη πορεία νόσου στο σύνολο των ασθενών βρέθηκε να συσχετίζεται αρνητικά με την έκφραση του miR-202 ($p=0.045$). Τέλος, η παρατεταμένη ελεγχόμενη νόσος βρέθηκε να συσχετίζεται θετικά με την έκφραση του miR-146a και στο σύνολο των ασθενών ($p=0.030$) και στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα ($p=0.018$). Η έκφραση του miR-34a ($p=0.045$) βρέθηκε επίσης να συσχετίζεται θετικά με την παρατεταμένη ελεγχόμενη νόσο στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα.

Στη 2^η ομάδα, η έκφραση του miR-34a συσχετίστηκε θετικά με ελεγχόμενη πορεία νόσου και στο σύνολο των ασθενών ($p=0.026$) και στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα ($p=0.039$). Επιπλέον, η παρατεταμένη ελεγχόμενη νόσος στο σύνολο των ασθενών συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση του miR-34a ($p=0.032$) και με την έκφραση του miR-195 ($p=0.037$). Στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση του miR-34a ($p=0.039$), ενώ στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα συσχετίστηκε θετικά με την έκφραση του miR-30d ($p=0.034$), με την έκφραση του miR-146a ($p=0.022$), με την έκφραση του miR-195 ($p=0.017$) και με την έκφραση του miR-223 ($p=0.022$).

Ένα επίσης μείζον πρόβλημα στην αντιμετώπιση ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα είναι η υψηλή πιθανότητα ανάπτυξης προόδου νόσου. Για το σκοπό αυτό, τα κυκλοφορούντα miRNAs μελετώνται ως πιθανοί προβλεπτικοί βιοδείκτες για τον κίνδυνο ανάπτυξης προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη θεραπεία. Στην 1^η ομάδα, η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι στο

σύνολο των ασθενών η χαμηλή έκφραση του miR-146a ($p=0.017$), καθώς και η υψηλή έκφραση του miR-200c ($p=0.027$) αποτελούν ανεξάρτητους προγνωστικούς δείκτες υψηλού κινδύνου προόδου νόσου ως απόκριση στη χορηγούμενη θεραπεία. Στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα, η χαμηλή έκφραση του miR-34a ($p=0.012$) και η υψηλή έκφραση του miR-200c ($p=0.043$) αναδείχθηκαν επίσης ως ανεξάρτητοι προγνωστικοί δείκτες υψηλού κινδύνου. Στη 2^η ομάδα, η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα η χαμηλή έκφραση του miR-34a ($p=0.027$) αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη αυξημένου κινδύνου ανάπτυξης προόδου νόσου ως βέλτιστη απόκριση στη χορηγούμενη θεραπεία.

Στην 1^η ομάδα, η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier, έδειξε ότι η υψηλή έκφραση του miR-200c σχετίζεται με μικρότερη ολική επιβίωση ($p=0.013$) στο σύνολο των ασθενών. Ομοίως, η υψηλή έκφραση του miR-202 συσχετίστηκε με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής ($p=0.048$) στο σύνολο των ασθενών, ενώ παράλληλα συσχετίστηκε και με μικρότερη ολική επιβίωση και στο σύνολο των ασθενών ($p=0.022$) και στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα ($p=0.012$). Στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα, η υψηλή έκφραση του miR-26a συσχετίστηκε με μικρότερη ολική επιβίωση ($p=0.042$), ενώ η υψηλή έκφραση του miR-155 συσχετίστηκε και με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής ($p=0.034$) και με μικρότερη ολική επιβίωση ($p=0.028$).

Στη 2^η ομάδα, η ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier έδειξε ότι στο σύνολο των ασθενών, η χαμηλή έκφραση του miR-34a σχετίζεται με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής ($p=0.039$), ενώ η υψηλή έκφραση του miR-200c σχετίζεται με μικρότερη ολική επιβίωση ($p=0.004$). Στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα, η υψηλή έκφραση του let-7c ($p=0.048$) και η χαμηλή έκφραση του miR-34a ($p=0.024$) σχετίζονται με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής, και παράλληλα, μικρότερη ολική επιβίωση σχετίζεται επίσης με χαμηλή έκφραση του miR-34a ($p=0.024$). Στην ίδια ομάδα ασθενών, η υψηλή έκφραση του miR-200c ($p=0.021$) σχετίζεται με μικρότερη ολική επιβίωση. Τέλος, στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα, μόνο η χαμηλή έκφραση του miR-26a ($p=0.020$) συσχετίστηκε με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η προγνωστική αξία των κυκλοφορούντων miRNAs ως πιθανοί βιοδείκτες για τον διάστημα ελεύθερο υποτροπής και ολικής επιβίωσης. Στην 1^η ομάδα, τα αποτελέσματα των αναλύσεων ανέδειξαν ότι η υψηλή έκφραση του miR-202 αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα δυσμενούς πρόγνωσης για το διάστημα ελεύθερο υποτροπής ($p=0.014$), ενώ η υψηλή έκφραση του miR-200c αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη για μικρότερη ολική επιβίωση ($p=0.041$), στο σύνολο των ασθενών. Στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα, η υψηλή έκφραση του miR-202 βρέθηκε επίσης να αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα μικρότερης ολικής επιβίωσης ($p=0.012$).

Στη 2^η ομάδα, στο σύνολο των ασθενών, η υψηλή έκφραση του miR-200c αναδείχτηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μικρότερη ολική επιβίωση ($p=0.013$). Στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα, η χαμηλή έκφραση του miR-34a σχετίζεται με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής ($p=0.046$), αλλά παράλληλα αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη για μικρότερη ολική επιβίωση ($p=0.019$). Με μικρότερη ολική επιβίωση συσχετίστηκε επίσης η υψηλή έκφραση του miR-200c ($p=0.034$). Στο υποσύνολο των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα, η χαμηλή έκφραση του miR-26a αναδείχτηκε ο ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης για μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής ($p=0.050$).

Το miR-26a είναι ένα miRNA που συμμετέχει στη ρύθμιση των Μφ και προάγει την πύλωση τους προς M2 φαινότυπο, καταστέλλοντας μια ποικιλία γονιδίων που σχετίζονται με τα σηματοδοτικά μονοπάτια του NF-κB και του MAPK [327]. Στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, το miR-26a αποδείχτηκε ότι καταστέλλει τη στρατολόγηση των Μφ στο μικροπεριβάλλον του όγκου [507]. Το miR-26a έχει βρεθεί επίσης να ενισχύει τη μεταναστευτική δραστηριότητα των κυττάρων του όγκου στον καρκίνο του πνεύμονα, τροποποιώντας την αντίστοιχη γονιδιακή έκφραση [344], ενώ υπάρχουν και αναφορές όπου το χαμηλό επίπεδο έκφρασης του miR-26a σχετίζεται με αντίσταση στην πλατίνα, σε κυτταρικές σειρές ΜΜΚΠ [508]. Πραγματοποιώντας μια ανάλυση κατά KM plotter βρέθηκε ότι στον καρκίνο του πνεύμονα η χαμηλή έκφραση του miR-26a σχετίζεται με μικρότερη επιβίωση και σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα και σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα (<http://kmpplot.com/analysis/index.php?p=service>).

Στον ορό ασθενών με γλοιοβλάστωμα, η έκφραση του miR-26a ήταν σημαντικά αυξημένη σε σχέση με τα δείγματα των υγιών ατόμων [509], εν αντιθέσει, οι ασθενείς με καρκίνο του στομάχου παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του miR-26a σε δείγματα πλάσματος και ιστού έναντι των δειγμάτων των υγιών [510]. Ομοίως, σε μια άλλη έρευνα, βρέθηκε ότι η χαμηλή έκφραση του miR-26a σχετίζεται με δυσμενή επιβίωση σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου [511]. Συνοψίζοντας, δεν υπάρχουν αρκετές μελέτες σχετικά με την προγνωστική αξία του miR-26a στον καρκίνο του πνεύμονα και αξίζει να σημειωθεί ότι τα μέχρι τώρα δεδομένα που προκύπτουν από τη βιβλιογραφία είναι αντικρουόμενα.

Το miR-34a είναι από τα πιο εξαιρετικά διατηρημένα και μελετημένα miRNAs, με ογκοκατασταλτική δράση [512]. Τα επίπεδα έκφρασης του miR-34a είναι στενά συνδεδεμένα με διάφορες λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος και της αντικαρκινικής ανοσολογικής απόκρισης, όπως είναι η λειτουργία και η δράση των NK κυττάρων, η πόλωση των Μφ, η διαφοροποίηση των MDSCs, και τέλος η ενεργοποίηση και ο πολλαπλασιασμός των διάφορων Τ κυτταρικών πληθυσμών [513], ενώ ταυτόχρονα έχει βρεθεί ότι συμμετέχει στη ρύθμιση του μεταβολισμού των καρκινικών κυττάρων και είναι ικανό να επαναπρογραμματίσει την ανάπτυξη, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση τους [513]. Επιπλέον, το miR-34a ελέγχει αρνητικά το μονοπάτι του EMT, στοχεύοντας μια ποικιλία γονιδίων και πιθανά συμμετέχει στη διαδικασία αυτή αναστρέφοντας την [513].

Δεδομένων των ογκοκατασταλτικών του λειτουργιών, το miR-34a συχνά υποεκφράζεται σε συμπαγείς όγκους. Αυτό το miRNA, στοχεύει άμεσα την 3-UTR του PD-L1 και καταστέλλει την έκφραση του [291]. Στον ΜΜΚΠ, η υποέκφραση του miR-34a συνεπάγεται υπερέκφραση του PD-L1 στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων. Ως μέρος του άξονα p53/miR-34a/PD-L1, στον ΜΜΚΠ, η παραπάνω σχέση σχετίζεται με δυσμενή κλινική έκβαση [514]. Ακόμη, σε ασθενείς με ΜΜΚΠ και κακοήθη υπεζωκοτική συλλογή, υψηλά επίπεδα CD44 στα κύτταρα είχαν ταυτόχρονη χαμηλή έκφραση του miR-34a, όπου η αποκατάσταση της έκφρασης του τελευταίου, ανέστειλε το σχηματισμό αποικιών καρκινικών κυττάρων με υψηλό CD44 [515].

Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας συμφωνούν με τα ευρήματα προηγούμενων μελετών, οι οποίες υποστηρίζουν ότι η υψηλή έκφραση του miR-34a στο πλάσμα ασθενών με

ΜΜΚΠ σχετίζεται με μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής και μακρύτερη επιβίωση [375], και παράλληλα σε γυναίκες με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού, η χαμηλή έκφραση του miR-34a στο πλάσμα τους συνδέθηκε με χειρότερη πρόγνωση [381]. Επιπρόσθετα, σε ασθενείς με ΜΜΚΠ, η ανάλυση δειγμάτων ιστού από εκτομή, έδειξε ότι τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του miR-34a σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο υποτροπής της νόσου [516]. Τέλος, από προηγούμενα εργαστηριακά δεδομένα έχει δειχθεί ότι οι ασθενείς με ΜΜΚΠ που εμφάνισαν κακή ανταπόκριση στη θεραπεία, είχαν και χαμηλότερα επίπεδα miR-34a στο πλάσμα [517].

Το miR-146a έχει χαρακτηριστεί ως ένα από τα βασικότερα μόρια που ρυθμίζουν την έμφυτη ανοσολογική απόκριση [518], με σαφή ρόλο στη ρύθμιση των λειτουργιών των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων [401]. Πιο συγκεκριμένα, έχει προταθεί ότι το miR-146a μεσολαβεί στην επιβίωση και ενεργοποίηση των δενδριτικών κυττάρων και της σηματοδότησης που έπεται της φλεγμονώδους αντίδρασης [388]. Στον καρκίνο, το miR-146a φαίνεται να εμπλέκεται στην ανάπτυξη και αναστολή της εξέλιξης του όγκου [519]. Στον καρκίνο του οισοφάγου, το miR-146a υποεκφράζεται σε δείγματα καρκινικού ιστού σε σχέση με τον υγιή ιστό και η έκφραση αυτή σχετίζεται με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής και με χειρότερη πρόγνωση [520]. Παρόμοια είναι τα αποτελέσματα και στον καρκίνο των ωθηκών [521].

Στον ΜΜΚΠ, το miR-146a έχει τόσο ογκογόνο, όσο ογκοκατασταλτική δράση, παρόλο που η πλειονότητα των μελετών προτείνει ότι το μόριο αυτό λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό. Το miR-146a υποεκφράζεται σε καρκινικές σειρές και σε δείγματα καρκινικού ιστού ΜΜΚΠ [522], και ως εκ τούτου μελετάται ως πιθανός βιοδείκτης για έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου του πνεύμονα [523]. Στην παρούσα μελέτη το miR-146a προτείνεται να δρα ως ογκοκατασταλτικό. Σε συμφωνία αυτού, βρίσκονται και άλλες μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα καρκινικού ιστού ασθενών με ΜΜΚΠ. Οι ασθενείς με χαμηλή έκφραση του miR-146a εμφάνισαν προχωρημένο στάδιο νόσου, με αυξημένη μεταστατική δραστηριότητα και μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής, έναντι των ασθενών με υψηλή έκφραση του συγκεκριμένου μορίου [522].

Το miR-200c είναι από τα πιο μελετημένα miRNAs σχετικά με το ρόλο του στην εξέλιξη του όγκου. Τα μέλη της οικογένειας miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429)

στοχεύουν απευθείας το μεταγραφικό παράγοντα ZEB1 (zinc-finger E-box-binding homeobox 1), ο οποίος ελέγχει την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT), με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η μετάσταση και η εισβολή των καρκινικών κυττάρων σε ιστούς [524]. Επιπλέον, το PD-L1 αποτελεί στόχο καθοδικά του άξονα miR-200/ZEB1, το οποίο είναι ένα μόριο με ενεργό ανοσοκατασταλτικό ρόλο στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Η έκφραση του PD-L1 από τα κύτταρα του όγκου προάγει την εξάντληση των CD8⁺ διηθητικών Τ λεμφοκυττάρων (TILs), βοηθώντας με τον τρόπο αυτό την ανάπτυξη και μετάσταση των κυττάρων του όγκου [524].

Στο πλαίσιο αυτό, το miR-200c στοχεύει την 3-UTR του PD-L1, αναστέλλοντας την έκφραση του, και ταυτόχρονα αντιστρέφει την εξάντληση των CD8⁺ διηθητικών Τ λεμφοκυττάρων. Αποτελέσματα ερευνών έχουν δείξει ότι σε πρώιμα στάδια ΜΜΚΠ, τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του miR-200c σχετίζονται με υψηλότερα επίπεδα PD-L1 και μεγαλύτερα ποσοστά επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης, προκαλώντας δυσμενή κλινική έκβαση [524]. Παρόλα αυτά, υπάρχουν στοιχεία που συνδέουν τη δράση του miR-200c με αγγειογένεση [525]. Μελέτες σε in-vitro μοντέλα και μελέτες σχετικές με τη λειτουργία των μορίων έχουν προτείνει ασύμβατα αποτελέσματα, αναφορικά με το εάν το miR-200c έχει ογκοκατασταλτική δράση ή προωθεί τη μετάσταση, από διαφορετικά δείγματα και διαφορετικούς τύπους όγκου [267, 526, 527].

Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, σε ασθενείς με ΜΜΚΠ η έκφραση του miR-200c ήταν υψηλότερη σε δείγματα καρκινικού έναντι υγιούς ιστού, και η έκφραση αυτή συσχετίστηκε με μικρότερη επιβίωση [528, 529]. Επιπρόσθετα, σε ασθενείς με ΜΜΚΠ, σε δείγματα ιστού από εκτομή, η υψηλή έκφραση του miR-200c συσχετίστηκε με μικρότερη ολική επιβίωση και στο σύνολο των ασθενών αλλά και στο υποσύνολο των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα [530]. Σε μια μελέτη που δημοσιεύτηκε πρόσφατα, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν κυτταρικές σειρές καρκίνου των ωοθηκών και βρήκαν ότι η υψηλή έκφραση του miR-200c συσχετίζεται με λιγότερο ογκογόνο μικροπεριβάλλον του όγκου, καθώς ανέστειλε και την έκφραση του PD-L1 [531]. Σε αντίθεση με αυτά τα αποτελέσματα, μια άλλη ερευνητική ομάδα που επίσης ασχολήθηκε με τον καρκίνο των ωοθηκών, διαπίστωσε ότι σε δείγματα καρκινικού ιστού, η υπερέκφραση του miR-200c συσχετίζεται με πιο επιθετική μορφή της νόσου [455].

Λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω, καθώς και τα ευρήματα της παρούσας μελέτης προκύπτει το συμπέρασμα ότι το miR-200c παρουσιάζει διαφορετικό μοτίβο έκφρασης στο μικροπεριβάλλον του όγκου και την κυκλοφορία. Δεδομένης της ετερογένειας του όγκου στον ΜΜΚΠ, μελλοντικές μελέτες είναι απαραίτητες για την κατανόηση του ρόλου του miR-200c, ενώ η αποσαφήνιση της προέλευσης του μπορεί να βοηθήσει στη βαθύτερη κατανόηση της λειτουργίας και της δράσης του [532].

Το miR-202 είναι ένα miRNA που συμμετέχει στη ρύθμιση των Μφ κατά τη βακτηριακή λοίμωξη [462-464]. Έχει επίσης αναφερθεί ότι το miR-202 αναστέλλει τον ανοσοκατασταλτικό μετατροπέα σήματος και ενεργοποιητή της μεταγραφής 3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3, STAT3) [465], η ενεργοποίηση του οποίου στο μικροπεριβάλλον του όγκου έχει σχετιστεί με τον Μ2 φαινότυπο των Μφ και με κακή πρόγνωση των ασθενών [533]. Το miR-202 ανήκει στην οικογένεια του let-7c και έχει χαρακτηριστεί ως ένα miRNA με ογκοκατασταλτική δράση σε διάφορους καρκίνους, συμπεριλαμβανομένου και του ΜΜΚΠ [465, 534-536], ενώ επίσης έχει βρεθεί να επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας με πλατινούχα σύμπλοκα, μέσω στόχευσης του μονοπατιού του Ras/MAPK [537]. Μειωμένα επίπεδα έκφρασης του miR-202 έχουν επίσης βρεθεί σε καρκινικούς ιστούς πνεύμονα [465, 536], καθώς και σε προχωρημένο στάδιο νόσου και λεμφαδενικές μεταστάσεις [465].

Σε αντίθεση με τα δεδομένα αυτά βρίσκονται τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, όπου για πρώτη φορά γίνεται αναφορά σε ογκογόνο δράση για το miR-202 [471]. Σε αντίθεση επίσης με τα ευρήματα αυτής της μελέτης είναι και η ανάλυση κατά KM plotter, στην οποία η χαμηλή έκφραση του miR-202 συσχετίζεται με μικρότερη επιβίωση και στους δύο ιστολογικούς υπότυπους του καρκίνου του πνεύμονα (<http://kmplot.com/analysis/index.php?p=service>) [471]. Η ασυμφωνία των αποτελεσμάτων θα μπορούσε να εξηγηθεί από τον διαφορετικό τύπο δειγμάτων (πλάσμα έναντι ιστού) ή/και από τα διαφορετικά στάδια νόσου των ασθενών, μεταξύ των αναλύσεων, καθώς η ανάλυση κατά KM plotter χρησιμοποιεί δεδομένα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα, η πλειονότητα των οποίων είναι πρώιμου σταδίου.

Ωστόσο, σε μια άλλη μελέτη σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, η έκφραση του miR-202 ήταν υψηλότερη στην κυκλοφορία, έναντι δειγμάτων υγιών ατόμων [467], ενώ η αυξημένη αυτή

έκφραση έχει συσχετιστεί με επιθετικότερη νόσο και μικρότερη επιβίωση [466]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το miR-202 έχει συμπεριληφθεί σε μια υπογραφή 6 miRNAs που προέρχονταν από δείγματα πνευμονικού ιστού και παρουσίασε διαφορική έκφραση μεταξύ αδενοκαρκινώματος και πλακώδους καρκινώματος [268].

Γενικά, δεδομένα για τη συσχέτιση της έκφρασης του miR-202 και την κλινική του σημασία σε ασθενείς με καρκίνο είναι εξαιρετικά περιορισμένα. Όμως, τα δεδομένα της παρούσας έρευνας προτείνουν ότι τα επίπεδα έκφρασης του κυκλοφορούντος miR-202 μπορεί να έχουν διαφορετική προγνωστική σημασία ανάλογα με τον ιστολογικό υπότυπο [471].

Το τελευταίο τμήμα της παρούσας διδακτορικής διατριβής αφορά στη μελέτη της προέλευσης των κυκλοφορούντων miRNAs. Η προέλευση των μορίων αυτών έχει απασχολήσει χρόνια την επιστημονική κοινότητα χωρίς όμως σαφείς διευκρινίσεις μέχρι και σήμερα. Στην εν λόγω έρευνα έγινε προσπάθεια προσέγγισης του συγκεκριμένου θέματος. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν αντιστοιχισμένα δείγματα ασθενών, που έλαβαν ανοσοθεραπεία δεύτερης γραμμής με αναστολείς PD-1/PD-L1, πλάσματος και μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος (PBMCs). Ελέγχθηκε η έκφραση των miRNAs που σχετίζονται με τη ρύθμιση των σημείων ελέγχου (miR-34a, miR-200b, miR-200c), που ελέγχουν τη ρύθμιση των T ρυθμιστικών κυττάρων (Tregs) (miR-146a, miR-155) και των κατασταλτικών κυττάρων μυελοειδούς προέλευσης (MDSCs) (miR-223).

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης μεταξύ των αντιστοιχισμένων δειγμάτων ασθενών σε πλάσμα και σε μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος έδειξε ότι τα miRNAs παρουσιάζουν διαφορική και στατιστικά σημαντική έκφραση μεταξύ των δειγμάτων. Το αποτέλεσμα αυτό προτείνει ότι τα miRNAs του πλάσματος αποτελούν μια ανεξάρτητη δεξαμενή και δε σχετίζονται με αυτά της έκφρασης των μονοπύρηνων κυττάρων. Ως εκ τούτου, προτείνεται το συμπέρασμα ότι τα συγκεκριμένα miRNAs αποτελούν προϊόν της μεταβολικής δραστηριότητας των διαφόρων θέσεων του όγκου.

Τα καρκινικά κύτταρα κατά τη διάρκεια των διαφόρων σταδίων ανάπτυξης του όγκου, αποπίπτουν ή νεκρώνονται, με αποτέλεσμα να απελευθερώνουν στην αιματική κυκλοφορία μόρια σχετιζόμενα με τον όγκο. Τα κυκλοφορούντα αυτά εξωκυττάρια μόρια προέρχονται είτε

από τις πρωτογενείς θέσεις του όγκου, είτε από διηθημένες ή μεταστατικές εστίες. Συνεπώς, μπορεί να λειτουργήσουν ως βιοδείκτες και το επίπεδο έκφρασης τους εξαρτάται/ανακλά το φορτίο του όγκου, το μέγεθος, το στάδιο ή/και τις μεταστατικές θέσεις [538]. Μελέτες έχουν δείξει ότι δεν υπάρχει αλληλοεπικάλυψη μεταξύ της έκφρασης των κυκλοφορούντων miRNAs και των miRNAs των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος, στον ΜΜΚΠ [539, 540].

Κατά συνέπεια, η έκφραση των miRNAs από τα μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος δεν είναι πιθανό να επηρεάζεται από τη δραστηριότητα των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων [541]. Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, οι μελέτες σύγκρισης της έκφρασης των miRNAs στην αιματική κυκλοφορία και στα μονοπύρηννα κύτταρα του περιφερικού αίματος είναι ελάχιστες και ειδικά για τον καρκίνο εξαιρετικά περιορισμένες. Η παρούσα μελέτη αποτελεί μια από τις πρώτες προσπάθειες αποσαφήνισης της προέλευσης των κυκλοφορούντων miRNAs. Εν κατακλείδι, το συγκεκριμένο θέμα χρήζει περαιτέρω έρευνας προκειμένου να δοθούν πιο σαφείς και αξιόπιστες απαντήσεις αναφορικά με την προέλευση των μορίων αυτών.

Συμπερασματικά, το σύνολο της εργασίας αυτής ενισχύει την υπόθεση ότι τα miRNAs αποτελούν πολλά υποσχόμενους βιοδείκτες της ανταπόκρισης στη θεραπεία και της επιβίωσης και παρέχει μια ακέραιη βάση για περαιτέρω έρευνες.

Κεφάλαιο V

Συμπεράσματα

Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη προ-αναλυτικές και αναλυτικές παράμετροι εξετάστηκαν διεξοδικά, λαμβάνοντας υπόψη όλες τις μεταβλητές που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μεροληψία [542, 543]. Επί του παρόντος, μελέτες σχετικά με τη συσχέτιση των miRNAs με την έκβαση ασθενών με ΜΜΚΠ που λαμβάνουν ανοσοθεραπεία είναι περιορισμένες [532]. Επίσης, οι βιολογικές λειτουργίες των κυκλοφορούντων miRNAs δεν έχουν διευκρινιστεί, θεωρείται όμως ότι συμμετέχουν σε διαδικασίες διακυτταρικής επικοινωνίας [490]. Επιπλέον, θα πρέπει να τονιστεί ότι η λειτουργία των κυκλοφορούντων miRNAs στην ανοσολογική απόκριση παραμένει ακόμη ασαφής, προσφέροντας έδαφος για μελέτη.

Ως αποτέλεσμα, τα διαθέσιμα δεδομένα για τα miRNAs που μπορούν να οδηγήσουν σε οποιοδήποτε σημαντικό συμπέρασμα σχετικά με το ρόλο τους στην πρόβλεψη της απόκρισης στη θεραπεία και της επιβίωσης είναι περιορισμένα, κυρίως λόγω του μικρού μεγέθους των δειγμάτων των ασθενών που εντάσσονται σε αυτές τις μελέτες, καθώς και λόγω των διαφορετικών πειραματικών τεχνικών μεταξύ των ερευνητικών ομάδων [544, 545]. Εν αντιθέσει, τα αποτελέσματα της εν λόγω μελέτης προέκυψαν από ένα σχετικά μεγάλο αριθμό δειγμάτων ασθενών, ενώ παράλληλα η σημασία της μελέτης έγκειται στη συσχέτιση του προφίλ έκφρασης ανοσοτροποποιητικών miRNAs με την επιβίωση, την ανταπόκριση στη θεραπεία και τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών, και όχι ως ένα εργαλείο ανίχνευσης και διάγνωσης του ΜΜΚΠ στην κλινική πρακτική.

Οι προκαλούμενες από τον όγκο αλλοιώσεις στο προφίλ έκφρασης των κυκλοφορούντων miRNAs ασθενών με καρκίνο, είναι ένα πολλά υποσχόμενο μη-επεμβατικό εργαλείο με προγνωστική σημασία. Αυτά τα μικρά μη-κωδικά RNA που απελευθερώνονται στην κυκλοφορία από τον όγκο φέρουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την προέλευση, ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου, οι οποίες αντικατοπτρίζουν την προγνωστική τους αξία [546]. Συγκεντρωτικά, τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής υποστηρίζουν ότι το προφίλ έκφρασης των κυκλοφορούντων miRNAs που εμπλέκονται στη ρύθμιση βασικών συστατικών/παραμέτρων του ανοσοποιητικού

συστήματος σχετίζονται και παρέχουν σημαντικές πληροφορίες σχετικές με την επιβίωση των ασθενών με προχωρημένο ή μεταστατικό ΜΜΚΠ.

Μελλοντικές έρευνες θα πρέπει να εντάξουν ετερογενείς και ανεξάρτητες ομάδες ελέγχου, όπως ασθενείς με χρόνιες αναπνευστικές δυσλειτουργίες, να μελετηθούν ακόμη μεγαλύτερες ομάδες ασθενών, και κυρίως το προφίλ έκφρασης των κυκλοφορούντων miRNAs να εξεταστεί και σε μεταγενέστερα χρονικά σημεία της έναρξης της θεραπείας, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν και κατά πόσο η έκφραση τους επηρεάζεται και διαμορφώνεται από τη θεραπεία. Οι μελέτες αυτές θα προσφέρουν σημαντική βοήθεια στα πλαίσια της υγρής βιοψίας στη θεραπεία και την αντιμετώπιση ασθενών με ΜΜΚΠ.

Κεφάλαιο VI

Βιβλιογραφία

Βιβλιογραφία

1. *Non-Small Cell Lung Cancer Treatment (PDQ(R)): Patient Version*, in *PDQ Cancer Information Summaries*. 2002: Bethesda (MD).
2. de Groot, P.M., et al., *The epidemiology of lung cancer*. *Transl Lung Cancer Res*, 2018. **7**(3): p. 220-233.
3. Kuo, C.W., et al., *Non-small cell lung cancer in very young and very old patients*. *Chest*, 2000. **117**(2): p. 354-7.
4. Kocher, F., et al., *Longitudinal analysis of 2293 NSCLC patients: a comprehensive study from the TYROL registry*. *Lung Cancer*, 2015. **87**(2): p. 193-200.
5. *Non-Small Cell Lung Cancer Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version*, in *PDQ Cancer Information Summaries*. 2002: Bethesda (MD).
6. Peter Boyle, N.G., Jack Henningfield, John Seffrin, Witold Zatonski, *Tobacco: Science, policy and public health*, ed. P. Boyle, et al. 2010: Oxford University Press.
7. North, C.M. and D.C. Christiani, *Women and lung cancer: what is new?* *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 2013. **25**(2): p. 87-94.
8. Hamra, G.B., et al., *Outdoor particulate matter exposure and lung cancer: a systematic review and meta-analysis*. *Environ Health Perspect*, 2014. **122**(9): p. 906-11.
9. Rivera, G.A. and H. Wakelee, *Lung Cancer in Never Smokers*. *Adv Exp Med Biol*, 2016. **893**: p. 43-57.
10. Krewski, D., et al., *Residential radon and risk of lung cancer: a combined analysis of 7 North American case-control studies*. *Epidemiology*, 2005. **16**(2): p. 137-45.
11. Alberg, A.J., et al., *Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines*. *Chest*, 2013. **143**(5 Suppl): p. e1S-e29S.
12. Driscoll, T., et al., *The global burden of disease due to occupational carcinogens*. *Am J Ind Med*, 2005. **48**(6): p. 419-31.
13. Dela Cruz, C.S., L.T. Tanoue, and R.A. Matthay, *Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention*. *Clin Chest Med*, 2011. **32**(4): p. 605-44.
14. De Matteis, S., D. Consonni, and P.A. Bertazzi, *Exposure to occupational carcinogens and lung cancer risk. Evolution of epidemiological estimates of attributable fraction*. *Acta Biomed*, 2008. **79 Suppl 1**: p. 34-42.
15. Debaeky, M., *Carcinoma of the lung and tobacco smoking: a historical perspective*. *Ochsner J*, 1999. **1**(3): p. 106-8.
16. Labaki, W.W. and S.R. Rosenberg, *Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. *Ann Intern Med*, 2020. **173**(3): p. ITC17-ITC32.
17. Vogelmeier, C.F., et al., *Goals of COPD treatment: Focus on symptoms and exacerbations*. *Respir Med*, 2020. **166**: p. 105938.
18. Croft, J.B., et al., *Urban-Rural County and State Differences in Chronic Obstructive Pulmonary Disease - United States, 2015*. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2018. **67**(7): p. 205-211.
19. Zhang, X., et al., *Chronic obstructive pulmonary disease and risk of lung cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies*. *Oncotarget*, 2017. **8**(44): p. 78044-78056.
20. Brenner, D.R., J.R. McLaughlin, and R.J. Hung, *Previous lung diseases and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis*. *PLoS One*, 2011. **6**(3): p. e17479.

21. Brenner, D.R., et al., *Previous lung diseases and lung cancer risk: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium*. Am J Epidemiol, 2012. **176**(7): p. 573-85.
22. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 436-44.
23. Sogaard, K.K., et al., *Pneumonia and the incidence of cancer: a Danish nationwide cohort study*. J Intern Med, 2015. **277**(4): p. 429-38.
24. Schabath, M.B., et al., *Opposing effects of emphysema, hay fever, and select genetic variants on lung cancer risk*. Am J Epidemiol, 2005. **161**(5): p. 412-22.
25. Grulich, A.E., et al., *Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis*. Lancet, 2007. **370**(9581): p. 59-67.
26. Shiels, M.S. and E.A. Engels, *Evolving epidemiology of HIV-associated malignancies*. Curr Opin HIV AIDS, 2017. **12**(1): p. 6-11.
27. Dubrow, R., et al., *HIV infection, aging, and immune function: implications for cancer risk and prevention*. Curr Opin Oncol, 2012. **24**(5): p. 506-16.
28. Franzetti, M., E. Ricci, and P. Bonfanti, *The Pattern of Non-AIDS-defining Cancers in the HIV Population: Epidemiology, Risk Factors and Prognosis. A Review*. Curr HIV Res, 2019. **17**(1): p. 1-12.
29. Engels, E.A., et al., *Cancer risk in people infected with human immunodeficiency virus in the United States*. Int J Cancer, 2008. **123**(1): p. 187-94.
30. Winstone, T.A., et al., *Epidemic of lung cancer in patients with HIV infection*. Chest, 2013. **143**(2): p. 305-314.
31. Sigel, K., A. Makinson, and J. Thaler, *Lung cancer in persons with HIV*. Curr Opin HIV AIDS, 2017. **12**(1): p. 31-38.
32. Lissowska, J., et al., *Family history and lung cancer risk: international multicentre case-control study in Eastern and Central Europe and meta-analyses*. Cancer Causes Control, 2010. **21**(7): p. 1091-104.
33. Yokota, J., K. Shiraishi, and T. Kohno, *Genetic basis for susceptibility to lung cancer: Recent progress and future directions*. Adv Cancer Res, 2010. **109**: p. 51-72.
34. Schwartz, A.G. and M.L. Cote, *Epidemiology of Lung Cancer*. Adv Exp Med Biol, 2016. **893**: p. 21-41.
35. Herbst, R.S., J.V. Heymach, and S.M. Lippman, *Lung cancer*. N Engl J Med, 2008. **359**(13): p. 1367-80.
36. Siddiqui, F., S. Vaqar, and A.H. Siddiqui, *Lung Cancer*, in *StatPearls*. 2023: Treasure Island (FL).
37. Kumar, V., et al., *Robbins basic pathology*. 2018, Philadelphia, Pa: Elsevier.
38. Inamura, K., *Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification*. Front Oncol, 2017. **7**: p. 193.
39. Rami-Porta, R., et al., *The IASLC lung cancer staging project: the new database to inform the eighth edition of the TNM classification of lung cancer*. J Thorac Oncol, 2014. **9**(11): p. 1618-24.
40. Chansky, K., et al., *The IASLC Lung Cancer Staging Project: External Validation of the Revision of the TNM Stage Groupings in the Eighth Edition of the TNM Classification of Lung Cancer*. J Thorac Oncol, 2017. **12**(7): p. 1109-1121.
41. Wahbah, M., et al., *Changing trends in the distribution of the histologic types of lung cancer: a review of 4,439 cases*. Ann Diagn Pathol, 2007. **11**(2): p. 89-96.
42. Schabath, M.B. and M.L. Cote, *Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2019. **28**(10): p. 1563-1579.

43. Travis, W.D., E. Brambilla, and G.J. Riely, *New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials*. J Clin Oncol, 2013. **31**(8): p. 992-1001.
44. Gariani, J., et al., *Noninvasive pulmonary nodule characterization using transcutaneous bioconductance: Preliminary results of an observational study*. Medicine (Baltimore), 2018. **97**(34): p. e11924.
45. Myers, D.J. and J.M. Wallen, *Lung Adenocarcinoma*, in *StatPearls*. 2023: Treasure Island (FL).
46. Rubin, P. and J.T. Hansen, *TNM staging atlas with 3D oncoanatomy*. 2nd ed. 2012, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
47. Travis, W.D., et al., *International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma*. J Thorac Oncol, 2011. **6**(2): p. 244-85.
48. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma*. Nature, 2014. **511**(7511): p. 543-50.
49. Ellrott, K., et al., *Scalable Open Science Approach for Mutation Calling of Tumor Exomes Using Multiple Genomic Pipelines*. Cell Syst, 2018. **6**(3): p. 271-281 e7.
50. Herbst, R.S., D. Morgensztern, and C. Boshoff, *The biology and management of non-small cell lung cancer*. Nature, 2018. **553**(7689): p. 446-454.
51. Rodriguez-Canales, J., E. Parra-Cuentas, and Wistuba, II, *Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer*. Cancer Treat Res, 2016. **170**: p. 25-46.
52. Travis, W.D., et al., *The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification*. J Thorac Oncol, 2015. **10**(9): p. 1243-1260.
53. Kenfield, S.A., et al., *Comparison of aspects of smoking among the four histological types of lung cancer*. Tob Control, 2008. **17**(3): p. 198-204.
54. Wilkerson, M.D., et al., *Lung squamous cell carcinoma mRNA expression subtypes are reproducible, clinically important, and correspond to normal cell types*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(19): p. 4864-75.
55. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers*. Nature, 2012. **489**(7417): p. 519-25.
56. Campbell, J.D., et al., *Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas*. Nat Genet, 2016. **48**(6): p. 607-16.
57. Weissferdt, A., *Large cell carcinoma of lung: On the verge of extinction?* Semin Diagn Pathol, 2014. **31**(4): p. 278-88.
58. Villalobos, P. and Wistuba, II, *Lung Cancer Biomarkers*. Hematol Oncol Clin North Am, 2017. **31**(1): p. 13-29.
59. Collins, L.G., et al., *Lung cancer: diagnosis and management*. Am Fam Physician, 2007. **75**(1): p. 56-63.
60. Sim, A.J., et al., *A review of the role of MRI in diagnosis and treatment of early stage lung cancer*. Clin Transl Radiat Oncol, 2020. **24**: p. 16-22.
61. Marcus, C., et al., *(18)F-FDG PET/CT for Response Assessment in Lung Cancer*. Semin Nucl Med, 2022. **52**(6): p. 662-672.
62. Nooreldeen, R. and H. Bach, *Current and Future Development in Lung Cancer Diagnosis*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(16).
63. Marshall, T., S. Kalanjeri, and F.A. Almeida, *Lung cancer staging, the established role of bronchoscopy*. Curr Opin Pulm Med, 2022. **28**(1): p. 17-30.

64. Feng, S.H. and S.T. Yang, *The new 8th TNM staging system of lung cancer and its potential imaging interpretation pitfalls and limitations with CT image demonstrations*. *Diagn Interv Radiol*, 2019. **25**(4): p. 270-279.
65. Goldstraw, P., et al., *The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer*. *J Thorac Oncol*, 2016. **11**(1): p. 39-51.
66. Amin, M.B., et al., *The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging*. *CA Cancer J Clin*, 2017. **67**(2): p. 93-99.
67. Lester, J.F., F.R. MacBeth, and B. Coles, *Prophylactic cranial irradiation for preventing brain metastases in patients undergoing radical treatment for non-small-cell lung cancer: a Cochrane Review*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005. **63**(3): p. 690-4.
68. Pottgen, C., et al., *Prophylactic cranial irradiation in operable stage IIIA non small-cell lung cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy: results from a German multicenter randomized trial*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(31): p. 4987-92.
69. Pao, W. and N. Girard, *New driver mutations in non-small-cell lung cancer*. *Lancet Oncol*, 2011. **12**(2): p. 175-80.
70. Crequit, P., et al., *Comparative efficacy and safety of second-line treatments for advanced non-small cell lung cancer with wild-type or unknown status for epidermal growth factor receptor: a systematic review and network meta-analysis*. *BMC Med*, 2017. **15**(1): p. 193.
71. Ramos-Esquivel, A., et al., *Anti-PD-1/anti-PD-L1 immunotherapy versus docetaxel for previously treated advanced non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials*. *ESMO Open*, 2017. **2**(3): p. e000236.
72. Lindeman, N.I., et al., *Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology*. *J Mol Diagn*, 2013. **15**(4): p. 415-53.
73. Muenst, S., et al., *The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts*. *J Intern Med*, 2016. **279**(6): p. 541-62.
74. Vinay, D.S., et al., *Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies*. *Semin Cancer Biol*, 2015. **35 Suppl**: p. S185-S198.
75. Liu, Y. and G. Zeng, *Cancer and innate immune system interactions: translational potentials for cancer immunotherapy*. *J Immunother*, 2012. **35**(4): p. 299-308.
76. Vesely, M.D., et al., *Natural innate and adaptive immunity to cancer*. *Annu Rev Immunol*, 2011. **29**: p. 235-71.
77. Mortellaro, A. and P. Ricciardi-Castagnoli, *From vaccine practice to vaccine science: the contribution of human immunology to the prevention of infectious disease*. *Immunol Cell Biol*, 2011. **89**(3): p. 332-9.
78. Dranoff, G., *Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(1): p. 11-22.
79. Bonaventura, P., et al., *Cold Tumors: A Therapeutic Challenge for Immunotherapy*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 168.
80. Aranda, F., et al., *Immune effectors responsible for the elimination of hyperploid cancer cells*. *Oncoimmunology*, 2018. **7**(8): p. e1463947.

81. Pennycuik, A., et al., *Immune Surveillance in Clinical Regression of Preinvasive Squamous Cell Lung Cancer*. *Cancer Discov*, 2020. **10**(10): p. 1489-1499.
82. Chen, D.S. and I. Mellman, *Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle*. *Immunity*, 2013. **39**(1): p. 1-10.
83. Kunimasa, K. and T. Goto, *Immunosurveillance and Immunoediting of Lung Cancer: Current Perspectives and Challenges*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(2).
84. Higuchi, R., et al., *PD-L1 Expression and Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Thymic Epithelial Neoplasms*. *J Clin Med*, 2019. **8**(11).
85. Motz, G.T. and G. Coukos, *Deciphering and reversing tumor immune suppression*. *Immunity*, 2013. **39**(1): p. 61-73.
86. Jhunjhunwala, S., C. Hammer, and L. Delamarre, *Antigen presentation in cancer: insights into tumour immunogenicity and immune evasion*. *Nat Rev Cancer*, 2021. **21**(5): p. 298-312.
87. Tang, S., et al., *Mechanisms of immune escape in the cancer immune cycle*. *Int Immunopharmacol*, 2020. **86**: p. 106700.
88. Ready, N., et al., *First-Line Nivolumab Plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (CheckMate 568): Outcomes by Programmed Death Ligand 1 and Tumor Mutational Burden as Biomarkers*. *J Clin Oncol*, 2019. **37**(12): p. 992-1000.
89. Hellmann, M.D., et al., *Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden*. *N Engl J Med*, 2018. **378**(22): p. 2093-2104.
90. Hellmann, M.D., et al., *Genomic Features of Response to Combination Immunotherapy in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer*. *Cancer Cell*, 2018. **33**(5): p. 843-852 e4.
91. McGranahan, N., et al., *Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade*. *Science*, 2016. **351**(6280): p. 1463-9.
92. Reis e Sousa, C., *Dendritic cells in a mature age*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(6): p. 476-83.
93. Ohno, Y., et al., *IL-6 down-regulates HLA class II expression and IL-12 production of human dendritic cells to impair activation of antigen-specific CD4(+) T cells*. *Cancer Immunol Immunother*, 2016. **65**(2): p. 193-204.
94. Kitamura, H., et al., *Interleukin-6/STAT3 signaling as a promising target to improve the efficacy of cancer immunotherapy*. *Cancer Sci*, 2017. **108**(10): p. 1947-1952.
95. Chen, X., et al., *Interleukin 35: Inhibitory regulator in monocyte-derived dendritic cell maturation and activation*. *Cytokine*, 2018. **108**: p. 43-52.
96. Veglia, F., et al., *Lipid bodies containing oxidatively truncated lipids block antigen cross-presentation by dendritic cells in cancer*. *Nat Commun*, 2017. **8**(1): p. 2122.
97. Ning, Y., et al., *Tumor exosomes block dendritic cells maturation to decrease the T cell immune response*. *Immunol Lett*, 2018. **199**: p. 36-43.
98. Ribas, A. and J.D. Wolchok, *Cancer immunotherapy using checkpoint blockade*. *Science*, 2018. **359**(6382): p. 1350-1355.
99. Boutros, C., et al., *Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016. **13**(8): p. 473-86.
100. Gu, X., et al., *Knockdown of endothelin receptor B inhibits the progression of triple-negative breast cancer*. *Ann N Y Acad Sci*, 2019. **1448**(1): p. 5-18.
101. Voron, T., et al., *VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors*. *J Exp Med*, 2015. **212**(2): p. 139-48.
102. Apte, R.S., D.S. Chen, and N. Ferrara, *VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development*. *Cell*, 2019. **176**(6): p. 1248-1264.

103. Khan, K.A. and R.S. Kerbel, *Improving immunotherapy outcomes with anti-angiogenic treatments and vice versa*. Nat Rev Clin Oncol, 2018. **15**(5): p. 310-324.
104. Fukumura, D., et al., *Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges*. Nat Rev Clin Oncol, 2018. **15**(5): p. 325-340.
105. Tada, Y., et al., *Targeting VEGFR2 with Ramucirumab strongly impacts effector/ activated regulatory T cells and CD8(+) T cells in the tumor microenvironment*. J Immunother Cancer, 2018. **6**(1): p. 106.
106. Roh, W., et al., *Integrated molecular analysis of tumor biopsies on sequential CTLA-4 and PD-1 blockade reveals markers of response and resistance*. Sci Transl Med, 2017. **9**(379).
107. Zaretsky, J.M., et al., *Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma*. N Engl J Med, 2016. **375**(9): p. 819-29.
108. Gettinger, S., et al., *Impaired HLA Class I Antigen Processing and Presentation as a Mechanism of Acquired Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Lung Cancer*. Cancer Discov, 2017. **7**(12): p. 1420-1435.
109. Shionoya, Y., et al., *Loss of tapasin in human lung and colon cancer cells and escape from tumor-associated antigen-specific CTL recognition*. Oncoimmunology, 2017. **6**(2): p. e1274476.
110. Xu, W., M.B. Atkins, and D.F. McDermott, *Checkpoint inhibitor immunotherapy in kidney cancer*. Nat Rev Urol, 2020. **17**(3): p. 137-150.
111. Sharpe, A.H. and K.E. Pauken, *The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(3): p. 153-167.
112. Holmgaard, R.B., et al., *Tumor-Expressed IDO Recruits and Activates MDSCs in a Treg-Dependent Manner*. Cell Rep, 2015. **13**(2): p. 412-24.
113. Prendergast, G.C., et al., *Inflammatory Reprogramming with IDO1 Inhibitors: Turning Immunologically Unresponsive 'Cold' Tumors 'Hot'*. Trends Cancer, 2018. **4**(1): p. 38-58.
114. Munn, D.H., et al., *GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase*. Immunity, 2005. **22**(5): p. 633-42.
115. Cheong, J.E. and L. Sun, *Targeting the IDO1/TDO2-KYN-AhR Pathway for Cancer Immunotherapy - Challenges and Opportunities*. Trends Pharmacol Sci, 2018. **39**(3): p. 307-325.
116. Wang, J., et al., *Fibrinogen-like Protein 1 Is a Major Immune Inhibitory Ligand of LAG-3*. Cell, 2019. **176**(1-2): p. 334-347 e12.
117. Andrews, L.P., et al., *LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target*. Immunol Rev, 2017. **276**(1): p. 80-96.
118. Chinen, T., et al., *An essential role for the IL-2 receptor in T(reg) cell function*. Nat Immunol, 2016. **17**(11): p. 1322-1333.
119. Ferreira, L.M.R., et al., *Next-generation regulatory T cell therapy*. Nat Rev Drug Discov, 2019. **18**(10): p. 749-769.
120. Saleh, R. and E. Elkord, *Treg-mediated acquired resistance to immune checkpoint inhibitors*. Cancer Lett, 2019. **457**: p. 168-179.
121. Di Gennaro, P., et al., *T regulatory cells mediate immunosuppression by adenosine in peripheral blood, sentinel lymph node and TILs from melanoma patients*. Cancer Lett, 2018. **417**: p. 124-130.
122. Sasidharan Nair, V. and E. Elkord, *Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy: a focus on T-regulatory cells*. Immunol Cell Biol, 2018. **96**(1): p. 21-33.
123. Matoba, T., et al., *Regulatory T cells expressing abundant CTLA-4 on the cell surface with a proliferative gene profile are key features of human head and neck cancer*. Int J Cancer, 2019. **144**(11): p. 2811-2822.

124. Togashi, Y., K. Shitara, and H. Nishikawa, *Regulatory T cells in cancer immunosuppression - implications for anticancer therapy*. Nat Rev Clin Oncol, 2019. **16**(6): p. 356-371.
125. Ahmetlic, F., et al., *Regulatory T Cells in an Endogenous Mouse Lymphoma Recognize Specific Antigen Peptides and Contribute to Immune Escape*. Cancer Immunol Res, 2019. **7**(4): p. 600-608.
126. Taylor, N.A., et al., *Treg depletion potentiates checkpoint inhibition in claudin-low breast cancer*. J Clin Invest, 2017. **127**(9): p. 3472-3483.
127. Anderson, A.C., N. Joller, and V.K. Kuchroo, *Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation*. Immunity, 2016. **44**(5): p. 989-1004.
128. Tang, R., M. Rangachari, and V.K. Kuchroo, *Tim-3: A co-receptor with diverse roles in T cell exhaustion and tolerance*. Semin Immunol, 2019. **42**: p. 101302.
129. Yasinska, I.M., et al., *The Tim-3-Galectin-9 Pathway and Its Regulatory Mechanisms in Human Breast Cancer*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1594.
130. Yu, J., et al., *The effects of Tim-3 activation on T-cells in gastric cancer progression*. Oncol Lett, 2019. **17**(2): p. 1461-1466.
131. Pu, F., et al., *TIM-3 expression and its association with overall survival in primary osteosarcoma*. Oncol Lett, 2019. **18**(5): p. 5294-5300.
132. Nakano, M., et al., *PD-1+ TIM-3+ T cells in malignant ascites predict prognosis of gastrointestinal cancer*. Cancer Sci, 2018. **109**(9): p. 2986-2992.
133. Koyama, S., et al., *Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 10501.
134. Vari, F., et al., *Immune evasion via PD-1/PD-L1 on NK cells and monocyte/macrophages is more prominent in Hodgkin lymphoma than DLBCL*. Blood, 2018. **131**(16): p. 1809-1819.
135. Lin, C., et al., *Tumour-associated macrophages-derived CXCL8 determines immune evasion through autonomous PD-L1 expression in gastric cancer*. Gut, 2019. **68**(10): p. 1764-1773.
136. Cassetta, L. and J.W. Pollard, *Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2018. **17**(12): p. 887-904.
137. Mantovani, A., et al., *Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology*. Nat Rev Clin Oncol, 2017. **14**(7): p. 399-416.
138. Hu, B., et al., *Blockade of DC-SIGN(+) Tumor-Associated Macrophages Reactivates Antitumor Immunity and Improves Immunotherapy in Muscle-Invasive Bladder Cancer*. Cancer Res, 2020. **80**(8): p. 1707-1719.
139. Park, M.J., et al., *Interleukin-10 produced by myeloid-derived suppressor cells is critical for the induction of Tregs and attenuation of rheumatoid inflammation in mice*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 3753.
140. Liu, Y., et al., *Targeting myeloid-derived suppressor cells for cancer immunotherapy*. Cancer Immunol Immunother, 2018. **67**(8): p. 1181-1195.
141. Vasquez-Dunddel, D., et al., *STAT3 regulates arginase-1 in myeloid-derived suppressor cells from cancer patients*. J Clin Invest, 2013. **123**(4): p. 1580-9.
142. Li, A., et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 inhibition targets anti-PD1-resistant lung tumors by blocking myeloid-derived suppressor cells*. Cancer Lett, 2018. **431**: p. 54-63.
143. Fleming, V., et al., *Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells to Bypass Tumor-Induced Immunosuppression*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 398.
144. Ostrand-Rosenberg, S. and C. Fenselau, *Myeloid-Derived Suppressor Cells: Immune-Suppressive Cells That Impair Antitumor Immunity and Are Sculpted by Their Environment*. J Immunol, 2018. **200**(2): p. 422-431.

145. Kim, S.H., et al., *Phenformin Inhibits Myeloid-Derived Suppressor Cells and Enhances the Anti-Tumor Activity of PD-1 Blockade in Melanoma*. *J Invest Dermatol*, 2017. **137**(8): p. 1740-1748.
146. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(11): p. 991-8.
147. Yarchoan, M., et al., *Targeting neoantigens to augment antitumour immunity*. *Nat Rev Cancer*, 2017. **17**(4): p. 209-222.
148. Mittal, D., et al., *New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape*. *Curr Opin Immunol*, 2014. **27**: p. 16-25.
149. Loeb, L.A., K.R. Loeb, and J.P. Anderson, *Multiple mutations and cancer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(3): p. 776-81.
150. Beatty, G.L. and W.L. Gladney, *Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(4): p. 687-92.
151. O'Donnell, J.S., M.W.L. Teng, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2019. **16**(3): p. 151-167.
152. Anagnostou, V., et al., *Evolution of Neoantigen Landscape during Immune Checkpoint Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer*. *Cancer Discov*, 2017. **7**(3): p. 264-276.
153. Gao, D. and V. Mittal, *The role of bone-marrow-derived cells in tumor growth, metastasis initiation and progression*. *Trends Mol Med*, 2009. **15**(8): p. 333-43.
154. Hanahan, D. and L.M. Coussens, *Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment*. *Cancer Cell*, 2012. **21**(3): p. 309-22.
155. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
156. Joyce, J.A. and J.W. Pollard, *Microenvironmental regulation of metastasis*. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(4): p. 239-52.
157. Gao, D., et al., *Microenvironmental regulation of epithelial-mesenchymal transitions in cancer*. *Cancer Res*, 2012. **72**(19): p. 4883-9.
158. Lee, G., T.C. Walser, and S.M. Dubinett, *Chronic inflammation, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer*. *Curr Opin Pulm Med*, 2009. **15**(4): p. 303-7.
159. Punturieri, A., et al., *Lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease: needs and opportunities for integrated research*. *J Natl Cancer Inst*, 2009. **101**(8): p. 554-9.
160. Kerkar, S.P. and N.P. Restifo, *Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment*. *Cancer Res*, 2012. **72**(13): p. 3125-30.
161. Sautes-Fridman, C., et al., *Tumor microenvironment is multifaceted*. *Cancer Metastasis Rev*, 2011. **30**(1): p. 13-25.
162. Galon, J., et al., *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome*. *Science*, 2006. **313**(5795): p. 1960-4.
163. Pages, F., et al., *Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(25): p. 2654-66.
164. Suzuki, K., et al., *Prognostic immune markers in non-small cell lung cancer*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(16): p. 5247-56.
165. Ohri, C.M., et al., *Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival*. *Eur Respir J*, 2009. **33**(1): p. 118-26.
166. Welsh, T.J., et al., *Macrophage and mast-cell invasion of tumor cell islets confers a marked survival advantage in non-small-cell lung cancer*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(35): p. 8959-67.

167. Almand, B., et al., *Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 1755-66.
168. Fricke, I. and D.I. Gabrilovich, *Dendritic cells and tumor microenvironment: a dangerous liaison*. Immunol Invest, 2006. **35**(3-4): p. 459-83.
169. Sarraf, K.M., et al., *Neutrophil/lymphocyte ratio and its association with survival after complete resection in non-small cell lung cancer*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2009. **137**(2): p. 425-8.
170. Baratelli, F., et al., *PGE(2) contributes to TGF-beta induced T regulatory cell function in human non-small cell lung cancer*. Am J Transl Res, 2010. **2**(4): p. 356-67.
171. De Vita, F., et al., *Serum interleukin-10 levels as a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer patients*. Chest, 2000. **117**(2): p. 365-73.
172. Kusmartsev, S., S. Nagaraj, and D.I. Gabrilovich, *Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4583-92.
173. Bronte, V., *Myeloid-derived suppressor cells in inflammation: uncovering cell subsets with enhanced immunosuppressive functions*. Eur J Immunol, 2009. **39**(10): p. 2670-2.
174. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 162-74.
175. Srivastava, M.K., et al., *Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine*. Cancer Res, 2010. **70**(1): p. 68-77.
176. Liu, C.Y., et al., *Population alterations of L-arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b+/CD14(-)/CD15+/CD33+ myeloid-derived suppressor cells and CD8+ T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2010. **136**(1): p. 35-45.
177. De Pas, T., et al., *Vaccines in non-small cell lung cancer: rationale, combination strategies and update on clinical trials*. Crit Rev Oncol Hematol, 2012. **83**(3): p. 432-43.
178. Graves, E.E., A. Maity, and Q.T. Le, *The tumor microenvironment in non-small-cell lung cancer*. Semin Radiat Oncol, 2010. **20**(3): p. 156-63.
179. Shepherd, F.A., J.Y. Douillard, and G.R. Blumenschein, Jr., *Immunotherapy for non-small cell lung cancer: novel approaches to improve patient outcome*. J Thorac Oncol, 2011. **6**(10): p. 1763-73.
180. Brahmer, J.R., *Harnessing the immune system for the treatment of non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2013. **31**(8): p. 1021-8.
181. Forde, P.M., et al., *What lies within: novel strategies in immunotherapy for non-small cell lung cancer*. Oncologist, 2013. **18**(11): p. 1203-13.
182. Zhang, Y., et al., *Programmed death-1 upregulation is correlated with dysfunction of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in human non-small cell lung cancer*. Cell Mol Immunol, 2010. **7**(5): p. 389-95.
183. Chen, Y.B., C.Y. Mu, and J.A. Huang, *Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study*. Tumori, 2012. **98**(6): p. 751-5.
184. Mu, C.Y., et al., *High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation*. Med Oncol, 2011. **28**(3): p. 682-8.
185. Konishi, J., et al., *B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(15): p. 5094-100.

186. Korkolopoulou, P., et al., *Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer*. Br J Cancer, 1996. **73**(2): p. 148-53.
187. Domagala-Kulawik, J., I. Osinska, and G. Hoser, *Mechanisms of immune response regulation in lung cancer*. Transl Lung Cancer Res, 2014. **3**(1): p. 15-22.
188. Zingone, B., et al., *Early and late outcomes of cardiac surgery in octogenarians*. Ann Thorac Surg, 2009. **87**(1): p. 71-8.
189. Horne, Z.D., et al., *Increased levels of tumor-infiltrating lymphocytes are associated with improved recurrence-free survival in stage 1A non-small-cell lung cancer*. J Surg Res, 2011. **171**(1): p. 1-5.
190. Petersen, R.P., et al., *Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients*. Cancer, 2006. **107**(12): p. 2866-72.
191. Shimizu, K., et al., *Tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells are correlated with cyclooxygenase-2 expression and are associated with recurrence in resected non-small cell lung cancer*. J Thorac Oncol, 2010. **5**(5): p. 585-90.
192. Dai, F., et al., *The number and microlocalization of tumor-associated immune cells are associated with patient's survival time in non-small cell lung cancer*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 220.
193. Sznol, M. and L. Chen, *Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(5): p. 1021-34.
194. Li, X., et al., *Lessons learned from the blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. J Hematol Oncol, 2018. **11**(1): p. 31.
195. Saab, S., et al., *Insights Into Lung Cancer Immune-Based Biology, Prevention, and Treatment*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 159.
196. Wei, S.C., C.R. Duffy, and J.P. Allison, *Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy*. Cancer Discov, 2018. **8**(9): p. 1069-1086.
197. Shi, L.Z., et al., *Blockade of CTLA-4 and PD-1 Enhances Adoptive T-cell Therapy Efficacy in an ICOS-Mediated Manner*. Cancer Immunol Res, 2019. **7**(11): p. 1803-1812.
198. Buchbinder, E.I. and A. Desai, *CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition*. Am J Clin Oncol, 2016. **39**(1): p. 98-106.
199. Wing, K., et al., *CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function*. Science, 2008. **322**(5899): p. 271-5.
200. Alard, E., et al., *Advances in Anti-Cancer Immunotherapy: Car-T Cell, Checkpoint Inhibitors, Dendritic Cell Vaccines, and Oncolytic Viruses, and Emerging Cellular and Molecular Targets*. Cancers (Basel), 2020. **12**(7).
201. Okazaki, T. and T. Honjo, *PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application*. Int Immunol, 2007. **19**(7): p. 813-24.
202. Simon, S. and N. Labarriere, *PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy?* Oncoimmunology, 2017. **7**(1): p. e1364828.
203. Alsaab, H.O., et al., *PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome*. Front Pharmacol, 2017. **8**: p. 561.
204. Shi, L.Z., et al., *Interdependent IL-7 and IFN-gamma signalling in T-cell controls tumour eradication by combined alpha-CTLA-4+alpha-PD-1 therapy*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12335.
205. Benci, J.L., et al., *Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade*. Cell, 2016. **167**(6): p. 1540-1554 e12.
206. Pico de Coana, Y., A. Choudhury, and R. Kiessling, *Checkpoint blockade for cancer therapy: revitalizing a suppressed immune system*. Trends Mol Med, 2015. **21**(8): p. 482-91.

207. O'Neill, L.A. and E.J. Pearce, *Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function*. J Exp Med, 2016. **213**(1): p. 15-23.
208. Zhu, J., et al., *Resistance to cancer immunotherapy mediated by apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 1404.
209. Meyers, D.E., et al., *Targeting the PD-1/PD-L1 axis for the treatment of non-small-cell lung cancer*. Curr Oncol, 2018. **25**(4): p. e324-e334.
210. Thai, A.A., et al., *Lung cancer*. Lancet, 2021. **398**(10299): p. 535-554.
211. Califf, R.M., *Biomarker definitions and their applications*. Exp Biol Med (Maywood), 2018. **243**(3): p. 213-221.
212. Roman, M., et al., *KRAS oncogene in non-small cell lung cancer: clinical perspectives on the treatment of an old target*. Mol Cancer, 2018. **17**(1): p. 33.
213. Davies, J.C., et al., *Efficacy and safety of ivacaftor in patients aged 6 to 11 years with cystic fibrosis with a G551D mutation*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **187**(11): p. 1219-25.
214. Kalemkerian, G.P., et al., *Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update*. J Clin Oncol, 2018. **36**(9): p. 911-919.
215. Lindeman, N.I., et al., *Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology*. Arch Pathol Lab Med, 2018. **142**(3): p. 321-346.
216. Havel, J.J., D. Chowell, and T.A. Chan, *The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2019. **19**(3): p. 133-150.
217. Pitt, J.M., et al., *Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors*. Immunity, 2016. **44**(6): p. 1255-69.
218. Bensch, F., et al., *(89)Zr-atezolizumab imaging as a non-invasive approach to assess clinical response to PD-L1 blockade in cancer*. Nat Med, 2018. **24**(12): p. 1852-1858.
219. Schoenfeld, A.J., et al., *Clinical and molecular correlates of PD-L1 expression in patients with lung adenocarcinomas*. Ann Oncol, 2020. **31**(5): p. 599-608.
220. Rizvi, N.A., et al., *Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer*. Science, 2015. **348**(6230): p. 124-8.
221. Marabelle, A., et al., *Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: prospective biomarker analysis of the multicohort, open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study*. Lancet Oncol, 2020. **21**(10): p. 1353-1365.
222. Fumet, J.D., et al., *Prognostic and predictive role of CD8 and PD-L1 determination in lung tumor tissue of patients under anti-PD-1 therapy*. Br J Cancer, 2018. **119**(8): p. 950-960.
223. Uryvaev, A., et al., *The role of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) as a predictive biomarker of response to anti-PD1 therapy in patients with metastatic non-small cell lung cancer or metastatic melanoma*. Med Oncol, 2018. **35**(3): p. 25.
224. Sutic, M., et al., *Diagnostic, Predictive, and Prognostic Biomarkers in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Management*. J Pers Med, 2021. **11**(11).
225. Guibert, N., et al., *Current and future applications of liquid biopsy in nonsmall cell lung cancer from early to advanced stages*. Eur Respir Rev, 2020. **29**(155).

226. Castro-Giner, F., et al., *Cancer Diagnosis Using a Liquid Biopsy: Challenges and Expectations*. Diagnostics (Basel), 2018. **8**(2).
227. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
228. Ha, M. and V.N. Kim, *Regulation of microRNA biogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(8): p. 509-24.
229. Turchinovich, A., A.G. Tonevitsky, and B. Burwinkel, *Extracellular miRNA: A Collision of Two Paradigms*. Trends Biochem Sci, 2016. **41**(10): p. 883-892.
230. Lujambio, A. and S.W. Lowe, *The microcosmos of cancer*. Nature, 2012. **482**(7385): p. 347-55.
231. Plotnikova, O., A. Baranova, and M. Skoblov, *Comprehensive Analysis of Human microRNA-mRNA Interactome*. Front Genet, 2019. **10**: p. 933.
232. Kim, V.N., J. Han, and M.C. Siomi, *Biogenesis of small RNAs in animals*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(2): p. 126-39.
233. Krol, J., I. Loedige, and W. Filipowicz, *The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(9): p. 597-610.
234. Siomi, H. and M.C. Siomi, *Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals*. Mol Cell, 2010. **38**(3): p. 323-32.
235. Lin, S. and R.I. Gregory, *MicroRNA biogenesis pathways in cancer*. Nat Rev Cancer, 2015. **15**(6): p. 321-33.
236. Treiber, T., N. Treiber, and G. Meister, *Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. **20**(1): p. 5-20.
237. Gebert, L.F.R. and I.J. MacRae, *Regulation of microRNA function in animals*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019. **20**(1): p. 21-37.
238. Suzuki, H.I. and K. Miyazono, *Emerging complexity of microRNA generation cascades*. J Biochem, 2011. **149**(1): p. 15-25.
239. Matsuyama, H. and H.I. Suzuki, *Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis*. Int J Mol Sci, 2019. **21**(1).
240. Kim, Y.K. and V.N. Kim, *Processing of intronic microRNAs*. EMBO J, 2007. **26**(3): p. 775-83.
241. Li, Z. and T.M. Rana, *Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges*. Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(8): p. 622-38.
242. Liu, J., et al., *Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi*. Science, 2004. **305**(5689): p. 1437-41.
243. Winter, J., et al., *Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(3): p. 228-34.
244. Chiang, H.R., et al., *Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes*. Genes Dev, 2010. **24**(10): p. 992-1009.
245. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-33.
246. Huntzinger, E. and E. Izaurralde, *Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(2): p. 99-110.
247. Becker, W.R., et al., *High-Throughput Analysis Reveals Rules for Target RNA Binding and Cleavage by AGO2*. Mol Cell, 2019. **75**(4): p. 741-755 e11.
248. van Kouwenhove, M., M. Kedde, and R. Agami, *MicroRNA regulation by RNA-binding proteins and its implications for cancer*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(9): p. 644-56.

249. Hansen, T.B., et al., *Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges*. Nature, 2013. **495**(7441): p. 384-8.
250. Memczak, S., et al., *Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency*. Nature, 2013. **495**(7441): p. 333-8.
251. Szabo, L. and J. Salzman, *Detecting circular RNAs: bioinformatic and experimental challenges*. Nat Rev Genet, 2016. **17**(11): p. 679-692.
252. Friedman, R.C., et al., *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. Genome Res, 2009. **19**(1): p. 92-105.
253. Agarwal, V., et al., *Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs*. Elife, 2015. **4**.
254. McGeary, S.E., et al., *The biochemical basis of microRNA targeting efficacy*. Science, 2019. **366**(6472).
255. Oliveto, S., et al., *Role of microRNAs in translation regulation and cancer*. World J Biol Chem, 2017. **8**(1): p. 45-56.
256. Takamizawa, J., et al., *Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival*. Cancer Res, 2004. **64**(11): p. 3753-6.
257. Souza, C.P., et al., *Deregulated microRNAs Are Associated with Patient Survival and Predicted to Target Genes That Modulate Lung Cancer Signaling Pathways*. Cancers (Basel), 2020. **12**(9).
258. Boeri, M., et al., *MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(9): p. 3713-8.
259. Mohammadi, A., et al., *Restoration of miR-330 expression suppresses lung cancer cell viability, proliferation, and migration*. J Cell Physiol, 2021. **236**(1): p. 273-283.
260. Ye, J., et al., *MicroRNA-671-5p inhibits cell proliferation, migration and invasion in non-small cell lung cancer by targeting MFAP3L*. Mol Med Rep, 2022. **25**(1).
261. Yuan, Y., et al., *miR-410 induces both epithelial-mesenchymal transition and radioresistance through activation of the PI3K/mTOR pathway in non-small cell lung cancer*. Signal Transduct Target Ther, 2020. **5**(1): p. 85.
262. Pandey, M., et al., *Role of microRNAs in regulating cell proliferation, metastasis and chemoresistance and their applications as cancer biomarkers in small cell lung cancer*. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2021. **1876**(1): p. 188552.
263. Pal, A.S., et al., *Identification of microRNAs that promote erlotinib resistance in non-small cell lung cancer*. Biochem Pharmacol, 2021. **189**: p. 114154.
264. Sun, H. and Y. Sun, *Lidocaine inhibits proliferation and metastasis of lung cancer cell via regulation of miR-539/EGFR axis*. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019. **47**(1): p. 2866-2874.
265. Jiang, Z., et al., *MiR-148b suppressed non-small cell lung cancer progression via inhibiting ALCAM through the NF-kappaB signaling pathway*. Thorac Cancer, 2020. **11**(2): p. 415-425.
266. Yu, S.L., et al., *MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer*. Cancer Cell, 2008. **13**(1): p. 48-57.
267. Dvinge, H., et al., *The shaping and functional consequences of the microRNA landscape in breast cancer*. Nature, 2013. **497**(7449): p. 378-82.
268. Yanaihara, N., et al., *Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis*. Cancer Cell, 2006. **9**(3): p. 189-98.
269. Foss, K.M., et al., *miR-1254 and miR-574-5p: serum-based microRNA biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer*. J Thorac Oncol, 2011. **6**(3): p. 482-8.

270. Zheng, D., et al., *Plasma microRNAs as novel biomarkers for early detection of lung cancer*. Int J Clin Exp Pathol, 2011. **4**(6): p. 575-86.
271. Hou, J., et al., *Circulating Plasma MicroRNAs As Diagnostic Markers for NSCLC*. Front Genet, 2016. **7**: p. 193.
272. Peng, W., et al., *Diagnostic and Prognostic Potential of Circulating Long Non-Coding RNAs in Non Small Cell Lung Cancer*. Cell Physiol Biochem, 2018. **49**(2): p. 816-827.
273. Lebanony, D., et al., *Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma*. J Clin Oncol, 2009. **27**(12): p. 2030-7.
274. Landi, M.T., et al., *MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(2): p. 430-41.
275. Peng, Y. and C.M. Croce, *The role of MicroRNAs in human cancer*. Signal Transduct Target Ther, 2016. **1**: p. 15004.
276. Dragomir, M., et al., *Key questions about the checkpoint blockade-are microRNAs an answer?* Cancer Biol Med, 2018. **15**(2): p. 103-115.
277. Cortez, M.A., et al., *Role of miRNAs in immune responses and immunotherapy in cancer*. Genes Chromosomes Cancer, 2019. **58**(4): p. 244-253.
278. Mehta, A. and D. Baltimore, *MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(5): p. 279-94.
279. Fontana, L., et al., *MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopoiesis through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(7): p. 775-87.
280. Aras, S. and M.R. Zaidi, *TAMEless traitors: macrophages in cancer progression and metastasis*. Br J Cancer, 2017. **117**(11): p. 1583-1591.
281. Beaulieu, A.M., et al., *MicroRNA function in NK-cell biology*. Immunol Rev, 2013. **253**(1): p. 40-52.
282. Rodriguez, A., et al., *Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function*. Science, 2007. **316**(5824): p. 608-11.
283. Jiang, S., et al., *Molecular dissection of the miR-17-92 cluster's critical dual roles in promoting Th1 responses and preventing inducible Treg differentiation*. Blood, 2011. **118**(20): p. 5487-97.
284. Baumjohann, D., et al., *The microRNA cluster miR-17 approximately 92 promotes TFH cell differentiation and represses subset-inappropriate gene expression*. Nat Immunol, 2013. **14**(8): p. 840-8.
285. Zou, W. and N.P. Restifo, *T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(4): p. 248-56.
286. Kryczek, I., et al., *Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments*. Blood, 2009. **114**(6): p. 1141-9.
287. Kosaka, A., et al., *Transgene-derived overexpression of miR-17-92 in CD8+ T-cells confers enhanced cytotoxic activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **458**(3): p. 549-554.
288. Eis, P.S., et al., *Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(10): p. 3627-32.
289. Keir, M.E., et al., *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 677-704.
290. Wang, X., et al., *Tumor suppressor miR-34a targets PD-L1 and functions as a potential immunotherapeutic target in acute myeloid leukemia*. Cell Signal, 2015. **27**(3): p. 443-52.
291. Smolle, M.A., et al., *Noncoding RNAs and immune checkpoints-clinical implications as cancer therapeutics*. FEBS J, 2017. **284**(13): p. 1952-1966.

292. Joyce, J.A. and D.T. Fearon, *T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment*. Science, 2015. **348**(6230): p. 74-80.
293. Di Leva, G., M. Garofalo, and C.M. Croce, *MicroRNAs in cancer*. Annu Rev Pathol, 2014. **9**: p. 287-314.
294. O'Brien, J., et al., *Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation*. Front Endocrinol (Lausanne), 2018. **9**: p. 402.
295. Kai, K., R.L. Dittmar, and S. Sen, *Secretory microRNAs as biomarkers of cancer*. Semin Cell Dev Biol, 2018. **78**: p. 22-36.
296. Condrat, C.E., et al., *miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis*. Cells, 2020. **9**(2).
297. Zen, K. and C.Y. Zhang, *Circulating microRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers*. Med Res Rev, 2012. **32**(2): p. 326-48.
298. Weber, J.A., et al., *The microRNA spectrum in 12 body fluids*. Clin Chem, 2010. **56**(11): p. 1733-41.
299. Wang, K., et al., *Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(20): p. 7248-59.
300. Zubakov, D., et al., *MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation*. Int J Legal Med, 2010. **124**(3): p. 217-26.
301. Hanson, E.K., H. Lubenow, and J. Ballantyne, *Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs*. Anal Biochem, 2009. **387**(2): p. 303-14.
302. Raposo, G. and W. Stoorvogel, *Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends*. J Cell Biol, 2013. **200**(4): p. 373-83.
303. Vickers, K.C., et al., *MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(4): p. 423-33.
304. Arroyo, J.D., et al., *Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(12): p. 5003-8.
305. Cortez, M.A., et al., *MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers*. Nat Rev Clin Oncol, 2011. **8**(8): p. 467-77.
306. Weickmann, J.L. and D.G. Glitz, *Human ribonucleases. Quantitation of pancreatic-like enzymes in serum, urine, and organ preparations*. J Biol Chem, 1982. **257**(15): p. 8705-10.
307. Nahand, J.S., et al., *microRNAs: New prognostic, diagnostic, and therapeutic biomarkers in cervical cancer*. J Cell Physiol, 2019. **234**(10): p. 17064-17099.
308. Mahdian-Shakib, A., et al., *Differential role of microRNAs in prognosis, diagnosis, and therapy of ovarian cancer*. Biomed Pharmacother, 2016. **84**: p. 592-600.
309. Asiaf, A., et al., *MicroRNAs in Breast Cancer: Diagnostic and Therapeutic Potential*. Methods Mol Biol, 2018. **1699**: p. 23-43.
310. Lawrie, C.H., et al., *Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma*. Br J Haematol, 2008. **141**(5): p. 672-5.
311. Mitchell, P.S., et al., *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(30): p. 10513-8.
312. Lan, H., et al., *MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: opportunities and challenges*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 125094.
313. Acunzo, M., et al., *MicroRNA and cancer--a brief overview*. Adv Biol Regul, 2015. **57**: p. 1-9.

314. Singh, H., et al., *Detection of antibodies to Toxoplasma gondii in domesticated ruminants by recombinant truncated SAG2 enzyme-linked immunosorbent assay*. Trop Anim Health Prod, 2015. **47**(1): p. 171-8.
315. Chen, M., G.A. Calin, and Q.H. Meng, *Circulating microRNAs as Promising Tumor Biomarkers*. Adv Clin Chem, 2014. **67**: p. 189-214.
316. Ghai, V. and K. Wang, *Recent progress toward the use of circulating microRNAs as clinical biomarkers*. Arch Toxicol, 2016. **90**(12): p. 2959-2978.
317. Schwarzenbach, H., et al., *Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2014. **11**(3): p. 145-56.
318. He, L., et al., *A microRNA polycistron as a potential human oncogene*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 828-33.
319. Baffa, R., et al., *MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets*. J Pathol, 2009. **219**(2): p. 214-21.
320. Di Leva, G. and C.M. Croce, *Roles of small RNAs in tumor formation*. Trends Mol Med, 2010. **16**(6): p. 257-67.
321. Zhang, W., et al., *Polycomb-mediated loss of microRNA let-7c determines inflammatory macrophage polarization via PAK1-dependent NF-kappaB pathway*. Cell Death Differ, 2015. **22**(2): p. 287-97.
322. Banerjee, S., et al., *MicroRNA let-7c regulates macrophage polarization*. J Immunol, 2013. **190**(12): p. 6542-9.
323. Ibarra, I., et al., *A role for microRNAs in maintenance of mouse mammary epithelial progenitor cells*. Genes Dev, 2007. **21**(24): p. 3238-43.
324. Wang, X., et al., *Regulation of let-7 and its target oncogenes (Review)*. Oncol Lett, 2012. **3**(5): p. 955-960.
325. Wang, Y., et al., *Quantification of distinct let-7 microRNA family members by a modified stem-loop RT-qPCR*. Mol Med Rep, 2018. **17**(3): p. 3690-3696.
326. Garcia-Vazquez, R., et al., *let-7d-3p is associated with apoptosis and response to neoadjuvant chemotherapy in ovarian cancer*. Oncol Rep, 2018. **39**(6): p. 3086-3094.
327. Lu, L., et al., *Time Series miRNA-mRNA integrated analysis reveals critical miRNAs and targets in macrophage polarization*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 37446.
328. Graff, J.W., et al., *Identifying functional microRNAs in macrophages with polarized phenotypes*. J Biol Chem, 2012. **287**(26): p. 21816-25.
329. Johnson, S.M., et al., *RAS is regulated by the let-7 microRNA family*. Cell, 2005. **120**(5): p. 635-47.
330. Childs, G., et al., *Low-level expression of microRNAs let-7d and miR-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma*. Am J Pathol, 2009. **174**(3): p. 736-45.
331. Nadiminty, N., et al., *MicroRNA let-7c is downregulated in prostate cancer and suppresses prostate cancer growth*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e32832.
332. Nadiminty, N., et al., *MicroRNA let-7c suppresses androgen receptor expression and activity via regulation of Myc expression in prostate cancer cells*. J Biol Chem, 2012. **287**(2): p. 1527-37.
333. Zhao, B., et al., *MicroRNA let-7c inhibits migration and invasion of human non-small cell lung cancer by targeting ITGB3 and MAP4K3*. Cancer Lett, 2014. **342**(1): p. 43-51.
334. Sun, D., et al., *Regulation of several androgen-induced genes through the repression of the miR-99a/let-7c/miR-125b-2 miRNA cluster in prostate cancer cells*. Oncogene, 2014. **33**(11): p. 1448-57.

335. Guo, Y., et al., *Let-7c inhibits metastatic ability of mouse hepatocarcinoma cells via targeting mannoside acetylglucosaminyltransferase 4 isoenzyme A*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014. **53**: p. 1-8.
336. Unal-Cevik, I. and C.M. Temucin, *Head drop in an elder Parkinson's disease after development of myasthenia gravis*. *Mov Disord*, 2009. **24**(13): p. 2025-6.
337. Gao, J. and Q.G. Liu, *The role of miR-26 in tumors and normal tissues (Review)*. *Oncol Lett*, 2011. **2**(6): p. 1019-1023.
338. Padgett, K.A., et al., *Primary biliary cirrhosis is associated with altered hepatic microRNA expression*. *J Autoimmun*, 2009. **32**(3-4): p. 246-53.
339. Chang, L., K. Li, and T. Guo, *miR-26a-5p suppresses tumor metastasis by regulating EMT and is associated with prognosis in HCC*. *Clin Transl Oncol*, 2017. **19**(6): p. 695-703.
340. Shao, Y., et al., *MiR-26a and miR-144 inhibit proliferation and metastasis of esophageal squamous cell cancer by inhibiting cyclooxygenase-2*. *Oncotarget*, 2016. **7**(12): p. 15173-86.
341. Guo, K., et al., *Loss of miR-26a-5p promotes proliferation, migration, and invasion in prostate cancer through negatively regulating SERBP1*. *Tumour Biol*, 2016. **37**(9): p. 12843-12854.
342. Qu, F., et al., *MicroRNA-26a induces osteosarcoma cell growth and metastasis via the Wnt/beta-catenin pathway*. *Oncol Lett*, 2016. **11**(2): p. 1592-1596.
343. Song, Q., et al., *MiR-26a-5p potentiates metastasis of human lung cancer cells by regulating ITGbeta8- JAK2/STAT3 axis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018. **501**(2): p. 494-500.
344. Liu, B., et al., *MiR-26a enhances metastasis potential of lung cancer cells via AKT pathway by targeting PTEN*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1822**(11): p. 1692-704.
345. Varga, A., et al., *Suppressing the PI3K/AKT Pathway by miR-30d-5p Mimic Sensitizes Ovarian Cancer Cells to Cell Death Induced by High-Dose Estrogen*. *Biomedicines*, 2022. **10**(9).
346. Jiao, Y., et al., *Exosomal miR-30d-5p of neutrophils induces M1 macrophage polarization and primes macrophage pyroptosis in sepsis-related acute lung injury*. *Crit Care*, 2021. **25**(1): p. 356.
347. Yang, X., et al., *mir-30d Regulates multiple genes in the autophagy pathway and impairs autophagy process in human cancer cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. **431**(3): p. 617-22.
348. Ye, Z., et al., *miR-30d Blocked Transforming Growth Factor beta1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition by Targeting Snail in Ovarian Cancer Cells*. *Int J Gynecol Cancer*, 2015. **25**(9): p. 1574-81.
349. Kranjc, T., et al., *Plasma levels of miR-30d-5p are decreased in regularly exercising postmenopausal women*. *Menopause*, 2020. **27**(3): p. 319-325.
350. Zeng, Q., et al., *Long noncoding RNA POU3F3 enhances cancer cell proliferation, migration and invasion in non-small cell lung cancer (adenocarcinoma) by downregulating microRNA-30d-5p*. *BMC Pulm Med*, 2020. **20**(1): p. 185.
351. Zhu, Y., et al., *Serum expression and significance of MicroRNA-30d-5p in esophageal squamous cell carcinoma*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2017. **10**(8): p. 8677-8685.
352. Wang, G., et al., *A novel long noncoding RNA, LOC440173, promotes the progression of esophageal squamous cell carcinoma by modulating the miR-30d-5p/HDAC9 axis and the epithelial-mesenchymal transition*. *Mol Carcinog*, 2020. **59**(12): p. 1392-1408.
353. Barcelo, M., et al., *Seminal plasma microRNAs improve diagnosis/prognosis of prostate cancer in men with moderately altered prostate-specific antigen*. *Am J Transl Res*, 2020. **12**(5): p. 2041-2051.
354. Kong, J. and W. Wang, *A Systemic Review on the Regulatory Roles of miR-34a in Gastrointestinal Cancer*. *Onco Targets Ther*, 2020. **13**: p. 2855-2872.

355. Chi, S.W., et al., *Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps*. Nature, 2009. **460**(7254): p. 479-86.
356. Lai, E.C., *Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation*. Nat Genet, 2002. **30**(4): p. 363-4.
357. Lodygin, D., et al., *Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer*. Cell Cycle, 2008. **7**(16): p. 2591-600.
358. He, L., et al., *A microRNA component of the p53 tumour suppressor network*. Nature, 2007. **447**(7148): p. 1130-4.
359. Koelzer, V.H., et al., *Digital analysis and epigenetic regulation of the signature of rejection in colorectal cancer*. Oncoimmunology, 2017. **6**(4): p. e1288330.
360. Baer, C., et al., *Extensive promoter DNA hypermethylation and hypomethylation is associated with aberrant microRNA expression in chronic lymphocytic leukemia*. Cancer Res, 2012. **72**(15): p. 3775-85.
361. Slabakova, E., et al., *Alternative mechanisms of miR-34a regulation in cancer*. Cell Death Dis, 2017. **8**(10): p. e3100.
362. Wu, X., et al., *Down-regulation of the tumor suppressor miR-34a contributes to head and neck cancer by up-regulating the MET oncogene and modulating tumor immune evasion*. J Exp Clin Cancer Res, 2021. **40**(1): p. 70.
363. Yang, P., et al., *TGF-beta-miR-34a-CCL22 signaling-induced Treg cell recruitment promotes venous metastases of HBV-positive hepatocellular carcinoma*. Cancer Cell, 2012. **22**(3): p. 291-303.
364. Brabletz, T., *MiR-34 and SNAIL: another double-negative feedback loop controlling cellular plasticity/EMT governed by p53*. Cell Cycle, 2012. **11**(2): p. 215-6.
365. Sun, F., et al., *Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest*. FEBS Lett, 2008. **582**(10): p. 1564-8.
366. Rokavec, M., et al., *The p53/miR-34 axis in development and disease*. J Mol Cell Biol, 2014. **6**(3): p. 214-30.
367. Li, X.J., Z.J. Ren, and J.H. Tang, *MicroRNA-34a: a potential therapeutic target in human cancer*. Cell Death Dis, 2014. **5**(7): p. e1327.
368. Misso, G., et al., *Mir-34: a new weapon against cancer?* Mol Ther Nucleic Acids, 2014. **3**(9): p. e194.
369. Cheng, C., et al., *Knockdown of long non-coding RNA HOTAIR inhibits cisplatin resistance of gastric cancer cells through inhibiting the PI3K/Akt and Wnt/beta-catenin signaling pathways by up-regulating miR-34a*. Int J Biol Macromol, 2018. **107**(Pt B): p. 2620-2629.
370. Agostini, M. and R.A. Knight, *miR-34: from bench to bedside*. Oncotarget, 2014. **5**(4): p. 872-81.
371. Nie, D., et al., *Roles of MicroRNA-34a in Epithelial to Mesenchymal Transition, Competing Endogenous RNA Sponging and Its Therapeutic Potential*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(4).
372. Tafsiri, E., et al., *Expression of miRNAs in non-small-cell lung carcinomas and their association with clinicopathological features*. Tumour Biol, 2015. **36**(3): p. 1603-12.
373. Stahlhut, C. and F.J. Slack, *Combinatorial Action of MicroRNAs let-7 and miR-34 Effectively Synergizes with Erlotinib to Suppress Non-small Cell Lung Cancer Cell Proliferation*. Cell Cycle, 2015. **14**(13): p. 2171-80.
374. Garofalo, M., et al., *MiR-34a/c-Dependent PDGFR-alpha/beta Downregulation Inhibits Tumorigenesis and Enhances TRAIL-Induced Apoptosis in Lung Cancer*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e67581.

375. Zhao, K., et al., *Circulating microRNA-34 family low expression correlates with poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer*. J Thorac Dis, 2017. **9**(10): p. 3735-3746.
376. Kasinski, A.L. and F.J. Slack, *miRNA-34 prevents cancer initiation and progression in a therapeutically resistant K-ras and p53-induced mouse model of lung adenocarcinoma*. Cancer Res, 2012. **72**(21): p. 5576-87.
377. Zhang, X., et al., *MicroRNA-34a suppresses colorectal cancer metastasis by regulating Notch signaling*. Oncol Lett, 2017. **14**(2): p. 2325-2333.
378. Zhang, D., J. Zhou, and M. Dong, *Dysregulation of microRNA-34a expression in colorectal cancer inhibits the phosphorylation of FAK via VEGF*. Dig Dis Sci, 2014. **59**(5): p. 958-67.
379. Liang, J., et al., *LEF1 Targeting EMT in Prostate Cancer Invasion Is Regulated by miR-34a*. Mol Cancer Res, 2015. **13**(4): p. 681-8.
380. Wang, B., et al., *miR-34a directly targets tRNA(i)(Met) precursors and affects cellular proliferation, cell cycle, and apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(28): p. 7392-7397.
381. Zeng, Z., et al., *Low Expression of Circulating MicroRNA-34c is Associated with Poor Prognosis in Triple-Negative Breast Cancer*. Yonsei Med J, 2017. **58**(4): p. 697-702.
382. Zhang, L., et al., *MiR-34b/c-5p and the neurokinin-1 receptor regulate breast cancer cell proliferation and apoptosis*. Cell Prolif, 2019. **52**(1): p. e12527.
383. Mohamed, A.A., et al., *MicroRNAs and clinical implications in hepatocellular carcinoma*. World J Hepatol, 2017. **9**(23): p. 1001-1007.
384. Bhaumik, D., et al., *Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells*. Oncogene, 2008. **27**(42): p. 5643-7.
385. Labbaye, C. and U. Testa, *The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer*. J Hematol Oncol, 2012. **5**: p. 13.
386. Curtale, G., et al., *An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes*. Blood, 2010. **115**(2): p. 265-73.
387. Jurkin, J., et al., *miR-146a is differentially expressed by myeloid dendritic cell subsets and desensitizes cells to TLR2-dependent activation*. J Immunol, 2010. **184**(9): p. 4955-65.
388. Park, H., et al., *MicroRNA-146a and microRNA-146b regulate human dendritic cell apoptosis and cytokine production by targeting TRAF6 and IRAK1 proteins*. J Biol Chem, 2015. **290**(5): p. 2831-41.
389. Hou, J., et al., *MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2*. J Immunol, 2009. **183**(3): p. 2150-8.
390. Bhairavabhotla, R., et al., *Transcriptome profiling of human FoxP3+ regulatory T cells*. Hum Immunol, 2016. **77**(2): p. 201-13.
391. Holmstrom, K., A.E. Pedersen, and M. Gad, *Analysis of miR-146a and miR-142-3p as Potential Markers of Freshly Isolated or In Vitro-Expanded Human Treg cells*. Scand J Immunol, 2017. **85**(2): p. 113-121.
392. Zhou, Q., et al., *Decreased expression of miR-146a and miR-155 contributes to an abnormal Treg phenotype in patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2015. **74**(6): p. 1265-74.
393. Pacifico, F., et al., *Nuclear factor-kappaB contributes to anaplastic thyroid carcinomas through up-regulation of miR-146a*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(3): p. 1421-30.
394. Yu, J., et al., *MicroRNA alterations of pancreatic intraepithelial neoplasias*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(4): p. 981-92.

395. Li, L., X.P. Chen, and Y.J. Li, *MicroRNA-146a and human disease*. Scand J Immunol, 2010. **71**(4): p. 227-31.
396. Kogo, R., et al., *Clinical significance of miR-146a in gastric cancer cases*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(13): p. 4277-84.
397. Wang, H., et al., *Multiple roles of microRNA-146a in immune responses and hepatocellular carcinoma*. Oncol Lett, 2019. **18**(5): p. 5033-5042.
398. Hurst, D.R., et al., *Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis*. Cancer Res, 2009. **69**(4): p. 1279-83.
399. Li, Y., et al., *miR-146a suppresses invasion of pancreatic cancer cells*. Cancer Res, 2010. **70**(4): p. 1486-95.
400. Cornett, A.L. and C.S. Lutz, *Regulation of COX-2 expression by miR-146a in lung cancer cells*. RNA, 2014. **20**(9): p. 1419-30.
401. Testa, U., et al., *miR-146 and miR-155: Two Key Modulators of Immune Response and Tumor Development*. Noncoding RNA, 2017. **3**(3).
402. Karrich, J.J., et al., *MicroRNA-146a regulates survival and maturation of human plasmacytoid dendritic cells*. Blood, 2013. **122**(17): p. 3001-9.
403. O'Connell, R.M., et al., *MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(5): p. 1604-9.
404. Lu, L.F., et al., *Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein*. Immunity, 2009. **30**(1): p. 80-91.
405. Sanchez-Diaz, R., et al., *Thymus-Derived Regulatory T Cell Development Is Regulated by C-Type Lectin-Mediated BIC/MicroRNA 155 Expression*. Mol Cell Biol, 2017. **37**(9).
406. Wu, M., et al., *MiR-155-5p promotes oral cancer progression by targeting chromatin remodeling gene ARID2*. Biomed Pharmacother, 2020. **122**: p. 109696.
407. Pedersen, I.M., et al., *Onco-miR-155 targets SHIP1 to promote TNFalpha-dependent growth of B cell lymphomas*. EMBO Mol Med, 2009. **1**(5): p. 288-95.
408. Mattiske, S., et al., *The oncogenic role of miR-155 in breast cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2012. **21**(8): p. 1236-43.
409. Zhang, Y., et al., *Hepatitis C virus-induced up-regulation of microRNA-155 promotes hepatocarcinogenesis by activating Wnt signaling*. Hepatology, 2012. **56**(5): p. 1631-40.
410. Babar, I.A., et al., *Inhibition of hypoxia-induced miR-155 radiosensitizes hypoxic lung cancer cells*. Cancer Biol Ther, 2011. **12**(10): p. 908-14.
411. Higgs, G. and F. Slack, *The multiple roles of microRNA-155 in oncogenesis*. J Clin Bioinforma, 2013. **3**(1): p. 17.
412. Gironella, M., et al., *Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(41): p. 16170-5.
413. Cai, Z.K., et al., *microRNA-155 promotes the proliferation of prostate cancer cells by targeting annexin 7*. Mol Med Rep, 2015. **11**(1): p. 533-8.
414. Luo, Q., et al., *Tumor-suppressive microRNA-195-5p regulates cell growth and inhibits cell cycle by targeting cyclin dependent kinase 8 in colon cancer*. Am J Transl Res, 2016. **8**(5): p. 2088-96.
415. Xing, Z., et al., *The long non-coding RNA LINC00473 contributes to cell proliferation via JAK-STAT3 signaling pathway by regulating miR-195-5p/SEPT2 axis in prostate cancer*. Biosci Rep, 2020. **40**(9).

416. Guo, H., et al., *MiR-195 targets HDGF to inhibit proliferation and invasion of NSCLC cells*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(9): p. 8861-6.
417. Yang, X., et al., *MiR-195 regulates cell apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells by targeting LATS2*. *Pharmazie*, 2012. **67**(7): p. 645-51.
418. Lin, X., et al., *miR-195-5p/NOTCH2-mediated EMT modulates IL-4 secretion in colorectal cancer to affect M2-like TAM polarization*. *J Hematol Oncol*, 2019. **12**(1): p. 20.
419. Yongchun, Z., et al., *MicroRNA-195 inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting MYB*. *Cancer Lett*, 2014. **347**(1): p. 65-74.
420. Li, M., et al., *The Effects of miR-195-5p/MMP14 on Proliferation and Invasion of Cervical Carcinoma Cells Through TNF Signaling Pathway Based on Bioinformatics Analysis of Microarray Profiling*. *Cell Physiol Biochem*, 2018. **50**(4): p. 1398-1413.
421. Wang, X., et al., *MiR-195 inhibits the growth and metastasis of NSCLC cells by targeting IGF1R*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(9): p. 8765-70.
422. Wang, H., et al., *Reversal of Chemotherapy Resistance to Cisplatin in NSCLC by miRNA-195-5p via Targeting the FGF2 Gene*. *Pharmgenomics Pers Med*, 2021. **14**: p. 497-508.
423. Shen, D., et al., *Long non-coding RNA MCM3AP antisense RNA 1 promotes non-small cell lung cancer progression through targeting microRNA-195-5p*. *Bioengineered*, 2021. **12**(1): p. 3525-3538.
424. Zhang, Q.Q., et al., *MicroRNA-195 plays a tumor-suppressor role in human glioblastoma cells by targeting signaling pathways involved in cellular proliferation and invasion*. *Neuro Oncol*, 2012. **14**(3): p. 278-87.
425. Zhou, B., et al., *MicroRNA-195 Suppresses the Progression of Pancreatic Cancer by Targeting DCLK1*. *Cell Physiol Biochem*, 2017. **44**(5): p. 1867-1881.
426. Liu, B., et al., *MiR-195 suppresses non-small cell lung cancer by targeting CHEK1*. *Oncotarget*, 2015. **6**(11): p. 9445-56.
427. Fu, M.G., et al., *Differential expression of miR-195 in esophageal squamous cell carcinoma and miR-195 expression inhibits tumor cell proliferation and invasion by targeting of Cdc42*. *FEBS Lett*, 2013. **587**(21): p. 3471-9.
428. Wang, L.K., et al., *Upregulation of miR-200b Inhibits Hepatocellular Carcinoma Cell Proliferation and Migration by Targeting HMGB3 Protein*. *Technol Cancer Res Treat*, 2018. **17**: p. 1533033818806475.
429. Kim, S.L., et al., *A novel HDAC1 inhibitor, CBUD-1001, exerts anticancer effects by modulating the apoptosis and EMT of colorectal cancer cells*. *Int J Oncol*, 2020. **57**(4): p. 1027-1038.
430. Gregory, P.A., et al., *The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1*. *Nat Cell Biol*, 2008. **10**(5): p. 593-601.
431. Li, J., et al., *MicroRNA-200b inhibits the growth and metastasis of glioma cells via targeting ZEB2*. *Int J Oncol*, 2016. **48**(2): p. 541-50.
432. Watson, K.L., et al., *The miR-200b/200a/429 cluster prevents metastasis and induces dormancy in a murine claudin-low mammary tumor cell line*. *Exp Cell Res*, 2018. **369**(1): p. 17-26.
433. Saleeb, R., et al., *The miR-200 family as prognostic markers in clear cell renal cell carcinoma*. *Urol Oncol*, 2019. **37**(12): p. 955-963.
434. Grenda, A., et al., *Tissue MicroRNA Expression as a Predictor of Response to Immunotherapy in NSCLC Patients*. *Front Oncol*, 2020. **10**: p. 563613.
435. Xu, T., et al., *MiR-200b Suppresses Gastric Cancer Cell Migration and Invasion by Inhibiting NRG1 through ERBB2/ERBB3 Signaling*. *J Oncol*, 2021. **2021**: p. 4470778.

436. Chen, L., et al., *miR-200b-3p inhibits proliferation and induces apoptosis in colorectal cancer by targeting Wnt1*. Mol Med Rep, 2018. **18**(3): p. 2571-2580.
437. Moh-Moh-Aung, A., et al., *Decreased miR-200b-3p in cancer cells leads to angiogenesis in HCC by enhancing endothelial ERG expression*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 10418.
438. Gui, Z., et al., *Oridonin inhibition and miR-200b-3p/ZEB1 axis in human pancreatic cancer*. Int J Oncol, 2017. **50**(1): p. 111-120.
439. Gyvyte, U., et al., *The Role of miR-375-3p and miR-200b-3p in Gastrointestinal Stromal Tumors*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(14).
440. Li, D., et al., *The microRNAs miR-200b-3p and miR-429-5p target the LIMK1/CFL1 pathway to inhibit growth and motility of breast cancer cells*. Oncotarget, 2017. **8**(49): p. 85276-85289.
441. Zhou, W.J., et al., *NEAT1/miR-200b-3p/SMAD2 axis promotes progression of melanoma*. Aging (Albany NY), 2020. **12**(22): p. 22759-22775.
442. Pelka, K., et al., *miR-96-5p, miR-134-5p, miR-181b-5p and miR-200b-3p heterogenous expression in sites of prostate cancer versus benign prostate hyperplasia-archival samples study*. Histochem Cell Biol, 2021. **155**(3): p. 423-433.
443. Liu, K., et al., *MiR-200b-3p Functions as an Oncogene by Targeting ABCA1 in Lung Adenocarcinoma*. Technol Cancer Res Treat, 2019. **18**: p. 1533033819892590.
444. Wang, L., et al., *Circular RNA hsa_circ_0008305 (circPTK2) inhibits TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis by controlling TIF1gamma in non-small cell lung cancer*. Mol Cancer, 2018. **17**(1): p. 140.
445. Xie, K., et al., *Genetic variants in regulatory regions of microRNAs are associated with lung cancer risk*. Oncotarget, 2016. **7**(30): p. 47966-47974.
446. Ishibashi, O., et al., *MiR-141-3p is upregulated in esophageal squamous cell carcinoma and targets pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase-2, a negative regulator of the PI3K/AKT pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2018. **501**(2): p. 507-513.
447. Amorim, M., et al., *Predictive and Prognostic Value of Selected MicroRNAs in Luminal Breast Cancer*. Front Genet, 2019. **10**: p. 815.
448. Wei, W., et al., *miR-200c regulates the proliferation, apoptosis and invasion of gastric carcinoma cells through the downregulation of EDNRA expression*. Int J Mol Med, 2018. **41**(3): p. 1619-1626.
449. Hanahan, D., *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. Cancer Discov, 2022. **12**(1): p. 31-46.
450. Ruan, K., X. Fang, and G. Ouyang, *MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer*. Cancer Lett, 2009. **285**(2): p. 116-26.
451. Van Roosbroeck, K. and G.A. Calin, *Cancer Hallmarks and MicroRNAs: The Therapeutic Connection*. Adv Cancer Res, 2017. **135**: p. 119-149.
452. Mei, S., et al., *MicroRNA-200c Promotes Suppressive Potential of Myeloid-Derived Suppressor Cells by Modulating PTEN and FOG2 Expression*. PLoS One, 2015. **10**(8): p. e0135867.
453. Williams, M.M., et al., *MicroRNA-200c restoration reveals a cytokine profile to enhance M1 macrophage polarization in breast cancer*. NPJ Breast Cancer, 2021. **7**(1): p. 64.
454. Santasusagna, S., et al., *Prognostic Impact of miR-200 Family Members in Plasma and Exosomes from Tumor-Draining versus Peripheral Veins of Colon Cancer Patients*. Oncology, 2018. **95**(5): p. 309-318.
455. Cao, Q., et al., *Clinicopathological and prognostic implications of the miR-200 family in patients with epithelial ovarian cancer*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(5): p. 2392-401.

456. Du, M., et al., *MicroRNA-200a suppresses migration and invasion and enhances the radiosensitivity of NSCLC cells by inhibiting the HGF/c-Met signaling pathway*. *Oncol Rep*, 2019. **41**(3): p. 1497-1508.
457. Song, C., et al., *miR-200c inhibits breast cancer proliferation by targeting KRAS*. *Oncotarget*, 2015. **6**(33): p. 34968-78.
458. Xue, B., et al., *miR-200 deficiency promotes lung cancer metastasis by activating Notch signaling in cancer-associated fibroblasts*. *Genes Dev*, 2021. **35**(15-16): p. 1109-1122.
459. Lee, J.W., et al., *The expression of the miRNA-200 family in endometrial endometrioid carcinoma*. *Gynecol Oncol*, 2011. **120**(1): p. 56-62.
460. Carter, J.V., et al., *The microRNA-200 family acts as an oncogene in colorectal cancer by inhibiting the tumor suppressor RASSF2*. *Oncol Lett*, 2019. **18**(4): p. 3994-4007.
461. Liu, W., et al., *MIR-202-5p Inhibits RIG-I-Dependent Innate Immune Responses to RGNNV Infection by Targeting TRIM25 to Mediate RIG-I Ubiquitination*. *Viruses*, 2020. **12**(3).
462. von Both, U., et al., *Mycobacterium tuberculosis Exploits a Molecular Off Switch of the Immune System for Intracellular Survival*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 661.
463. Lin, Y., et al., *Construction and analysis of the transcription factor-microRNA co-regulatory network response to Mycobacterium tuberculosis: a view from the blood*. *Am J Transl Res*, 2017. **9**(4): p. 1962-1976.
464. Patel, J.B., et al., *Control of EVI-1 oncogene expression in metastatic breast cancer cells through microRNA miR-22*. *Oncogene*, 2011. **30**(11): p. 1290-301.
465. Zhao, Z., et al., *miR-202 functions as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer by targeting STAT3*. *Mol Med Rep*, 2017. **16**(2): p. 2281-2289.
466. Joosse, S.A., et al., *Circulating cell-free cancer-testis MAGE-A RNA, BORIS RNA, let-7b and miR-202 in the blood of patients with breast cancer and benign breast diseases*. *Br J Cancer*, 2014. **111**(5): p. 909-17.
467. Kim, J., et al., *Diagnostic Value of Circulating miR-202 in Early-Stage Breast Cancer in South Korea*. *Medicina (Kaunas)*, 2020. **56**(7).
468. Liu, T., J. Guo, and X. Zhang, *MIR-202-5p/PTEN mediates doxorubicin-resistance of breast cancer cells via PI3K/Akt signaling pathway*. *Cancer Biol Ther*, 2019. **20**(7): p. 989-998.
469. Mody, H.R., et al., *miR-202 Diminishes TGFbeta Receptors and Attenuates TGFbeta1-Induced EMT in Pancreatic Cancer*. *Mol Cancer Res*, 2017. **15**(8): p. 1029-1039.
470. Wang, R., X.F. Chen, and Y.Q. Shu, *Prediction of non-small cell lung cancer metastasis-associated microRNAs using bioinformatics*. *Am J Cancer Res*, 2015. **5**(1): p. 32-51.
471. Monastirioti, A., et al., *A Prognostic Role for Circulating microRNAs Involved in Macrophage Polarization in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer*. *Cells*, 2021. **10**(8).
472. Fazi, F., et al., *A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis*. *Cell*, 2005. **123**(5): p. 819-31.
473. Yuan, X., et al., *MicroRNA miR-223 as regulator of innate immunity*. *J Leukoc Biol*, 2018. **104**(3): p. 515-524.
474. Chen, L., et al., *High Expression of microRNA-223 Indicates a Good Prognosis in Triple-Negative Breast Cancer*. *Front Oncol*, 2021. **11**: p. 630432.
475. Du, T., et al., *Regulatory effect of microRNA-223-3p on breast cancer cell processes via the Hippo/Yap signaling pathway*. *Oncol Lett*, 2021. **22**(1): p. 516.
476. Li, X., et al., *miRNA-223 promotes gastric cancer invasion and metastasis by targeting tumor suppressor EPB41L3*. *Mol Cancer Res*, 2011. **9**(7): p. 824-33.

477. Zhou, X., et al., *MiR-223 promotes the cisplatin resistance of human gastric cancer cells via regulating cell cycle by targeting FBXW7*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015. **34**(1): p. 28.
478. Zhu, Y., et al., *miR-223-3p promotes cell proliferation and invasion by targeting Arid1a in gastric cancer*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2020. **52**(2): p. 150-159.
479. Oken, M.M., et al., *Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group*. *Am J Clin Oncol*, 1982. **5**(6): p. 649-55.
480. Holland, P.M., et al., *Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(16): p. 7276-80.
481. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
482. Huggett, J., et al., *Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations*. *Genes Immun*, 2005. **6**(4): p. 279-84.
483. Saviozzi, S., et al., *Selection of suitable reference genes for accurate normalization of gene expression profile studies in non-small cell lung cancer*. *BMC Cancer*, 2006. **6**: p. 200.
484. Faraldi, M., et al., *Normalization strategies differently affect circulating miRNA profile associated with the training status*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 1584.
485. Lou, G., et al., *Differential distribution of U6 (RNU6-1) expression in human carcinoma tissues demonstrates the requirement for caution in the internal control gene selection for microRNA quantification*. *Int J Mol Med*, 2015. **36**(5): p. 1400-8.
486. Causin, R.L., et al., *Identification and performance evaluation of housekeeping genes for microRNA expression normalization by reverse transcription-quantitative PCR using liquid-based cervical cytology samples*. *Oncol Lett*, 2019. **18**(5): p. 4753-4761.
487. Nishino, M., et al., *Revised RECIST guideline version 1.1: What oncologists want to know and what radiologists need to know*. *AJR Am J Roentgenol*, 2010. **195**(2): p. 281-9.
488. McShane, L.M., et al., *Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK)*. *J Natl Cancer Inst*, 2005. **97**(16): p. 1180-4.
489. Lemjabbar-Alaoui, H., et al., *Lung cancer: Biology and treatment options*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1856**(2): p. 189-210.
490. Cui, M., et al., *Circulating MicroRNAs in Cancer: Potential and Challenge*. *Front Genet*, 2019. **10**: p. 626.
491. Antolin, S., et al., *Circulating miR-200c and miR-141 and outcomes in patients with breast cancer*. *BMC Cancer*, 2015. **15**: p. 297.
492. Zanutto, S., et al., *Circulating miR-378 in plasma: a reliable, haemolysis-independent biomarker for colorectal cancer*. *Br J Cancer*, 2014. **110**(4): p. 1001-7.
493. Zhang, J., et al., *Circulating MiR-16-5p and MiR-19b-3p as Two Novel Potential Biomarkers to Indicate Progression of Gastric Cancer*. *Theranostics*, 2015. **5**(7): p. 733-45.
494. Zhao, Y., et al., *Circulating microRNAs: Promising Biomarkers Involved in Several Cancers and Other Diseases*. *DNA Cell Biol*, 2017. **36**(2): p. 77-94.
495. Kawaguchi, T., et al., *Clinical impact of circulating miR-221 in plasma of patients with pancreatic cancer*. *Br J Cancer*, 2013. **108**(2): p. 361-9.
496. Mirzaei, H.R., et al., *Circulating microRNAs in Hepatocellular Carcinoma: Potential Diagnostic and Prognostic Biomarkers*. *Curr Pharm Des*, 2016. **22**(34): p. 5257-5269.
497. Huan, T., et al., *Age-associated microRNA expression in human peripheral blood is associated with all-cause mortality and age-related traits*. *Aging Cell*, 2018. **17**(1).

498. Wozniak, M.B., et al., *Circulating MicroRNAs as Non-Invasive Biomarkers for Early Detection of Non-Small-Cell Lung Cancer*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0125026.
499. Charkiewicz, R., et al., *Validation for histology-driven diagnosis in non-small cell lung cancer using hsa-miR-205 and hsa-miR-21 expression by two different normalization strategies*. Int J Cancer, 2016. **138**(3): p. 689-97.
500. Huang, W., et al., *Validation and target gene screening of hsa-miR-205 in lung squamous cell carcinoma*. Chin Med J (Engl), 2014. **127**(2): p. 272-8.
501. Blandin Knight, S., et al., *Progress and prospects of early detection in lung cancer*. Open Biol, 2017. **7**(9).
502. Shen, J., et al., *Diagnosis of lung cancer in individuals with solitary pulmonary nodules by plasma microRNA biomarkers*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 374.
503. Pang, P.C., et al., *miR-497 as a potential serum biomarker for the diagnosis and prognosis of osteosarcoma*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016. **20**(18): p. 3765-3769.
504. Gong, L., et al., *Decreased expression of microRNA-148a predicts poor prognosis in ovarian cancer and associates with tumor growth and metastasis*. Biomed Pharmacother, 2016. **83**: p. 58-63.
505. Ren, G.B., et al., *Study on the relationship between miR-520g and the development of breast cancer*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016. **20**(4): p. 657-63.
506. Xu, L.F., et al., *MicroRNA-21 (miR-21) regulates cellular proliferation, invasion, migration, and apoptosis by targeting PTEN, RECK and Bcl-2 in lung squamous carcinoma, Gejiu City, China*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e103698.
507. Chai, Z.T., et al., *microRNA-26a suppresses recruitment of macrophages by down-regulating macrophage colony-stimulating factor expression through the PI3K/Akt pathway in hepatocellular carcinoma*. J Hematol Oncol, 2015. **8**: p. 56.
508. Yang, Y., et al., *Decreased MicroRNA-26a expression causes cisplatin resistance in human non-small cell lung cancer*. Cancer Biol Ther, 2016. **17**(5): p. 515-25.
509. ParvizHamidi, M., et al., *Circulating miR-26a and miR-21 as biomarkers for glioblastoma multiform*. Biotechnol Appl Biochem, 2019. **66**(2): p. 261-265.
510. Pacheco Plaza, M.C., et al., *[Ultrasonics in endodontics: mechanism of action]*. Rev Esp Endodoncia, 1989. **7**(1): p. 7-12.
511. Qiu, X., et al., *Expression and prognostic value of microRNA-26a and microRNA-148a in gastric cancer*. J Gastroenterol Hepatol, 2017. **32**(4): p. 819-827.
512. Okada, N., et al., *A positive feedback between p53 and miR-34 miRNAs mediates tumor suppression*. Genes Dev, 2014. **28**(5): p. 438-50.
513. Li, W.J., et al., *MicroRNA-34a: Potent Tumor Suppressor, Cancer Stem Cell Inhibitor, and Potential Anticancer Therapeutic*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 640587.
514. Cortez, M.A., et al., *PDL1 Regulation by p53 via miR-34*. J Natl Cancer Inst, 2016. **108**(1).
515. Basak, S.K., et al., *The CD44(high) tumorigenic subsets in lung cancer biospecimens are enriched for low miR-34a expression*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73195.
516. Gallardo, E., et al., *miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer*. Carcinogenesis, 2009. **30**(11): p. 1903-9.
517. Monastirioti, A., et al., *Mir-34a as predictor of immunotherapy efficacy in NSCLC patients*. Journal of Clinical Oncology, 2021. **39**(15_suppl): p. e21191-e21191.
518. Saba, R., D.L. Sorensen, and S.A. Booth, *MicroRNA-146a: A Dominant, Negative Regulator of the Innate Immune Response*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 578.

519. Shahriar, A., et al., *The dual role of mir-146a in metastasis and disease progression*. Biomed Pharmacother, 2020. **126**: p. 110099.
520. Wang, C., et al., *Prognostic and diagnostic potential of miR-146a in oesophageal squamous cell carcinoma*. Br J Cancer, 2016. **114**(3): p. 290-7.
521. Wilczynski, M., et al., *Expression of miR-146a in patients with ovarian cancer and its clinical significance*. Oncol Lett, 2017. **14**(3): p. 3207-3214.
522. Chen, G., et al., *miR-146a inhibits cell growth, cell migration and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e60317.
523. Pavel, A.B., et al., *Alterations in Bronchial Airway miRNA Expression for Lung Cancer Detection*. Cancer Prev Res (Phila), 2017. **10**(11): p. 651-659.
524. Chen, L., et al., *Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumour cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5241.
525. Pecot, C.V., et al., *Tumour angiogenesis regulation by the miR-200 family*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2427.
526. Dykxhoorn, D.M., et al., *miR-200 enhances mouse breast cancer cell colonization to form distant metastases*. PLoS One, 2009. **4**(9): p. e7181.
527. Korpala, M., et al., *Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization*. Nat Med, 2011. **17**(9): p. 1101-8.
528. Liu, X.G., et al., *High expression of serum miR-21 and tumor miR-200c associated with poor prognosis in patients with lung cancer*. Med Oncol, 2012. **29**(2): p. 618-26.
529. Kim, M.K., et al., *Expression of microRNA miR-126 and miR-200c is associated with prognosis in patients with non-small cell lung cancer*. Virchows Arch, 2014. **465**(4): p. 463-71.
530. Tejero, R., et al., *miR-141 and miR-200c as markers of overall survival in early stage non-small cell lung cancer adenocarcinoma*. PLoS One, 2014. **9**(7): p. e101899.
531. Anastasiadou, E., et al., *MiR-200c-3p Contrasts PD-L1 Induction by Combinatorial Therapies and Slows Proliferation of Epithelial Ovarian Cancer through Downregulation of beta-Catenin and c-Myc*. Cells, 2021. **10**(3).
532. Monastiriotti, A., et al., *Plasma-Based microRNA Expression Analysis in Advanced Stage NSCLC Patients Treated with Nivolumab*. Cancers (Basel), 2022. **14**(19).
533. Nevalainen, M.T., et al., *MRI of a painful carpal boss: variations at the extensor carpi radialis brevis insertion and imaging findings in regional traumatic and overuse injuries*. Skeletal Radiol, 2019. **48**(7): p. 1079-1085.
534. Deng, X., et al., *miR-202 Suppresses Cell Proliferation by Targeting FOXR2 in Endometrial Adenocarcinoma*. Dis Markers, 2017. **2017**: p. 2827435.
535. Gao, S., et al., *miR-202 acts as a potential tumor suppressor in breast cancer*. Oncol Lett, 2018. **16**(1): p. 1155-1162.
536. Jiang, J., et al., *MicroRNA-202 induces cell cycle arrest and apoptosis in lung cancer cells through targeting cyclin D1*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016. **20**(11): p. 2278-84.
537. Sun, W., et al., *miR-202 Enhances the Anti-Tumor Effect of Cisplatin on Non-Small Cell Lung Cancer by Targeting the Ras/MAPK Pathway*. Cell Physiol Biochem, 2018. **51**(5): p. 2160-2171.
538. Ilie, M., et al., *Current challenges for detection of circulating tumor cells and cell-free circulating nucleic acids, and their characterization in non-small cell lung carcinoma patients. What is the best blood substrate for personalized medicine?* Ann Transl Med, 2014. **2**(11): p. 107.

539. Sozzi, G., et al., *Clinical utility of a plasma-based miRNA signature classifier within computed tomography lung cancer screening: a correlative MILD trial study*. J Clin Oncol, 2014. **32**(8): p. 768-73.
540. Jarry, J., et al., *The validity of circulating microRNAs in oncology: five years of challenges and contradictions*. Mol Oncol, 2014. **8**(4): p. 819-29.
541. Ma, J., et al., *Differential miRNA expressions in peripheral blood mononuclear cells for diagnosis of lung cancer*. Lab Invest, 2015. **95**(10): p. 1197-206.
542. Becker, N. and C.M. Lockwood, *Pre-analytical variables in miRNA analysis*. Clin Biochem, 2013. **46**(10-11): p. 861-8.
543. McDonald, J.S., et al., *Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges*. Clin Chem, 2011. **57**(6): p. 833-40.
544. Indini, A., E. Rijavec, and F. Grossi, *Circulating Biomarkers of Response and Toxicity of Immunotherapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Comprehensive Review*. Cancers (Basel), 2021. **13**(8).
545. Halvorsen, A.R., et al., *Circulating microRNAs associated with prolonged overall survival in lung cancer patients treated with nivolumab*. Acta Oncol, 2018. **57**(9): p. 1225-1231.
546. Cojocneanu, R., et al., *Plasma and Tissue Specific miRNA Expression Pattern and Functional Analysis Associated to Colorectal Cancer Patients*. Cancers (Basel), 2020. **12**(4).

Παράρτημα Α΄

Ανάτυπα δημοσιεύσεων στο πλαίσιο της διδακτορικής διατριβής.

Article

A Prognostic Role for Circulating microRNAs Involved in Macrophage Polarization in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer

Alexia Monastiriotti ¹, Chara Papadaki ¹, Konstantinos Rounis ², Despoina Kalapanida ²,
Dimitrios Mavroudis ^{1,2} and Sofia Agelaki ^{1,2,*}

¹ Laboratory of Translational Oncology, School of Medicine, University of Crete, Vassilika Voutou, 71003 Heraklion, Crete, Greece; monasal91@gmail.com (A.M.); chapapadak@uoc.gr (C.P.); mavroudis@uoc.gr (D.M.)

² Department of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, Vassilika Voutou, 71110 Heraklion, Crete, Greece; rounis@gmail.com (K.R.); despoinakalapanida87@gmail.com (D.K.)

* Correspondence: agelakisofia@gmail.com; Tel.: +30-281-0392438



Citation: Monastiriotti, A.; Papadaki, C.; Rounis, K.; Kalapanida, D.; Mavroudis, D.; Agelaki, S. A Prognostic Role for Circulating microRNAs Involved in Macrophage Polarization in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Cells* **2021**, *10*, 1988. <https://doi.org/10.3390/cells10081988>

Academic Editor: Steven G. Gray

Received: 7 July 2021

Accepted: 3 August 2021

Published: 5 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Circulating microRNAs (miRNAs) are key regulators of the crosstalk between tumor cells and immune response. In the present study, miRNAs (let-7c, miR-26a, miR-30d, miR-98, miR-195, miR-202) reported to be involved in the polarization of macrophages were examined for associations with the outcomes of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (N = 125) treated with first-line platinum-based chemotherapy. RT-qPCR was used to analyze miRNA expression levels in the plasma of patients prior to treatment. In our results, disease progression was correlated with high miR-202 expression (HR: 2.335; $p = 0.040$). Additionally, high miR-202 expression was characterized as an independent prognostic factor for shorter progression-free survival (PFS, HR: 1.564; $p = 0.021$) and overall survival (OS, HR: 1.558; $p = 0.024$). Moreover, high miR-202 independently predicted shorter OS (HR: 1.989; $p = 0.008$) in the non-squamous (non-SqCC) subgroup, and high miR-26a was correlated with shorter OS in the squamous (SqCC) subgroup (10.07 vs. 13.53 months, $p = 0.033$). The results of the present study propose that the expression levels of circulating miRNAs involved in macrophage polarization are correlated with survival measures in NSCLC patients, and their role as potential biomarkers merits further investigation.

Keywords: circulating miRNAs; NSCLC; platinum-based chemotherapy; immune response; survival; tumor associated macrophages; TAMs; tumor microenvironment; TME

1. Introduction

Even though the discovery of targeted drugs [1] and immunotherapy [2] brought major changes in the field of precision medicine in NSCLC [2,3], high cost, the detection of targetable alterations (e.g., EGFR, c-MET, ALK, ROS1 and BRAF) [4] in less than 30% of cancer patients and the efficacy of immunotherapy in only a subset of patients, limit the number of patients who can benefit. As a result, despite recent progress, platinum-based chemotherapy, alone or in combination with immunotherapy, remains the cornerstone of treatment for a significant number of advanced or metastatic NSCLC patients with no targetable genetic alterations [5]. Furthermore, chemotherapy is recommended following failure of targeted therapies or immunotherapy, and in patients with early stages of the disease.

Platinum compounds bind to DNA and form platinum-DNA adducts, which interfere with transcription and DNA replication, ultimately resulting in programmed cell death [6]. In response to cisplatin (CDDP), cells activate multiple repair pathways, such as homologous recombination, nucleotide excision repair, and Fanconi anemia, to detect and repair DNA adducts. The ability of cells to repair DNA crosslinks is considered a critical determinant for the cytotoxic effects of CDDP, and mutations or deregulated expression of genes

involved in DNA repair pathways is associated with sensitivity to platinum agents [7]. Nevertheless, CDDP sensitivity is not always associated with a defective DNA damage response, and the quest for markers predictive of outcomes with platinum-based treatment remains a significant challenge.

Besides the formation of DNA cross-links, immunomodulatory effects have also been ascribed to platinum compounds. Collectively, CDDP positively regulates MHC class I expression, stimulates the recruitment and proliferation of effector T cells and antigen-presenting cells (APCs), enhances cytotoxic effector T-cell activity and counteracts immunosuppressive factors within the tumor, thereby creating an inflammatory tumor microenvironment (TME) [8]. Intense lymphocytic infiltration, suggestive of an existing anti-tumor immune response within the TME, was shown to be a favorable prognostic marker for survival in resected NSCLC; however, there are no robust data on the prognostic significance of different subsets of immune cells [9].

Macrophages are crucial components of the innate immune response; and tumor associated macrophages (TAMs) participate in the regulation of tumor growth, survival and the anti-tumor adaptive immune response [10]. Macrophages demonstrate a high level of plasticity, having the ability to transit between M1 and M2 polarized phenotypes. Macrophage polarization has prognostic value for various tumor types. The M1-like phenotype promotes anti-tumor responses, and the M2-like phenotype exhibits tumor-supporting functions [11–13]. The TME of NSCLC contains one of the highest TAM densities among human cancers [14]. Several studies have reported associations of their presence with patient outcomes [15]. A higher M1-like phenotype content in NSCLC has been linked to prolonged survival of patients, whereas M2-polarization of macrophages has been associated with adverse patient outcomes [16–18].

MiRNAs, a class of small non-coding RNAs, suppress gene expression at the post-transcriptional level [19], acting either as oncomirs or as tumor suppressors depending on the tumor type [19], and a variety of studies have demonstrated that miRNAs may represent potential biomarkers in NSCLC patients treated with platinum-based chemotherapy [20,21]. MiRNAs have been reported to regulate immune system development and function, and deregulated expression of several of these miRNAs can lead to hematological cancers [22]. Furthermore, miRNAs are central mediators of the crosstalk between tumor cells and the immune system [23]; and they have been reported to participate in the regulation of macrophage production and reprogramming, and to modulate their polarization [10,24,25].

The miRNAs let-7c, miR-26a and miR-202 have been found to induce macrophage polarization towards the M2-like phenotype [25–27]. Tumor-originated miR-30d was shown to increase the expression and secretion of IL-10 that promotes M2-like phenotype polarization [28]. On the contrary, miR-98 targets IL-10 and suppresses M2-like phenotype polarization [25]. Finally, in experimental models of colorectal cancer, miR-195 has been proposed to inhibit M2-like phenotype polarization and to restrict tumor growth [29].

Tissue-based analyses cannot capture the dynamic nature of the tumor–host interactions, in contrast to circulating markers, which may conclude the systemic response to the tumor, providing, in parallel, the opportunity for repeated monitoring. In the current study, we hypothesized that the expression levels of the aforementioned let-7c, miR-26a, miR-30d, miR-98, miR-195 and miR-202, when assessed in the plasma, may predict clinical outcomes in NSCLC patients treated with first-line platinum-based chemotherapy.

2. Materials and Methods

2.1. Patients' Characteristics

In the current analysis, patients with advanced (not amenable to radical loco-regional treatment) or metastatic NSCLC, treated with first-line platinum-based chemotherapy at the Department of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, Crete, Greece, from 2009 to 2017, with available plasma samples, obtained prior to the initiation of first-line chemotherapy, were retrieved (N = 195). Patients with plasma samples that changed color towards pink/red, suggesting that the samples were hemolyzed, were

volunteers (Mann–Whitney test, $p = 0.272$) (Figure S1). Acceptable mean cycle threshold (Ct) ranges were for U6 snRNA, $30 < \text{Ct U6} < 33$, and for cel-miR-39, $20 < \text{Ct cel-miR-39} < 22$. Samples with mean Ct values outside of these ranges were excluded from the analysis ($N = 14$ for U6 snRNA and $N = 9$ for cel-miR-39). The fold changes in target miRNAs relative to their expression in healthy volunteers were determined by the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method [31]. Median Ct values, SD and median miRNA expression values for both patients and healthy volunteers are depicted in Table S2.

2.6. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed via SPSS software package version 22.0 (statistical package of the social sciences, SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Normality tests (Kolmogorov–Smirnov and Shapiro–Wilk test) revealed that the miRNAs relative expression values do not follow a normal distribution ($p < 0.05$). Each patient was categorized as having high or low expression according to the median value of each miRNA. More specifically, miRNA expression values higher than or equal to median values characterized patients as “high expression,” whereas those with expression values lower than the median values were characterized as “low expression.” The correlation between miRNA expression and clinicopathological characteristics was assessed by chi-squared test. The association of miRNA expression levels with disease stabilization rates (PR (partial response) or SD (stable disease) vs. PD (progressive disease)) was examined using chi-square test and the probability of developing disease progression as the best response to treatment was evaluated by applying binary logistic regression. Plasma miRNA expression levels and their correlations with PFS and OS were assessed via Kaplan–Meier method, log rank test (Mantel–Cox) and the Cox proportional hazard regression models. Multivariate Cox regression analysis was composed of parameters that had achieved statistical significance in the univariate analysis. PFS and OS were estimated from the start of first-line treatment until the date of the first documented instance disease progression and death, respectively. If a patient had not progressed or was alive at the time of data analysis, he/she was censored at the time of the last follow-up. Statistical significance was set to $p < 0.05$ (two-sided test). This report was written based on the Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK) criteria [32].

2.7. KM Plotter Analysis

After an extensive literature review, we identified candidate miRNAs with reported roles in macrophage polarization in tumors and/or inflammation (Table S3). We then employed KM plotter database, an online tool (<http://kmplot.com/analysis/>, accessed on 17 March 2020), to assess the correlations between the expression of these miRNAs and overall survival in lung cancer, and to draw preliminary conclusions regarding the roles of the miRNAs in prognoses for NSCLC. KM plotter utilizes genome-wide microarray datasets that have been published over the years, and integrates a large-scale database comprising gene expression information and clinical outcome parameters of various types of cancer, suitable for the in-silico validation of biomarker candidates [33]. KM plotter analysis was performed to acquire KM survival plots, and the hazard ratios (HR), 95% confidence intervals (CI) and log-rank p -values were determined. When the p -value was < 0.05 , the difference was regarded as statistically significant. Let-7c, miR-26a, miR-30d, miR-98, miR-195 and miR-202 were selected based on their suggested prognostic value according to the KM plotter analysis (Figure S6), and the limited, or no, data regarding their prognostic roles as circulating biomarkers in NSCLC.

3. Results

3.1. Patients' Characteristics and Study Design

Patients' characteristics are depicted in Table 1, and the flow of the study is depicted in Figure 1. The median age was 65 years (range: 37–88); 86.4% of the patients were male;

68% of the patients had non-SqCC histologic type; 26.4% of the patients experienced PR, 39.2% SD and 34.4% PD.

Table 1. Patients' clinicopathological characteristics.

Characteristic	All Patients		SqCC		Non-SqCC		p value
	N	%	N	%	N	%	
Number of patients	125		40	32.0	85	68.0	
	Gender						0.008 ^a
Male	108	86.4	40	100.0	68	63.0	
Female	17	13.6	0	0.0	17	37.0	
	Age (years)						0.339 ^a
median (range)	65 (37–88)		66.5 (46–88)		63.2 (37–82)		
	ECOG PS						0.354 ^a
0	31	24.8	11	27.5	20	23.5	
1	77	61.6	22	55.0	55	64.7	
2	13	10.4	7	17.5	6	7.1	
3	4	3.2	0	0.0	4	4.7	
	Stage at diagnosis						0.004 ^a
II	1	0.8	1	2.5	0	0.0	
III	4	3.2	4	10	0	0.0	
IV	120	96	35	87.5	85	100.0	
	Histology						Ns ^a
Adenocarcinoma	77	61.6					
Squamous	40	32.0					
Others	8	6.4					
	Number of metastatic sites						0.073 ^a
0	15	12	6	15.0	9	10.6	
1	50	40	21	52.5	29	34.12	
2	33	26.4	9	22.5	24	28.23	
≥3	27	21.6	4	10.0	23	27.05	
	Chemotherapy regimens						<0.001 ^a
CDDP/TXT	46	36.8	19	47.5	27	31.76	
CDDP/GEM	33	26.4	20	50.0	13	15.3	
CDDP/PEM	44	35.2	1	2.5	43	50.59	
CDDP/other	2	1.6			2	2.35	
	Response						0.715 ^a
PR	33	26.4	13	32.5	20	23.53	
SD	49	39.2	14	35.0	35	41.17	
PD	43	34.4	13	32.5	30	35.3	

SqCC, squamous cell carcinoma; non-SqCC, non-squamous cell carcinoma; ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; CDDP, cis-diamminedichloridoplatinum; TXT, taxotere; GEM, gemcitabine; PEM, pemetrexed; PR, partial response; SD, stable disease; PD, progressive disease; ns, non-significant; ^a Pearson's chi-squared test for comparison between patients with SqCC and non-SqCC. Response to treatment was assessed according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST 1.1 criteria) [30]; number of metastatic sites depicts the number of affected organs.

3.2. miRNA Expression and Clinicopathological Characteristics

Out of patients with ≥3 metastatic sites, 69.8% had low miR-26a expression, in contrast to 30.4% of patients with high expression (Mann–Whitney U test, $p = 0.030$) (Figure S2). Additionally, 77.8% of patients with low miR-26a developed brain metastases, compared to 22.2% of patients with high miR-26a expression (Mann–Whitney test, $p = 0.008$) (Figure S2). Finally, 21.1% of patients with high and 78.9% of patients with low let-7c expression developed bone metastases (chi-square test, $p = 0.015$). No other correlations were observed when comparing miRNA expression with patients' clinicopathological characteristics.

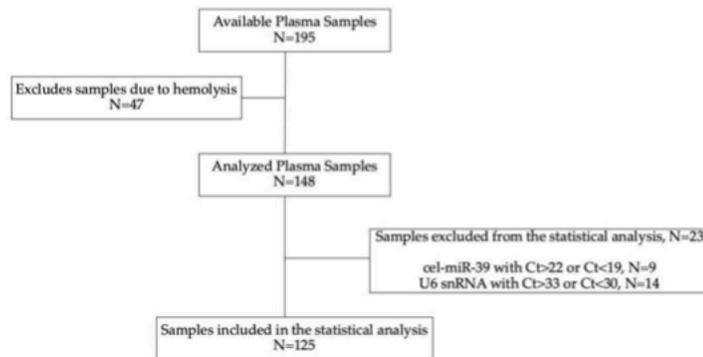


Figure 1. Flow of the study, schematic illustration.

3.3. miRNA Expression and Their Effect on Response to Treatment

Univariate binary logistic regression ($N = 125$) analysis revealed that only high miR-202 expression (HR: 2.335, 95% CI: 1.038–5.254; $p = 0.040$) was correlated with the probability of developing progressive disease as the response to chemotherapy (Table 2). Specifically, out of patients with high miR-202 expression, 64.9% developed PD, compared to 35.1% of patients with low miR-202 (chi-square test, $p = 0.030$). However, multivariate binary logistic regression analysis for responses was not feasible due to the lack of other statistically significant factors.

Table 2. Binary logistic regression analysis depicting the odds ratios of the study parameters based on the probability of developing progressive disease as a response to platinum-based chemotherapy in NSCLC patients ($N = 125$).

Binary Logistic Regression	Univariate Analysis	
	OR (95% CI)	p Value
Age (<65 vs. ≥ 65)	1.130 (0.537–2.379)	0.747
Gender (male vs. female)	1.460 (0.513–4.158)	0.477
ECOG PS (≥ 2 vs. 0–1)	1.460 (0.513–4.158)	0.477
Stage at Diagnosis (IV vs. <IV)	1.333 (0.214–8.304)	0.757
Histology (SqCC vs. non-SqCC)	1.620 (0.306–8.583)	0.571
No. of Metastatic Sites (≥ 3 vs. 0–2)	2.209 (0.925–5.277)	0.074
Brain Metastases	1.014 (0.352–2.924)	0.979
Liver Metastases	1.877 (0.801–4.399)	0.144
Bone Metastases	1.289 (0.587–2.829)	0.527
let-7c (high vs. low)	1.201 (0.552–2.615)	0.644
miR-26a (high vs. low)	1.026 (0.476–2.211)	0.947
miR-30d (high vs. low)	1.422 (0.662–3.056)	0.366
miR-98 (high vs. low)	1.071 (0.445–2.577)	0.878
miR-195 (high vs. low)	1.047 (0.480–2.284)	0.908
miR-202 (high vs. low)	2.335 (1.038–5.254)	0.040 *

HR, hazard ratio; CI, confidence intervals; ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; patients were classified into high or low expression groups according to the median value of each miRNA; Cox regression, * $p < 0.05$.

3.4. miRNA Expression and Association with Survival Outcomes

The median PFS was 5.13 months (range: 0.27–102.0 months) and the median OS was 10.20 months (range: 0.90–102.0 months) in the whole group of patients ($N = 125$). Patients with high miR-202 expression had shorter PFS and shorter OS (4.4 vs. 6.17 months,

$p = 0.041$; and 7.87 vs. 13.53 months, $p = 0.022$) (Figure 2A,B, respectively). The expression levels of the remaining miRNAs were not associated with either PFS or OS (Figure S3).

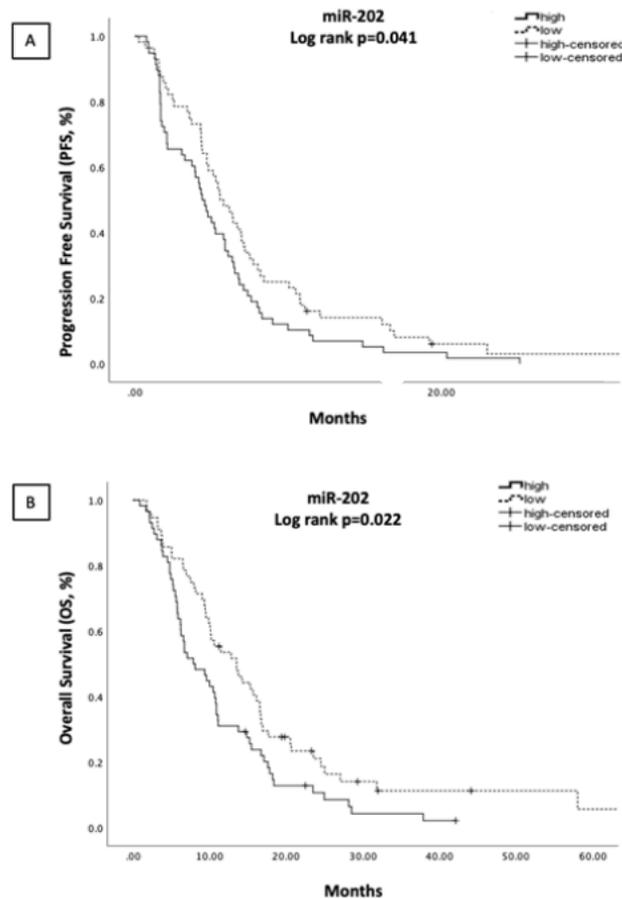


Figure 2. Kaplan-Meier analysis for PFS (A) and OS (B) according to miR-202 expression levels in the plasma of NSCLC patients (N = 125). Median expression values classified patients into high and low expression groups. Curves were compared using the log rank test. p values are shown.

Univariate cox regression analysis (N = 125) revealed that high miR-202 was associated with shorter PFS (HR: 1.455, 95% CI: 1.000–2.118; $p = 0.048$) (Table 3) and shorter OS (HR: 1.596, 95% CI: 1.074–2.292; $p = 0.020$) (Table 4). Other factors associated with shorter PFS were male gender (HR: 1.831, 95% CI: 1.089–3.078; $p = 0.023$), the presence of ≥ 3 metastatic sites (HR: 2.014, 95% CI: 1.301–3.118; $p = 0.002$) and the presence of liver metastases (HR: 2.192, 95% CI: 1.413–3.402; $p < 0.001$) (Table 3). $PS \geq 2$ (HR: 2.289, 95% CI: 1.353–3.871; $p = 0.002$), the presence of ≥ 3 metastatic sites (HR: 1.589, 95% CI: 1.028–2.456; $p = 0.037$) and the presence liver metastases (HR: 1.826, 95% CI: 1.190–2.802; $p = 0.006$) were associated with shorter OS (Table 4).

Table 3. Univariate and multivariate Cox regression analysis for progression-free survival (PFS) in NSCLC patients (N = 125).

Univariate Analysis		
Cox Regression	HR (95% CI)	p Value
Age (<65 vs. ≥65)	1.179 (0.824–1.688)	0.368
Gender (male vs. female)	1.831 (1.089–3.078)	0.023 *
ECOG PS (≥2 vs. 0–1)	1.210 (0.724–2.025)	0.467
Stage at Diagnosis (IV vs. <IV)	1.069 (0.435–2.625)	0.884
Histology (SqCC vs. non-SqCC)	1.223 (0.826–1.812)	0.315
No. of Metastatic Sites (≥3 vs. 0–2)	2.014 (1.301–3.118)	0.002 *
Brain Metastases (yes vs. no)	1.226 (0.742–2.028)	0.426
Liver Metastases (yes vs. no)	2.192 (1.413–3.402)	<0.001 *
Bone Metastases (yes vs. no)	1.168 (0.796–1.713)	0.428
let-7c (high vs. low)	1.206 (0.830–1.752)	0.327
miR-26a (high vs. low)	1.110 (0.765–1.610)	0.584
miR-30d (high vs. low)	1.113 (0.769–1.610)	0.571
miR-98 (high vs. low)	1.086 (0.718–1.641)	0.696
miR-195 (high vs. low)	1.086 (0.751–1.571)	0.662
miR-202 (high vs. low)	1.455 (1.000–2.118)	0.048 *
Multivariate Analysis		
Cox Regression	HR (95% CI)	p Value
Gender (male vs. female)	2.232 (1.262–3.946)	0.006 *
No. of Metastatic Sites (≥3 vs. 0–2)	1.537 (0.924–2.556)	0.097
Liver Metastases (yes vs. no)	1.877 (1.139–3.094)	0.014 *
miR-202 (high vs. low)	1.564 (1.068–2.289)	0.021 *

HR, hazard ratio; CI, confidence intervals; ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; patients were classified into high and low expression groups according to the median value of each miRNA; Cox regression, * $p < 0.05$.

Table 4. Univariate and multivariate Cox regression analysis for overall survival (OS) in NSCLC patients (N = 125).

Univariate Analysis		
Cox Regression	HR (95% CI)	p Value
Age (<65 vs. ≥65)	1.214 (0.846–1.742)	0.292
Gender (male vs. female)	1.546 (0.933–2.622)	0.090
ECOG PS (≥2 vs. 0–1)	2.289 (1.353–3.871)	0.002 *
Stage at Diagnosis (IV vs. <IV)	1.542 (0.627–3.793)	0.346
Histology (SqCC vs. non-SqCC)	1.262 (0.850–1.874)	0.249
No. of Metastatic Sites (≥3 vs. 0–2)	1.589 (1.028–2.456)	0.037 *
Brain Metastases (yes vs. no)	1.082 (0.653–1.793)	0.759
Liver Metastases (yes vs. no)	1.826 (1.190–2.802)	0.006 *
Bone Metastases (yes vs. no)	1.416 (0.965–2.078)	0.075
let-7c (high vs. low)	1.050 (0.724–1.524)	0.797
miR-26a (high vs. low)	1.329 (0.907–1.946)	0.145
miR-30d (high vs. low)	1.251 (0.865–1.809)	0.235
miR-98 (high vs. low)	1.101 (0.725–1.673)	0.651
miR-195 (high vs. low)	1.307 (0.894–1.911)	0.167
miR-202 (high vs. low)	1.596 (1.074–2.292)	0.020 *
Multivariate Analysis		
Cox Regression	HR (95% CI)	p Value
ECOG PS (≥2 vs. 0–1)	2.065 (1.215–3.581)	0.008 *
No. of Metastatic Sites (≥3 vs. 0–2)	1.230 (0.751–2.016)	0.410
Liver Metastases (yes vs. no)	1.666 (1.033–2.687)	0.036 *
miR-202 (high vs. low)	1.558 (1.060–2.291)	0.024 *

HR, hazard ratio; CI, confidence intervals; ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; patients were classified into high and low expression groups according to the median value of each miRNA; Cox regression, * $p < 0.05$.

In multivariate cox regression analysis (N = 125), high miR-202 expression emerged as an independent prognostic factor for both worse PFS and worse OS (HR: 1.564, 95% CI: 1.068–2.289, $p = 0.021$, Table 3; and HR: 1.558, 95% CI: 1.060–2.291, $p = 0.024$, Table 4). Male gender (HR: 2.232, 95% CI: 1.262–3.946; $p = 0.006$) and liver metastasis (HR: 1.877, 95% CI: 1.139–3.094; $p = 0.014$) were independent predictors for poor PFS, (Table 3), whereas

PS ≥ 2 (HR: 2.065, 95%CI: 1.215–3.581; $p = 0.008$) and liver metastases (HR: 1.666, 95% CI: 1.033–2.687; $p = 0.036$) independently predicted poor OS (Table 4).

3.5. Correlations of Clinicopathological Characteristics and miRNA Expression with Patient Outcomes According to Histologic Subtype

Patients were classified into the SqCC (N = 40) and non-SqCC (N = 85) subgroups based on their histologic subtypes. The characteristics for each group of patients are summarized in Table 1. No association was observed between miRNA expression levels and histologic subtype. In addition, there was no statistically significant correlation of miRNA expression with response to treatment based on the histologic subgroup.

In the SqCC subgroup, no correlations were found regarding miRNA expression and clinicopathological characteristics. Moreover, no associations were revealed between miRNA expressions and PFS. Patients with high miR-26a had shorter OS compared to patients with low expression (10.07 vs. 13.53 months, $p = 0.033$) (Figure 3) and in Univariate Cox regression analysis (N = 40), high miR-26a expression ($p = 0.047$) was correlated with poor OS, along with PS ≥ 2 ($p = 0.048$) (Table S4). However, none of the aforementioned factors was revealed to be independent in multivariate Cox regression analysis (Table S4).

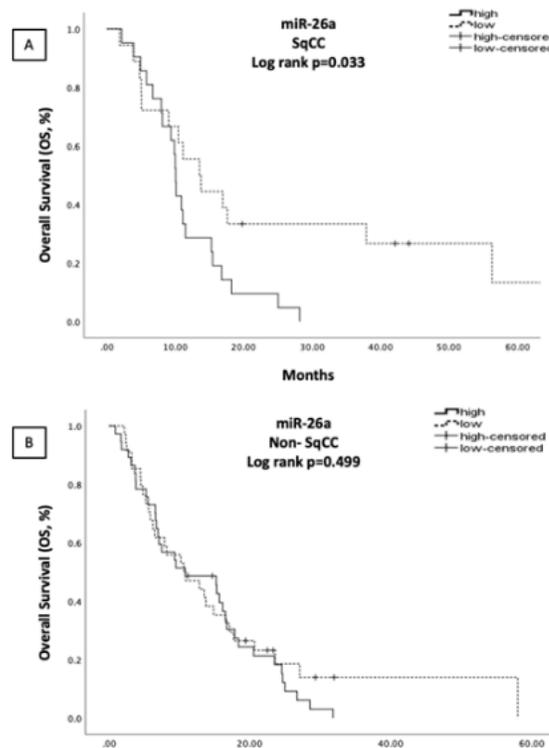


Figure 3. Kaplan–Meier analysis for OS based on miR-26a expression levels in the plasma of SqCC (A, N = 40) and non-SqCC (B, N = 85) NSCLC patients. Median expression values classified patients into high and low expression groups. Curves were compared using the log rank test; p -values are shown.

In the non-SqCC subgroup, low miR-26 was associated with the presence of brain metastases (78.6% vs. 21.4%, low vs. high, respectively; $p = 0.011$). No other correlations were observed when comparing miRNA expression and clinicopathological characteristics in this patient subset. Patients with high miR-202 expression had shorter median PFS and OS compared to those with low miR-202 expression (4.17 vs. 5.80 months, $p = 0.050$; and 6.27 vs. 15.30 months, $p = 0.012$) (Figure 4A,B, respectively). The remaining miRNAs had no statistically significant associations with survival measures (Figure S4 and S5). High miR-202 expression (HR: 1.989, 95% CI: 1.196–3.309; $p = 0.008$), however, emerged as the only independent prognostic factor for worse OS in the non-SqCC subgroup (Table S5).

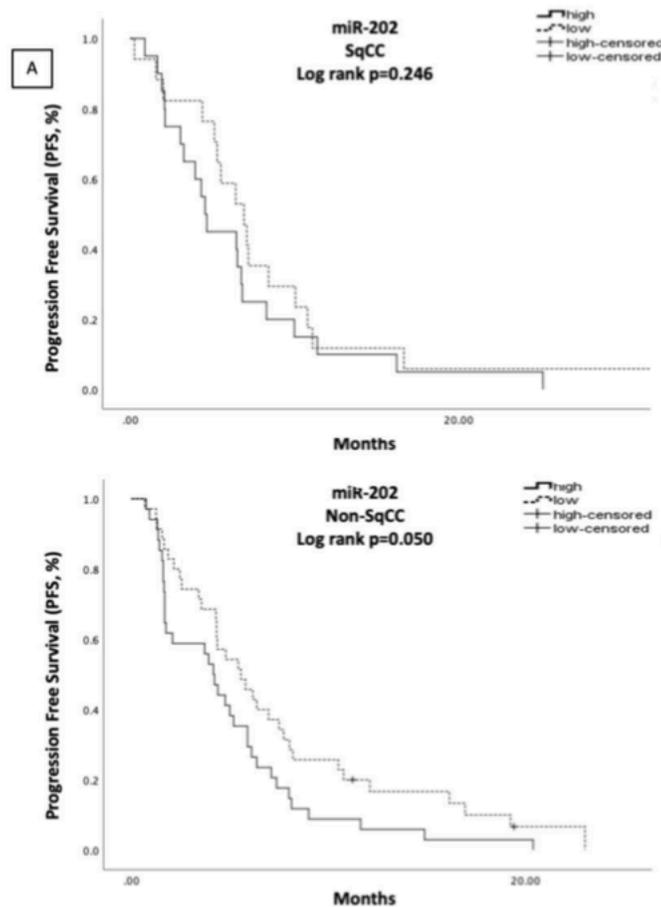


Figure 4. Cont.

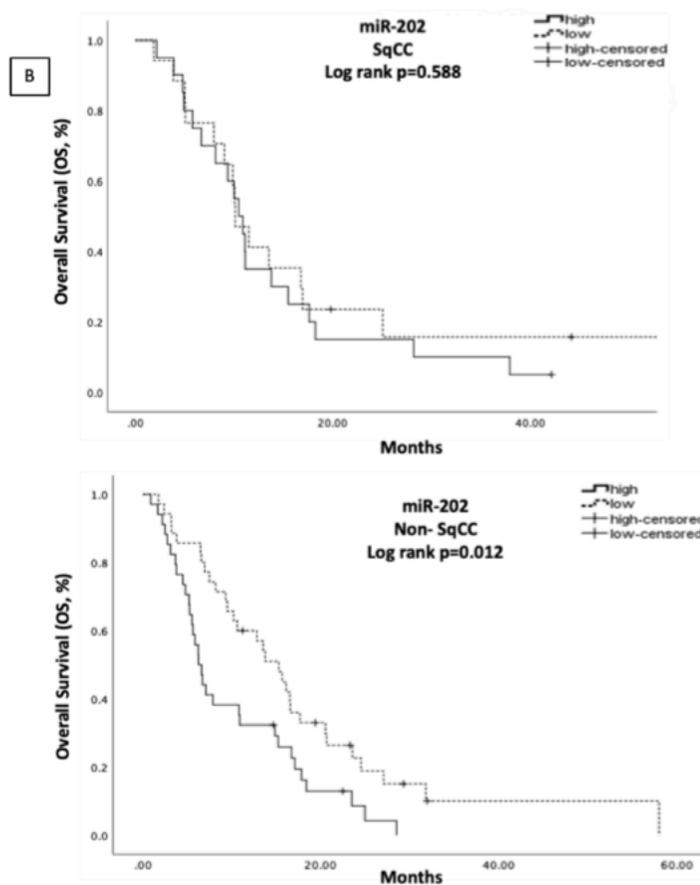


Figure 4. Kaplan–Meier analysis for PFS (A) and OS (B) according to miR-202 expression levels in the plasma of SqCC (N = 40) and non-SqCC (N = 85) NSCLC patients. Median expression values classified patients into high and low expression groups. Curves were compared using the log rank test. *p* values are shown.

4. Discussion

Circulating miRNAs have been recognized as potential prognostic biomarkers in cancer patients [34]. In the present study, the expression levels of let-7c, miR-26a, miR-30d, miR-98, miR-195 and miR-202 were assessed in the plasma of NSCLC patients treated with first-line platinum-based chemotherapy and evaluated regarding clinical outcomes. These miRNAs were selected according to their reported roles in macrophage polarization [25–29]. Collectively, in our results, high miR-202 expression was associated with disease progression. Moreover, high miR-202 was revealed as an independent prognostic factor for shorter PFS and OS in the whole group of patients, and in the non-SqCC subgroup. In the SqCC subgroup, only high miR-26a expression was correlated with shorter OS.

MiR-202 has been implicated in the regulation of the macrophage response to bacterial infection [35–37]. Furthermore, miR-202 has been reported to inhibit the immune suppres-

sor signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) [38], whose activation in the TME has been associated with M2-like phenotype and poor patient prognosis [39]. MiR-202 belongs to the let-7 family and has been identified as a tumor suppressor in many cancer types, including NSCLC [38,40–42], where it has been also reported to enhance cisplatin efficacy through Ras/MAPK targeting [43]. Reduced miR-202 expression levels have been demonstrated in lung cancer tissues [38,42]; low miR-202 expression levels are associated with tumor stage and lymph node metastasis [38].

In contrast to the reported tumor-suppressing activity of miR-202 in lung cancer, our results, for the first time, report that high plasma miR-202 expression independently predicted shorter survival in the whole group of patients and in the non-SqCC subgroup. In general, there is limited evidence regarding the associations of circulating miR-202 with clinical outcomes in cancer patients. In accordance with our results, circulating miR-202 expression was increased in breast cancer patients compared to healthy individuals [44] and was associated with tumor aggressiveness and shorter survival [45]. Our data also imply that circulating miR-202 may have differential prognostic implications in relation to the NSCLC histologic subtype. Interestingly, miR-202 was included in a 6-miRNA signature derived from lung tissue samples that were differentially expressed between lung adenocarcinoma and squamous carcinoma [46].

Contrary to our results, in KM plotter analysis, low tissue miR-202 expression was associated with poor survival in both SqCC and non-SqCC NSCLC (Figure S6). The inconsistency between our results and the results from KM plotter analysis could be related to the different types of samples tested (plasma versus tissue) and/or the different disease stages of patients evaluated. Specifically, KM plotter analysis was conducted using data from NSCLC patients, most of whom had early disease.

MiR-26a promotes M2-like phenotype polarization by repressing a variety of genes related to NF- κ B and MAPK signaling pathways [27]. In hepatocellular carcinoma, miR-26a was shown to suppress the recruitment of macrophages in the TME [47]. MiR-26a promotes the metastatic potential of lung cancer via the modulation of metastasis-related gene expression [48], whereas in other reports, low miR-26a was associated with CDDP resistance in NSCLC cell lines [49].

In our results, high plasma miR-26a expression was associated with shorter survival in the SqCC subgroup only. To the best of our knowledge, there are no reports on the prognostic value of miR-26a in lung cancer. KM plotter analysis (Figure S6) demonstrated that, in contrast to our results in the plasma, low tissue miR-26a expression was associated with shorter OS in both SqCC and non-SqCC NSCLC (Figure S6). In general, contrasting results are reported regarding the role of circulating miRNA-26. In detail, patients with glioblastoma had significantly up-regulated serum miR-26a expression levels compared to controls [50], whereas patients with gastric cancer had decreased plasma and tissue levels compared to controls [51]. In another study, low miR-26a expression in patients with gastric cancer was associated with significantly shorter survival [52].

The biological functions of circulating miRNAs have not been clarified yet; however, they are considered to participate in extracellular cell communication processes regulating biological functions [34]. Both miR-202 and miR-26a are involved in the STAT3 signaling pathway in NSCLC [38,53]. STAT3 is frequently activated in NSCLC, has been linked to macrophage polarization balance [54] and has a pivotal role in driving tumor-promoting inflammation and the evasion of anti-tumor immunity [55]. Thus, STAT3 may provide a link between both miR-202 and miR-26a and NSCLC tumor progression. However, it should be noted here that the origin of circulating miRNAs is debatable. They could be either derived from the tumor, thereby carrying information regarding the place of origin [56], or secreted by blood cells. To further understand their roles, investigations of their associations with their respective tissue-based counterparts and/or the macrophage content or polarization in patient samples should be pursued.

In the present study, pre-analytical and analytical parameters were considered thoroughly, taking into account the variables that could lead to bias in miRNA quantifica-

tion [57,58]. This study is the first to demonstrate that circulating miR-202 and miR-26a may predict treatment outcomes in NSCLC. Limitations of our study include the retrospective, exploratory nature of our analysis, and the small sample size precluding firm statistical correlations. The origins of the analyzed miRNAs were not investigated, and we cannot comment on the prognostic or predictive value of our findings. Finally, the results lack validation in an independent patient cohort.

5. Conclusions

In summary, our results show that the expression levels of miRNAs with reported roles in macrophage polarization, when assessed in the plasma, are associated with survival measures in patients with NSCLC treated with platinum-based chemotherapy. Further studies are necessary to clarify the origins of miR-202 and miR-26a and to confirm their role as circulating biomarkers in NSCLC.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells10081988/s1>. Table S1: Assay ID for each miRNA used in the study. Figure S1: U6 snRNA expression levels between NSCLC patients and healthy donors. Figure S2: Expression of miR-26a associated with (a) the numbers of metastases (metastatic sites > 3 vs. 0–2) and (b) brain metastases (yes vs. no) in NSCLC patients (N = 125) treated with first-line platinum-based chemotherapy. Figure S3: Kaplan–Meier analysis for PFS (left column) and OS (right column) (from top to bottom): miR-26a, let-7c, miR-30d, miR-195 and miR-98, based on the microRNAs' expression levels in the plasma of NSCLC patients (N = 125). Figure S4: Kaplan–Meier analysis for PFS in SqCC (left column) and non-SqCC (right column) (from top to bottom): miR-26a, let-7c, miR-30d, miR-195 and miR-98, based on the microRNAs' expression levels in the plasma of SqCC (N=40) and non-SqCC (N = 85) NSCLC patients. Figure S5: Kaplan–Meier analysis for OS in SqCC (left column) and non-SqCC (right column) (from top to bottom): let-7c, miR-30d, miR-195 and miR-98, based on the microRNAs' expression levels in the plasma of SqCC (N=40) and non-SqCC (N = 85) NSCLC patients. Table S2: Median Ct values, SD and median miRNA expression values in the plasma of NSCLC patients (N = 125) and healthy volunteers (N = 33). Table S3: List of macrophage related miRNAs and their statistical significance in lung cancer based on KM plotter dataset. Table S4: Univariate and multivariate Cox regression analysis for overall survival (OS) in Squamous subtype NSCLC patients (N = 40). Table S5: Univariate and multivariate Cox regression analysis for overall survival (OS) in Non-Squamous subtype NSCLC patients (N = 85). Figure S6: Survival analysis of hsa-let-7c, hsa-miR-26a, hsa-miR-30d, hsa-miR-98, hsa-miR-195 and hsa-miR-202 in (A) adenocarcinoma (N = 513) and (B) lung squamous cell carcinoma (N = 478) (KM plotter dataset).

Author Contributions: Conceptualization, S.A.; methodology, A.M. and C.P.; formal analysis, A.M. and C.P.; investigation, A.M., C.P., K.R. and D.K.; resources, D.M. and S.A.; writing—original draft preparation, A.M., C.P. and S.A.; writing—review and editing, A.M., C.P., K.R., D.K., D.M. and S.A.; visualization, A.M., C.P. and S.A.; supervision C.P., D.M. and S.A.; project administration, A.M., C.P., D.M. and S.A.; funding acquisition, D.M. and S.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Hellenic Society of Medical Oncology (HESMO) and Anti-cancer Research Support Association (ARSA).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics and Scientific Committee of the University General Hospital of Heraklion, Crete, Greece (ID: 13725/8-11-17, Crete, Greece).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data will be available upon request.

Acknowledgments: We are thankful to all patients and volunteers who participated in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript or in the decision to publish the results.

Abbreviations

Abbreviation	Definition
APCs	Antigen-presenting cells
cDNA	Complementary DNA
CDDP	Cis-diamminedichloridplatinum, cisplatin
CI	Confidence intervals
CT	Computed tomography
Ct	Cycle threshold
CTLs	Cytotoxic T lymphocytes
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
Et-OH	Ethanol
GALNT7	N-acetylgalactosaminyltransferase 7
GEM	Gemcitabine
HR	Hazard ratio
MATN2	Matrilin 2
miRNAs	microRNAs
MRI	Magnetic resonance imaging
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
non-SqCC	non-Squamous
OS	Overall survival
PD	Progression disease
PEM	pemetrexed
PFS	Progression free survival
PR	Partial response
PS	Performance status
RT-qPCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction
SD	Stable disease
SqCC	Squamous
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TAMs	Tumor associated macrophages
TME	Tumor microenvironment
TXT	Taxotere

References

- Zhang, C.; Leighl, N.B.; Wu, Y.L.; Zhong, W.Z. Emerging therapies for non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol* **2019**, *12*, 45. [[CrossRef](#)]
- Doroshov, D.B.; Sanmamed, M.F.; Hastings, K.; Politi, K.; Rimm, D.L.; Chen, L.; Melero, I.; Schalper, K.A.; Herbst, R.S. Immunotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer: Facts and Hopes. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 4592–4602. [[CrossRef](#)]
- Politi, K.; Herbst, R.S. Lung cancer in the era of precision medicine. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 2213–2220. [[CrossRef](#)]
- Schrank, Z.; Chhabra, G.; Lin, L.; Iderzorig, T.; Osude, C.; Khan, N.; Kuckovic, A.; Singh, S.; Miller, R.J.; Puri, N. Current Molecular-Targeted Therapies in NSCLC and Their Mechanism of Resistance. *Cancers* **2018**, *10*, 224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kyakulaga, A.H.; Aqil, F.; Munagala, R.; Gupta, R.C. Synergistic combinations of paclitaxel and withaferin A against human non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget* **2020**, *11*, 1399–1416. [[CrossRef](#)]
- Papadaki, C.; Monastiriotti, A.; Rounis, K.; Makrakis, D.; Kalbakis, K.; Nikolaou, C.; Mavroudis, D.; Agelaki, S. Circulating MicroRNAs Regulating DNA Damage Response and Responsiveness to Cisplatin in the Prognosis of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer Treated with First-Line Platinum Chemotherapy. *Cancers* **2020**, *12*, 1282. [[CrossRef](#)]
- Siddik, Z.H. Cisplatin Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **2003**, *22*, 7265–7279. [[CrossRef](#)]
- De Biasi, A.R.; Villena-Vargas, J.; Adusumilli, P.S. Cisplatin-induced antitumor immunomodulation: A review of preclinical and clinical evidence. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 5384–5391. [[CrossRef](#)]
- Brambilla, E.; Le Teuff, G.; Marguet, S.; Lantuejoul, S.; Dunant, A.; Graziano, S.; Pirker, R.; Douillard, J.Y.; Le Chevalier, T.; Filipits, M.; et al. Prognostic Effect of Tumor Lymphocytic Infiltration in Resectable Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol* **2016**, *34*, 1223–1230. [[CrossRef](#)]
- Syed, S.N.; Frank, A.C.; Raue, R.; Brune, B. MicroRNA-A Tumor Trojan Horse for Tumor-Associated Macrophages. *Cells* **2019**, *8*, 1482. [[CrossRef](#)]
- Larionova, I.; Cherdynstseva, N.; Liu, T.; Patysheva, M.; Rakina, M.; Kzhyshkowska, J. Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncoimmunology* **2019**, *8*, 1596004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Thielmann, C.M.; Costa da Silva, M.; Muley, T.; Meister, M.; Herpel, E.; Muckenthaler, M.U. Iron accumulation in tumor-associated macrophages marks an improved overall survival in patients with lung adenocarcinoma. *Sci Rep.* **2019**, *9*, 11326. [[CrossRef](#)]
13. Tamminga, M.; Hiltermann, T.J.N.; Schuurin, E.; Timens, W.; Fehrmann, R.S.; Groen, H.J. Immune microenvironment composition in non-small cell lung cancer and its association with survival. *Clin. Transl. Immunol.* **2020**, *9*, e1142. [[CrossRef](#)]
14. Jung, K.Y.; Cho, S.W.; Kim, Y.A.; Kim, D.; Oh, B.C.; Park, D.J.; Park, Y.J. Cancers with Higher Density of Tumor-Associated Macrophages Were Associated with Poor Survival Rates. *J. Pathol. Transl. Med.* **2015**, *49*, 318–324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Remark, R.; Becker, C.; Gomez, J.E.; Damotte, D.; Dieu-Nosjean, M.C.; Sautes-Fridman, C.; Fridman, W.H.; Powell, C.A.; Altorki, N.K.; Merad, M.; et al. The non-small cell lung cancer immune contexture. A major determinant of tumor characteristics and patient outcome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2015**, *191*, 377–390. [[CrossRef](#)]
16. Ma, J.; Liu, L.; Che, G.; Yu, N.; Dai, F.; You, Z. The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC Cancer* **2010**, *10*, 112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ohri, C.M.; Shikotra, A.; Green, R.H.; Waller, D.A.; Bradding, P. Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. *Eur Respir J.* **2009**, *33*, 118–126. [[CrossRef](#)]
18. Zhang, B.C.; Gao, J.; Wang, J.; Rao, Z.G.; Wang, B.C.; Gao, J.F. Tumor-associated macrophages infiltration is associated with peritumoral lymphangiogenesis and poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Med. Oncol.* **2011**, *28*, 1447–1452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Svoronos, A.A.; Engelman, D.M.; Slack, F.J. OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 3666–3670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Chen, B.; Gao, T.; Yuan, W.; Zhao, W.; Wang, T.H.; Wu, J. Prognostic Value of Survival of MicroRNAs Signatures in Non-small Cell Lung Cancer. *J. Cancer* **2019**, *10*, 5793–5804. [[CrossRef](#)]
21. Fadejeva, I.; Olschewski, H.; Hrzenjak, A. MicroRNAs as regulators of cisplatin-resistance in non-small cell lung carcinomas. *Oncotarget* **2017**, *8*, 115754–115773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Mehta, A.; Baltimore, D. MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic. *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16*, 279–294. [[CrossRef](#)]
23. Cho, S.; Tai, J.W.; Lu, L.F. MicroRNAs and Their Targetomes in Tumor-Immune Communication. *Cancers* **2020**, *12*, 2025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Squadrito, M.L.; Etzrodt, M.; De Palma, M.; Pittet, M.J. MicroRNA-mediated control of macrophages and its implications for cancer. *Trends Immunol.* **2013**, *34*, 350–359. [[CrossRef](#)]
25. Xu, S.J.; Hu, H.T.; Li, H.L.; Chang, S. The Role of miRNAs in Immune Cell Development, Immune Cell Activation, and Tumor Immunity: With a Focus on Macrophages and Natural Killer Cells. *Cells* **2019**, *8*, 1140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Banerjee, S.; Xie, N.; Cui, H.; Tan, Z.; Yang, S.; Icyuz, M.; Abraham, E.; Liu, G. MicroRNA let-7c regulates macrophage polarization. *J. Immunol.* **2013**, *190*, 6542–6549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Lu, L.; McCurdy, S.; Huang, S.; Zhu, X.; Peplowska, K.; Tiirikainen, M.; Boisvert, W.A.; Garmire, L.X. Time Series miRNA-mRNA integrated analysis reveals critical miRNAs and targets in macrophage polarization. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 37446. [[CrossRef](#)]
28. Gaziel-Sovran, A.; Segura, M.F.; Di Micco, R.; Collins, M.K.; Hanniford, D.; Vega-Saenz de Miera, E.; Rakus, J.F.; Dankert, J.F.; Shang, S.; Kerbel, R.S.; et al. miR-30b/30d regulation of GalNAc transferases enhances invasion and immunosuppression during metastasis. *Cancer Cell* **2011**, *20*, 104–118. [[CrossRef](#)]
29. Lin, X.; Wang, S.; Sun, M.; Zhang, C.; Wei, C.; Yang, C.; Dou, R.; Liu, Q.; Xiong, B. miR-195-5p/NOTCH2-mediated EMT modulates IL-4 secretion in colorectal cancer to affect M2-like TAM polarization. *J. Hematol. Oncol.* **2019**, *12*, 20. [[CrossRef](#)]
30. Nishino, M.; Jagannathan, J.P.; Ramaiya, N.H.; Van den Abbeele, A.D. Revised RECIST guideline version 1.1: What oncologists want to know and what radiologists need to know. *AJR Am. J. Roentgenol.* **2010**, *195*, 281–289. [[CrossRef](#)]
31. Schmittgen, T.D.; Livak, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1101–1108. [[CrossRef](#)]
32. McShane, L.M.; Altman, D.G.; Sauerbrei, W.; Taube, S.E.; Gion, M.; Clark, G.M. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *J. Natl. Cancer Inst.* **2005**, *97*, 1180–1184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Gyorffy, B.; Surowiak, P.; Budczies, J.; Lanczky, A. Online survival analysis software to assess the prognostic value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e82241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Cui, M.; Wang, H.; Yao, X.; Zhang, D.; Xie, Y.; Cui, R.; Zhang, X. Circulating MicroRNAs in Cancer: Potential and Challenge. *Front. Genet.* **2019**, *10*, 626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Von Both, U.; Berk, M.; Agapow, P.M.; Wright, J.D.; Git, A.; Hamilton, M.S.; Goldgof, G.; Siddiqui, N.; Bellos, E.; Wright, V.J.; et al. Mycobacterium tuberculosis Exploits a Molecular Off Switch of the Immune System for Intracellular Survival. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lin, Y.; Duan, Z.; Xu, F.; Zhang, J.; Shulgina, M.V.; Li, F. Construction and analysis of the transcription factor-microRNA co-regulatory network response to Mycobacterium tuberculosis: A view from the blood. *Am. J. Transl. Res.* **2017**, *9*, 1962–1976.
37. Curtale, G.; Rubino, M.; Locati, M. MicroRNAs as Molecular Switches in Macrophage Activation. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 799. [[CrossRef](#)]
38. Zhao, Z.; Lv, B.; Zhang, L.; Zhao, N.; Lv, Y. miR-202 functions as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer by targeting STAT3. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *16*, 2281–2289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

39. Andersen, M.N.; Etzerodt, A.; Graversen, J.H.; Holthof, L.C.; Moestrup, S.K.; Hokland, M.; Moller, H.J. STAT3 inhibition specifically in human monocytes and macrophages by CD163-targeted corosolic acid-containing liposomes. *Cancer Immunol. Immunother.* **2019**, *68*, 489–502. [[CrossRef](#)]
40. Deng, X.; Hou, C.; Liang, Z.; Wang, H.; Zhu, L.; Xu, H. miR-202 Suppresses Cell Proliferation by Targeting FOXR2 in Endometrial Adenocarcinoma. *Dis. Markers* **2017**, *2017*, 2827435. [[CrossRef](#)]
41. Gao, S.; Cao, C.; Dai, Q.; Chen, J.; Tu, J. miR-202 acts as a potential tumor suppressor in breast cancer. *Oncol. Lett.* **2018**, *16*, 1155–1162. [[CrossRef](#)]
42. Jiang, J.; Huang, J.; Wang, X.R.; Quan, Y.H. MicroRNA-202 induces cell cycle arrest and apoptosis in lung cancer cells through targeting cyclin D1. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2016**, *20*, 2278–2284.
43. Sun, W.; Ping, W.; Tian, Y.; Zou, W.; Liu, J.; Zu, Y. miR-202 Enhances the Anti-Tumor Effect of Cisplatin on Non-Small Cell Lung Cancer by Targeting the Ras/MAPK Pathway. *Cell Physiol. Biochem.* **2018**, *51*, 2160–2171. [[CrossRef](#)]
44. Kim, J.; Park, S.; Hwang, D.; Kim, S.I.; Lee, H. Diagnostic Value of Circulating miR-202 in Early-Stage Breast Cancer in South Korea. *Medicina* **2020**, *56*, 340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Joosse, S.A.; Muller, V.; Steinbach, B.; Pantel, K.; Schwarzenbach, H. Circulating cell-free cancer-testis MAGE-A RNA, BORIS RNA, let-7b and miR-202 in the blood of patients with breast cancer and benign breast diseases. *Br. J. Cancer* **2014**, *111*, 909–917. [[CrossRef](#)]
46. Yanaihara, N.; Caplen, N.; Bowman, E.; Seike, M.; Kumamoto, K.; Yi, M.; Stephens, R.M.; Okamoto, A.; Yokota, J.; Tanaka, T.; et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* **2006**, *9*, 189–198. [[CrossRef](#)]
47. Chai, Z.T.; Zhu, X.D.; Ao, J.Y.; Wang, W.Q.; Gao, D.M.; Kong, J.; Zhang, N.; Zhang, Y.Y.; Ye, B.G.; Ma, D.N.; et al. microRNA-26a suppresses recruitment of macrophages by down-regulating macrophage colony-stimulating factor expression through the PI3K/Akt pathway in hepatocellular carcinoma. *J. Hematol. Oncol.* **2015**, *8*, 56. [[CrossRef](#)]
48. Liu, B.; Wu, X.; Liu, B.; Wang, C.; Liu, Y.; Zhou, Q.; Xu, K. MiR-26a enhances metastasis potential of lung cancer cells via AKT pathway by targeting PTEN. *Biochim Biophys Acta* **2012**, *1822*, 1692–1704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Yang, Y.; Zhang, P.; Zhao, Y.; Yang, J.; Jiang, G.; Fan, J. Decreased MicroRNA-26a expression causes cisplatin resistance in human non-small cell lung cancer. *Cancer Biol. Ther.* **2016**, *17*, 515–525. [[CrossRef](#)]
50. ParvizHamidi, M.; Haddad, G.; Ostadrahimi, S.; Ostadrahimi, N.; Sadeghi, S.; Fayaz, S.; Fard-Esfahani, P. Circulating miR-26a and miR-21 as biomarkers for glioblastoma multiform. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2019**, *66*, 261–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Pacheco Plaza, M.C.; Kessler Nieto, F.; Orts Rodriguez, M.T.; Ruiz de Temino Malo, P. Ultrasonics in endodontics: Mechanism of action. *Rev. Esp Endodencia* **1989**, *7*, 7–12.
52. Qiu, X.; Zhu, H.; Liu, S.; Tao, G.; Jin, J.; Chu, H.; Wang, M.; Tong, N.; Gong, W.; Zhao, Q.; et al. Expression and prognostic value of microRNA-26a and microRNA-148a in gastric cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *32*, 819–827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Song, Q.; Liu, B.; Li, X.; Zhang, Q.; Cao, L.; Xu, M.; Meng, Z.; Wu, X.; Xu, K. MiR-26a-5p potentiates metastasis of human lung cancer cells by regulating ITCbeta8- JAK2/STAT3 axis. *Biochem Biophys Res. Commun.* **2018**, *501*, 494–500. [[CrossRef](#)]
54. Wang, N.; Liang, H.; Zen, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Mohrherr, J.; Uras, I.Z.; Moll, H.P.; Casanova, E. STAT3: Versatile Functions in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers* **2020**, *12*, 1107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Chen, G.; Wang, J.; Cui, Q. Could circulating miRNAs contribute to cancer therapy? *Trends Mol. Med.* **2013**, *19*, 71–73. [[CrossRef](#)]
57. Becker, N.; Lockwood, C.M. Pre-analytical variables in miRNA analysis. *Clin. Biochem.* **2013**, *46*, 861–868. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. McDonald, J.S.; Milosevic, D.; Reddi, H.V.; Grebe, S.K.; Algeciras-Schimnich, A. Analysis of circulating microRNA: Preanalytical and analytical challenges. *Clin. Chem.* **2011**, *57*, 833–840. [[CrossRef](#)]

Article

Plasma-Based microRNA Expression Analysis in Advanced Stage NSCLC Patients Treated with Nivolumab

Alexia Monastiriotti ¹, Chara Papadaki ¹, Despoina Kalapanida ², Konstantinos Rounis ^{1,3,4}, Kleita Michaelidou ¹, Maria A. Papadaki ¹, Dimitrios Mavroudis ^{1,2} and Sofia Agelaki ^{1,2,*}

¹ Laboratory of Translational Oncology, School of Medicine, University of Crete, Vassilika Vouton, 71003 Heraklion, Crete, Greece

² Department of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, Vassilika Vouton, 71110 Heraklion, Crete, Greece

³ Thoracic Oncology Center, Theme Cancer, Karolinska University Hospital, 17164 Stockholm, Sweden

⁴ Department of Oncology-Pathology, Karolinska Institutet, 17164 Stockholm, Sweden

* Correspondence: agelakisofia@gmail.com; Tel.: +30-281-039-2438

Simple Summary: Nivolumab (anti-PD-1 inhibitor) is the first monoclonal antibody approved for the treatment of NSCLC, with research results showing that patients who had received previous lines of therapy had a better response to this treatment and better overall survival. Tissue-level analyses fail to capture the dynamic tumor-host relationship, in contrast to circulating biomarkers, which can reflect the systemic response of the tumor, allowing for repeated sampling and monitoring. In the context of liquid biopsy, microRNAs are studied as biomarkers of immunotherapy efficacy based on their role in regulating antitumor immunity. The present study suggests that miR-200c and miR-34a plasma expression levels have a prognostic role in patients with advanced NSCLC receiving Nivolumab. It further supports that the expression profile of circulating immunomodulatory microRNAs provides information on the survival of patients with advanced NSCLC receiving Nivolumab and could represent promising circulating biomarkers that may provide information about patients' responses to immunotherapy.



Citation: Monastiriotti, A.; Papadaki, C.; Kalapanida, D.; Rounis, K.; Michaelidou, K.; Papadaki, M.A.; Mavroudis, D.; Agelaki, S.

Plasma-Based microRNA Expression Analysis in Advanced Stage NSCLC Patients Treated with Nivolumab. *Cancers* **2022**, *14*, 4739. <https://doi.org/10.3390/cancers14194739>

Academic Editors: Marta Dueñas and Rodrigo Toledo

Received: 12 July 2022

Accepted: 25 September 2022

Published: 28 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Since circulating microRNAs (miRNAs) are involved in the modulation of the immune response, they are tested as liquid biopsy-based biomarkers in patients with NSCLC treated with immunotherapy. We analyzed the expression levels and examined the clinical significance of immunoregulatory miRNAs involved in immune checkpoint regulation (miR-34a, miR-200b, miR-200c), T-cell activity (miR-155), and the function of myeloid-derived suppressive cells (MDSCs) (miR-223) or regulatory T lymphocytes (Tregs) (miR-146a), in patients with advanced NSCLC (N = 69) treated with anti-PD-1 (Nivolumab) immunotherapy as 2nd or 3rd line of treatment therapy. Plasma levels of circulating miRNAs were analyzed by RT-qPCR before the initiation of immunotherapy. Expression of miR-34a, miR-146a, miR-200c, and miR-223 was found to be associated with response to immunotherapy. High miR-200c expression emerged as an independent prognostic factor for inferior overall survival in all patients with NSCLC (OS, HR: 2.243, 95% CI: 1.208–4.163; $p = 0.010$) and in patients with non-Squamous (non-SqCC) subtype (N = 38) (HR: 2.809, 95% CI: 1.116–7.074; $p = 0.028$). Low miR-34a expression independently predicted for shorter OS (HR: 3.189, 95% CI: 1.193–8.527; $p = 0.021$) in the non-SqCC subgroup. Our findings suggest that alterations in circulating miR-200c and miR-34a expression levels are associated with the response and outcome in patients with advanced NSCLC treated with anti-PD1 immunotherapy.

Keywords: circulating miRNAs; miRNAs; NSCLC; immune checkpoint inhibitors; immunotherapy; immune response; survival; Nivolumab; PD-1

1. Introduction

Despite the evolution of therapeutic options, advanced NSCLC remains incurable [1], and approximately only 5% of the patients exceed the 5-year survival rates [2]. The advent of immune checkpoint inhibitors (ICIs) targeting components of the immune system responsible for immune evasion by the tumor cells has led to prolonged progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) [3].

ICIs are monoclonal antibodies that aim the immune system activation by inhibiting several targets that suppress T-cell function and proliferation [4]. Over the years, the FDA has approved a variety of drugs against tumors, including NSCLC, which have exhibited promising results [5]. The first approved ICI for patients with advanced NSCLC was Nivolumab, a human IgG4 anti-PD-1 monoclonal antibody that blocks the interaction of PD-1 with PD-L1/PD-L2 [6]. CheckMate 017 and CheckMate 057 (phase III clinical trials) enrolled heavily pretreated stage III/IV patients with squamous-cell NSCLC and non-squamous-cell NSCLC, exhibiting disease progression during or after platinum-based chemotherapy, respectively. Patients treated with Nivolumab were reported to have longer OS compared to those treated with docetaxel in both studies [5,7]. Furthermore, the survival benefit of Nivolumab lasted over 2 years, regardless of the patient's histology type [8]. Last year, Borghaei et al. published a 5-year follow-up report of these two phase III clinical trials, where "Nivolumab continued to demonstrate survival benefits over docetaxel, by exhibiting an increase in the OS rate" [9].

Despite these significant results, the benefit of immunotherapy is limited to only a subset of patients, while most patients eventually develop resistance to immunotherapy [10]. Therefore, the identification of patients that will have lasting clinical benefits is crucial [10]. Currently, PD-L1 quantification in tumor biopsies is the most widely validated and accepted biomarker in the selection of patients who are more likely to benefit from immunotherapy [11,12]. Also, other predictive factors associated with response to ICIs have been studied, such as high tumor mutational burden, DNA repair defects, and the presence of tumor-specific neo-antigens [11]. Yet, their predictive and prognostic role is still debated [1] because they do not reflect the tumor heterogeneity, as well as the dynamic interactions over time in the tumor microenvironment (TME) [12]. In this regard, characterization of the TME, along with the subsets of immune cells that have infiltrated it, may aid in the identification of factors that are favorable or undesirable for patients [13,14].

Over the past years, there has been an increasing interest in the field of liquid biopsy, and data resulting from studies are pointing to miRNAs as promising biomarkers for immunotherapy efficacy based on their role as regulators of antitumor immune responses [15]. MiRNAs may influence the course of tumor progression since they are central mediators of the interactions between the tumor cells and the immune cells in the TME [16]. Boeri et al., in their study, resulted in a panel of miRNAs that could identify patients with advanced NSCLC with worse response to immunotherapy [1], while Fan et al. identified another panel of miRNAs that could predict patients with better response to immunotherapy treatment [17].

In our study, we hypothesized that circulating miRNAs participating in the regulation of immune checkpoints, Tregs and MDSCs may have prognostic implications as biomarkers in patients with advanced NSCLC treated with second-line anti-PD-1 (Nivolumab). Specifically, miR-34a has been shown to suppress the expression of PD-L1 as a downstream regulator of p53 [18]. MiR-200b and miR-200c (part of the miR-200 family) through the miR-200/ZEB1 axis negatively regulate the EMT process and metastasis by targeting PD-L1 [19]. MiR-146a [20] and miR-155 [21] are critical regulators of Tregs development and suppressive functions, and miR-223 has been found to participate in myeloid cell proliferation and differentiation [22].

2. Materials and Methods

2.1. Patients' Characteristics, Healthy Volunteers, and Blood Sample Collection

Patients with advanced (not amenable to radical loco-regional treatment) or metastatic NSCLC, treated with 2nd- or 3rd-line Nivolumab (recurrence or progression after first-line

chemotherapy) at the Department of Medical Oncology, University General Hospital of Heraklion, Crete, Greece, from 2018 to 2020, were enrolled in the present study. The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics and Scientific Committee of the University General Hospital of Heraklion, Crete, Greece (ID: 13725/8-11-17, Crete, Greece). A total of 82 patients with available plasma samples prior to the initiation of immunotherapy were retrieved (Figure 1). Hemolyzed plasma samples (N = 11) were excluded from the study (Figure 1). Clinical and follow-up data of the patients were collected prospectively.

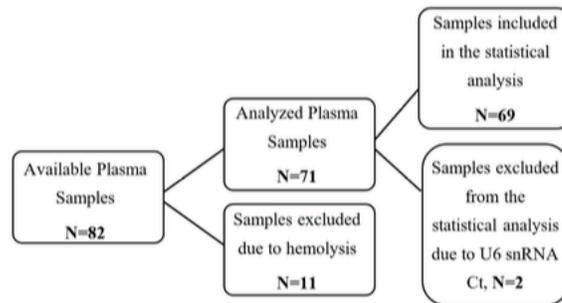


Figure 1. Flow Diagram for study participants treated with Nivolumab monotherapy.

For the normalization of the miRNAs' expression values, blood samples of 33 healthy volunteers were used as a control group. These samples were obtained as part of the volunteer blood donation procedure in the Blood Bank Department of the University General Hospital of Heraklion, Crete, Greece. Healthy volunteers' median age was 63 years, 30 of whom were male and 3 females. All patients and volunteers have signed an informed consent form for their participation in the current research program before their plasma sample collection. Peripheral blood from patients and healthy volunteers was collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes. Plasma was isolated from whole blood by centrifugation and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further use.

2.2. miRNA Expression: RNA Isolation from Plasma Samples & Quantitative Real-Time PCR Analysis

Total RNA was extracted from 400 μL of plasma using Trizol-LS (Ambion, Life Technologies) according to the manufacturer's instructions, and synthetic miRNA from *C. elegans* (Cel-miR-39, Qiagen Inc., Hilden, Germany) was used as an exogenous control to allow for normalization of sample-to-sample variations, as previously described [23]. Chloroform was also added to each sample to allow for aqueous phase separation. The RNA pellet was resuspended in 50 μL RNase-free water, and the samples were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further use in the subsequent real-time qPCR.

Reverse Transcription and RT-qPCR were performed according to the manufacturer's instructions, as previously described [23]. Total RNA was reversed transcribed using TaqMan miRNA Reverse Transcription kit and miRNA-specific stem-loop primers (Table S1: miRNA assay IDs, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The reverse transcription reaction was performed in a final volume of 5 μL , and the complementary DNA (cDNA) was later diluted at 20 μL final volume. The RT-qPCR reaction was carried out on a ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All the assays were performed in triplicates. Appropriate negative controls were used in both cDNA synthesis, and RT-qPCR reactions, where RNA input was replaced by H₂O and no template control was used, respectively [23]. The average expression levels for each miRNA were calculated by the $2^{-\Delta\text{Ct}}$ method relative to the average of U6 snRNA.

U6 snRNA was chosen as a suitable reference gene for normalization due to expression stability and reproducibility among the group of patients and the group of healthy

volunteers (Mann-Whitney test, $p = 0.160$, Figure S1). Acceptable mean cycle threshold (Ct) range were for U6 snRNA: $30 < \text{Ct U6} < 33$ and for cel-miR-39: $20 < \text{Ct cel-miR-39} < 22$. Samples with mean Ct outside of these ranges were excluded from the analysis ($N = 2$ for U6 snRNA and $N = 0$ for cel-miR-39). The fold change in target miRNAs relative to their expression in healthy volunteers was determined using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method [24]. Median Ct values, SD, and median miRNA expression values for both patients and healthy volunteers are depicted in Table S2.

2.3. Assessment of Outcome of Immunotherapy

Computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI) scans were used to assess the patients' responses to treatment based on the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) 1.1 criteria [25]. Based on the response to immunotherapy, patients were characterized as having a partial response (PR), stable disease (SD), or progressive disease (PD). Objective response rate (ORR) included the patients that achieved PR as the best response to therapy, disease control rate (DCR) included the patients that achieved PR or SD as the best response to therapy and prolonged duration of disease control (PDDC) included patients that achieved PR or SD and did not exhibit disease progression for a period of 6 months or longer. Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) were measured from the initiation of 2nd or 3rd line immunotherapy treatment until the first documentation of disease progression (or death) and death, respectively. The date of the last follow-up was used in patients that had no disease progression and were still alive at the time of data analysis.

2.4. Statistical Analysis

SPSS software package version 22.0 (accessed on 20 September 2021; statistical package of the social sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used to implement the statistical analysis. The miRNAs' relative expression values do not follow a normal distribution ($p < 0.05$, Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests). Based on the median value of each miRNA, patients with expression values higher than or equal to the median values were classified as high expression, whereas those with expression values lower than the median values were classified as low expression. The correlation of miRNA expression with clinicopathological characteristics was assessed using the Mann-Whitney and chi-square tests. The association of miRNAs expression levels with PFS and OS was assessed using the Kaplan–Meier method, log-rank test (Mantel–Cox), and Cox proportional hazard regression models. Parameters with statistical significance in the univariate analysis were used to compose the multivariate Cox regression analysis. Statistical significance was set at $p < 0.05$ (two-sided test). This report is written based on the Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK criteria) [26].

3. Results

3.1. Study Design and Patients' Clinicopathological Characteristics

The flow of the present study and the clinicopathological characteristics are summarized in Figure 1 and Table 1, respectively. A total of 69 patients treated with Nivolumab monotherapy as second- or third-line therapy were included in this study and analyzed. The median age was 70.5 years (range: 39–82), 84.1% of the patients were male, and 15.9% were female. Of the total, 55.1% had non-SqCC histologic subtype, and 44.9% had SqCC. Regarding patients' response to immunotherapy treatment, 11.6% experienced PR (partial response), 40.6% SD (stable disease) and 47.8% PD (progressive disease) based on the RECIST 1.1 criteria [25].

Table 1. Clinicopathological Characteristics of Patients.

Characteristic	All Patients		SqCC		Non-SqCC		p Value
	N	%	N	%	N	%	
Number of patients	69		31	44.9	38	55.1	
	Gender						0.009 ^a
Male	58	84.1	30	96.8	28	73.7	
Female	11	15.9	1	3.2	10	26.3	
	Age (years)						0.050 ^a
median (range)	70.5 (39–82)		72 (55–81)		69 (39–82)		
	ECOG PS						0.553 ^a
0	24	34.8	9	29.0	15	39.5	
1	31	44.9	16	51.6	15	39.5	
2	14	20.2	6	19.3	8	21.1	
	Smoking Status						0.052
Current Smoker	42	60.9	15	48.4	27	71.1	
Former Smoker	23	33.3	15	48.4	8	21.1	
Never Smoker	4	5.8	1	3.2	3	7.9	
	Histology						ns ^a
Non-SqCC	38	55.1					
Squamous	31	44.9					
	Number of metastatic sites						0.217 ^a
0	2	2.9	1	3.2	1	2.6	
1	16	23.1	9	29.0	7	18.4	
2	31	44.9	17	54.8	14	36.8	
≥3	20	29.0	4	12.9	16	42.1	
	Line of Immunotherapy Treatment						0.083
2nd line	59	85.5	29	93.5	30	78.9	
3rd line	10	14.5	2	6.5	8	21.1	
	Response						0.454 ^a
PR	8	11.6	2	6.5	6	15.8	
SD	28	40.6	14	45.2	14	36.8	
PD	33	47.8	15	48.4	18	47.4	

ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; PR, partial response; SD, stable disease; PD, progressive disease; ^a Pearson's chi-squared test for comparison between patients with SC and non-SQCC; number of metastatic sites depicts the number of affected organs.

3.2. miRNA Expression and Patients' Clinicopathological Characteristics

The relative expression of miR-34a (Mann-Whitney test; $p < 0.001$), miR-146a (Mann-Whitney test; $p < 0.001$), miR-200b (Mann-Whitney test; $p < 0.001$), miR-200c (Mann-Whitney test; $p < 0.001$) and miR-233 (Mann-Whitney test; $p < 0.001$), were found to be higher in patients with NSCLC (N = 69) compared to healthy volunteers (N = 33) (Figure S2).

Regarding miRNA expression and patients' clinicopathological characteristics, expression of miR-200b and miR-200c was found to be differentially expressed in the histologic subtypes, and both their expression was higher in patients with non-SqCC subtype compared to SqCC (Mann-Whitney test, $p = 0.001$, and $p = 0.019$, respectively, Figure S3A). High expression of miR-200b and miR-200c was correlated with bone metastases in all patients (Mann-Whitney test, $p = 0.002$ and $p = 0.020$, respectively, Figure S3B) and in patients with SqCC subtype (Mann-Whitney test, $p = 0.028$ and $p = 0.019$, respectively, Figure S3B). Additionally, high expression of miR-34a, miR-200b and miR-200c were associated with liver metastases (Mann-Whitney test, $p = 0.042$, $p = 0.018$ and $p = 0.006$, respectively, Figure S3C) in all patients and high miR-200c expression was also associated with liver metastases in patients with non-SqCC subtype (Mann-Whitney test, $p = 0.048$, Figure S3C). Furthermore, higher expression of miR-200b and miR-200c was correlated with the presence of multiple metastatic sites (>3) (Mann-Whitney test, $p = 0.013$ and $p = 0.022$, respectively, Figure S3D). No other correlations were observed comparing miRNA expression with patients' clinicopathological characteristics.

3.3. miRNA Expression and Response to Immunotherapy

Regarding miRNA expression and response to treatment, there was no association in all patients. However, in patients with the SqCC subtype, miR-146a and miR-223 were found to be correlated with PDDC, while in patients with the non-SqCC subtype, miR-34a was correlated with DCR and miR-200c with ORR and PDDC (Table 2). More specifically in the SqCC subgroup, patients with low miR-146a and low miR-223 expressions exhibited shorter duration of disease control (88.9% SD < 6 months/PD vs. 11.1% PR/SD > 6 months, $p = 0.014$ and 88.2% SD < 6 months/PD vs. 11.8% PR/SD > 6 months, $p = 0.026$, respectively, chi-square test).

Additionally, in the non-SqCC subgroup, 75.0% of patients with low miR-34a expression exhibited PD, compared to 25.0% of patients with low miR-34a expression who exhibited PR/SD, while 95.0% of patients with high miR-200c expression exhibited SD/PD, compared to 5.0% of patients with high miR-200c expression who exhibited PR ($p = 0.038$ and $p = 0.049$, respectively, chi-square test). Lastly, patients with high miR-200c expression exhibited shorter duration of disease control (80.0% SD < 6 months/PD vs. 20.0% PR/SD > 6 months, $p = 0.028$, chi-square test). Statistical correlation of miRNAs expression levels and response to immunotherapy exhibited in the following table are depicted as box plots in the supplementary (Figure S4).

3.4. miRNA Expression and Survival Outcomes

In all patients ($N = 69$), the median PFS was 4.0 months (95% CI: 2.180–5.820), and the median OS was 8.0 months (95% CI: 4.758–11.242). There was no correlation between miRNA expression levels and PFS (Figure S5). However, patients with high miR-200c expression had shorter OS (high expression: 5.0 months vs. low expression: 10.0 months, $p = 0.003$, Figure 2). The expression of the remaining miRNAs was not associated with OS (Figure S5).

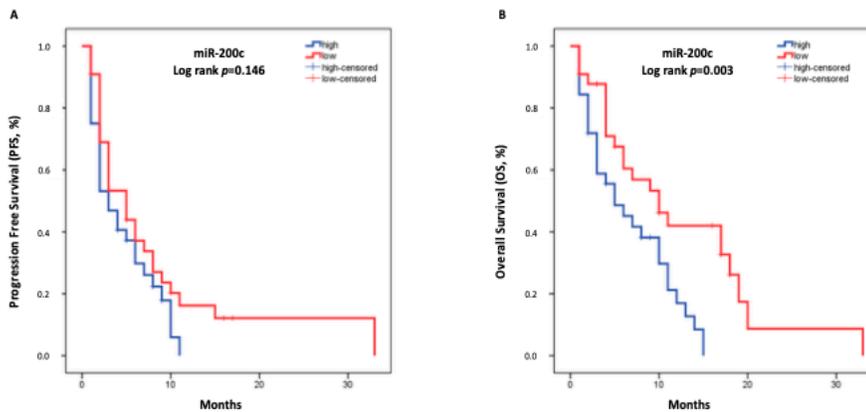


Figure 2. Kaplan–Meier analysis for PFS (A) and OS (B) based on the miR-200c expression levels in the plasma of patients with advanced NSCLC ($N = 69$). Median expression values classified patients into high and low expression groups. Curves were compared using the log-rank test. p -values are shown.

Table 2. miRNAs Correlation and Response to Treatment.

Response		ORR						DCR						PDDC					
Histology		SqCC			Non-SqCC			SqCC			Non-SqCC			SqCC			Non-SqCC		
Expression Levels		PR (%)	SD + PD (%)	p Value	PR (%)	SD + PD (%)	p Value	PR + SD (%)	PD (%)	p Value	PR + SD (%)	PD (%)	p Value	PR + SD > 6 Months (%)	SD < 6 Months + PD (%)	p Value	PR + SD > 6 Months (%)	SD < 6 Months + PD (%)	p Value
miR-34a	High	7.1	92.9	0.708	22.7	77.3	0.180	50.0	50.0	0.578	59.1	40.9	0.038 *	28.6	71.4	0.637	50.0	50.0	0.111
	Low	5.9	94.1		6.2	93.8		47.1	52.9		25.0	75.0		29.4	70.6		25.0	75.0	
miR-146a	High	7.7	92.3	0.671	13.0	87.0	0.444	61.5	38.5	0.189	39.1	60.9	0.299	53.8	46.2	0.014 *	30.4	69.6	0.142
	Low	5.6	94.4		20.0	80.0		38.9	61.1		53.3	46.7		11.1	88.9		53.3	46.7	
miR-155	High	7.1	92.9	0.708	22.7	77.3	0.180	64.3	35.7	0.106	45.5	54.5	0.590	42.9	57.1	0.127	36.4	63.6	0.449
	Low	5.9	94.1		6.2	93.8		35.3	64.7		43.8	56.2		17.6	82.4		43.8	56.2	
miR-200b	High	9.1	90.9	0.591	20.8	79.2	0.264	54.5	45.5	0.447	41.7	58.3	0.435	45.5	54.5	0.140	37.5	62.5	0.505
	Low	5.0	95.0		7.1	92.9		45.0	55.0		50.0	50.0		20.0	80.0		42.9	57.1	
mir-200c	High	8.3	91.7	0.665	5.0	95.0	0.049 *	58.3	41.7	0.413	30.0	70.0	0.106	41.7	58.3	0.263	20.0	80.0	0.028 *
	Low	5.9	94.1		31.2	68.8		47.1	52.9		56.2	43.8		23.5	76.5		56.2	43.8	
miR-223	High	7.1	92.9	0.708	13.6	86.4	0.502	57.1	42.9	0.300	45.5	54.5	0.590	50.0	50.0	0.026 *	36.4	63.6	0.449
	Low	5.9	94.1		18.8	81.2		41.2	58.8		43.8	56.2		11.8	88.2		43.8	56.2	

ORR: Objective Response Rate; DCR: Disease Control Rate; PDDC: Prolonged Duration Disease Control; PR: Partial Response; SD: Stable Disease; PD: Progressive Disease; SqCC: Squamous; Non-SqCC: non-Squamous; Patients classified into high and low expression groups according to the median value of each miRNA; * p < 0.05.

The Cox regression model showed that there were no statistically significant correlations among miRNAs' expression and clinicopathological characteristics with PFS (Table 3).

Table 3. Univariate and Multivariate Cox Regression Analysis for Progression Free Survival (PFS) and Overall Survival (OS) in Patients with Advanced NSCLC (N = 69) Treated with Nivolumab.

Variable	Progression Free Survival (PFS)				Overall Survival (OS)			
	Univariate Analysis		Multivariate Analysis		Univariate Analysis		Multivariate Analysis	
	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value
Age (<60 vs. ≥60)	1.106 (0.558–2.192)	0.773	-	-	1.105 (0.518–2.356)	0.796	-	-
Gender (male vs. female)	1.149 (0.564–2.341)	0.702	-	-	1.361 (0.633–2.929)	0.430	-	-
Smoker (Yes vs. No)	1.679 (0.522–5.403)	0.384	-	-	2.446 (0.589– 10.154)	0.218	-	-
ECOG PS (≥2 vs. 0–1)	1.804 (0.981–3.318)	0.058	-	-	2.295 (1.223–4.305)	0.010 *	1.819 (0.949–3.486)	0.071
Histology (SqCC vs. Non-SqCC)	1.197 (0.712–2.011)	0.497	-	-	1.010 (0.584–1.748)	0.971	-	-
Immunotherapy Line (2nd vs. 3rd)	1.060 (0.534–2.104)	0.868	-	-	1.030 (0.497–2.134)	0.936	-	-
No. of Metastatic Sites (≥3 vs. 0–2)	1.202 (0.679–2.125)	0.528	-	-	1.760 (0.971–3.189)	0.062	-	-
miR-34a (low vs. high)	1.424 (0.848–2.390)	0.181	-	-	1.083 (0.623–1.881)	0.778	-	-
miR-146a (high vs. low)	1.110 (0.662–1.861)	0.693	-	-	1.180 (0.678–2.052)	0.558	-	-
miR-155 (high vs. low)	1.039 (0.616–1.752)	0.885	-	-	1.379 (0.785–2.426)	0.264	-	-
miR-200b (high vs. low)	1.076 (0.642–1.803)	0.781	-	-	1.618 (0.952–2.828)	0.092	-	-
miR-200c (high vs. low)	1.438 (0.838–2.468)	0.187	-	-	2.382 (1.291–4.393)	0.005 *	2.243 (1.208–4.163)	0.010 *
miR-223 (high vs. low)	1.163 (0.693–1.952)	0.568	-	-	1.379 (0.788–2.412)	0.260	-	-

HR, Hazard Ratio; CI, Confidence Intervals; ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; patients classified into high and low expression groups according to the median value of each miRNA; Cox regression, * $p < 0.05$.

Univariate Cox regression analysis (N = 69) revealed that high miR-200c was associated with shorter OS (HR: 2.382, 95% CI: 1.291–4.393; $p = 0.005$) (Table 3). Among the other factors, only PS ≥ 2 was associated with shorter OS (HR: 2.295, 95% CI: 1.223–4.305; $p = 0.010$) (Table 3). In the multivariate Cox regression analysis (N = 69), high miR-200c expression emerged as an independent prognostic factor for worse OS (HR: 2.243, 95% CI: 1.208–4.163; $p = 0.010$; Table 3).

3.5. miRNA Expression and Survival Outcomes in the Histologic Subgroups

As mentioned in Section 3.1, 44.9% of patients had the SqCC histologic subtype (N = 31), 55.1% had the non-SqCC histologic subtype (N = 38), and the characteristics for each group of patients are depicted and summarized in Table 1. In patients with the SqCC subtype, the median PFS was 3.0 months (95% CI: 1.226–4.774), and the median OS was 6.0 months (95% CI: 0.791–11.209). There was no association of miRNAs expression levels with neither PFS nor OS in this subgroup of patients (Figure S6). Through the Univariate Cox regression analysis (N = 31), there was no association with PFS; however, only PS ≥ 2 was associated with shorter OS (HR: 4.267, 95% CI: 1.584–11.494; $p = 0.004$; Table S3).

In patients with the non-SqCC subtype, the median PFS was 5.0 months (95% CI: 1.799–8.201), and the median OS was 9.0 months (95% CI: 5.091–12.909). Low miR-34a

expression was associated with shorter OS (high expression: 11.0 months vs. low expression: 4.0 months, $p = 0.027$, Figure 3A). Additionally, high miR-200c expression was associated with both shorter PFS and OS (high expression: 2.0 months vs. low expression: 8.0 months, $p = 0.019$ and high expression: 3.0 months vs. low expression: 11.0 months, $p = 0.008$, respectively, Figure 3B). There was no other correlation with PFS or OS for the remaining miRNAs in this group of patients (Figure S7).

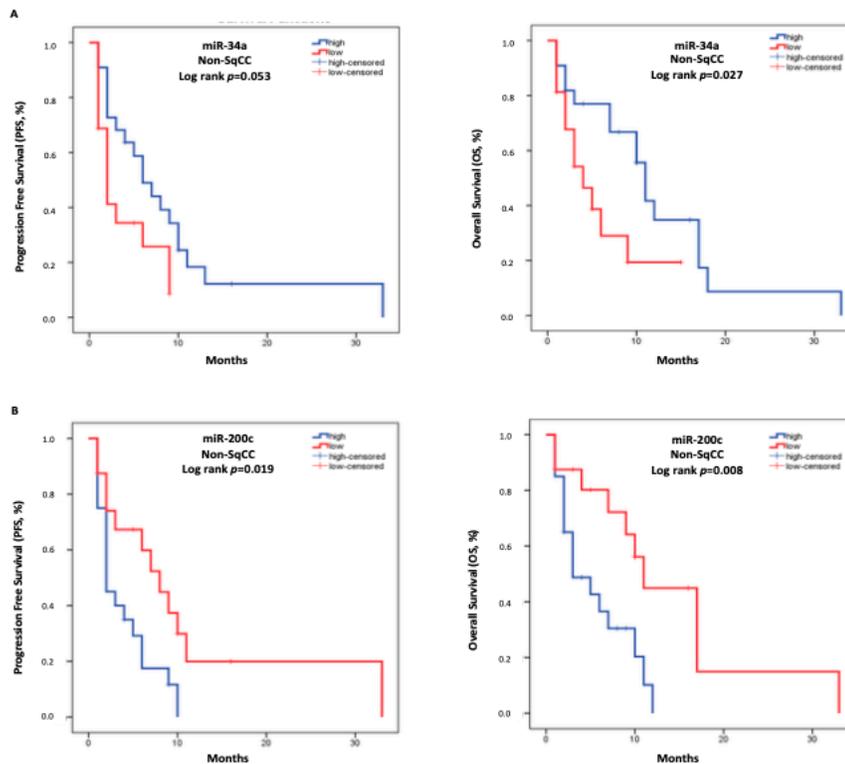


Figure 3. Kaplan–Meier analysis for PFS (Left) and OS (Right) based on the miR-34a (A) and miR-200c (B) expression levels in the plasma of patients with non-SqCC subtype (N = 38). Median expression values classified patients into high and low expression groups. Curves were compared using the log-rank test. p -values are shown.

Through the Univariate Cox Regression analysis (N = 38), high miR-200c expression was associated with shorter PFS (HR: 2.346, 95% CI: 1.053–5.225; $p = 0.037$). However, there were no other statistically significant correlations with PFS (Table 4). In addition, low miR-34a expression and high miR-200c expression were associated with shorter OS (HR: 2.500, 95% CI: 1.050–5.952; $p = 0.038$ and HR: 3.112, 95% CI: 1.247–7.766; $p = 0.015$, respectively; Table 4). In the multivariate Cox regression analysis (N = 38), both low miR-34a expression and high miR-200c expression emerged as independent prognostic factors for worse OS (HR: 3.189, 95% CI: 1.193–8.527; $p = 0.021$ and HR: 2.809, 95% CI: 1.116–7.074; $p = 0.028$, respectively; Table 4).

Table 4. Univariate and Multivariate Cox Regression Analysis for Progression Free Survival (PFS) and Overall Survival (OS) in Patients with non-SqCC Subtype (N = 38) Treated with Nivolumab.

Variable	Progression Free Survival (PFS)				Overall Survival (OS)			
	Univariate Analysis		Multivariate Analysis		Univariate Analysis		Multivariate Analysis	
	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value	HR (95% CI)	p Value
Age (<60 vs. ≥60)	1.247 (0.555–2.806)	0.593	-	-	1.066 (0.444–2.557)	0.886	-	-
Gender (male vs. female)	1.114 (0.498–2.494)	0.792	-	-	1.261 (0.518–3.069)	0.610	-	-
Smoker (Yes vs. No)	2.094 (0.493–8.889)	0.316	-	-	5.059 (0.670– 38.183)	0.116	-	-
ECOG PS (≥2 vs. 0–1)	1.876 (0.813–4.330)	0.141	-	-	1.663 (0.715–3.869)	0.237	-	-
Immunotherapy Line (2nd vs. 3rd)	1.029 (0.456–2.324)	0.945	-	-	1.316 (0.564–3.071)	0.526	-	-
No. of Metastatic Sites (≥3 vs. 0–2)	1.314 (0.636–2.712)	0.461	-	-	1.646 (0.749–3.615)	0.215	-	-
miR-34a (low vs. high)	1.970 (0.918–4.226)	0.082	-	-	2.500 (1.050–5.952)	0.038 *	3.189 (1.193–8.527)	0.021*
miR-146a (high vs. low)	1.286 (0.621–2.664)	0.499	-	-	1.423 (0.622–3.252)	0.403	-	-
miR-155 (high vs. low)	1.203 (0.583–2.482)	0.617	-	-	1.198 (0.543–2.643)	0.655	-	-
miR-200b (high vs. low)	1.061 (0.507–2.221)	0.874	-	-	1.642 (0.712–3.787)	0.245	-	-
miR-200c (high vs. low)	2.346 (1.053–5.226)	0.037*	-	-	3.112 (1.247–7.766)	0.015 *	2.809 (1.116–7.074)	0.028*
miR-223 (high vs. low)	1.245 (0.603–2.567)	0.554	-	-	1.759 (0.753–4.108)	0.192	-	-

HR, Hazard Ratio; CI, Confidence Intervals; ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; patients classified into high and low expression groups according to the median value of each miRNA; Cox regression, * $p < 0.05$.

4. Discussion

MiRNAs expression has been documented to be dysregulated in tumors, forming a particular expression profile, and this dysregulation has been linked to their origin, disease progression, responses to therapy, and survival rates of cancer patients [27]. The original hypothesis of the present study was to examine the role of immune-related miRNAs in the plasma of NSCLC patients treated with Nivolumab. Following a thorough literature review, we concluded by examining miRNAs with a reported role in immune regulation and, more specifically, miRNAs that participate in the regulation of immune checkpoints (miR-34a, miR-200b, miR-200c), T-cell activity (miR-155), Tregs (miR-146a) and the function of myeloid-derived suppressive cells (MDSCs) (miR-223). These miRNAs were chosen based on their already proposed role in cancer immunity and their correlation with survival measures and overall response in cancer patients. The aim of our study was to investigate whether immune-related miRNAs hold any predictive significance when assessed in the plasma of NSCLC patients. MiRNAs are subjected to molecular changes posed by the tumor cells, and as a result, circulating miRNAs could be considered reliable disease monitoring markers [27]. Expression levels of circulating miR-34a, miR-146a, miR-155, miR-200b, miR-200c, and miR-223 were assessed in the plasma of patients with advanced NSCLC treated with second- or third-line anti-PD1 therapy and were correlated with survival outcomes. High miR-200c expression emerged as an independent prognostic factor for poor OS, both in all patients and those with the non-SqCC subtype. Additionally, low miR-34a expression independently predicted worse OS in patients with non-SqCC subtype. Furthermore, in patients with the SqCC subtype, both low miR-146a and miR-223 expressions were

associated with PDDC, whereas in patients with the non-SqCC subtype, high miR-200c expression was correlated with ORR and PDDC, and low miR-34a expression with DCR.

Mir-200c is one of the most studied miRNAs regarding its role in tumor progression. The miR-200 family members (miR-200a, -200b, -200c, -141, -429) directly targets the zinc-finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1), a transcription activator of EMT, resulting in inhibition of metastasis and invasion of tumor cells [19]. Additionally, PD-L1 is a downstream target of the miR-200/ZEB1 axis, known to facilitate immunosuppression in the tumor milieu. PD-L1 expression from tumor cells promotes CD8⁺ TILs exhaustion, thus supporting tumor growth and metastasis [19]. In this context, miR-200c targets the 3' untranslated region (UTR) of PD-L1 and inhibits its expression, along with reversing the CD8⁺ T cells exhaustion. In early-stage NSCLC, low miR-200c expression levels have been associated with higher PD-L1 levels and higher EMT scores, resulting in unfavorable clinical outcomes [19]. However, there has been evidence for its function in tumor angiogenesis [28]. In vitro and functional studies have produced incompatible results regarding whether miR-200c acts as a tumor suppressor or promotes metastasis in different samples and cancer types [29–31].

In our results, high miR-200c expression was strongly associated with worse OS in all patients and, through the multivariate Cox model, independently predicted shorter OS. Additionally, in patients with non-SqCC subtype, high miR-200c expression was correlated with shorter PFS and OS. Through the univariate Cox model, high miR-200c was related to shorter PFS in patients with non-SqCC subtype. Also, through the multivariate Cox model, high miR-200c expression emerged as a negative independent predictor for OS in the non-SqCC subgroup. Moreover, higher miR-200c expression was associated with worse responses to therapy in patients with non-SqCC subtype.

In accordance with our results, miR-200c expression was higher in tumor tissue samples from patients with NSCLC compared to non-tumor samples, and its expression was associated with shorter survival [32,33]. Furthermore, high miR-200c expression in resected NSCLC tissue samples was associated with worse OS in all patients and in patients with the non-SqCC subtype of the cohort's patients [34]. Earlier this year, in ovarian cancer cell lines, higher miR-200c expression was associated with a less tumorigenic microenvironment and inhibited PD-L1 expression [35]. Contrary to these results, another group studying also ovarian cancer found that in tissue samples, overexpression of miR-200c was correlated with a more aggressive tumor [36]. Taken together findings from previous studies and the results of our study, we have come to believe that miR-200c is differentially expressed in the tumor microenvironment and in circulation. Given the heterogeneity of the tumor regarding NSCLC, further studies are essential to understand the role of miR-200c, and mapping its origin might provide a deeper understanding of its functions.

Mir-34a is one of the most studied, highly conserved miRNAs with tumor suppressive functions [37]. MiR-34a expression levels are suggested to be closely linked with multiple components of the immune system and tumor immunity, such as NK cell activity, the polarization of macrophages, differentiation of MDSCs, and T-cell populations' activation and proliferation [38]. Additionally, miR-34a has been found to participate in the regulation of the metabolism of tumor cells and is able to rewire their growth abilities, proliferation, and maintenance [38]. Furthermore, miR-34a negatively regulates the EMT process by targeting a variety of key genes and can possibly reverse this process [38]. Given its tumor suppressive functions, miR-34a is often downregulated in solid tumors. MiR-34a directly targets the 3' UTR region of PD-L1 and suppresses its expression [39]. In NSCLC, low miR-34a expression levels are associated with overexpression of PD-L1 on the cell surface of tumor cells [18]. As part of the p53/miR-34/PD-L1 axis, in NSCLC, low miR-34a expression and high PD-L1 expression have been associated with poor clinical outcomes [18]. In patients with NSCLC with malignant pleural effusion, highly tumorigenic CD44-high cell subsets were presented with low miR-34a expression levels, and miR-34a-mediated expression inhibited CD44-high cell colony formation [40].

In our results, in patients with non-SqCC subtype, low miR-34a expression was correlated with poor PFS and OS and, through the multivariate Cox model, independently predicted worse OS. These findings are supported by previous studies, where high miR-34a expression in the plasma of patients with NSCLC has been correlated with better PFS and OS [41], while in women with triple-negative breast cancer (TNBC), low circulating miR-34a expression was associated with worse OS [42]. Moreover, tissue analysis of surgically resected samples of patients with NSCLC showed that low expression levels of miR-34a were correlated with a higher probability of relapse [43]. Also, in the present study, high miR-34a expression was associated with better responses to anti-PD-1 regimens in patients with non-SqCC subtype, which is supported by our previous work, in which case lower miR-34a expression levels were observed in patients with poor response to second- and third-line immunotherapy [44].

MiR-223, a key regulator of myeloid differentiation, is highly expressed during hematopoiesis and negatively regulates MDSCs [45]. It has also been characterized as a central mediator of the immune response during inflammation by modulating granulocyte differentiation, macrophage polarization, dendritic cell differentiation, T-cell mediated inflammation, and endothelial and epithelial inflammation [46]. MiR-223 has been described as a tumor suppressor in a variety of tumors [47] and has been found to suppress cell growth and proliferation and inhibit colony formation in HeLa cell lines [46]. In the TME, deregulation of miR-223 often leads to MDSCs expansion and activation [45]. In lung cancer, miR-223 was found to be downregulated and participate in cell cycle regulation, while its upregulation *in vitro* resulted in inhibition of tumor cell migration and invasion [48]. D'Antona et al., in their study, validated miR-223 as a reproducible and effective serum biomarker for patients with early NSCLC [49].

In previous studies, miR-223 was found to be downregulated in squamous lung cancer tissues compared to adjacent normal tissues. In *in vitro* experiments of the same study, miR-223 was also found to inhibit proliferation and migration, while in *in vivo* experiments, it suppressed tumor growth [50]. Additionally, circulating levels of miR-223 in patients with osteosarcoma were downregulated, and shorter survival was correlated with low miR-223 expression [51], and in TNBC tissue samples, high miR-223 expression was associated with improved survival measures [52]. The results of our study are supported by these findings. Specifically, we found that in the SqCC subgroup of patients, low miR-223 expression was negatively associated with prolonged disease control, and these patients exhibited disease progression earlier than the patients with high miR-223 expression.

MiR-146a has been characterized as a central regulator of innate immune responses [53], with a distinct role in controlling various biological functions of antigen-presenting cells [54]. More specifically, studies have suggested the role of miR-146a as a mediator of dendritic cell survival and activation and post-inflammatory signaling [55]. In cancer, miR-146a has been implicated in the development and inhibition of tumor progression [56]. In esophageal cancer, miR-146a was downregulated in tumor tissue samples compared to normal tissue, and this was correlated with worse PFS and OS [57]. Similarly, in ovarian cancer, low miR-146a expression was associated with poorer PFS and OS [58].

In NSCLC, miR-146a has been found to act both as an oncomiR and as a tumor suppressor. However, most studies have proposed a tumor suppressive role of miR-146a. MiR-146a is reported to be downregulated in NSCLC cell lines and tissue samples [59] and, as such, has been studied as a potential biomarker for lung cancer detection [60]. Additionally, in tumor samples from patients with NSCLC, low miR-146a expression levels were associated with advanced tumor stage, metastases, and shorter PFS compared to patients with high miR-146a expression [59]. Our results further support these studies. In detail, we found that patients with low miR-146a expression exhibited progressive disease at a shorter period, thus proposing a tumor suppressive role of this miRNA.

In the present study, pre-analytical and analytical parameters were considered thoroughly, considering the variables that could lead to bias in miRNA quantification [61,62]. Presently, studies regarding the correlation of miRNAs with the outcome of NSCLC patients

undergoing immunotherapy treatment are limited. As a result, available data on miRNAs to drive any significant conclusion on their role in response prediction and survival are finite, mostly due to the small size of patients enrolled in those studies and the different techniques [63,64]. On the contrary, results derived from our study are based on a rather large number of patients ($n = 69$). Also, the significance of our study lies in the correlation of the expression profile of immunomodulatory miRNAs with the survival, the response to immunotherapy, and the clinicopathological characteristics of the patients and not as a tool of NSCLC detection in clinical practice. Furthermore, it should also be stressed that the function of the circulating miRNAs in immune response remains unclear as yet, and further investigation is required to unravel their biological function in circulation.

The external validation of our results on heterogeneous and independent datasets is among our future goals to strengthen the significance of our findings for patients with NSCLC treated with anti-PD-1 immunotherapy regimens. Additionally, we aim to enroll more patients in our future goals to further validate the prognostic/predictive role of these miRNAs. One other limitation of the present study is the lack of experimental results from later time points during the therapy of our patients to analyze possible variations of miRNA expression patterns. However, our future goal is to analyze the expression levels of these miRNAs in the mononuclear cells of the peripheral blood (PBMCs) of this cohort of patients, with a view to understanding the origin of the miRNAs, along with investigating the role of these miRNAs in a cohort of patients receiving first-line immunotherapy.

5. Conclusions

MiRNAs are stably expressed in numerous body fluids, yet the association of circulating miRNAs with miRNAs expressed in tissues remains vague. Furthermore, it should also be mentioned that the function of the circulating miRNAs in the modulation of immune response remains unclear as yet, and further investigation is required to unravel their biological function in circulation. Nevertheless, the interpretation of the role of circulating miRNAs as potential biomarkers is of great importance [65]. The tumor-originated alterations of circulating miRNAs in cancer patients represent a promising, non-invasive tool with prognostic implications. These small non-coding RNAs released into the circulation by the tumor carry important information regarding the origin, development, and progression of the tumor, which reflects their prognostic potential [66].

To summarize, our results further support the hypothesis that the expression profile of miRNAs, involved in the regulation of key components of the immune system, is associated with survival measures in patients with advanced NSCLC treated with anti-PD-1 regimens. To achieve a more comprehensive understanding of the regulatory interactions of the immune checkpoints and the immune components, future research should be directed toward the origin of circulating miRNAs. These studies will provide insight and further clarify the significance of liquid biopsy in the treatment of NSCLC.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers14194739/s1>, Table S1: Assay ID for each miRNA used in the study; Figure S1: U6 snRNA expression levels between patients with NSCLC and healthy donors. Mann-Whitney test was used to determine statistically significant differences, and the results were displayed on box plots. The horizontal line depicts the median Ct value, whereas the length of the boxes is the interquartile range that represents values between the 75th and 25th percentiles of individual Ct values. p -values are shown; Table S2: Median Ct values, SD, and median miRNA expression values in the plasma of patients with NSCLC ($N = 72$) and healthy volunteers ($N = 33$); Figure S2: Differential expression of miR-34a, miR-146a, miR-155, miR-200b, miR-200c, and miR-223 in the plasma of NSCLC patients ($N = 69$) treated with Nivolumab compared to healthy donors ($N = 33$); Figure S3: Correlation of miRNAs expression levels and patients' clinicopathological characteristics. Correlation with (A) the histologic subtype, (B) bone metastasis, (C) liver metastasis, and (D) the presence of multiple metastatic sites. Expression levels of miRNAs were assessed by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, and U6 snRNA was used as a reference gene. Statistically significant differences were determined by the Mann-Whitney test, and the results are displayed on box plots. The horizontal line depicts the

median, whereas the length of the boxes is the interquartile range that represents values between the 75th and 25th percentiles of individual fold change expression values. Relative expression values on the y-axis are plotted on a log₁₀ scale. *p*-values are shown; Figure S4: Correlation of miRNAs expression levels and response to immunotherapy, (A) Correlation of miR-146a and PDDC in the SqCC subgroup (B) Correlation of miR-223 and PDDC in the SqCC subgroup, (C) Correlation of miR-34a and DCR in the Non-SqCC subgroup, (D) Correlation of miR-200c and ORR in the Non-SqCC subgroup and (E) Correlation of miR-200c and PDDC in the Non-SqCC subgroup. *p*-values are shown; Figure S5: Kaplan–Meier analysis for PFS (left column) and OS (right column) (A) miR-34a, (B) miR-146a, (C) miR-155, (D) miR-200b and (E) miR-223, based on the microRNA's expression levels in the plasma of patients with NSCLC (N = 69). Median expression values for each microRNA subcategorized patients into high and low expression groups. Curves were compared using the log-rank test. *p*-values are shown; Figure S6: Kaplan–Meier analysis for PFS (left column) and OS (right column) based on the miRNAs' expression levels in the plasma of patients with SqCC subtype (N = 31): (A) miR-34a, (B) miR-146a, (C) miR-155, (D) miR-200b, (E) miR-200c and (F) miR-223. Median expression values for each microRNA subcategorized patients into high and low expression groups. Curves were compared using the log-rank test. *p*-values are shown; Table S3: Univariate and Multivariate Cox regression analysis for Progression Free Survival (PFS) and Overall Survival (OS) in patients with SqCC subtype (N = 31) treated with Nivolumab; Figure S7: Kaplan–Meier analysis for PFS (left column) and OS (right column) based on the miRNAs' expression levels in the plasma of patients with non-SqCC subtype (N = 38): (A) miR-146a, (B) miR-155, (C) miR-200b and (D) miR-223. Median expression values for each microRNA subcategorized patients into high and low expression groups. Curves were compared using the log-rank test. *p*-values are shown.

Author Contributions: Conceptualization, S.A.; methodology, A.M. and C.P.; formal analysis, A.M. and C.P.; investigation, A.M., C.P., D.K., K.R., K.M. and M.A.P.; resources, D.M. and S.A.; writing—original draft preparation, A.M., C.P. and S.A.; writing—review and editing, A.M., C.P., D.K., K.R., K.M., M.A.P., D.M. and S.A.; visualization, A.M., C.P. and S.A.; supervision, C.P., D.M. and S.A.; project administration, A.M., C.P., D.M. and S.A.; funding acquisition, D.M. and S.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research study received a grant from Bristol Myers Squibb International Corporation (BMS) (Study ID: CA209-8NX).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics and Scientific Committee of the University General Hospital of Heraklion, Crete, Greece (ID: 13725/8-11-17, Crete, Greece).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data will be available upon request from the corresponding author.

Acknowledgments: We are thankful to all patients and volunteers who participated in this study. This study was financially supported by Bristol-Myers Squibb (BMS), but the study conduct, including toxicity monitoring, was done by the study team. BMS was not involved in the initial design of the study and in the conduct, collection, management, analysis, and interpretation of the data. BMS or its employees were not involved in the preparation or approval of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Abbreviations

cDNA	Complementary DNA
CI	Confidence intervals
CT	Computed tomography
Ct	Cycle threshold
DCR	Disease Control Rate
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid

EMT	Epithelial to Mesenchymal Transition
HR	Hazard ratio
ICIs	Immune Checkpoint Inhibitors
MDSCs	Myeloid-Derived Suppressor Cells
miRNAs	microRNAs
MRI	Magnetic resonance imaging
NK	Natural killer cells
non-SqCC	non-Squamous
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
ORR	Objective Response Rate
OS	Overall survival
PD	Progression disease
PDDC	Prolonged Duration of Disease Control
PFS	Progression-free survival
PR	Partial response
PS	Performance status
RT-qPCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction
SD	Stable disease
SqCC	Squamous
TILs	Tumor-infiltrating lymphocytes
TME	Tumor microenvironment
TNBC	Triple-negative breast cancer
Tregs	T regulatory cells

References

- Boeri, M.; Milione, M.; Proto, C.; Signorelli, D.; Russo, G.L.; Galeone, C.; Verri, C.; Mensah, M.; Centonze, G.; Martinetti, A.; et al. Circulating miRNAs and PD-L1 Tumor Expression Are Associated with Survival in Advanced NSCLC Patients Treated with Immunotherapy: A Prospective Study. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 2166–2173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Antonia, S.J.; Borghaei, H.; Ramalingam, S.S.; Horn, L.; De Castro Carpeño, J.; Pluzanski, A.; Burgio, M.A.; Garassino, M.; Chow, L.Q.M.; Gettinger, S.; et al. Four-Year Survival with Nivolumab in Patients with Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Pooled Analysis. *Lancet Oncol.* **2019**, *20*, 1395–1408. [[CrossRef](#)]
- Vokes, E.E.; Ready, N.; Felip, E.; Horn, L.; Burgio, M.A.; Antonia, S.J.; Frontera, O.A.; Gettinger, S.; Holgado, E.; Spigel, D.; et al. Nivolumab Versus Docetaxel in Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (CheckMate 017 and CheckMate 057): 3-Year Update and Outcomes in Patients with Liver Metastases. *Ann. Oncol.* **2018**, *29*, 959–965. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Filin, I.Y.; Solovyeva, V.V.; Kitaeva, K.V.; Rutland, C.S.; Rizvanov, A.A. Current Trends in Cancer Immunotherapy. *Biomedicines* **2020**, *8*, 621. [[CrossRef](#)]
- Borghaei, H.; Paz-Ares, L.; Horn, L.; Spigel, D.R.; Steins, M.; Ready, N.E.; Chow, L.Q.; Vokes, E.E.; Felip, E.; Holgado, E.; et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 1627–1639. [[CrossRef](#)]
- Shields, M.D.; Marin-Acevedo, J.A.; Pellini, B. Immunotherapy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Decade of Progress. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* **2021**, *41*, e105–e127. [[CrossRef](#)]
- Brahmer, J.; Reckamp, K.L.; Baas, P.; Crinò, L.; Eberhardt, W.E.E.; Poddubskaya, E.; Antonia, S.; Pluzanski, A.; Vokes, E.E.; Holgado, E.; et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 123–135. [[CrossRef](#)]
- Horn, L.; Spigel, D.R.; Vokes, E.E.; Holgado, E.; Ready, N.; Steins, M.; Poddubskaya, E.; Borghaei, H.; Felip, E.; Paz-Ares, L.; et al. Nivolumab Versus Docetaxel in Previously Treated Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Two-Year Outcomes from Two Randomized, Open-Label, Phase III Trials (CheckMate 017 and CheckMate 057). *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 3924–3933. [[CrossRef](#)]
- Borghaei, H.; Gettinger, S.; Vokes, E.E.; Chow, L.Q.M.; Burgio, M.A.; Carpeno, J.D.C.; Pluzanski, A.; Arrieta, O.; Frontera, O.A.; Chiari, R.; et al. Five-Year Outcomes from the Randomized, Phase III Trials CheckMate 017 and 057: Nivolumab Versus Docetaxel in Previously Treated Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2021**, *39*, 723–733. [[CrossRef](#)]
- Wang, S.; Xie, K.; Liu, T. Cancer Immunotherapies: From Efficacy to Resistance Mechanisms—Not Only Checkpoint Matters. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 690112. [[CrossRef](#)]
- Jamieson, N.; Maker, A.V. Gene-Expression Profiling to Predict Responsiveness to Immunotherapy. *Cancer Gene Ther.* **2016**, *24*, 134–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Spencer, K.R.; Wang, J.; Silk, A.W.; Ganesan, S.; Kaufman, H.L.; Mehnert, J.M. Biomarkers for Immunotherapy: Current Developments and Challenges. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* **2016**, *36*, e493–e503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fridman, W.H.; Pagès, F.; Sautès-Fridman, C.; Galon, J. The Immune Contexture in Human Tumours: Impact on Clinical Outcome. *Nat. Cancer* **2012**, *12*, 298–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Anfossi, S.; Babayan, A.; Pantel, K.; Calin, G.A. Clinical Utility of Circulating Non-Coding Rnas—An Update. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2018**, *15*, 541–563. [[CrossRef](#)]
15. Mihnea, D.; Baoqing, C.; Xiao, F.; George, A.C. Key questions About the Checkpoint Blockade—Are MicroRNAs an Answer? *Cancer Biol. Med.* **2018**, *15*, 103–115. [[CrossRef](#)]
16. Mehta, A.; Baltimore, D. MicroRNAs as Regulatory Elements in Immune System logic. *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16*, 279–294. [[CrossRef](#)]
17. Fan, J.; Yin, Z.; Xu, J.; Wu, F.; Huang, Q.; Yang, L.; Jin, Y.; Yang, G. Circulating MicroRNAs Predict the Response to Anti-PD-1 Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Genomics* **2019**, *112*, 2063–2071. [[CrossRef](#)]
18. Cortez, M.A.; Ivan, C.; Valdecanas, D.; Wang, X.; Peltier, H.J.; Ye, Y.; Araujo, L.; Carbone, D.P.; Shilo, K.; Giri, D.K.; et al. PDL1 Regulation by p53 Via miR-34. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2015**, *108*, djv303. [[CrossRef](#)]
19. Chen, L.; Gibbons, D.L.; Goswami, S.; Cortez, M.A.; Ahn, Y.-H.; Byers, L.A.; Zhang, X.; Yi, X.; Dwyer, D.; Lin, W.; et al. Metastasis is Regulated Via MicroRNA-200/ZEB1 Axis Control of Tumour Cell PD-L1 Expression and Intratumoral Immunosuppression. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5241. [[CrossRef](#)]
20. Lu, L.-F.; Boldin, M.P.; Chaudhry, A.; Lin, L.-L.; Taganov, K.D.; Hanada, T.; Yoshimura, A.; Baltimore, D.; Rudensky, A.Y. Function of miR-146a in Controlling Treg Cell-Mediated Regulation of Th1 Responses. *Cell* **2010**, *142*, 914–929. [[CrossRef](#)]
21. Kohlhaas, S.; Garden, O.A.; Scudamore, C.; Turner, M.; Okkenhaug, K.; Vigorito, E. Cutting Edge: The Foxp3 Target miR-155 Contributes to the Development of Regulatory T Cells. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 2578–2582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. El-Gazzar, M. microRNAs as Potential Regulators of Myeloid-Derived Suppressor Cell Expansion. *Innate Immun.* **2014**, *20*, 227–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Monastirioti, A.; Papadaki, C.; Rounis, K.; Kalapanida, D.; Mavroudis, D.; Agelaki, S. A Prognostic Role for Circulating microRNAs Involved in Macrophage Polarization in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Cells* **2021**, *10*, 1988. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Schmittgen, T.D.; Livak, K.J. Analyzing Real-Time PCR Data by the Comparative C(T) Method. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1101–1108. [[CrossRef](#)]
25. Nishino, M.; Jagannathan, J.P.; Ramaia, N.H.; van den Abbeele, A.D. Revised RECIST Guideline Version 1.1: What Oncologists Want to Know and What Radiologists Need to Know. *Am. J. Roentgenol.* **2010**, *195*, 281–289. [[CrossRef](#)]
26. McShane, L.M.; Altman, D.G.; Sauerbrei, W.; Taube, S.E.; Gion, M.; Clark, G.M. Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK). *JNCI: J. Natl. Cancer Inst.* **2005**, *97*, 1180–1184. [[CrossRef](#)]
27. Cui, M.; Wang, H.; Yao, X.; Zhang, D.; Xie, Y.; Cui, R.; Zhang, X. Circulating MicroRNAs in Cancer: Potential and Challenge. *Front. Genet.* **2019**, *10*, 626. [[CrossRef](#)]
28. Pecot, C.V.; Rupaimoole, R.; Yang, D.; Akbani, R.; Ivan, C.; Lu, C.; Wu, S.; Han, H.-D.; Shah, M.Y.; Rodriguez-Aguayo, C.; et al. Tumour Angiogenesis Regulation by the miR-200 Family. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1–14. [[CrossRef](#)]
29. Dykxhoorn, D.M.; Wu, Y.; Xie, H.; Yu, F.; Lal, A.; Petrocca, F.; Martinvalet, D.; Song, E.; Lim, B.; Lieberman, J. miR-200 Enhances Mouse Breast Cancer Cell Colonization to Form Distant Metastases. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e7181. [[CrossRef](#)]
30. Korpal, M.; Ell, B.J.; Buffa, F.; Ibrahim, T.; Blanco, M.A.; Celià-Terrassa, T.; Mercatali, L.; Khan, Z.; Goodarzi, H.; Hua, Y.; et al. Direct targeting of Sec23a by miR-200s Influences Cancer Cell Secretome and Promotes Metastatic Colonization. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1101–1108. [[CrossRef](#)]
31. Dvinge, H.; Git, A.; Gräf, S.; Salmon-Divon, M.; Curtis, C.; Sottoriva, A.; Zhao, Y.; Hirst, M.; Armisen, J.; Miska, E.; et al. The Shaping and Functional Consequences of the MicroRNA Landscape in Breast Cancer. *Nature* **2013**, *497*, 378–382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Liu, X.-G.; Zhu, W.-Y.; Huang, Y.-Y.; Ma, L.-N.; Zhou, S.-Q.; Wang, Y.-K.; Zeng, F.; Zhou, J.-H.; Zhang, Y.-K. High Expression of Serum Mir-21 and Tumor Mir-200c Associated with Poor Prognosis in Patients with Lung Cancer. *Med. Oncol.* **2012**, *29*, 618–626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kim, M.K.; Jung, S.B.; Kim, J.-S.; Roh, M.S.; Lee, J.H.; Lee, E.H.; Lee, H.W. Expression of microRNA miR-126 and miR-200c Is Associated with Prognosis in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Virchows Arch.* **2014**, *465*, 463–471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Tejero-Villalba, R.; Navarro, A.; Campayo, M.; Viñolas, N.; Marrades, R.M.; Cordeiro, A.; Ruiz-Martínez, M.; Santasusagna, S.; Molins, L.; Ramirez, J.; et al. miR-141 and miR-200c as Markers of Overall Survival in Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer Adenocarcinoma. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e101899. [[CrossRef](#)]
35. Anastasiadou, E.; Messina, E.; Sanavia, T.; Mundo, L.; Farinella, F.; Lazzi, S.; Megiorni, F.; Ceccarelli, S.; Pontecorvi, P.; Marampon, F.; et al. MiR-200c-3p Contrasts PD-L1 Induction by Combinatorial Therapies and Slows Proliferation of Epithelial Ovarian Cancer through Downregulation of β -Catenin and c-Myc. *Cells* **2021**, *10*, 519. [[CrossRef](#)]
36. Cao, Q.; Lu, K.; Dai, S.; Hu, Y.; Fan, W. Clinicopathological and Prognostic Implications of the Mir-200 Family in Patients with Epithelial Ovarian Cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2014**, *7*, 2392–2401.
37. Okada, N.; Lin, C.-P.; Ribeiro, M.C.; Biton, A.; Lai, G.; He, X.; Bu, P.; Vogel, H.; Jablons, D.M.; Keller, A.C.; et al. A Positive Feedback Between P53 and Mir-34 Mirnas Mediates Tumor Suppression. *Genes Dev.* **2014**, *28*, 438–450. [[CrossRef](#)]
38. Li, W.; Wang, Y.; Liu, R.; Kasinski, A.L.; Shen, H.; Slack, F.J.; Tang, D.G. MicroRNA-34a: Potent Tumor Suppressor, Cancer Stem Cell Inhibitor, and Potential Anticancer Therapeutic. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 640587. [[CrossRef](#)]
39. Smolle, M.A.; Calin, H.N.; Pichler, M.; Calin, G.A. Noncoding RNAs and Immune Checkpoints—Clinical Implications as Cancer Therapeutics. *FEBS J.* **2017**, *284*, 1952–1966. [[CrossRef](#)]

40. Basak, S.K.; Veena, M.S.; Oh, S.; Lai, C.; Vangala, S.; Elashoff, D.; Fishbein, M.C.; Sharma, S.; Rao, N.P.; Rao, D.; et al. The CD44^{high}Tumorigenic Subsets in Lung Cancer Biospecimens Are Enriched for Low miR-34a Expression. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e73195. [\[CrossRef\]](#)
41. Zhao, K.; Cheng, J.; Chen, B.; Liu, Q.; Xu, D.; Zhang, Y. Circulating MicroRNA-34 Family Low Expression Correlates with Poor Prognosis in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Dis.* **2017**, *9*, 3735–3746. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Zeng, Z.; Chen, X.; Zhu, D.; Luo, Z.; Yang, M. Low Expression of Circulating MicroRNA-34c is Associated with Poor Prognosis in Triple-Negative Breast Cancer. *Yonsei Med. J.* **2017**, *58*, 697–702. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Gallardo, E.; Navarro, A.; Viñolas, N.; Marrades, R.M.; Diaz, T.; Gel, B.; Quera, A.; Bandres, E.; Garcia-Foncillas, J.; Ramirez, J.; et al. miR-34a as a Prognostic Marker of Relapse in Surgically Resected Non-Small-Cell Lung Cancer. *Carcinogenesis* **2009**, *30*, 1903–1909. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Monastriotti, A.; Papadaki, C.; Rounis, K.; Kalapanida, D.; Makrakis, D.; Vardakis, N.; Mavroudis, D.; Agelaki, S. Mir-34a as Predictor of Immunotherapy Efficacy in NSCLC Patients. *J. Clin. Oncol.* **2021**, *39*, e21191. [\[CrossRef\]](#)
45. Cantoni, C.; Cignarella, F.; Ghezzi, L.; Mikesell, B.; Bollman, B.; Berrien-Elliott, M.; Ireland, A.R.; Fehniger, T.A.; Wu, G.F.; Piccio, L. Mir-223 Regulates the Number and Function of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Multiple Sclerosis and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Acta Neuropathol.* **2017**, *133*, 61–77. [\[CrossRef\]](#)
46. Jiao, P.; Wang, X.-P.; Luoreng, Z.-M.; Yang, J.; Jia, L.; Ma, Y.; Wei, D.-W. miR-223: An Effective Regulator of Immune Cell Differentiation and Inflammation. *Int. J. Biol. Sci.* **2021**, *17*, 2308–2322. [\[CrossRef\]](#)
47. Zhao, F.-Y.; Han, J.; Chen, X.-W.; Wang, J.; Wang, X.-D.; Sun, J.-G.; Chen, Z.-T. miR-223 Enhances the Sensitivity of Non-Small Cell Lung Cancer Cells to Erlotinib by Targeting the Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor. *Int. J. Mol. Med.* **2016**, *38*, 183–191. [\[CrossRef\]](#)
48. Nian, W.; Ao, X.; Wu, Y.; Huang, Y.; Shao, J.; Wang, Y.; Chen, Z.; Chen, F.; Wang, D. miR-223 Functions as a Potent Tumor Suppressor of the Lewis Lung Carcinoma Cell Line by Targeting Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor and Cyclin-Dependent Kinase 2. *Oncol. Lett.* **2013**, *6*, 359–366. [\[CrossRef\]](#)
49. D'Antona, P.; Cattoni, M.; Dominioni, L.; Poli, A.; Moretti, F.; Cinquetti, R.; Gini, E.; Daffrè, E.; Noonan, D.M.; Imperatori, A.; et al. Serum miR-223: A Validated Biomarker for Detection of Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2019**, *28*, 1926–1933. [\[CrossRef\]](#)
50. Luo, P.; Wang, Q.; Ye, Y.; Zhang, J.; Lu, D.; Cheng, L.; Zhou, H.; Xie, M.; Wang, B. MiR-223-3p Functions as a Tumor Suppressor in Lung Squamous Cell Carcinoma by miR-223-3p-Mutant p53 Regulatory Feedback Loop. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, *38*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)
51. Dong, J.; Liu, Y.; Liao, W.; Liu, R.; Shi, P.; Wang, L. miRNA-223 is a Potential Diagnostic and Prognostic Marker for Osteosarcoma. *J. Bone Oncol.* **2016**, *5*, 74–79. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Chen, L.; Zhu, X.; Han, B.; Ji, L.; Yao, L.; Wang, Z. High Expression of microRNA-223 Indicates a Good Prognosis in Triple-Negative Breast Cancer. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 630432. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Esaba, R.; Sorensen, D.L.; Booth, S.A. MicroRNA-146a: A Dominant, Negative Regulator of the Innate Immune Response. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 578. [\[CrossRef\]](#)
54. Testa, U.; Pelosi, E.; Castelli, G.; Labbaye, C. miR-146 and miR-155: Two Key Modulators of Immune Response and Tumor Development. *Non-Coding RNA* **2017**, *3*, 22. [\[CrossRef\]](#)
55. Park, H.; Huang, X.; Lu, C.; Cairo, M.S.; Zhou, X. MicroRNA-146a and MicroRNA-146b Regulate Human Dendritic Cell Apoptosis and Cytokine Production by Targeting TRAF6 and IRAK1 Proteins. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 2831–2841. [\[CrossRef\]](#)
56. Shahriar, A.; Shiva, G.G.-A.; Ghader, B.; Farhad, J.; Hosein, A.; Parsa, H. The Dual Role of Mir-146a In Metastasis and Disease Progression. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, *126*, 110099. [\[CrossRef\]](#)
57. Wang, C.; Guan, S.; Liu, F.; Chen, X.; Shanghui, G.; Wang, D.; Nesa, E.U.; Wang, X.; Bao, C.; Wang, N.; et al. Prognostic and Diagnostic Potential of Mir-146a in Oesophageal Squamous Cell Carcinoma. *Br. J. Cancer* **2016**, *114*, 290–297. [\[CrossRef\]](#)
58. Wilczyński, M.; Żytko, E.; Szymańska, B.; Dzieniecka, M.; Nowak, M.; Danielska, J.; Stachowiak, G.; Wilczyński, J.R. Expression of miR-146a in Patients with Ovarian Cancer and Its Clinical Significance. *Oncol. Lett.* **2017**, *14*, 3207–3214. [\[CrossRef\]](#)
59. Chen, G.; Umelo, I.; Lv, S.; Teugels, E.; Fostier, K.; Kronenberger, P.; Dewaele, A.; Sadones, J.; Geers, C.; De Grève, J. miR-146a Inhibits Cell Growth, Cell Migration and Induces Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e60317. [\[CrossRef\]](#)
60. Pavel, A.B.; Campbell, J.D.; Liu, G.; Elashoff, D.; Dubinett, S.; Smith, K.; Whitney, D.; Lenburg, M.E.; Spira, A. Alterations in Bronchial Airway miRNA Expression for Lung Cancer Detection. *Cancer Prev. Res.* **2017**, *10*, 651–659. [\[CrossRef\]](#)
61. Becker, N.; Lockwood, C.M. Pre-Analytical Variables in miRNA Analysis. *Clin. Biochem.* **2013**, *46*, 861–868. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. McDonald, J.S.; Milosevic, D.; Reddi, H.V.; Grebe, S.K.; Algeciras-Schimmich, A. Analysis of Circulating MicroRNA: Preanalytical and Analytical Challenges. *Clin. Chem.* **2011**, *57*, 833–840. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Indini, A.; Rijavec, E.; Grossi, F. Circulating Biomarkers of Response and Toxicity of Immunotherapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Comprehensive Review. *Cancers* **2021**, *13*, 1794. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Halvorsen, A.R.; Sandhu, V.; Sprauten, M.; Flote, V.G.; Kure, E.H.; Brustugun, O.T.; Helland, A. Circulating microRNAs Associated with Prolonged Overall Survival in Lung Cancer Patients Treated with Nivolumab. *Acta Oncol.* **2018**, *57*, 1225–1231. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

-
65. Cui, C.; Cui, Q. The Relationship of Human Tissue Micromas with Those from Body Fluids. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 5644. [[CrossRef](#)]
 66. Cojocneanu, R.; Braicu, C.; Raduly, L.; Jurj, A.; Zanoaga, O.; Magdo, L.; Irimie, A.; Muresan, M.-S.; Ionescu, C.; Grigorescu, M.; et al. Plasma and Tissue Specific miRNA Expression Pattern and Functional Analysis Associated to Colorectal Cancer Patients. *Cancers* **2020**, *12*, 843. [[CrossRef](#)]

Παράρτημα Β΄

Αίτηση προς το επιστημονικό συμβούλιο, απόφαση έγκρισης από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας, και έντυπο ενημέρωσης και συγκατάθεσης που απευθύνεται στους ασθενείς.

Αίτηση Διδακτορικής Διατριβής

**Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Κρήτης
Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας**

Μοναστηριώτη Αλεξία του Ευαγγέλου
Ολυμπιονικών 17, Ηράκλειο, Κρήτη-71500
6981658255, 2810540446
monasal91@gmail.com

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή :

- Αγγελάκη Σοφία
- Μαυρουδής Δημήτριος
- Σπηλιανάκης Χαράλαμπος

Τίτλος : Ο ρόλος των κυκλοφορούντων βιοδεικτών στην εκτίμηση της έκβασης ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα που λαμβάνουν ανοσοθεραπεία

Ηράκλειο, 2017

ΕΙΣΑΓΩΓΗ / ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗ ΕΡΕΥΝΑ

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως, με τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο (ΜΜΚΠ) να αφορά στο 85% των περιπτώσεων (Molina et al., 2008). Τα τελευταία χρόνια η εξατομίκευση της θεραπείας μέσω της στόχευσης συγκεκριμένων μοριακών στόχων, βελτίωσε σημαντικά την επιβίωση των ασθενών με ΜΜΚΠ (Zarra and Mousa, 2016). Επιπλέον, η ανοσοθεραπεία και ειδικότερα η αναστολή των σημείων ελέγχου της ανοσοαπόκρισης με ειδικά αντισώματα που στοχεύουν τον υποδοχέα PD-1 ή τον προσδέτη PD-L1 αποτελεί μια καινοτόμο θεραπευτική προσέγγιση στον ΜΜΚΠ.

Οι αναστολείς αυτοί συσχετίζονται με σμίκρυνση του όγκου, μακρές ανταποκρίσεις και αύξηση της επιβίωσης σε ασθενείς με ΜΜΚΠ. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το μονοπάτι PD-1/PD-L1 αναστέλλει την ανοσοαπόκριση για να προστατεύσει τους ιστούς από την υπέρμετρη ενεργοποίηση του ανοσολογικού συστήματος, ενώ τα καρκινικά κύτταρα ιδιοποιούνται τον μηχανισμό αυτό ώστε να διαφεύγουν της αναγνώρισης από τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα (Pardoll, 2012).

Δυστυχώς, ένα μικρό ποσοστό ασθενών ωφελούνται από την ανοσοθεραπεία, ενώ ταυτόχρονα η χρήση της συνοδεύεται δυνητικά από σημαντικές παρενέργειες (πνευμονίτιδα, κολίτιδα, ηπατίτιδα, ενδοκρινοπάθειες, εξάνθημα, υποθυρεοειδισμό, διάρροια και νεφρική ανεπάρκεια) (Malhotra, Jabbour and Aisner, 2017) και από σημαντικό κόστος (Kelly and Smith, 2016). Η κατάλληλη επιλογή των ασθενών είναι πολύ σημαντική για την βελτίωση των αποτελεσμάτων της ανοσοθεραπείας, συνεπώς, η αναγνώριση αξιόπιστων προβλεπτικών βιοδεικτών για την ταυτοποίηση εκείνων που έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να ωφεληθούν, είναι επιβεβλημένη.

Τα miRNAs είναι μια οικογένεια μικρών μη-κωδικών RNA (20-22 νουκλεοτίδια), που συμμετέχουν σε πληθώρα βιολογικών μονοπατιών (Reddy, 2015) και δρουν είτε ως ογκογονίδια, είτε ως ογκοκατασταλτικά γονίδια (Florczuk, Szpachcinski and Chorostowska-Wynimko, 2017). Εξωκυτταρικά miRNAs κυκλοφορούν στο αίμα υγιών και ασθενών, εμπεριεχόμενα σε λιπίδια ή σε σύμπλοκα λιποπρωτεϊνών, γεγονός που τα καθιστά εξαιρετικά σταθερά (Kosaka, Iguchi and Ochiya, 2010).

Η έκφραση των miRNAs εμφανίζεται απορυθμισμένη στους περισσότερους όγκους (MacFarlane and R. Murthy, 2010) και λόγω της συμμετοχής τους στην έναρξη και εξέλιξη του όγκου, τα μόρια αυτά διερευνώνται ως πιθανοί προγνωστικοί και προβλεπτικοί βιοδείκτες στον καρκίνο (Florczuk, Szpachcinski and Chorostowska-Wynimko, 2017). Πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν ότι τα miRNAs ρυθμίζουν την ανοσοαπόκριση, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης και διαφοροποίησης των ανοσοκυττάρων, της παραγωγής αντισωμάτων και της απελευθέρωσης φλεγμονωδών κυτοκινών, οπότε δυνητικά συμμετέχουν και στη ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης κατά του καρκίνου (Lee, Nguyen and Lu, 2014).

Η μελέτη των κυκλοφορούντων miRNAs παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα, λόγω της ευκολίας στη λήψη του δείγματος και της δυνατότητας επαναλαμβανόμενων δειγματοληψιών κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Το πλάσμα αποτελεί μια δεξαμενή miRNAs τα οποία απελευθερώνονται από διαφορετικά σημεία του αρχικού όγκου ή από μεταστατικές εστίες, και ως εκ τούτου θεωρείται ότι αντανακλούν την ετερογένεια του όγκου. Πράγματι, η μεταβολή της έκφρασής τους θεωρείται ότι μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο βιοδείκτη για τη πρόγνωση, την πρόβλεψη της έκβασης και την παρακολούθηση της θεραπείας ασθενών με καρκίνο (Schwarzenbach et al., 2014).

Στην παρούσα μελέτη προτείνεται η διερεύνηση του ρόλου κυκλοφορούντων miRNAs που σχετίζονται με την ρύθμιση της ανοσοαπόκρισης όσον αφορά:

- α) την εκτίμηση της πρόγνωσης ασθενών με ΜΜΚΠ,
- β) την πρόβλεψη της έκβασης ασθενών με ΜΜΚΠ που λαμβάνουν ανοσοθεραπεία και
- γ) την μελέτη των μηχανισμών αντίστασης στην ανοσοθεραπεία.

ΣΤΟΧΟΣ ΚΑΙ ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗ ΤΗΣ ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑΣ ΤΗΣ ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΥΠΑΡΧΟΥΣΑ ΔΙΕΘΝΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Οι αναστολείς του μονοπατιού PD1/PD-L1 έχουν φέρει επανάσταση στη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα. Κλινικοπαθολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά όπως το ιστορικό καπνίσματος, η γενική κατάσταση του ασθενούς, η παρουσία οδηγών μεταλλάξεων στον όγκο καθώς και το γενικό φορτίο μεταλλάξεων του όγκου, έχουν χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στους αναστολείς αυτούς, χωρίς όμως κάποιο από αυτά να εφαρμόζεται στην κλινική πράξη για την επιλογή των ασθενών (Hegde, Karanikas and Evers, 2016).

Διάφορα δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι αναστολείς των σημείων ελέγχου είναι περισσότερο δραστικοί εφόσον προϋπάρχει ανοσολογική απάντηση στο μικροπεριβάλλον του όγκου (TME). Έτσι, οι όγκοι που χαρακτηρίζονται από την παρουσία CD8+ T-λεμφοκυττάρων, έκφραση PD-L1 και από τη μοριακή υπογραφή που διαμορφώνεται από την έκφραση γονιδίων που επάγονται από την ιντερφερόνη-γ είναι «φλεγμονώδεις» και γενικά ανταποκρίνονται στην ανοσοθεραπεία. Στην περίπτωση αυτών των όγκων η αντίσταση στην ανοσοθεραπεία σχετίζεται με την υπερέκφραση κατασταλτικών μορίων (PD-L1, LAG3, TIM3, IDO), με την προσέλκυση ανοσοκατασταλτικών T-ρυθμιστικών κυττάρων (regulatory T cells, Tregs) στο μικροπεριβάλλον του όγκου (TME) καθώς και με την μείωση της ανοσογονικότητας των καρκινικών κυττάρων με αποτέλεσμα να μην αναγνωρίζονται από τα T-λεμφοκύτταρα (Hegde, Karanikas and Evers, 2016).

Αντίθετα, οι «μη φλεγμονώδεις» όγκοι, δεν διηθούνται από CD8+ T-λεμφοκύτταρα, δεν εκφράζουν PD-L1 και χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη ανοσοκατασταλτικού στρώματος και την παρουσία μυελοειδών κατασταλτικών κυττάρων (MDSCs), τα οποία εμποδίζουν την διήθηση ή/και την ενεργοποίηση των T-κυττάρων (Hegde, Karanikas and Evers, 2016). Στους όγκους αυτούς, η ανοσοθεραπεία δεν θεωρείται αποτελεσματική και η ανοσοδιαφυγή οφείλεται στην απουσία στρατολόγησης κυττάρων της έμφυτης ανοσοαπόκρισης, στην ενεργοποίηση ογκογόνων μονοπατιών που αλλάζουν το TME και προκαλούν τον αποκλεισμό των T-κυττάρων και απουσία έκφρασης κυτοκινών που μπορούν να προσελκύσουν τα T-λεμφοκύτταρα (Spranger, 2016).

Ολοένα και περισσότερα δεδομένα συγκλίνουν στο ότι τα miRNAs μπορούν να ρυθμίσουν την ανοσολογική απάντηση κατά του όγκου, επηρεάζοντας την έκφραση ανοσορρυθμιστικών μορίων στον όγκο και τα ανοσοκύτταρα. Τα miRNAs είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη και λειτουργία των κυττάρων της έμφυτης ανοσίας, καθώς ρυθμίζουν την παραγωγή κυτοκινών και την αντιγονοπαρουσίαση μέσω του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας MHC. Επιπροσθέτως, συμμετέχουν στην έναρξη αντιγονοειδικών αποκρίσεων και κατέχουν καίριο ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη των B-κυττάρων καθώς και στην ωρίμανση και ενεργοποίηση των T-κυττάρων (O'Connell et al., 2010).

Ειδικότερα, το miR-34a αναστέλλει την έκφραση των σημείων ελέγχου PD-1, PD-L1 και TIM3, το miR-200 αναστέλλει την επιθηλιομεσεγχυματική μετάβαση ενώ και τα δύο αναστέλλουν την έκφραση του PD-L1 στα T-λεμφοκύτταρα, ενισχύοντας έτσι την ανοσοαπάντηση (Smolle et al., 2017). Το miR-155 ενεργοποιεί την ανοσοαπόκριση που διαμεσολαβείται από τα T, B και NK κύτταρα, ενώ η υπερέκφραση του επηρεάζει την ανταπόκριση των Tregs στην IL-2, την κύρια κυτοκίνη που ρυθμίζει την επιβίωση και την αύξησή τους (Ha, 2011). Επίσης σημαντικό ρόλο στην λειτουργία των T-regs έχει το miR-146a, το οποίο περιορίζει την ανοσολογική απάντηση που προκαλείται από την IFN- γ (Lu et al., 2010). Ισχυρά δεδομένα υποστηρίζουν ότι κατά την φλεγμονή ή την αύξηση του όγκου παρατηρείται μειωμένη έκφραση του miR-223 και προκαλείται έκπτωση των MDSCs καταστέλλοντας έτσι τη δράση των CD8⁺ T-κυττάρων (El-Gazzar, 2013).

Με βάση τα παραπάνω στην παρούσα διατριβή θα διερευνηθεί :

1. Η έκφραση (α) του miR-34a και miR-200 που σχετίζονται με τη ρύθμιση των σημείων ελέγχου της ανοσοαπόκρισης, (β) του miR-155 και miR-146 που σχετίζονται με τη ρύθμιση των T-regs και (γ) του miR-223 που σχετίζεται με τα MDSCs, καθώς και με την παρουσία κυττάρων της έμφυτης ανοσίας στο TME,
2. Ο προγνωστικός και προβλεπτικός τους ρόλος σε ασθενείς με ΜΜΚΠ που λαμβάνουν ανοσοθεραπεία και
3. Η πιθανή αξία τους στην αποσαφήνιση των μηχανισμών αντίστασης στην ανοσοθεραπεία.

ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Ασθενείς

Στην παρούσα μελέτη θα ενταχθούν περίπου 100 ασθενείς οι οποίοι θα λάβουν ανοσοθεραπεία στην Παθολογική-Ογκολογική Κλινική ΠΑΓΝΗ, σύμφωνα με τη συνήθη κλινική πρακτική, κατά το χρονικό διάστημα από Ιανουάριο 2018-Ιανουάριο 2020. Περιφερικό αίμα θα συλλέγεται σε σωληνάρια EDTA πριν την έναρξη της θεραπείας και στην υποτροπή της νόσου και θα προωθείται εντός 2 ωρών για τη συλλογή του πλάσματος. Το πλάσμα θα φυλάσσεται στους -80°C μέχρι περαιτέρω ανάλυση.

Επιπλέον θα ενταχθούν ως ομάδες ελέγχου για συγκριτική αξιολόγηση:

- α) 100 ασθενείς οι οποίοι έχουν λάβει χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής και έχουν διαθέσιμο δείγμα πλάσματος προ της έναρξης της χημειοθεραπείας
- β) 50 ασθενείς οι οποίοι έχουν λάβει χημειοθεραπεία δεύτερης γραμμής και έχουν διαθέσιμο δείγμα πλάσματος.

Για την πραγματοποίηση της προτεινόμενης έρευνας θα ακολουθηθούν τα παρακάτω βήματα :

1. Βελτιστοποίηση των μεθόδων ανίχνευσης των miRNAs.

Θα χρησιμοποιηθεί πλάσμα από φυσιολογικούς αιμοδότες και καρκινικές σειρές πνεύμονα, οι οποίες θα καλλιεργηθούν σύμφωνα με τις πρότυπες συνθήκες. Η ανάπτυξη και η βελτιστοποίηση της ανίχνευσης των miRNAs θα γίνει σε ολικό RNA από τις κυτταρικές σειρές. Για την απομόνωση του ολικού RNA από το πλάσμα, στο οποίο περιλαμβάνονται τα miRNAs, και από τις κυτταρικές σειρές θα χρησιμοποιηθεί TRIZOL-LS. Για τον έλεγχο της απομόνωσης των miRNAs και την εξακρίβωση ότι πραγματοποιείται με την ίδια αποτελεσματικότητα σε όλα τα δείγματα, ως μάρτυρας θα χρησιμοποιηθεί η αλληλουχία cel-miR-39 από τον οργανισμό *C. elegans*. Έπειτα από τον καθαρισμό και την απομόνωση των RNA, τα δείγματα φυλάσσονται στους -80°C μέχρι την επόμενη χρήση τους.

Για τη σύνθεση cDNA θα χρησιμοποιηθεί το TaqMan MicroRNA reverse transcription kit και το miRNA-specific stem-loop primers, ενώ θα χρησιμοποιηθούν και ειδικοί εκκινητές για κάθε miRNA. Ακολούθως, η ανίχνευση καθενός από τα miRNA γίνεται με τη χρήση του TaqMan MicroRNA assay. Η σχετική έκφραση των miRNA στο πλάσμα θα μετρηθεί με τη μέθοδο $2^{-\Delta\text{Ct}}$ σε σχέση με την έκφραση του miR-1228, το οποίο έχει βρεθεί ότι εκφράζεται σταθερά στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ. Η σχετική ποσοτικοποίηση των miRNA σε σχέση με την έκφραση του στο φυσιολογικό πλάσμα θα πραγματοποιηθεί με τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

2. Μελέτη της προγνωστικής αξίας των υπό μελέτη miRNAs σε ασθενείς με ΜΜΚΠ.

Η έκφραση των miRNAs θα αναλυθεί σε ασθενείς που έχουν λάβει χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής και δεν είχαν εκτεθεί σε ανοσοθεραπεία λόγω της μη διαθεσιμότητά της μέχρι και πολύ πρόσφατα. Θα πραγματοποιηθούν συσχετίσεις της έκφρασης των miRNAs με την αντικειμενική ανταπόκριση στη χορηγηθείσα θεραπεία, το διάστημα ελεύθερο υποτροπής της νόσου και τη συνολική επιβίωση των ασθενών.

3. Μελέτη της προβλεπτικής αξίας των υπό μελέτη miRNAs στην έκβαση ασθενών με ΜΜΚΠ που λαμβάνουν ανοσοθεραπεία.

Η έκφραση των miRNAs θα αναλυθεί σε ασθενείς που θα λάβουν ανοσοθεραπεία ως θεραπεία δεύτερης ή επόμενης γραμμής. Ως ομάδα ελέγχου θα μελετηθούν ασθενείς που έχουν λάβει στο παρελθόν άλλου τύπου θεραπεία (όχι ανοσοθεραπεία). Θα πραγματοποιηθούν συσχετίσεις της έκφρασης των miRNAs, με την αντικειμενική ανταπόκριση στη χορηγούμενη θεραπεία, το διάστημα ελεύθερο υποτροπής της νόσου και τη συνολική επιβίωση των ασθενών.

4. Ανάλυση της έκφρασης των miRNAs στην υποτροπή της νόσου.

Η έκφραση των miRNAs θα μελετηθεί στο δείγμα που θα ληφθεί κατά την υποτροπή της νόσου και θα πραγματοποιηθεί σύγκριση του μοτίβου έκφρασης με το αντίστοιχο μοτίβο προ της έναρξης της θεραπείας.

Στατιστική ανάλυση μέσω του προγράμματος SPSS

Οι ασθενείς θα κατηγοριοποιηθούν ως υψηλής ή χαμηλής έκφρασης με βάση τη διάμεση τιμή για το κάθε miRNA. Η συσχέτιση της έκφρασης των miRNAs με τη μεταστατική νόσο θα διερευνηθεί με το τεστ χ^2 . Η συσχέτιση της παρουσίας των miRNAs με την έκβαση των ασθενών ύστερα από ανοσοθεραπεία ή και μετά την υποτροπή θα διερευνηθεί με τη μέθοδο Kaplan Meier, log rank test (Mantel-Cox). Τέλος, η αξιολόγηση της κλινικής τους σημασίας στην πρόγνωση θα γίνει με ανάλυση ROC (receiver operating characteristic curve).

ΕΓΚΡΙΣΗ ΑΠΟ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΒΙΟΗΘΙΚΗΣ

Πρόκειται για μια κλινικο-εργαστηριακή μεταφραστική μελέτη κατά την οποία θα γίνουν συσχετίσεις της έκφρασης κυκλοφορούντων miRNAs που ενέχονται στην ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης με την έκβαση ασθενών με ΜΜΚΠ. Οι ασθενείς που θα ενταχθούν στη μελέτη θα λάβουν την καθιερωμένη θεραπεία, σύμφωνα με την τρέχουσα κλινική πρακτική. Οι ασθενείς θα ενταχθούν στη μελέτη αφού υπογράψουν έντυπο ενημέρωσης και συγκατάθεσης. Τα δείγματα των ασθενών θα μεταφέρονται για περαιτέρω επεξεργασία στο Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης όπου θα κωδικοποιούνται και

θα φυλάσσονται έως την τελική επεξεργασία τους. Οι θεράποντες γιατροί δεν θα έχουν πρόσβαση στα αποτελέσματα των αναλύσεων και η θεραπεία των ασθενών με κανένα τρόπο δεν θα επηρεάζεται από αυτές. Το πρωτόκολλο εργασίας έχει κατατεθεί προς έγκριση από την Επιτροπή Ηθικής Δεοντολογίας του ΠΑΓΝΗ.

Reagents	Cat. No	Cost euro/kit	Quantity	Total cost euro
TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit	4366596	160	1	160
TaqMan Universal PCR Master Mix	4324018	440	1	440
TaqMan MicroRNA Assays	4427975	347	7	2429
miScript miRNA Mimic	MSY0000010	455	1	455
Trizol LS	10296028	300	5	1500
TOTAL				4984

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (αλφαβητικά)

- El-Gazzar, M. (2013). microRNAs as potential regulators of myeloid-derived suppressor cell expansion. *Innate Immunity*, 20(3), pp.227-238.
- Florczuk, M., Szepechcinski, A. and Chorostowska-Wynimko, J. (2017). miRNAs as Biomarkers and Therapeutic Targets in Non-Small Cell Lung Cancer: Current Perspectives. *Targeted Oncology*, 12(2), pp.179-200.
- Ha, T. (2011). The Role of MicroRNAs in Regulatory T Cells and in the Immune Response. *Immune Network*, 11(1), p.11.
- Hegde, P., Karanikas, V. and Evers, S. (2016). The Where, the When, and the How of Immune Monitoring for Cancer Immunotherapies in the Era of Checkpoint Inhibition. *Clinical Cancer Research*, 22(8), pp.1865-1874.
- Kelly, R. and Smith, T. (2016). Checkpoint Inhibitors in Lung Cancer Are Not Immune from Cost-Effectiveness Analysis. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(11), pp.1814-1816.
- Kosaka, N., Iguchi, H. and Ochiya, T. (2010). Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Science*, 101(10), pp.2087-2092.
- Lee, H., Nguyen, D. and Lu, L. (2014). Progress and challenge of microRNA research in immunity. *Frontiers in Genetics*, 5.
- Livak, K. and Schmittgen, T. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), pp.402-408.

- Lu, L., Boldin, M., Chaudhry, A., Lin, L., Taganov, K., Hanada, T., Yoshimura, A., Baltimore, D. and Rudensky, A. (2010). Function of miR-146a in Controlling Treg Cell-Mediated Regulation of Th1 Responses. *Cell*, 142(6), pp.914-929.
- MacFarlane, L. and R. Murphy, P. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics*, 11(7), pp.537-561.
- Malhotra, J., Jabbour, S. and Aisner, J. (2017). Current state of immunotherapy for non-small cell lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*, 6(2), pp.196-211.
- Molina, J., Yang, P., Cassivi, S., Schild, S. and Adjei, A. (2008). Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. *Mayo Clinic Proceedings*, 83(5), pp.584-594.
- O'Connell, R., Rao, D., Chaudhuri, A. and Baltimore, D. (2010). Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 10(2), pp.111-122.
- Pardoll, D. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), pp.252-264.
- Reddy, K. (2015). MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer Cell International*, 15(1).
- Schwarzenbach, H., Nishida, N., Calin, G. and Pantel, K. (2014). Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 11(3), pp.145-156.
- Smolle, M., Calin, H., Pichler, M. and Calin, G. (2017). Noncoding RNAs and immune checkpoints-clinical implications as cancer therapeutics. *The FEBS Journal*, 284(13), pp.1952-1966.
- Spranger, S. (2016). Mechanisms of tumor escape in the context of the T-cell-inflamed and the non-T-cell-inflamed tumor microenvironment. *International Immunology*, 28(8), pp.383-391.
- Zappa, C. and Mousa, S. (2016). Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Translational Lung Cancer Research*, 5(3), pp.288-300.



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΥΓΕΙΑΣ
7^η ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΗ ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑ ΚΡΗΤΗΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ Γ. Ν. Η.-Γ.Ν. «ΒΕΝΙΖΕΛΕΙΟ»

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ
ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ

Ηράκλειο 13/12/2017
Αρ. πρωτ.: 13725

ΠΡΟΕΔΡΟΣ
Βελεγράκης Γεώργιος
Καθηγητής
Δ/ντής ΩΡΛ Κλινικής

ΤΑΚΤΙΚΑ ΜΕΛΗ
Μιχαηλίδη Ελένη
Δ/ντρια ΕΣΥ
Παιδιατρικής

Πατριανίκος Αλέξανδρος
Δ/ντής ΕΣΥ
Καρδιολογίας

Αθανασάκης Ηλίας
Επιμελητής Α'
Γεν. Χειρουργικής

Παναγιωτάκης Γεώργιος
Επιμελητής Β'
Γεν. Χειρουργικής

Βενυάκη Μαρία
Επικ. Καθηγήτρια
Κλινικής Χημείας

Βενιανάκη Μαρία
Ειδικευόμενη
Γεν. Χειρουργικής

Γραμματοπούλου Μαρία
Τομέαρχης Νοσηλευτικής

Ταμπουράκη
Μαρία
ΤΕ Φυσικοθεραπείας

Γραμματεία
Μαρία Μπενέτου
Τηλ.: 2810392478
2813405316

ΠΡΟΣ: Δ/ντή Ιατρικής Υπηρεσίας
Καθηγητή κ. Γ. Χαλκιαδάκη

Κοιν: - Διοικητή Πα.ΓΝΗ
- Καθηγητή κ. Δ. Μαυρουδή
- Βιολόγο κα. Α. Μοναστηριώτη

ΘΕΜΑ: «Έγκριση ερευνητικού πρωτοκόλλου που θα διεξαχθεί στην Παθολογική-Ογκολογική Κλινική του Πα.ΓΝΗ στα πλαίσια Διδακτορικής Διατριβής της Βιολόγου κα. Α. Μοναστηριώτη»

Το Ε.Σ στη συνεδρίασή του της 13/12/2017, αφού έλαβε υπόψη την επιστολή του Καθηγητή κ. Δ. Μαυρουδή και της Βιολόγου κα. Α. Μοναστηριώτη, με αρ. πρωτ. 13725/8-11-2017, τη θετική εισήγηση της Ομάδας Εργασίας της Επιτροπής Ηθικής και Δεοντολογίας, καθώς και τα επισυναπτόμενα έγγραφα, εισηγείται θετικά στο Δ.Σ την έγκριση του ερευνητικού πρωτοκόλλου με τίτλο «Ο ρόλος των κυκλοφορούντων βιοδεικτών στην εκτίμηση της έκβασης ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα που λαμβάνουν ανοσοθεραπεία», που θα διεξαχθεί στην Παθολογική- Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου μας στα πλαίσια Διδακτορικής Διατριβής της Βιολόγου κα. Α. Μοναστηριώτη.

Η εισήγηση του Ε.Σ. δεν επέχει σε καμία περίπτωση ισχύ απόφασης και δεν δύναται να χρησιμοποιηθεί ως τέτοια.

Για το Επιστημονικό Συμβούλιο
Καθηγητής Γεώργιος Βελεγράκης

ΑΠΟΦΑΣΗ 1379

ΘΕΜΑ 38^ο «Έγκριση ερευνητικού πρωτοκόλλου που θα διεξαχθεί στην Παθολογική-Ογκολογική Κλινική του ΠαΓΝΗ στα πλαίσια Διδακτορικής Διατριβής της κας Α. Μοναστηριώτη»

Σχετ:

1. Η με αρ. πρωτ. 13725/8-11-2017 επιστολή του Καθηγητή Δ. Μαυρουδή, και της Βιολόγου Α. Μοναστηριώτη, καθώς και η θετική εισήγηση της Ομάδας Εργασίας της Επιτροπής Ηθικής και Δεοντολογίας.
2. Η με αρ. πρωτ. 13725/13-12-2017 επιστολή του Επιστημονικού Συμβουλίου του Πα.Γ.Ν.Η.
3. Η με αρ. πρωτ. 13725/13-12-2017 εισήγηση του Διευθυντή Ιατρικής Υπηρεσίας του Πα.Γ.Ν.Η. Καθηγητή Γ. Χαλκιαδάκη.

Το Δ.Σ. ύστερα από εισήγηση του Διευθυντή της Ιατρικής Υπηρεσίας Καθηγητή Γ. Χαλκιαδάκη και αφού έλαβε υπόψη του τα παραπάνω σχετικά,

ομόφωνα αποφασίζει

Εγκρίνει το ερευνητικό πρωτόκολλο με τίτλο «Ο ρόλος των κυκλοφορούντων βιοδεικτών στην εκτίμηση της έκβασης ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα που λαμβάνουν ανοσοθεραπεία», που θα διεξαχθεί στην Παθολογική - Ογκολογική Κλινική του Νοσοκομείου μας στα πλαίσια Διδακτορικής Διατριβής της κας Α. Μοναστηριώτη.

Η Γραμματεία Ιατρικής Υπηρεσίας του Πα.Γ.Ν.Η να κάνει τις απαραίτητες ενέργειες.

Ο ΠΡΟΕΔΡΟΣ

ΤΑΣΣΟΠΟΥΛΟΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

Ο ΑΝΤΙΠΡΟΕΔΡΟΣ

ΦΑΝΟΥΡΓΙΑΚΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΤΑ ΜΕΛΗ

ΧΑΛΚΙΑΔΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΖΑΧΑΡΗΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ

ΚΟΝΙΔΑΚΗΣ ΠΑΝΑΓΟΣ

ΤΖΩΡΤΖΑΚΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ

ΚΟΝΤΡΑΦΟΥΡΗΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ

Η ΓΡΑΜΜΑΤΕΑΣ ΔΣ

ΜΑΡΙΑ ΒΑΣΙΛΑΚΗ

Ο ΑΝΑΓΓ. ΔΙΟΙΚΗΤΗΣ

ΜΟΣΧΟΒΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ



ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ-ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ, ΠΑΓΝΗ
ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΠΑΝ/ΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ

Έντυπο Συγκατάθεσης μετά από Ενημέρωση για
τη συμμετοχή στο ερευνητικό πρόγραμμα:

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΒΑΣΗΣ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΜΗ-
ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΥΝ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ**

Ανάλυση δειγμάτων ολικού αίματος ασθενών που πάσχουν από μεταστατικό καρκίνο πνεύμονα και πρόκειται να λάβουν ανοσοθεραπεία με αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος.

Εισαγωγή

Θα θέλαμε να σας προσκαλέσουμε να σκεφθείτε το ενδεχόμενο συμμετοχής σας σε ένα πρόγραμμα μεταφραστικής έρευνας που πραγματοποιείται στην Παθολογική-Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Το πρόγραμμα αυτό περιλαμβάνει μετρήσεις σε δείγμα αίματός σας και στοχεύει στην εύρεση πιθανής συσχέτισης μεταξύ των μετρήσεων αυτών και του αποτελέσματος της θεραπείας με αναστολείς των σημείων ελέγχου της ανοσολογικής απάντησης που λαμβάνετε μετά από σύσταση του θεράποντος ιατρού σας. Αυτό το φύλλο ενημέρωσης σας πληροφορεί σχετικά με το πρόγραμμα, προκειμένου να σας βοηθήσει να αποφασίσετε κατά πόσον θα συμμετέχετε ή όχι. Παρακαλείστε να αφιερώσετε τον απαραίτητο χρόνο για να το διαβάσετε προσεκτικά πριν πάρετε την απόφασή σας. Εάν έχετε οποιαδήποτε ερώτηση ή εάν κάτι δεν σας είναι σαφές, παρακαλείστε να το συζητήσετε με τον γιατρό σας / με εμάς και, εάν το επιθυμείτε, με τον οικογενειακό σας γιατρό.

Η ανοσοθεραπεία έχει φέρει μια μικρή επανάσταση στην αντιμετώπιση του μεταστατικού μη μικροκυτταρικού καρκίνου πνεύμονα. Σε ένα νόσημα με πολύ πτωχά αποτελέσματα από θεραπευτικής απόψεως έχει καταφέρει σημαντικά αποτελέσματα σε έναν δύσκολα θεραπεύσιμο πληθυσμό ασθενών. Όμως οι συγκεκριμένες υποομάδες ασθενών που μπορεί να ωφεληθούν από αυτή δεν έχουν καθοριστεί λόγω έλλειψης βιοδεικτών. Το ερευνητικό αυτό πρόγραμμα του Πανεπιστημίου Κρήτης έχει σκοπό τη μελέτη κυκλοφορούντων μορίων και πιο συγκεκριμένα των miRNAs που σχετίζονται με τη ρύθμιση της ανοσολογικής απάντησης, ώστε να αναγνωριστούν παράμετροι που βοηθούν στην πρόβλεψη του αποτελέσματος της

θεραπείας που λαμβάνετε. Για την παρακολούθηση των παραμέτρων αυτών δεν απαιτούνται παρεμβατικές διαδικασίες πέραν των όσων πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της θεραπείας σας.

Ποιος είναι ο σκοπός αυτής της μελέτης ;

Ο στόχος της συγκεκριμένης μελέτης είναι η ταυτοποίηση παραγόντων που σχετίζονται με την ανταπόκριση της νόσου ασθενών με μεταστατικό μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα που λαμβάνουν ανοσοθεραπεία, σύμφωνα με την συμβουλή του θεράποντος γιατρού, με βάση την καθιερωμένη κλινική πρακτική.

Για τον σκοπό της μελέτης θα αναλυθεί δείγμα αίματός σας και θα καταγραφούν δεδομένα που αφορούν τη νόσο σας και το αποτέλεσμα της χορηγούμενης θεραπείας. Η μελέτη αυτή δεν έχει σχεδιαστεί για τον προσδιορισμό της κατάλληλης για σας θεραπείας και δεν θα επωφεληθείτε από τα ευρήματά της. Οι αναλύσεις που θα πραγματοποιηθούν στο βιολογικό σας υλικό περιγράφονται σε οργανωμένο πρωτόκολλο μελέτης το οποίο έχει υποβληθεί και έχει λάβει έγκριση από τις αρμόδιες Ρυθμιστικές Αρχές (Επιτροπή Ηθικής Δεοντολογίας και Επιστημονική Επιτροπή του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου).

Πληροφορίες σχετικά με το τι θα συμβεί

Δεν είστε υποχρεωμένοι να δεχθείτε να συμμετάσχετε στην έρευνα αυτή. Εάν όμως αποφασίσετε να λάβετε μέρος στο πρόγραμμα της έρευνας ένα δείγμα αίματός σας θα αναλυθεί σύμφωνα με το ερευνητικό/επιστημονικό ερώτημα, χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές που ανιχνεύουν την παρουσία συγκεκριμένων μοριακών αλλαγών στο αίμα. Το δείγμα αίματος θα ληφθεί κατά τη διάρκεια της προγραμματισμένης αιμοληψίας που πραγματοποιείται πριν από την θεραπεία σας.

Τα δείγματά σας θα κωδικοποιηθούν με έναν αριθμητικό κωδικό (δείγματα μονής κωδικοποίησης) και δεν θα φέρουν το όνομά σας. Ο κωδικός θα συνδέει τα δείγματα με πληροφορίες σχετικά με τα αποτελέσματα των εξετάσεων. Μόνο ο γιατρός της μελέτης και άλλα εξουσιοδοτημένα από αυτόν μέλη του προσωπικού θα είναι σε θέση να αναγνωρίσουν το όνομά σας από τον κωδικό.

Επιπροσθέτως, η συγκατάθεσή σας περιορίζει τον χρόνο αποθήκευσης των δειγμάτων σας σε μία περίοδο 50 ετών. Ο χρόνος των 50 ετών αρχίζει από την ημερομηνία συγκατάθεσης σας. Μετά τη παρέλευση του μέγιστου χρόνου αποθήκευσης (ή και νωρίτερα), τα δείγματά σας και οποιοδήποτε υλικό έχει απομονωθεί από αυτά θα καταστραφούν. Τα γενετικά δεδομένα που θα απορρέουν από τα δείγματά σας θα μπορούν να αποθηκευτούν για μία χρονική περίοδο 50 ετών ή και ακόμη μεγαλύτερη, όπως απαιτείται από τις ρυθμιστικές αρχές (π.χ. ΕΜΕΑ).

Πιθανόν να χρειαστεί κωδικοποιημένα δείγματα και δεδομένα σας να σταλούν σε άλλες χώρες ή/και συνεργαζόμενα εργαστήρια για ανάλυση.

Μπορώ να αποσύρω τη συγκατάθεσή μου σχετικά με τη συμμετοχή μου;

Ναι, μπορείτε να αποσύρετε τη συγκατάθεση για τη συμμετοχή σας σε οποιαδήποτε στιγμή, χωρίς να χρειαστεί να επικαλεστείτε κάποιον λόγο και χωρίς να υποστείτε οποιαδήποτε κύρωση. Εάν αποφασίσετε να κάνετε κάτι τέτοιο, παρακαλείστε να ενημερώσετε τον γιατρό της μελέτης, ο οποίος στη συνέχεια θα κοινοποιήσει τον δικό σας κωδικό ασθενούς στο κεντρικό εργαστήριο, όπου θα καταστραφούν τα δείγματά σας και οποιοδήποτε υλικό έχει απομονωθεί από αυτά. Δεν θα χρησιμοποιηθεί κανένα περαιτέρω δεδομένο από τα κωδικοποιημένα δείγματά σας.

Ωστόσο, η συγκατάθεσή σας για τα δεδομένα που έχουν ήδη συλλεχθεί είναι αμετάκλητη. Συνεπώς, τα δεδομένα που έχουν ήδη προκύψει από την ανάλυση των δειγμάτων σας πριν από την απόσυρση της συγκατάθεσής σας δεν θα διαγράφονται. Τα δεδομένα που έχουν ήδη συλλεχθεί μπορεί επίσης να υποβληθούν σε κωδικοποιημένη μορφή προς τις ρυθμιστικές αρχές, για να υπάρξει συμμόρφωση με τις απαιτήσεις των ρυθμιστικών αρχών για πλήρη υποβολή δεδομένων. Αντίστοιχα, τα δεδομένα που έχουν ήδη προκύψει θα φυλάσσονται για το χρονικό διάστημα που απαιτείται από τις ρυθμιστικές αρχές.

Πιθανά οφέλη από τη συμμετοχή

Η συμμετοχή σας σε αυτό το πρόγραμμα έρευνας δεν θα σας ωφελήσει άμεσα. Ωστόσο, πληροφορίες από τις μελέτες που θα πραγματοποιηθούν χρησιμοποιώντας τα δείγματά σας μπορεί να βοηθήσουν τους ερευνητές να βελτιώσουν τις ήδη υπάρχουσες τεχνικές ανίχνευσης μοριακών αλλαγών στο αίμα ασθενών με καρκίνο και να συμβάλλουν στην βελτίωση της διάγνωσης και της θεραπείας των ασθενών αυτών.

Πληρωμή

Η συμμετοχή σας στο πρόγραμμα έρευνας δεν θα έχει κανένα κόστος για εσάς, ενώ δεν θα χρειαστεί να πληρώσετε για τις δοκιμασίες, τις εξετάσεις ή την ιατρική φροντίδα που απαιτούνται στο πλαίσιο αυτού του προγράμματος. Επίσης, δεν θα πληρωθείτε για τη συμμετοχή σας στο πρόγραμμα.

Ο ερευνητής μπορεί να χρησιμοποιήσει τα ευρήματα των μελετών για επιστημονικούς σκοπούς ή ως πνευματική ιδιοκτησία. Δεν θα έχετε κανένα δικαίωμα σε οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία προκύψει από αυτό το πρόγραμμα. Τα δείγματα θα χρησιμοποιηθούν μόνο για ερευνητικούς σκοπούς και δεν θα πωληθούν.

Εμπιστευτικότητα των πληροφοριών που θα συλλεχθούν

Προσωπικές πληροφορίες που αφορούν στον συμμετέχοντα και σχετίζονται με αυτούς τους ελέγχους θα φυλάσσονται και θα αρχειοθετούνται σύμφωνα με τις αρχές της προστασίας των δεδομένων. Θα

καταβάλλεται κάθε δυνατή προσπάθεια για να διασφαλιστεί ότι τα αποτελέσματα των ελέγχων σας δεν θα δοθούν σε κανέναν, με την εξαίρεση των ατόμων εκείνων που περιγράφονται σε αυτήν την ενότητα.

Τα αποτελέσματα του ελέγχου που σας αφορούν προορίζονται μόνο για ερευνητικούς σκοπούς. Δεν θα σας δοθεί αντίγραφο των αποτελεσμάτων του ελέγχου που σας αφορούν παρά μόνο εάν εσείς το ζητήσετε εγγράφως από τον υπεύθυνο ερευνητή. Τα αποτελέσματα του ελέγχου δεν θα δοθούν σε οποιαδήποτε ασφαλιστική εταιρεία, στον εργοδότη σας, στην οικογένειά σας, στον γιατρό σας ή σε οποιονδήποτε άλλον γιατρό. Τα αποτελέσματα του ελέγχου δεν προορίζονται για προσωπική σας χρήση (π.χ. λήψη αποφάσεων σχετικά με την ιατρική φροντίδα σας). Θεωρούμε, επίσης, ότι καθώς τα ευρήματα είναι γενικής επιστημονικής φύσεως, δεν θα έχουν καμία προσωπική σημασία για εσάς ή για τους συγγενείς σας.

Οι ερευνητές καθώς και το προσωπικό των Αρμόδιων Αρχών ή της Επιτροπής Δεοντολογίας, θα χρειάζεται να έχουν πρόσβαση στον ιατρικό σας φάκελο για να διασφαλίζουν ότι η μελέτη διεξάγεται με ορθό τρόπο και ότι τα συλλεχθέντα δεδομένα είναι σωστά. Τα προσωπικά σας δεδομένα θα γίνονται σεβαστά.

Όλες οι πληροφορίες που συλλέγονται από εσάς, συμπεριλαμβανομένων των δειγμάτων, θα ταυτοποιούνται με ένα αριθμό, για να διασφαλίζεται ότι η ταυτότητά σας θα τηρείται εμπιστευτική. Μόνο ο γιατρός σας και άλλο εξουσιοδοτημένο προσωπικό θα έχει τις πληροφορίες που επιτρέπουν τη σύνδεση του αριθμού με το όνομά σας. Οι πληροφορίες αυτές θα φυλάσσονται για το ίδιο χρονικό διάστημα για το οποίο θα φυλάσσονται και οι πληροφορίες της μελέτης από τον γιατρό / το νοσοκομείο / εμάς.

Τα δεδομένα και τα ιατρικά ευρήματα που καταγράφονται κατά τη διάρκεια αυτού του ελέγχου θα συγκεντρώνονται σε ένα ηλεκτρονικό σύστημα δεδομένων και θα υποβάλλονται σε στατιστική αξιολόγηση. Κατά την ολοκλήρωση του ελέγχου, τα δεδομένα θα φυλάσσονται και θα αρχειοθετούνται με εμπιστευτικό τρόπο σύμφωνα με τις ισχύουσες εκείνη τη στιγμή κατευθυντήριες οδηγίες. Τα αποτελέσματα μπορεί επίσης να δημοσιευθούν σε επιστημονικά άρθρα. Δεν θα αναφέρεστε ονομαστικά σε οποιαδήποτε αναφορά/δημοσίευση.

Πληροφορίες σχετικά με την επιλογή σας να συμμετάσχετε

Η απόφασή σας να συμμετέχετε σε αυτό το πρόγραμμα είναι πλήρως εθελοντική. Εάν αποφασίσετε να μη συμμετέχετε, δεν θα υπάρξει καμία κύρωση ή απώλεια παροχών. Εάν αποφασίσετε να συμμετέχετε, μπορείτε να αλλάξετε γνώμη σε οποιαδήποτε στιγμή, χωρίς να επηρεαστούν η ιατρική σας φροντίδα ή τα νόμιμα δικαιώματά σας. Στην περίπτωση αυτή, δεν πρόκειται να συλλεχθεί καμία νέα πληροφορία για εσάς.

Εάν αποφασίσετε να συμμετέχετε στο ερευνητικό αυτό πρόγραμμα της Παν/κής Παθολογικής-Ογκολογικής Κλινικής, θα σας ζητηθεί να υπογράψετε ένα έντυπο συγκατάθεσης και θα σας δοθεί ένα αντίγραφο αυτού

του φύλλου ενημέρωσης και του υπογεγραμμένου εντύπου συγκατάθεσης. Θα σας δοθούν επίσης τα στοιχεία επικοινωνίας με τον γιατρό σας / εμάς. Θα πρέπει να τα έχετε μαζί σας συνέχεια.

Εάν έχετε ερωτήσεις σχετικά με το ερευνητικό πρόγραμμα ή με τα δικαιώματά σας παρακαλείστε να επικοινωνήσετε με τον θεράποντα γιατρό σας ή με το ιατρικό προσωπικό της Κλινικής. Σας παροτρύνουμε να κάνετε όποιες και όσες ερωτήσεις θέλετε, προκειμένου να μπορέσετε να αποφασίσετε εάν επιθυμείτε να συμμετάσχετε ή όχι.

Στοιχεία Επικοινωνίας

Ο γιατρός / οι γιατροί είναι:

Όνομα:

Τίτλος:

Σχέση με το Νοσοκομείο:

Διεύθυνση:

Αριθμός τηλεφώνου επικοινωνίας:

ΕΝΤΥΠΟ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ

- Επιβεβαιώνω ότι έχω διαβάσει το φύλλο ενημέρωσης για το ερευνητικό πρόγραμμα CATCH-U-DNA της Παθολογικής-Ογκολογικής Κλινικής του ΠΝΗ το οποίο μου έχει επεξηγηθεί επαρκώς και ότι είχα την ευκαιρία να κάνω ερωτήσεις.
- Είχα την ευκαιρία να συζητήσω το πρόγραμμα αυτό με ένα γιατρό / τον κ. _____

Έχω ενημερωθεί σχετικά με τα ακόλουθα:

- Η απόφασή μου να συμμετάσχω είναι πλήρως εθελοντική. Είμαι ελεύθερος/η να αλλάξω γνώμη / να αποσυρθώ σε οποιαδήποτε στιγμή, χωρίς να επηρεαστούν η ιατρική μου φροντίδα ή τα νόμιμα δικαιώματά μου.
- Τα αρχεία των εργαστηριακών μελετών και ο ιατρικός μου φάκελος μπορεί να επιθεωρηθούν από προσωπικό της μελέτης ή από εξουσιοδοτημένους εκπροσώπους τους, από τις Αρμόδιες Αρχές ή από την Επιτροπή Δεοντολογίας, όπου κάτι τέτοιο είναι σχετικό με τη συμμετοχή μου στη μελέτη. Δίνω την άδεια σε αυτά τα άτομα να έχουν άμεση πρόσβαση στον ιατρικό μου φάκελο και κατανοώ ότι τέτοιες πληροφορίες θα αντιμετωπίζονται ως εμπιστευτικές.
- Γνωρίζω ότι δεν θα λάβω τα αποτελέσματα των αναλύσεων που θα πραγματοποιηθούν στο πλαίσιο διαφόρων μελετών του προγράμματος έρευνας.

Εάν απαιτείται από τη τοπική νομοθεσία:

- Γνωρίζω ότι κανονικά δεν θα λάβω τα αποτελέσματα των γενομένων αναλύσεων σε βιολογικά μου υλικά, εκτός εάν τα ζητήσω συγκεκριμένα.
- Αποποιούμαι δια της παρούσης όλων των δικαιωμάτων μου σχετικά με τα ευρήματα του ελέγχου και αντίστοιχα δεν έχω δικαίωμα σε κανένα οικονομικό έσοδο στη βάση των ευρημάτων του ελέγχου.

	Συμφωνώ	Διαφωνώ
--	---------	---------

Συμφωνώ για την επεξεργασία και αποθήκευση των πληροφοριών σε κωδικοποιημένη μορφή, ώστε η ταυτότητά μου να διατηρείται εμπιστευτική.	Ναι <input type="checkbox"/>	
Συμφωνώ με τη μεταβίβαση των πληροφοριών εκτός της Ε.Ε. και κατανοώ ότι η ταυτότητά μου θα διατηρείται εμπιστευτική.	Ναι <input type="checkbox"/>	

Συμφωνώ να συμμετέχω στο ερευνητικό πρόγραμμα CATCH-U-DNA της Παθολογικής-Ογκολογικής Κλινικής του ΠΝΗ.

Ασθενής:

Όνοματεπώνυμο (με κεφαλαία) _____

Υπογραφή _____

Ημερομηνία _____

Εξουσιοδοτημένος Εκπρόσωπος Γιατρού/Ερευνητή

- Έχω εξηγήσει στον/ην ασθενή (και σε άλλους, όπου έχει εφαρμογή) και συζητήσει μαζί του τη φύση, τον σκοπό, τις απαιτήσεις του ερευνητικού προγράμματος OncoSeed της Παν/κής Παθολογικής-ογκολογικής Κλινικής του ΠΑΓΝΗ.
- Θα διασφαλίσω ότι ένα αντίγραφο αυτού του Φύλλου Ενημέρωσης / Εντύπου Συγκατάθεσης μετά από Ενημέρωση θα δοθεί στον εθελοντή.
- Ο/Η ασθενής δεν έχει υποβληθεί σε οποιαδήποτε ειδική για τη μελέτη διαδικασία, εκτός από τις διαδικασίες που πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο της συνήθους φροντίδας στο κέντρο και ανεξάρτητα από τη συμμετοχή του στη μελέτη.

Όνοματεπώνυμο (με κεφαλαία) _____

Υπογραφή: _____

Ημερομηνία _____

Άλλο Άτομο που Παρέχει Πληροφορίες

Έχω συζητήσει τα περιεχόμενα του φύλλου ενημέρωσης με τον

Όνοματεπώνυμο (με κεφαλαία)

Υπογραφή

Ημερομηνία

Θα πρέπει να συμπληρωθεί από έναν αμερόληπτο μάρτυρα (όπως έχει εφαρμογή σύμφωνα με τη χώρα και τις απαιτήσεις των τοπικών ρυθμιστικών αρχών)

Επιβεβαιώνω ότι οι πληροφορίες στο φύλλο ενημέρωσης, καθώς και οποιαδήποτε άλλη γραπτή πληροφορία, επεξηγήθηκαν με ακρίβεια και κατά τα φαινόμενα έγιναν κατανοητές από τον εθελοντή ή τον νόμιμο εκπρόσωπό του, όπως επίσης και ότι η συγκατάθεση δόθηκε από τον ασθενή ή τον νόμιμο εκπρόσωπό του με την ελεύθερη βούλησή του.

Όνοματεπώνυμο (με κεφαλαία)

Υπογραφή Ημερομηνία

Θα πρέπει να συμπληρωθεί από τον νόμιμο εκπρόσωπο/κηδεμόνα/γονέα του ασθενή

Ο[όνομα εθελοντή] δεν είναι σε θέση να δώσει τη συγκατάθεσή του λόγω: _____.

Επιβεβαιώνω ότι έχω λάβει γραπτή ενημέρωση και ότι συμφωνώ με τη συμμετοχή του[όνομα ασθενούς] στη μελέτη, καθώς είναι πεποίθησή μου ότι αυτή θα ήταν η επιθυμία του. Κατανοώ ότι εάν ο[όνομα ασθενούς] εκφράσει διαφορετική άποψη, θα αποσυρθεί από τη μελέτη χωρίς καμία αρνητική συνέπεια για τον ίδιο.

Όνοματεπώνυμο (με κεφαλαία)

Υπογραφή Ημερομηνία

Δυνατότητα για παροχή συγκατάθεσης: