



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
Ογκολογία: από την Ογκογένεση έως τη Θεραπεία



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

---

Μελέτη των μηχανισμών αλληλεπίδρασης της κυτταρικής απόκρισης  
στη βλάβη του DNA και του ανοσοποιητικού συστήματος στην  
ανοσοθεραπεία του καρκίνου κεφαλής και τραχήλου.

---

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Δρ. Σουλιώτης Λ. Βασίλης, Διευθυντής Ερευνών

ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

1140052

ΑΘΗΝΑ, 2021



UNIVERSITY OF CRETE  
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY  
NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION  
INSTITUTE OF CHEMICAL BIOLOGY



INTERINSTITUTIONAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES  
IN  
ONCOLOGY



MASTER THESIS

---

The interplay between the DNA Damage Response network and the  
immune system in immunotherapy of head and neck cancer

---

SUPERVISOR: Dr. Souliotis L. Vassilis, Research Director

PAPANIKOLAOU CHRISTINA

1140052

ATHENS, 2021

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης που απονέμει το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Εγκρίθηκε από τη κάτωθι τριμελή εξεταστική επιτροπή:

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

#### **ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ**

#### **ΒΑΘΜΙΔΑ**

Δρ. Σουλιώτης Λ. Βασίλης

Διευθυντής Ερευνών

Δρ. Στέλλας Δημήτριος

Εντεταλμένος Ερευνητής

Καθ. Ψυρρή Αμάντα

Καθηγήτρια Ογκολογίας, Διευθύντρια  
Β' Προπαιδευτικής Παθολογικής Κλινικής  
Πανεπιστημίου Αθηνών

## Ευχαριστίες

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Σουλιώτη, επιβλέπων της παρούσας πτυχιακής, για την εμπιστοσύνη και τη δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετέχω στην παρούσα μελέτη, καθώς επίσης για την καθοδήγηση, την υπομονή και την στήριξη που έδειξε και συνεχίζει να δείχνει στο πρόσωπο μου, συμβάλλοντας τα μέγιστα στο να διαμορφώσει τον τρόπο σκέψης και κρίσης μου.

Επίσης, ευχαριστώ τον κ. Στέλλα, για τη συμμετοχή του στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας, που συνέβαλε με τις γνώσεις και την εμπειρία του στην επίλυση τυχών αποριών και τεχνικών προβλημάτων που συναντήσαμε.

Ακόμα, ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα. Ψυρρή, για την εμπιστοσύνη της και την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω και να υλοποιήσω την παρούσα μελέτη, τη στήριξη και ενθάρρυνση της όλο αυτό το διάστημα και για την άψογη συνεργασία.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα παιδιά του εργαστήριου, τόσο για τη βοήθεια τους στα πειράματα, τις επιστημονικές αλλά και χαλαρές συζητήσεις, τα γέλια, καθώς και για όλη την υποστήριξη.

Στο σημείο αυτό θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την οικογένεια μου, που είναι δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια που σπούδαζα και συνεχίζω να σπουδάζω, ήταν και είναι πάντα στο πλευρό μου και μου έμαθαν πως να αντεπεξέρχομαι σε οποιαδήποτε δυσκολία συναντώ.

## Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT.....	8
ΣΚΟΠΟΣ.....	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 Καρκίνος κεφαλής και τραχήλου .....	10
1.2 Μετάσταση.....	12
1.3 Ανοσοθεραπεία στον HNSCC.....	13
1.4 Δίκτυο απόκρισης στην βλάβη του DNA (DDR) .....	14
1.5 Μηχανισμοί Επιδιόρθωσης του DNA.....	17
1.6 Οξειδωτικό στρες .....	20
1.7 Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί .....	21
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	23
2.1 Ασθενείς .....	23
2.2 Απομόνωση των PBMCs.....	23
2.3 Οξειδωτικό στρες και AP (απουρινικές/απυριμιδικές) θέσεις.....	23
2.4 Ηλεκτροφόρηση Μοναδιαίων Κυττάρων υπό Αλκαλικές Συνθήκες [μονόκλωνα (SSBs) και/ή δίκλωνα (DSBs) DNA θραύσματα] – Alkaline Comet Assay .....	24
2.5 Ικανότητα Επιδιόρθωσης του DNA με Εκτομή Νουκλεοτιδίων (NER).....	24
2.6 Ικανότητα Επιδιόρθωσης Δίκλωνων Θραυσμάτων DNA (DSB/R).....	24
2.7 Μέτρηση Αποπτωτικής Ικανότητας .....	25
2.8 Στατιστική Ανάλυση .....	25
3. Αποτελέσματα.....	26
3.1 Παράμετροι που σχετίζονται με το DDR μεταξύ ασθενών με HNSCC και υγιών μαρτύρων (HC).....	26
3.2 Ασθενείς με HNSCC: Συσχετισμός των παραμέτρων DDR με τους δείκτες απόκρισης στη θεραπεία με βάση το Nivolumab.....	33
4. Συζήτηση.....	44
Βιβλιογραφία .....	49

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Επιστημονικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι η ενεργοποίηση του δικτύου απόκρισης στη βλάβη του DNA (DDR) επηρεάζει πολλαπλές πτυχές του ανοσοποιητικού συστήματος. Στη παρούσα μελέτη εξετάζουμε την υπόθεση ότι οι αλλαγές που σχετίζονται με το DDR και οι οποίες μετρήθηκαν σε μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) από ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου (HNSCC), σχετίζονται με το θεραπευτικό αποτέλεσμα της αναστολής των σημείου ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος. Το οξειδωτικό στρες, οι ενδογενείς βλάβες του DNA [μονόκλωνα (SSBs) και δίκλωνα θραύσματα του DNA (DSBs)], οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του DNA [επιδιόρθωση εκτομής νουκλεοτιδίων (NER) και επιδιόρθωση δίκλωνων θραυσμάτων DNA (DSB/R)] και η απόπτωση αξιολογήθηκαν σε PBMCs 26 υγιών μαρτύρων (ΥΜ) και 50 ασθενών με υποτροπιάζοντα ή μεταστατικό καρκίνο κεφαλής και τραχήλου οι οποίοι συμμετείχαν σε κλινική δοκιμή φάσης II με Nivolumab (anti-PD-1, NCT03652142). Η αιμοληψία και η απομόνωση των PBMCs πραγματοποιήθηκαν κατά την έναρξη της θεραπείας με Nivolumab, μετά από 4 εβδομάδες θεραπείας με Nivolumab και έπειτα από την εξέλιξη της νόσου. Σύμφωνα και με προηγούμενα ευρήματα του εργαστηρίου μας, επαληθεύτηκε ότι τα PBMCs από ασθενείς κατά την έναρξη της θεραπείας έδειξαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ενδογενούς βλάβης του DNA σε σύγκριση με τους ΥΜ. Είναι ενδιαφέρον ότι χρησιμοποιώντας ηλεκτροφόρηση μοναδιαίων κυττάρων υπό αλκαλικές συνθήκες [SSBs±DSBs], βρήκαμε ότι χαμηλότερη ενδογενής βλάβη του DNA συσχετίστηκε με μεγαλύτερη συνολική επιβίωση [Overall Survival (OS),  $P=0,002$ ], υψηλότερη πιθανότητα απόκρισης στη θεραπεία ( $P=0,03$ ) και μεγαλύτερο κλινικό όφελος από το Nivolumab ( $P=0,015$ ). Αυτά τα αποτελέσματα επικυρώθηκαν χρησιμοποιώντας χρώση ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση του γH2AX (δείκτης DSBs). Πράγματι, διαπιστώσαμε ότι μικρότερο φορτίο DSBs κατά την έναρξη της θεραπείας συσχετίστηκε επίσης με στατιστικά σημαντική βελτίωση των OS, υψηλότερη πιθανότητα ανταπόκρισης στη συγκεκριμένη θεραπεία και μεγαλύτερο κλινικό όφελος (όλα  $P<0,002$ ). Επιπλέον, τα PBMC των ασθενών που εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα οξειδωτικού στρες συσχετίστηκαν με μεγαλύτερο κλινικό όφελος ( $P=0,011$ ). Άξιο αναφοράς είναι πως οι χαμηλότερες ικανότητες επιδιόρθωσης NER και DSB των PBMCs των ασθενών συσχετίστηκαν με καλύτερο OS, υψηλότερη πιθανότητα ανταπόκρισης και μεγαλύτερο κλινικό όφελος (όλα  $P<0,004$ ).

Συμπερασματικά, τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες και οι αλλαγές που σχετίζονται με το DDR και οι οποίες μετρήθηκαν σε PBMC από ασθενείς με HNSCC, συσχετίστηκαν με την ανταπόκριση στη θεραπεία με αναστολείς σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος, PD-1. Αυτά τα αποτελέσματα αποτελούν απόδειξη πως οι αλλαγές στο DDR θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως πιθανός μη επεμβατικός βιοδείκτης για την επιλογή ασθενών με HNSCC για θεραπεία με anti-PD-1 αναστολείς σημείου ελέγχου.

**ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ: DDR, HNSCC, Immunotherapy, Oxidative Stress.**

## **ABSTRACT**

PD-1 checkpoint inhibitors are effective against tumors with DNA mismatch repair deficiencies. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) patients, exhibit altered DDR-related parameters and greater levels of oxidative stress upon diagnosis than healthy persons, as we have previously demonstrated. In this study, we tested the hypothesis that abnormalities in the DDR signals of patients' PBMCs could predict the therapeutic effect of PD-1 checkpoint blockage in HNSCC. In PBMCs from 50 recurrent/metastatic HNSCC patients who took part in a phase II Nivolumab trial (NCT03652142), endogenous DNA damage, oxidative stress, and basal DNA repair mechanisms, including nucleotide excision repair (NER) and double-strand breaks (DSBs) repair, were assessed, along with 26 healthy controls (HC). PBMCs were collected at the beginning of the treatment, 4 weeks later, and at the point of progression. According to our prior research, we confirmed that baseline endogenous DNA damage levels in PBMCs from patients were considerably greater than those in HC. Interestingly, we discovered that reduced endogenous DNA damage correlated with longer PFS (Progression Free Survival;  $P=0.006$ ), OS (Overall Survival;  $P=0.002$ ), and better likelihood for response ( $P=0.03$ ) and clinical benefit with nivolumab ( $P=0.015$ ) when employing alkaline comet assay detecting single-strand breaks and/or double-strand breaks. DSBs were assessed using  $\gamma$ H2AX immunofluorescence staining to validate these findings. As a matter of fact, we found that decreased DSBs load at baseline also correlated with statistically significant improvements in PFS and OS as well as a better likelihood of response and clinical benefit (all  $P<0.002$ ). Additionally, PBMCs with lower levels of oxidative stress were linked to better clinical outcomes ( $P=0.011$ ). Also, decreased NER and DSB repair capacities of patients' PBMCs correlated with improved PFS and OS, as well as a higher likelihood of response and clinical benefit (all  $P<0.004$ ). Taken together, the response to PD-1 immune checkpoint inhibitor therapy was linked with oxidative stress and DDR-related abnormalities observed in PBMCs from HNSCC patients. These findings demonstrate the potential non-invasive biomarker application of DDR-based assessments in selecting HNSCC patients for PD-1 checkpoint inhibitor therapy.

**KEY WORDS: DDR, HNSCC, Immunotherapy, Oxidative Stress.**



## ΣΚΟΠΟΣ

Μονοπύρηννα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) από ασθενείς με υποτροπιάζοντα/μεταστατικό καρκίνο κεφαλής και τραχήλου (HNSCC), που λαμβάνονται πριν και κατά τη διάρκεια της θεραπείας με Nivolumab σε κλινική δοκιμή φάσης II (NCT03652142), χρησιμοποιήθηκαν για τον *in vivo* συστηματικό χαρακτηρισμό των επιδράσεων του Nivolumab σε βασικά μονοπάτια και μοριακούς δείκτες που σχετίζονται με τη σηματοδότηση του δικτύου κυτταρικής απόκρισης στη βλάβη του DNA (DDR) και το οξειδωτικό στρες. Δεδομένης της αλληλεπίδρασης μεταξύ του δικτύου DDR και του ανοσοποιητικού συστήματος, δοκιμάσαμε την υπόθεση ότι οι αλλαγές που καταγράφονται στο DDR ασθενών με HNSCC πριν την έναρξη της θεραπείας μπορούν να συσχετιστούν με το θεραπευτικό όφελος. Τα αποτελέσματα της μελέτης στοχεύουν στον εντοπισμό νέων θεραπευτικών στόχων και προβλεπτικών βιοδεικτών για την επιλογή των ασθενών με HNSCC που είναι πιθανό να επωφεληθούν από την θεραπεία με Nivolumab.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Καρκίνος κεφαλής και τραχήλου

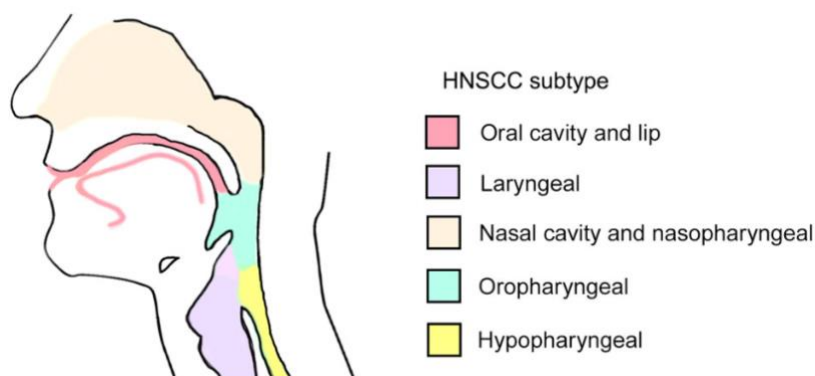
Τα καρκινώματα πλακωδών κυττάρων κεφαλής και τραχήλου (HNSCCs), είναι ο έκτος πιο συχνός καρκίνος παγκοσμίως, με 890.000 νέες περιπτώσεις και 450.000 θανάτους το 2018. Η επίπτωση του HNSCC συνεχίζει να αυξάνεται και αναμένεται να αυξηθεί κατά 30% (δηλαδή, 1,08 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις ετησίως) έως το 2030 (Ferlay et al., 2019; Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2018). Αναπτύσσονται στο βλεννογόνο επιθήλιο της στοματικής κοιλότητας, του φάρυγγα και του λάρυγγα και είναι οι πιο συχνές κακοήθειες που εμφανίζονται στην κεφαλή και τον τράχηλο. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποκαλύψει ένα ευρύ φάσμα παραγόντων κινδύνου για HNSCC, που έχει ταξινομηθεί από τον Διεθνή Οργανισμό Έρευνας για τον Καρκίνο (IARC) του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ). Αυτοί οι παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν το κάπνισμα, την κατανάλωση αλκοόλ, την έκθεση σε περιβαλλοντικούς ρύπους και τις ιικές μολύνσεις. Όλο και περισσότερο, οι όγκοι που εμφανίζονται στον στοματοφάρυγγα συνδέονται με προηγούμενη μόλυνση από ογκογόνα στελέχη του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV), κυρίως του στελέχους HPV-16, και, σε μικρότερο βαθμό, με το στέλεχος HPV-18 (Stein et al., 2015; Isayeva et al., 2012). Οι πιο συνηθισμένοι ογκογόνοι HPV ιοί, οι HPV-16 και HPV-18, καλύπτονται από εγκεκριμένα εμβόλια, καθιστώντας εφικτή την πρόληψη από HPV-θετικό HNSCC.

Ωστόσο, HNSCC της στοματικής κοιλότητας και του λάρυγγα εξακολουθούν να σχετίζονται κυρίως με το κάπνισμα και καταγράφονται στην βιβλιογραφία ως HPV-αρνητικά HNSCC. Το κάπνισμα και η κατανάλωση αλκοόλ είναι παράγοντες υψηλού κινδύνου που εμφανίζονται ευρύτερα γεωγραφικά. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι χρόνιοι χρήστες και των δύο ουσιών έχουν >35 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης HNSCC (Blot et al., 1988). Η επίδραση των ηλεκτρονικών τσιγάρων στον κίνδυνο εμφάνισης HNSCC παραμένει άγνωστη και θα είναι εμφανής μόνο τις επόμενες δεκαετίες. Επιπλέον, η έκθεση σε καρκινογόνους ατμοσφαιρικούς ρύπους, συμπεριλαμβανομένων οργανικών και ανόργανων χημικών ουσιών, καθώς και σε σωματίδια, αποτελεί παράγοντα κινδύνου για HNSCC, ειδικά σε

αναπτυσσόμενες χώρες/περιοχές με επιδείνωση της ατμοσφαιρικής ρύπανσης, όπως η Ινδία και η Κίνα (Wong et al., 2014). Άλλοι παράγοντες κινδύνου συμπεριλαμβάνουν τη γήρανση και την κακή στοματική υγιεινή (Guha et al., 2007).

Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως γενετικοί παράγοντες συμβάλλουν επίσης στον κίνδυνο εμφάνισης HNSCC. Τα άτομα με Fanconi αναιμία (FA), μια σπάνια, κληρονομική γενετική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από μειωμένη επιδιόρθωση του DNA (λόγω μεταλλάξεων σε οποιοδήποτε από τα 22 γονίδια FANC), έχουν 500-700 φορές αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης HNSCC (Velleuer et al., 2014), με τους μηχανισμούς που ευθύνονται για τη ροπή αυτών των ασθενών να αναπτύξουν HNSCC να παραμένουν άγνωστοι.

Το HNSCC της στοματικής κοιλότητας γενικά αντιμετωπίζεται με χειρουργική εκτομή, ακολουθούμενη από επικουρική ακτινοβολία ή χημειοθεραπεία μαζί με ακτινοβολία (γνωστή ως χημειοακτινοβολία ή CRT) ανάλογα με το στάδιο της νόσου. Η CRT είναι η κύρια προσέγγιση για τη θεραπεία καρκίνων που εμφανίζονται στον φάρυγγα ή τον λάρυγγα. Το HPV-θετικό HNSCC, γενικά, έχει πιο ευνοϊκή πρόγνωση από το HPV-αρνητικό HNSCC. Με εξαίρεση τους καρκίνους της στοματικής κοιλότητας πρώιμου σταδίου (που αντιμετωπίζονται μόνο με χειρουργική επέμβαση) ή τους καρκίνους του λάρυγγα (που επιδέχονται χειρουργική επέμβαση ή ακτινοβολία μόνο), η θεραπεία της πλειονότητας των περιπτώσεων HNSCC απαιτεί πολυτροπικές προσεγγίσεις και συνεπώς πολυεπιστημονική φροντίδα. Το μονοκλωνικό αντίσωμα του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR, γνωστό και ως HER1) είναι εγκεκριμένο από τον FDA ως ευαισθητοποιητής ακτινοβολίας, μόνο του ή σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία, για υποτροπιάζουσες ή μεταστατικές ασθένειες (Bonner et al., 2006). Αν και είναι κατώτερο από τη σισπλατίνη ως ραδιοευαισθητοποιητή στη νόσο που σχετίζεται με τον HPV, το Cetuximab χρησιμοποιείται συχνά σε ασθενείς που δεν είναι κατάλληλοι για σισπλατίνη (Gillison et al., 2019). Οι αναστολείς σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος, Pembrolizumab και Nivolumab έχουν εγκριθεί από τον FDA για τη θεραπεία του υποτροπιάζοντος ή μεταστατικού HNSCC ανθεκτικού στη σισπλατίνη και το Pembrolizumab έχει εγκριθεί ως θεραπεία πρώτης γραμμής για ασθενείς που παρουσιάζουν ανεγχείρητη ή μεταστατική νόσο (Ferris et al., 2016).



Εικόνα 1: Υπότυποι HNSCC με βάση την ανατομική τους εντόπιση (Adapted from Shin et al., 2020)

## 1.2 Μετάσταση

Πολλοί παράγοντες και μοριακά μονοπάτια συμβάλλουν στη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων HNSCC. Οι MMPs (Matrix Metallo Proteinases), που παράγονται τόσο από κύτταρα όγκου όσο και από στρωματικά κύτταρα στο μικροπεριβάλλον του όγκου (TME), παίζουν σημαντικό ρόλο στην υποβάθμιση και την αναδιαμόρφωση του ECM (extracellular matrix), προάγοντας έτσι την εισβολή των καρκινικών κυττάρων. Τα υψηλά επίπεδα MMP2, MMP9 και MMP13 σε όγκους HNSCC σχετίζονται με διήθηση, μετάσταση και κακή πρόγνωση (Viros et al., 2013). Τα CD44 και MMP9 συνεντοπίζονται στο διηθητικό μέτωπο των όγκων HNSCC και τα επίπεδα έκφρασής τους συσχετίζονται με τη μετάσταση (Viros et al., 2013).

Η επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT, η μετατροπή των καρκινικών κυττάρων από επιθηλιακό σε μεσεγχυματικό φαινότυπο) έχει βασικό ρόλο στη μετάσταση του HNSCC. Τα κύτταρα που υποβάλλονται σε EMT παρουσιάζουν αρνητική ρύθμιση της E-καντερίνης, ανοδική ρύθμιση της βιμεντίνης, μείωση της κυτταρικής προσκόλλησης και ενισχυμένη μετανάστευση και διεισδυτικότητα. Οι αλλαγές που σχετίζονται με την EMT στα επίπεδα της E-καντερίνης και της βιμεντίνης σχετίζονται με αυξημένη μετάσταση όγκων HNSCC (Peltanova et al., 2019). Οι μεταγραφικοί παράγοντες TWIST, SNAIL και SLUG μεσολαβούν στη μείωση της ρύθμισης της E-καντερίνης κατά τη διάρκεια της EMT, με τη συνέκφραση των TWIST, SNAIL και HIF1α να συσχετίζεται με υψηλά ποσοστά μετάστασης HNSCC (Yang et al., 2008). Οι υποξικές συνθήκες στο TME μπορούν να οδηγήσουν την EMT σε κύτταρα

όγκου, καθώς το HIF1α επάγει την έκφραση της βιμεντίνης, του TWIST και του SNAIL (Peltanova et al., 2019), εξηγώντας τη συσχέτιση των αυξημένων επιπέδων υποξίας με τη μετάσταση του HNSCC (Swartz et al., 2016). Η διαδικασία της EMT συνδέεται επίσης στενά με την απόκτηση ιδιοτήτων βλαστοκυττάρων (Zhang et al., 2012).

Η ικανότητα μετάστασης των καρκινικών κυττάρων HNSCC απαιτεί επίσης την ικανότητα αποκόλλησης από τη βασική μεμβράνη και τα σχετικά συστατικά της ECM. Τυπικά, όταν τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα αποσπώνται, χάνουν την πρόσβαση σε βασικούς παράγοντες επιβίωσης και υφίστανται μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Nirmala et al., 2020). Η μετάσταση εξαρτάται από την καταστολή ή την επίκτητη αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο. Οι αυξητικοί παράγοντες και οι κυτοκίνες στο TME, ιδιαίτερα οι IL-6, EGF και HGF, ενεργοποιούν τις οδούς σηματοδότησης των καρκινικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των οδών RAS–MAPK, PI3K–AKT–mTOR και STAT3, οι οποίες καταστέλλουν τον κυτταρικό θάνατο (Peltanova et al., 2019). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι κατασταλτικοί παράγοντες του κυτταρικού θανάτου στο TME προέρχονται από CAFs, ενδοθηλιακά κύτταρα, διεισδυτικά ανοσοκύτταρα και τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα (Peltanova et al., 2019), υπογραμμίζοντας τη σύνθετη διασταύρωση μεταξύ διαφορετικών τύπων κυττάρων που συμβάλλουν στη μετάσταση στο HNSCC.

### **1.3 Ανοσοθεραπεία στον HNSCC**

Ασθενείς με υποτροπιάζοντα ή μεταστατικό HNSCC, μπορεί να θεραπευτούν με χειρουργική εκτομή διάσωσης, επανακτινοβολήση (ιδιαίτερα για καρκίνο του ρινοφάρυγγα) ή μεταστατεκτομή (ιδιαίτερα για HPV-θετικό καρκίνο) (Fakhry et al., 2014). Οι υπόλοιποι ασθενείς εξετάζονται για συστηματική θεραπεία. Η θεραπεία πρώτης γραμμής περιλαμβάνει τον αναστολέα σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος Pembrolizumab (PD-1), για ασθενείς με όγκους που εκφράζουν PD-L1 ή μικροδορυφορική αστάθεια, εκτός εάν υπάρχει αντένδειξη για ανοσοθεραπεία λόγω υποκείμενης αυτοάνοσης διαταραχής. Μια κλινική δοκιμή φάσης III συνέκρινε τη μονοθεραπεία με Pembrolizumab ή τον συνδυασμό Pembrolizumab με 5-fluorouracil ή 5-fluorouracil με Cetuximab (Burtness et al., 2019). Ο συνδυασμός χημειοθεραπείας και Pembrolizumab βελτίωσε τη συνολική επιβίωση σε σύγκριση με το συνδυασμό χημειοθεραπείας και

Cetuximab, με συγκρίσιμα αποτελέσματα ανταπόκρισης και τοξικότητας. Το Pembrolizumab μόνο του δεν ήταν κατώτερο από τη συνδυασμένη χημειοθεραπεία με Cetuximab σε όλους τους ασθενείς με HNSCC. Μεταξύ ασθενών με έκφραση του βιοδείκτη PD-L1 [που ορίζεται ως συνδυασμένη θετική βαθμολογία (CPS)  $\geq 20$  ή  $\geq 1$ , όπου το CPS αντικατοπτρίζει όλα τα καρκινικά κύτταρα, τα μακροφάγα και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού που εκφράζουν PDL1 ως αναλογία του συνολικού αριθμού των κυττάρων του όγκου που μετρήθηκαν], η ολική επιβίωση ήταν ανώτερη για τη μονοθεραπεία με Pembrolizumab έναντι του συνδυασμού χημειοθεραπείας και Cetuximab (14,9 έναντι 12,3 μηνών, αντίστοιχα). Ωστόσο, το ποσοστό ανταπόκρισης ήταν υψηλότερο για τον συνδυασμό χημειοθεραπείας. Μια μειοψηφία ασθενών με HNSCC που λαμβάνουν θεραπεία με αναστολείς σημείου ελέγχου του ανοσοποιητικού μπορεί να παρουσιάσουν επιταχυνόμενη εξέλιξη της νόσου, που συχνά ονομάζεται Hyperprogression disease (HPD) (Saada-Bouzid et al., 2017). Η HPD είναι πιο πιθανή για HPV-αρνητική νόσο, ογκώδη τοπική ή περιφερειακή υποτροπή και όταν χρησιμοποιείται ανοσοθεραπεία χωρίς χημειοθεραπεία. Αν και η HPD σχετίζεται με χειρότερη έκβαση, ακόμη και ανθεκτικές αποκρίσεις στη χημειοθεραπεία μπορούν να παρατηρηθούν σε αυτό το πλαίσιο και η επαγρύπνηση και η ταχεία αλλαγή στη θεραπεία είναι σημαντικές για τη μεγιστοποίηση του ελέγχου της νόσου (Seleh et al., 2019). Για ασθενείς που εμφανίζουν ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό, όπως πνευμονίτιδα, κολίτιδα ή τραυματισμό άλλου οργάνου, ενδείκνυται η διακοπή της θεραπείας και τα συστηματικά κορτικοστεροειδή (Puzanov et al., 2017).

#### **1.4 Δίκτυο απόκρισης στην βλάβη του DNA (DDR)**

Το ανθρώπινο γονιδίωμα υπόκειται συνεχώς σε βλάβες από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες (Tubbs et al., 2017). Στις εξωγενείς πηγές βλάβης του DNA περιλαμβάνονται περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως το υπεριώδες φως, η ιονίζουσα ακτινοβολία, οι χημικές ουσίες, οι τοξίνες και οι ρύποι, ενώ οι κύριες πηγές ενδογενούς βλάβης του DNA περιλαμβάνουν τις ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS), αλδεΐδες που προέρχονται από υπεροξείδωση των λιπιδίων, παράγοντες μεθυλίωσης και υδρολυτική απαμίνωση (De Bont et al., 2004). Ενδογενής βλάβη μπορεί επίσης να προκύψει λόγω γονοτοξικού στρες από κυτταρικές διεργασίες, όπως η μεταγραφή και η αντιγραφή (Tubbs et al., 2017).

Η προστασία έναντι αυτών των γονοτοξικών προσβολών διασφαλίζεται από το δίκτυο απόκρισης στη βλάβη του DNA (DDR) που ενεργοποιείται από την ανίχνευση αλλοιώσεων/βλαβών στο DNA (Pateras et al., 2015). Το επόμενο βήμα είναι η έναρξη ενός καταρράκτη μεταγωγής σήματος που περιλαμβάνει μόρια που ενεργοποιούν οδούς προστασίας του γονιδιώματος, όπως η επισκευή του DNA, ο έλεγχος του κυτταρικού κύκλου, η απόπτωση, η μεταγραφή και η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης. Η αποτυχία επιδιόρθωσης της βλάβης του DNA μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες γονιδιακές αλλοιώσεις, όπως σημειακές μεταλλάξεις, χρωμοσωμικές μεταθέσεις και αύξηση ή απώλεια χρωμοσωμικών τμημάτων ή ολόκληρων χρωμοσωμάτων (Burrell et al., 2013). Κάτω από ορισμένες συνθήκες, αυτές οι γονιδιακές εκτροπές προκαλούν αλλαγές στην κυτταρική φυσιολογία που οδηγούν στην καρκινογένεση (Jeggo et al., 2016). Εκτός από το ότι παίζει ουσιαστικό ρόλο στην καρκινογένεση, η απώλεια της επιδιόρθωσης του DNA έχει σημαντικές επιπτώσεις για την εξέλιξη του όγκου και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Τα κοινά χαρακτηριστικά του όγκου, συμπεριλαμβανομένων των υψηλών επιπέδων οξειδωτικού στρες, του αντιγραφικού στρες και της απώλειας σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, συμβάλλουν στη συσσώρευση βλάβης στο DNA (Srinivas et al., 2019). Εκτός από τα υψηλά επίπεδα ενδογενούς βλάβης του DNA, η λειτουργική απώλεια ενός ή περισσότερων μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA παρατηρείται συχνά στους συμπαγείς όγκους (Caccaldi et al., 2016). Λόγω των αυξημένων επιπέδων βλάβης του DNA και της ταυτόχρονης μειωμένης ικανότητας επιδιόρθωσης του DNA, τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα συσσωρεύουν πολυάριθμες γονιδιακές αλλοιώσεις που τα διαφοροποιούν από τα φυσιολογικά κύτταρα (Chakravarthi et al., 2016). Αν και μόνο ένα μικρό υποσύνολο αυτών των γενετικών αλλαγών μπορεί να ευθύνεται για την έναρξη της καρκινογένεσης, το συνολικό τοπίο των αλλαγών του DNA παρέχει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την κατάσταση βλάβης του DNA του όγκου και την ικανότητα επιδιόρθωσης και μπορεί να προσδώσει στον όγκο μοναδικά χαρακτηριστικά που έχουν τη δυνατότητα να αξιοποιηθούν θεραπευτικά. Είναι ενδιαφέρον ότι πρόσφατα δεδομένα έχουν δείξει ότι το δίκτυο DDR έχει σημαντικό αντίκτυπο στην αλληλεπίδραση μεταξύ του όγκου και του ανοσοποιητικού συστήματος.

Όπως προαναφέρθηκε, τυπική θεραπεία του HNSCC είναι συνδυασμός χειρουργικής επέμβασης, ακτινοθεραπείας και χημειοθεραπείας (Cooper et al., 2004). Η κυτταροτοξική

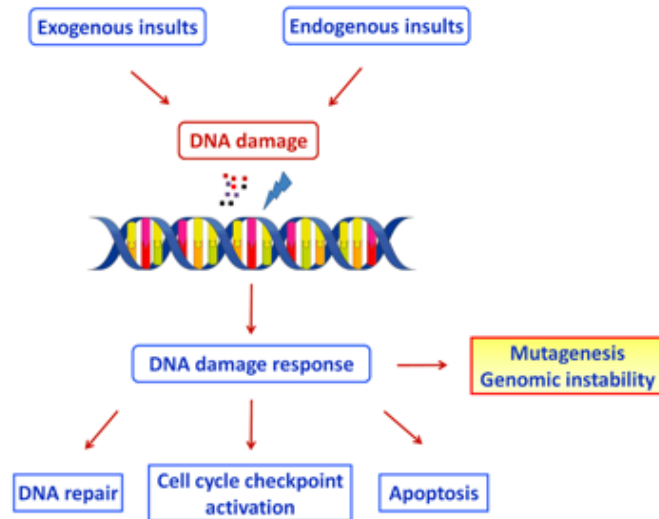
δράση της σισπλατίνης ασκείται μέσω της ανάπτυξης βλαβών DNA με το σχηματισμό διακλωνικών (interstrand) και ενδοκλωνικών (intrastrand) διασταυρούμενων δεσμών και της μονονουκλεοτιδικής βλάβης της γουανίνης. Ο μηχανισμός επιδιόρθωσης μέσω εκτομής νουκλεοτιδίων (NER) είναι η κύρια διαδικασία με την οποία επιδιορθώνονται οι εγκάρσιες συνδέσεις πλατίνας και η μονονουκλεοτιδική βλάβη της γουανίνης (Kartalou et al., 2001). Η επιδιόρθωση των ενδιάμεσων της επιδιόρθωσης απαιτεί συνδυασμό NER, του μονοπατιού της αναμιάς Fanconi, της σύνθεσης μετάθεσης και του ομόλογου ανασυνδυασμού. Είναι ενδιαφέρον ότι η επιδιόρθωση των διακλωνικών διασταυρούμενων δεσμών προχωρά μέσω του σχηματισμού θραύσεων διπλού κλώνου (DSBs), της πιο θανατηφόρας μορφής βλάβης του DNA (Chakraborty et al., 2016).

Η πολυ(ADP-ριβόζη) πολυμεράση 1 (PARP1) είναι το ιδρυτικό μέλος μιας υπεροικογένειας ενζύμων που χρησιμεύει για την προσθήκη τμημάτων πολυ(ADP) ριβόζης στις πρωτεΐνες-στόχους οδηγώντας στην επιδιόρθωση σπασίματος της μονής αλυσίδας (SSBs) και DSBs (Ray et al., 2017). Τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν την PARP για να επιδιορθώσουν τη βλάβη του DNA που προκαλείται από την πλατίνα και έτσι να διαφύγουν την απόπτωση. Για το σκοπό αυτό, ο συνδυασμός φαρμάκων πλατίνας με αναστολείς PARP, όπως το εγκεκριμένο από το FDA Olaparib, φαίνεται πολλά υποσχόμενος (Ledermann et al., 2019).

Τα τελευταία χρόνια, οι αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος, χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν το PD-1/PD-L1 οδήγησε σε εντυπωσιακές βελτιώσεις στην αποτελεσματικότητα της ανοσοθεραπείας έναντι αρκετών μορφών καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του HNSCC. Το ελαττωματικό δίκτυο DDR μπορεί να ενισχύσει την αντικαρκινική ανοσοαπόκριση με διάφορους τρόπους. Η ανεπάρκεια στην αποκατάσταση της βλάβης του DNA προκαλεί συσσώρευση μεταλλάξεων με αποτέλεσμα αυξημένο φορτίο μετάλλαξης του όγκου και υψηλότερα επίπεδα νεοαντιγόνων που παρουσιάζονται από το κύριο σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας, τα οποία αναγνωρίζονται από τα T κύτταρα (Yarchoan et al., 2017). Επιπλέον, η αποτυχία του DDR αυξάνει το κυτταροπλασματικό DNA, το οποίο συνδέεται με την κυκλική μονο-φωσφορική γουανοσίνη-συνθάση-μονοφωσφορικής αδενοσίνης και στη συνέχεια διεγείρει την έμφυτη ανοσολογική απόκριση μέσω της οδού του STING (Kwon et al., 2020). Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι οι όγκοι με ελαττωματική επιδιόρθωση του DNA μπορεί να ανταποκρίνονται καλύτερα στους αναστολείς σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού και



επίσης η στόχευση του DDR μπορεί να αντιπροσωπεύει μια σχετική στρατηγική για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας των αναστολέων σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος (Patel et al., 2019).



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση των μοριακών μονοπατιών DDR που ενεργοποιούνται από εξωγενείς και ενδογενείς προσβολές (Adapted from Paranikolaou et al., 2022).

## 1.5 Μηχανισμοί Επιδιόρθωσης του DNA

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το DNA των κυττάρων μας υφίσταται συνεχώς πολυάριθμες βλάβες από εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες. Αυτές οι βλάβες μπορούν να αναστείλουν βασικές κυτταρικές διεργασίες, όπως η αντιγραφή και η μεταγραφή του γονιδιώματος, και εάν δεν επιδιορθωθούν σωστά, μπορούν να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις ή αλλοιώσεις του DNA, αποτελώντας έτσι απειλή για το κύτταρο ή ακόμα και για τη βιωσιμότητα ενός συγκεκριμένου οργανισμού (Jackson et al., 2009).

Για την προστασία από τις γονοτοξικές επιδράσεις, τα κύτταρα έχουν αναπτύξει διάφορες οδούς προστασίας του γονιδιώματος, που συλλογικά ονομάζονται δίκτυο απόκρισης στη βλάβη του DNA (DDR) (Harper et al., 2007). Το DDR είναι ένα οργανωμένο σύστημα που περιλαμβάνει αισθητήρες, μεσολαβητές, μετατροπείς και τελεστές που ενεργοποιούν διάφορες οδούς, συμπεριλαμβανομένης της επιδιόρθωσης του DNA και του ελέγχου του

κυτταρικού κύκλου. Εάν οι μη επισκευασμένες βλάβες του DNA είναι πάνω από ένα ορισμένο επίπεδο, ενεργοποιείται η απόπτωση ή η μεταλλαξογένεση (Pateras et al., 2015).

Υπάρχουν τουλάχιστον επτά κύρια μονοπάτια επιδιόρθωσης του DNA που είναι ενεργά σε όλο τον κυτταρικό κύκλο, με το καθένα να επιδιορθώνει διαφορετικούς τύπους βλαβών.

#### (α) Επιδιόρθωση μέσω νουκλεοτιδικής εκτομής (NER).

Αυτός ο μηχανισμός επιδιορθώνει βλάβες που διαταράσσουν τη διπλή έλικα του DNA, όπως ογκώδεις βάσεις προσθήκης (Shuck et al., 2008). Ο NER ανιχνεύει βλάβες που παραμορφώνουν την έλικα μέσω δύο υπο-μηχανισμών: transcription-coupled repair (TCR), που προσδιορίζει βλάβες που αναστέλλουν τη μεταγραφή και global-genome repair (GGR), που αφαιρεί βλάβες σε όλο το γονιδίωμα.

#### (β) Επιδιόρθωση με εκτομή βάσης (BER).

Αυτή είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA που αναγνωρίζει και επιδιορθώνει κατεστραμμένες βάσεις DNA που δεν αλλάζουν τη δομή της έλικας του DNA. Το κύτταρο χρησιμοποιεί το BER για να επιδιορθώσει μη φυσιολογικές βάσεις DNA, απλές base-adducts, οξειδωτική βλάβη του DNA και SSBs (Krokan et al., 2013). Υπάρχουν δύο υπομηχανισμοί BER: το σύντομο και το μακρύ μονοπάτι (short-patch and the long-patch pathway). Η ενεργοποίηση ενός ή και των δύο από αυτά τα δύο υπό-μονοπάτια BER καθορίζεται από την προέλευση της βλάβης και τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία συμβαίνει η βλάβη.

#### (γ) Επιδιόρθωση αταίριαστων βάσεων (Mismatch Repair, MMR).

Αυτή η οδός εξαλείφει τις αναντιστοιχίες αντικατάστασης βάσεων και εισαγωγής/διαγραφής που συμβαίνουν όταν τα σφάλματα αντιγραφής διαφεύγουν από τη λειτουργία διόρθωσης των πολυμερασών του DNA (Jiricny et al., 2006).

#### (δ) Ομόλογος Ανασυνδυασμός (HRR).

Αυτός είναι ένας μηχανισμός επιδιόρθωσης DSB χωρίς σφάλματα που λειτουργεί στη φάση S και στη φάση G2 του κυτταρικού κύκλου για να βρει μια αδελφή χρωματίδα, η οποία

χρησιμεύει ως πρότυπο για να κατευθύνει την επισκευή της κατεστραμμένης ακολουθίας (Helleday et al., 2010).

(ε) Μηχανισμός σύνδεσης μη ομόλογων ελεύθερων άκρων (Non-homologous end-joining, NHEJ).

Αυτός ο μηχανισμός επιδιορθώνει σπασίματα DSBs που προκαλούνται από ακτινοβολία ή χημικά, καθώς και ενδιάμεσα των διαδικασιών ανασυνδυασμού V(D)J και του class-switch ανασυνδιαδμού (CSR) (Chakraborty et al., 2016). Είναι επιρρεπής σε σφάλματα και μπορεί να λειτουργήσει σε οποιοδήποτε στάδιο του κυτταρικού κύκλου. Υπάρχουν δύο υποτύποι του NHEJ: ο κανονικός (c-NHEJ) και ο εναλλακτικός (alt-NHEJ).

(στ) Επιδιόρθωση διακλωνικών διασταυρούμενων δεσμών (Interstrand cross-link, ICL).

Αυτή η οδός επιδιορθώνει τους διακλωνικούς διασταυρούμενους δεσμούς μεταξύ των δύο κλώνων του DNA, μια πολύ σημαντική βλάβη του DNA που συνήθως οδηγεί σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου και της αντιγραφής και τελικά σε κυτταρικό θάνατο (Hashimoto et al., 2016). Στα μη αναδιπλασιαζόμενα κύτταρα, η επιδιόρθωση του ICL μεσολαβεί από τον μηχανισμό NER, ενώ στη φάση S συνδέεται με την αντιγραφή του DNA και εξαρτάται από τον μηχανισμό του ομόλογου ανασυνδυασμού (Wang et al., 2013).

(ζ) Μηχανισμός άμεσης αναστροφής βλάβης (Direct repair pathway).

Η μόνη πρωτεΐνη που εμπλέκεται σε αυτόν τον μηχανισμό είναι η μεθυλτρανσφεράση Ο6-μεθυλγουανίνης-DNA (MGMT), η οποία αφαιρεί τις αλκυλομάδες από τη θέση Ο6 της γουανίνης σε ένα υπόλειμμα κυστεΐνης και υφίσταται τη διαδικασία αποικοδόμησης (Hinddinga et al., 2017).

DNA damaging agents	Toxins Alkylating agents Base deamination Replication errors	Oxidative damage Electrophiles	Ionizing radiation UV radiation Crosslinking agent Aromatic compounds Heat Cold Hypoxia
Damaged DNA	Mismatches Uracil Abasic sites Adducts	Lesions Single strand break Double strand break	Bulky lesions Intra- & Interstrand crosslink Single strand break Double strand break
DNA repair pathways	Mismatch repair Base excision repair	Base excision repair Single strand break repair Double strand break repair	Nucleotide excision repair Interstrand crosslink Repair Single strand break repair Double strand break repair Translesion synthesis

Εικόνα 3: Μηχανισμοί Επιδιόρθωσης του DNA (Adapted from Chatterjee et al., 2007).

## 1.6 Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες ορίζεται ως μια επικίνδυνη κατάσταση που προκαλείται από την ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής και της συσσώρευσης ROS (Souliotis et al., 2019). Τα ROS είναι μόρια υψηλής αντιδρασσης που πυροδοτούν γρήγορες αλυσιδωτές αντιδράσεις και προκαλούν οξειδωτική βλάβη σε μακρομόρια, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και νουκλεϊκά οξέα, επηρεάζοντας έτσι διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Προηγούμενα δεδομένα έχουν δείξει ότι τα αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες συμμετέχουν στην εμφάνιση και την εξέλιξη πολλών ασθενειών, όπως ο καρκίνος και η αυτοανοσία (Zuo et al., 2019). Από την άλλη πλευρά, πολύ χαμηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες έχουν ως αποτέλεσμα την πρόκληση αναγωγικού στρες και την εμφάνιση παθολογιών που κυμαίνονται από καρκίνο έως μυοκαρδιοπάθεια (Liou et al., 2010).

Ενδογενείς και εξωτερικοί επιβλαβείς παράγοντες αλληλεπιδρούν συνεχώς με το ανθρώπινο γονιδίωμα (Souliotis et al., 2019). Κάτω από αυτήν την ευρεία κατηγορία ενδογενών βλαβερών παραγόντων, συχνά λαμβάνουμε υπόψη το γονοτοξικό στρες από κυτταρικές διεργασίες, όπως η μεταγραφή και η αντιγραφή (Souliotis et al., 2019). Τα ROS όταν διατηρούνται σε ελάχιστες/ φυσιολογικές κυτταρικές συγκεντρώσεις, μπορεί να

λειτουργούν ως «αγγελιοφόροι οξειδοαναγωγής» και να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ενδοκυτταρική σηματοδότηση και ρύθμιση. Από την άλλη πλευρά, σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από το φυσιολογικό όριο, αυτές οι ρίζες οξυγόνου μπορεί να είναι επιβλαβείς, με αποτέλεσμα να δημιουργείται οξειδωτικό στρες (Park et al., 2009). Σε επίπεδο κυττάρων ή ιστών, επηρεαζόμαστε συνεχώς από ποικίλους ενδογενείς και εξωγενείς βλαβερούς παράγοντες. Οι ROS είναι ικανές να προκαλέσουν διάφορους τύπους βλάβης του DNA, συμπεριλαμβανομένων των οξειδωμένων πουρινών και πυριμιδινών, σπασίματος μονής έλικος (SSBs), σπασίματος διπλής αλυσίδας (DSBs) και αβασικών (AP, απουρινικών/απυριμιδινικών) θέσεων (Souliotis et al., 2019). Οι θέσεις AP είναι ένα ενδιάμεσο προϊόν πολλών οδών επεξεργασίας της βλάβης του DNA και εμφανίζεται με υψηλές συχνότητες σε κακοήθεις όγκους ή/και μετά από έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία (Zhao et al., 2007). Οι θέσεις AP είναι δυνητικά μεταλλαξιόνες και θανατηφόρες βλάβες που μπορούν να εμποδίσουν βασικές βιολογικές διεργασίες, όπως η αντιγραφή και η μεταγραφή του DNA. Η διάσπαση των θέσεων AP από AP-ενδονουκλεάσες ή AP-λυάσες επάγει SSBs που μπορούν να μετατραπούν σε DSBs μετά την αντιγραφή του DNA.

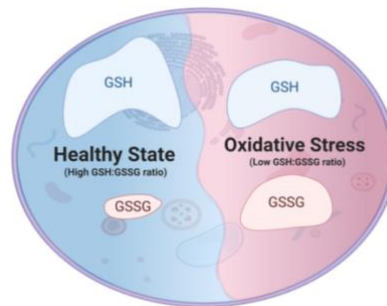
## **1.7 Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί**

Με τον όρο αντιοξειδωτικό, ορίζουμε κάθε ουσία η οποία βρισκόμενη σε μικρή ποσότητα, συγκριτικά με το προς οξείδωση υπόστρωμα, καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωση του (Halliwell & Gutteridge, 2015). Παράγονται είτε ενδογενώς από τον οργανισμό, είτε αποτελούν μόρια με μικρό μοριακό βάρος που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής. Ο οργανισμός για την προστασία του από τις επιπτώσεις των ελευθέρων ριζών διαθέτει προστατευτικούς μηχανισμούς, οι οποίοι είναι είτε ενζυμικοί είτε μη ενζυμικοί, με σκοπό να μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε αδρανή στοιχεία και να επιδιορθώνουν τις βλάβες που αυτές προκαλούν.

Στην κατηγορία των ενζυμικών μηχανισμών ανήκουν η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX), η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR), η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD), η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η υπεροξειδάση της

θειορεδοξίνης (Prx) και η αναγωγή της θειορεδοξίνης (TrxR). Στη κατηγορία των μη ενζυμικών μηχανισμών συγκαταλέγονται υδατοδιαλυτά και λιποδιαλυτά μικρά μόρια, η γλουταθειόνη, η βιταμίνη E, η βιταμίνη C, τα καροτενοειδή, το σελήνιο και το ουρικό.

Πιο συγκεκριμένα, η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. Αποτελεί την πιο άφθονη θειόλη στους ιστούς των ζώων και του ανθρώπου. Μπορεί να εντοπιστεί στο κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια. Συναντάται κυρίως στην ανοιγμένη της μορφή (GSH) και όχι τόσο στην οξειδωμένη (GSSG), η οποία αποτελεί το 10% της GSH. Οι δύο μορφές βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία και ο λόγος τους υποδεικνύει την παρουσία οξειδωτικού στρες. Συμβάλλει στο μεταβολισμό ασβεστίου, φαρμάκων, σε λειτουργίες της κυτταρικής μεμβράνης, αλλά και στην απέκκριση των ξενοβιοτικών και ελευθέρων ριζών, στη διατήρηση των επιπέδων των θειολικών ομάδων των πρωτεϊνών, και στη μεταφορά αμινοξέων μέσω των μεμβρανών (Wu et al., 2004).



Εικόνα 3: Αναλογία GSH/GSSG και οξειδωτικό στρες (Adapted from iivs.org)

## **2. Υλικά και Μέθοδοι**

### **2.1 Ασθενείς**

Περιφερικό αίμα συλλέχθηκε από 50 υποτροπιάζοντες/ μεταστατικούς HNSCC ασθενείς (8 responders, 7 non-responders, 6 stable diseases, 29 progression disease), που συμμετείχαν σε κλινική δοκιμή φάσης II με Nivolumab (NCT03652142), και από 26 υγιείς μάρτυρες (ΥΜ). Περιφερικό αίμα ασθενών συλλέχθηκε κατά την έναρξη της θεραπείας με Nivolumab, μετά από 4 εβδομάδες θεραπείας με Nivolumab και στην εξέλιξη της νόσου. Όλοι οι συμμετέχοντες έδωσαν τη συγκατάθεσή τους κατόπιν ενημέρωσης, σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι, η οποία είχε προηγουμένως εγκριθεί από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Νοσοκομείου Αττικόν, Αθήνα, Ελλάδα (...).

### **2.2 Απομόνωση των PBMCs**

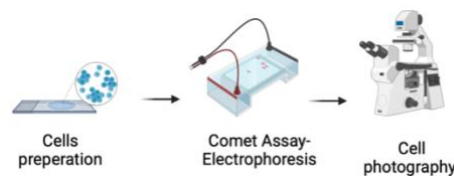
Τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMC) απομονώθηκαν με φυγοκέντρηση χρησιμοποιώντας Ficoll-Paque™ PLUS (Cytiva 17-1440-02) (Vlachogiannis et al, 2020). Τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε θρεπτικό υλικό κατάψυξης [90% εμβρυϊκός ορός βοοειδών (FBS), 10% διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)] και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

### **2.3 Οξειδωτικό στρες και AP (απουρινικές/απυριμιδικές) θέσεις**

Το οξειδωτικό στρες μετρήθηκε χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία GSH/GSSG-Glo, η οποία βασίζεται στον ποσοτικό προσδιορισμό της αναλογίας ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) προς οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) (Promega, #V6612). Οι αβασικές θέσεις ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας Oxi Select Oxidative DNA Damage Quantitation Kit (APsites; CellBiolabs; #STA-324). Και οι δύο αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που παρέχονται από τους κατασκευαστές.

## 2.4 Ηλεκτροφόρηση Μοναδιαίων Κυττάρων υπό Αλκαλικές Συνθήκες [μονόκλωνα (SSBs) και/ή δίκλωνα (DSBs) DNA θραύσματα] – Alkaline Comet Assay

Η τυπική δοκιμασία Alkaline Comet Assay, χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση σπασίματος μονής και/ή διπλής αλυσίδας (Sfikakis et al, 2022). Εν συντομία, τα PBMCs ( $5 \times 10^4$  κύτταρα) σε αгарόζη χαμηλής τήξης απλώθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες, τα κύτταρα λύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης και η ηλεκτροφόρηση έγινε στους  $4^\circ\text{C}$  (255mA, 25V, 30min). Στη συνέχεια, οι αντικειμενοφόρες πλάκες χρωματίστηκαν χρησιμοποιώντας SYBR Gold Nucleic Acid Gels Stain (ThermoFischer Scientific, #S11494) και οπτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας μικροσκόπιο φθορισμού (Zeiss Axio phot). Οι εικόνες των κομητών αναλύθηκαν από το λογισμικό ImageJ Analysis/Open Comet v1.3.1.



Εικόνα 4: Alkaline Comet Assay Technique (Made with Biorender).

## 2.5 Ικανότητα Επιδιόρθωσης του DNA με Εκτομή Νουκλεοτιδίων (NER)

Μετά από χορήγηση με  $5\mu\text{g/ml}$  σισπλατίνης για 3 ώρες στους  $37^\circ\text{C}$  σε θρεπτικό μέσον καλλιέργειας των PBMCs [RPMI-1640, 10% FBS, 100 units/ml πενικιλίνη, 100 mg/ml στρεπτομυκίνη, 2 mmol/l L-γλουταμίνη], τα κύτταρα επώαστηκαν για 0, 8 και 24 ώρες σε πλήρες θρεπτικό μέσον καλλιέργειας, χωρίς την προσθήκη κάποιου φαρμάκου, και τα monoadducts DNA ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την μέθοδο Southern Blot (Psyrris et al, 2021).

## 2.6 Ικανότητα Επιδιόρθωσης Δίκλωνων Θραυσμάτων DNA (DSB/R)

Μετά από χορήγηση  $5\mu\text{g/ml}$  σισπλατίνης για 3 ώρες στους  $37^\circ\text{C}$  σε θρεπτικό μέσον καλλιέργειας των PBMCs, τα κύτταρα επώαστηκαν για 0, 4, 24 και 48 ώρες σε πλήρες θρεπτικό μέσον καλλιέργειας, χωρίς την προσθήκη κάποιου φαρμάκου, προσκολλήθηκαν



σε καλυπτρίδα, σταθεροποιήθηκαν και ο ποσοτικός προσδιορισμός του γH2AX foci, έγινε με συνεστιακή μικροσκοπία (H2AX SerphosphorylatedatSer139; CellSignaling Technology, #9718T) (P syrri et al, 2021).

## **2.7 Μέτρηση Αποπτωτικής Ικανότητας**

Στα περιφερικά μονοκύτταρα χορηγήθηκαν 0-100 μg/ml σισπλατίνης για 3 ώρες, ακολουθήθηκε επώαση 24, 48 και 72 ωρών σε πλήρες θρεπτικό μέσον καλλιέργειας, χωρίς την προσθήκη κάποιου φαρμάκου, και η απόπτωση μετρήθηκε χρησιμοποιώντας το Cell Death Detection ELISA PLUS kit (Roche Diagnostics; #11774425001). Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

## **2.8 Στατιστική Ανάλυση**

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη χρήση του Graph Pad Prism version 9.00 (GraphPad Software, LaColla, CA). Για πολλαπλές συγκρίσεις κατά ζεύγη χρησιμοποιήθηκε το Student's t-tests. Επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο  $P < 0,05$ . Για τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS v.24.0. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  Standard deviation (SD).

### 3. Αποτελέσματα

Στα διαγράμματα που ακολουθούν πραγματοποιείται αναλυτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της μελέτης των μεταβολών στους δείκτες DDR και οξειδωτικού στρες, τόσο ακριβώς πριν από την έναρξη της θεραπείας (HNSCC- baseline), 4 εβδομάδες μετά τη θεραπεία με Nivolumab (HNSCC-4 weeks) καθώς και κατά την εξέλιξη της νόσου (HNSCC- at progression), σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες (HC).

Στη μελέτη συμμετείχαν 50 HNSCC ασθενείς, από τους οποίους 7 ασθενείς ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία (CR: complete response, PR: partial disease, MR: marginal response), 6 ασθενείς εμφάνισαν σταθερή νόσο (SD: stable disease), 29 ασθενείς εξέλιξη της νόσου (PD: progression disease), ενώ 7 ασθενείς εμφάνισαν Hyperprogressive disease (HPD, δυσμενή έκβαση της ανοσοθεραπείας που συνίσταται σε επιτάχυνση της ανάπτυξης του όγκου, συχνά συνοδευόμενη από άμεση κλινική επιδείνωση).

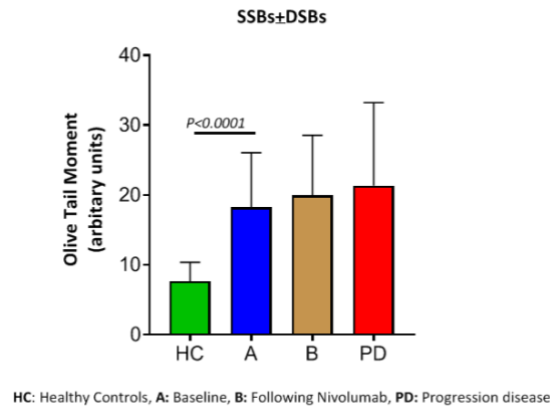
Τα επίπεδα βλάβης του DNA στα PBMCs των ασθενών και των υγιών μαρτύρων μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας Alkaline Comet Assay, που ανιχνεύει τόσο SSBs όσο και/ή DSBs. Επίσης, τα επίπεδα DSBs του DNA ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας χρώση ανοσοφθορισμού γH2AX. Ακόμα, για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες μετρήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα μέσω της αναλογίας GSH/GSSG και οι AP θέσεις εκτιμήθηκαν με τη χρήση ειδικού κιτ. Η επιδιορθωτική ικανότητα του μηχανισμού NER, μετρήθηκε με Southern blot, μετά από *ex vivo* χορήγηση σισπλατίνης, ενώ η επιδιόρθωση μέσω DSB/R με ανοσοφθορισμό γH2AX και συνεστιακή μικροσκοπία, μετά από *ex vivo* χορήγηση σισπλατίνης. Τέλος, τα ποσοστά απόπτωσης μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας κιτ απόπτωσης ακολουθώντας *ex vivo* χορήγηση σισπλατίνης.

#### 3.1 Παράμετροι που σχετίζονται με το DDR μεταξύ ασθενών με HNSCC και υγιών μαρτύρων (HC).

##### Alkaline Comet Assay

Σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας (Psyrrri et al, 2021), διαπιστώσαμε ότι τα επίπεδα SSBs±DSBs στην έναρξη της θεραπείας ήταν σημαντικά υψηλότερα σε ασθενείς με HNSCC από ότι σε υγιείς μάρτυρες (P<0,0001). Δεν βρέθηκαν

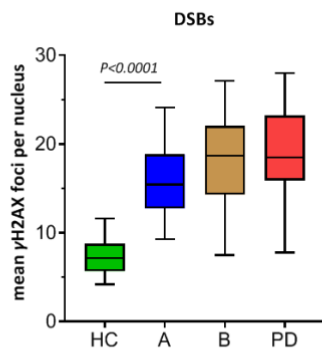
σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιπέδων SSBs±DSBs που μετρήθηκαν σε ασθενείς με HNSCC κατά την έναρξη της θεραπείας και εκείνων που μετρήθηκαν μετά από 4 εβδομάδες από τη θεραπεία με Nivolumab ή κατά την εξέλιξη της νόσου.



Διάγραμμα 1: Μέτρηση των συνολικών επιπέδων βλάβης του DNA με Comet Assay.

### DSBs levels

Τα επίπεδα DSBs του DNA μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας χρώση ανοσοφθορισμού γH2AX και είναι σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Alkaline Comet Assay, καθώς οι ασθενείς με HNSCC στην έναρξη της θεραπείας εμφάνισαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα DNA DSBs από τους υγιείς μάρτυρες ( $P < 0,0001$ ). Παρόμοια επίπεδα DNA DSBs παρατηρήθηκαν σε ασθενείς με HNSCC στο baseline, μετά από 4 εβδομάδες θεραπείας με Nivolumab και κατά την εξέλιξη της νόσου.

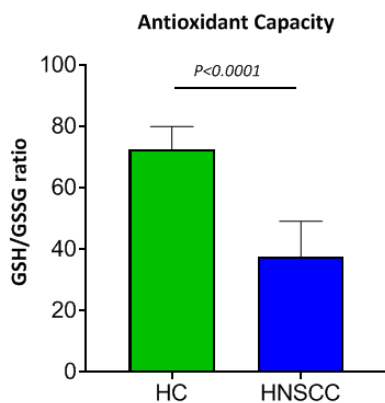


HC: Healthy Controls, A: Baseline, B: Following Nivolumab, PD: Progression disease

Διάγραμμα 2: Μέτρηση των DSBs επιπέδων με συνεστιακή μικροσκοπία.

### Οξειδωτικό στρες

Εντοπίστηκε ότι τα PBMCs από ασθενείς με HNSCC έδειξαν σημαντικά χαμηλότερο λόγο GSH/GSSG από τους υγιείς μάρτυρες, υποδεικνύοντας υψηλότερα επίπεδα οξειδωτικού στρες στα κύτταρα των ασθενών ( $P<0,0001$ ).

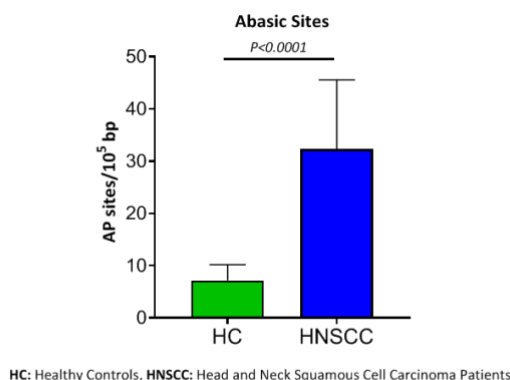


HC: Healthy Controls, HNSCC: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients

Διάγραμμα 3: Επίπεδα Οξειδωτικού Στρες.

## AP θέσεις

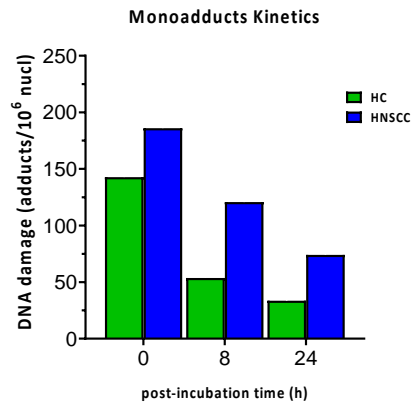
Παρόμοια αποτελέσματα με το οξειδωτικό στρες παρατηρήθηκαν όταν μετρήσαμε την παρουσία AP θέσεων, αλλοιώσεων του DNA που μπορούν να δημιουργηθούν είτε αυθόρμητα είτε ως αποτέλεσμα οξειδωτικού στρες. Τα PBMCs των HNSCC ασθενών στο baseline εμφάνισαν υψηλότερα επίπεδα AP θέσεων σε σύγκριση με τους HC ( $P < 0,0001$ ).



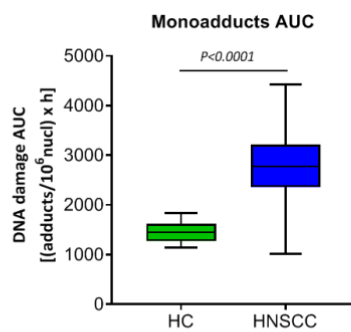
Διάγραμμα 4: Μέτρηση επιπέδων AP θέσεων .

## Επιδιόρθωση NER

Για τη μέτρηση της αποτελεσματικότητας του μηχανισμού NER, τα συνολικά PBMCs στο baseline, υποβλήθηκαν σε *ex vivo* χορήγηση 5 $\mu$ g/ml σισπλατίνης και η κινητική των επαγόμενων από το φάρμακο DNA monoadducts παρακολούθηθηκε στο μεταγραφικά ενεργό γονίδιο N-ras, του οποίου η επιδιόρθωση είναι αντιπροσωπευτική της συνολικής κυτταρικής επιδιόρθωσης μέσω NER (Souliotis et al., 2019). Μειωμένα ποσοστά NER βρέθηκαν σε ασθενείς με HNSCC από ότι σε υγιείς μάρτυρες, οδηγώντας σε υψηλότερη συσσώρευση DNA monoadducts επαγμένα από τη χορήγηση του φαρμάκου στα κύτταρα των ασθενών ( $P < 0,0001$ ).



Διάγραμμα 5: Κινητική των επαγόμενων από σιπλατίνη monoadducts.

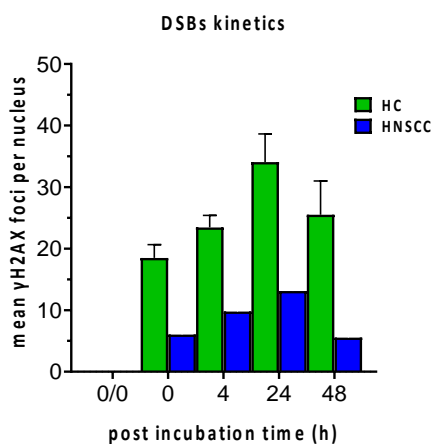


HC: Healthy Controls, HNSCC: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients

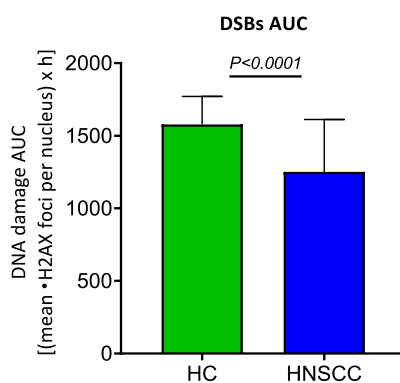
Διάγραμμα 6: Συσώρευση DNA monoadducts εκφρασμένα σαν AUC στη διάρκεια των 24h του πειράματος.

### DSB/R

Σύμφωνα και με προηγούμενα αποτελέσματα μας (Psyrris et al, 2021), οι ασθενείς με HNSCC εμφάνισαν αυξημένη ικανότητα επιδιόρθωσης των DNA DSBs από ότι οι υγιείς μάρτυρες, με αποτέλεσμα χαμηλότερο φορτίο DSBs συσχετισμένο με το Nivolumab στα κύτταρα των ασθενών ( $P < 0,0001$ ).



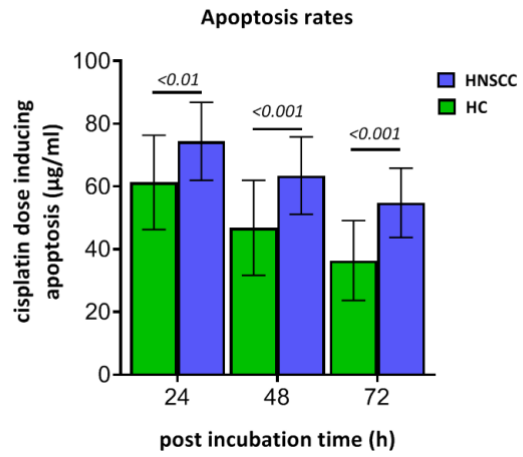
Διάγραμμα 7: Κινητική των επαγόμενων από σιπλατίνη γH2AX foci.



Διάγραμμα 8: Συσσωρευση γH2AX foci εκφρασμένα σαν AUC στη διάρκεια των 48h του πειράματος.

### Απόπτωση

Εμφανίζονται τα ποσοστά απόπτωσης από 26 HC και 50 HNSCC. Στις χρονικές στιγμές των 24,48 και 72 ωρών, απαιτούνται υψηλότερες δόσεις σισπλατίνης για να πυροδοτηθεί η απόπτωση στα PBMCs από ασθενείς με HNSCC στο baseline, σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες, υποδεικνύοντας ότι τα κύτταρα των ασθενών χαρακτηρίζονται από χαμηλότερη απόπτωση (όλα  $P < 0,01$ ).



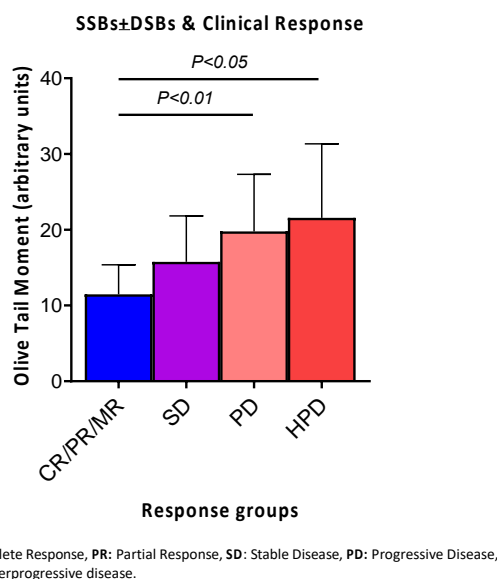
Διάγραμμα 9: Μέτρηση απόπτωσης σε ασθενείς και υγιείς μάρτυρες.



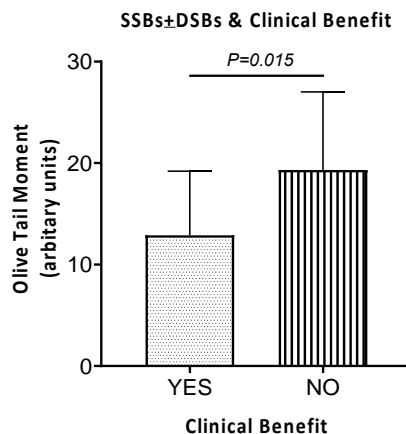
### 3.2 Ασθενείς με HNSCC: Συσχετισμός των παραμέτρων DDR με τους δείκτες απόκρισης στη θεραπεία με βάση το Nivolumab.

#### Alkaline Comet Assay

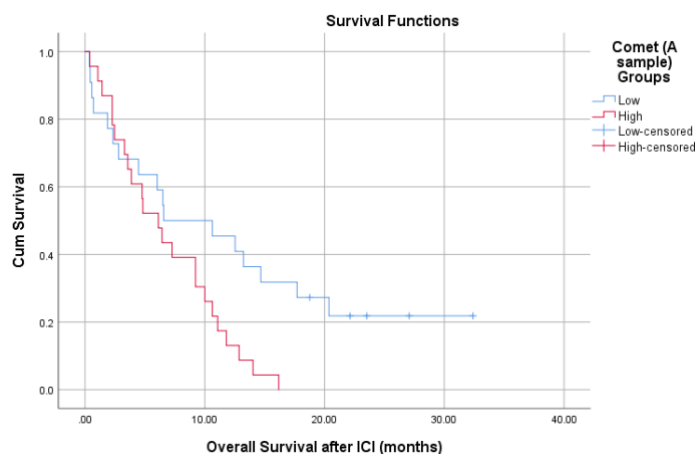
Παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα συνολικά επίπεδα των επιπέδων βλάβης στο DNA που μετρήθηκαν με Alkaline Comet Assay μεταξύ CR/PR/MR και PD ( $P<0,01$ ) καθώς και μεταξύ CR/PR/MR και HPD ασθενών ( $P<0,05$ ), υποδηλώνοντας ότι χαμηλότερα επίπεδα SSBs±DSBs στα PBMCs κατά την έναρξη της θεραπείας σχετίζονται με υψηλότερη πιθανότητα κλινικής ανταπόκρισης στη θεραπεία ( $P=0,03$ ). Επιπλέον, χαμηλότερα επίπεδα SSBs±DSBs συσχετίστηκαν με καλύτερο κλινικό όφελος ( $P=0,015$ ) και παρατεταμένη συνολική επιβίωση ( $P=0,002$ ).



Διάγραμμα 10: Συσχετισμός SSBs±DSBs και κλινική απόκριση στη θεραπεία με Nivolumab στο baseline.



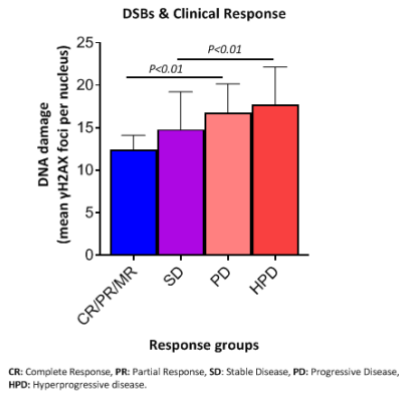
Διάγραμμα 11: Συσχετισμός SSBs±DSBs και κλινικό όφελος στο Nivolumab στο baseline.



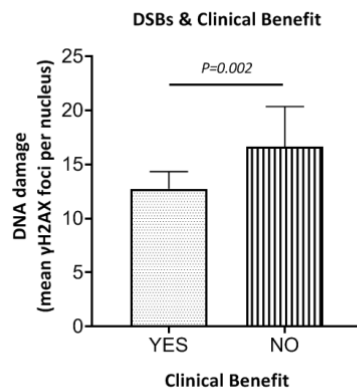
Διάγραμμα 12: Συσχετισμός SSBs±DSBs και συνολικής επιβίωσης.

### Επίπεδα DSBs

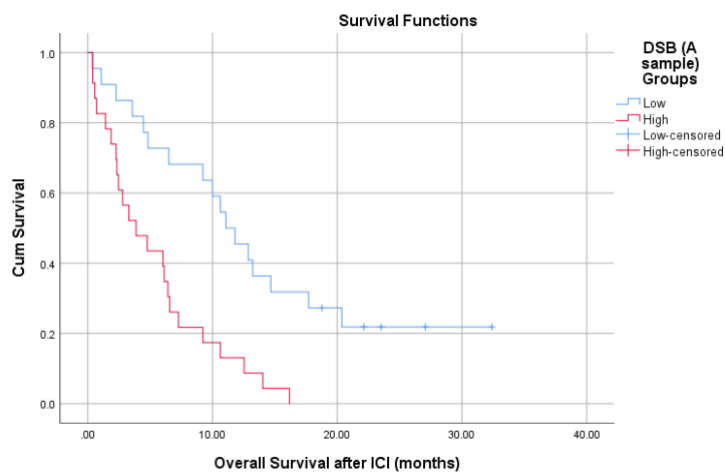
Επιπλέον, σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα DNA DSBs στο baseline των ασθενών μεταξύ CR/PR/MR και PD ή CR/PR/MR και HPD (όλοι  $P < 0,05$ ), υποδηλώνοντας και πάλι ότι τα χαμηλότερα επίπεδα DNA DSBs κατά την έναρξη της θεραπείας συσχετίζονται με υψηλότερη πιθανότητα κλινικής ανταπόκρισης ( $P=0,016$ ). Επίσης, χαμηλότερα επίπεδα DNA DSBs συσχετίστηκαν με μεγαλύτερο κλινικό όφελος ( $P=0,002$ ), και μεγαλύτερη συνολική επιβίωση ( $P=0,001$ ).



Διάγραμμα 13: Συσχετισμός DSBs και κλινική απόκριση στη θεραπεία με Nivolumab στο baseline.



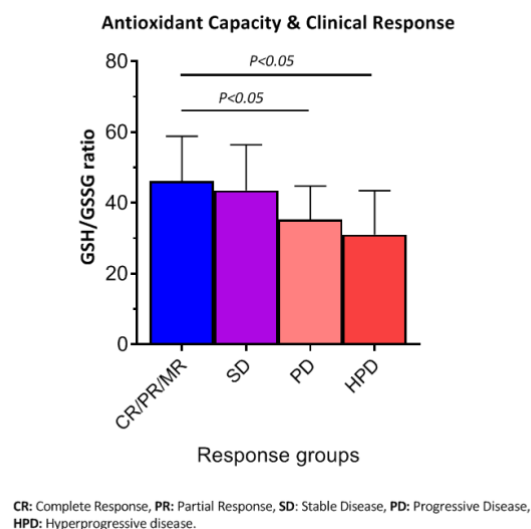
Διάγραμμα 14: Συσχετισμός DSBs και κλινικό όφελος από το Nivolumab στο baseline.



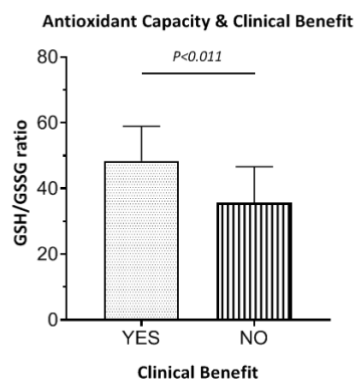
Διάγραμμα 15: Συσχετισμός DSBs και συνολικής επιβίωσης.

## Οξειδωτικό στρες

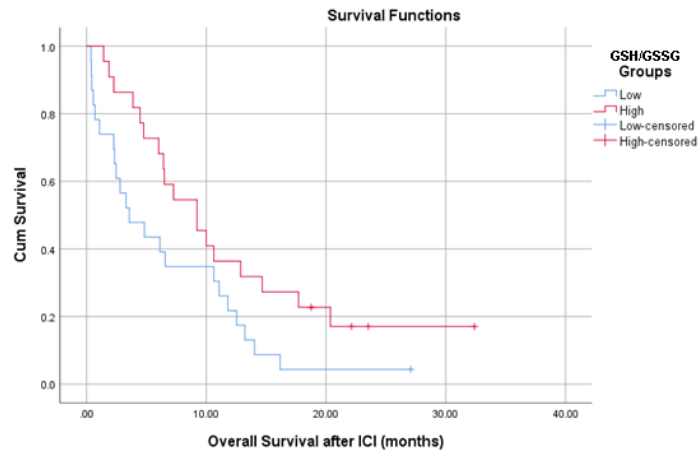
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της βλάβης του DNA, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα οξειδωτικού στρες μεταξύ CR/PR/MR και PD ( $P<0,01$ ) ή CR/PR/MR και HPD ασθενών ( $P<0,05$ ), γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ασθενείς που εμφάνισαν χαμηλότερα επίπεδα οξειδωτικού στρες κατά την έναρξη της θεραπείας συσχετίστηκαν με καλύτερη κλινική ανταπόκριση. Επίσης, χαμηλότερα επίπεδα οξειδωτικού στρες συσχετίστηκαν με καλύτερο κλινικό όφελος ( $P<0,011$ ) και μεγαλύτερη συνολική επιβίωση.



Διάγραμμα 16: Συσχέτιση επιπέδων οξειδωτικού στρες των PBMCs στο baseline εκφρασμένα με την αναλογία GSH/GSSG και κλινική απόκριση στο Nivolumab.



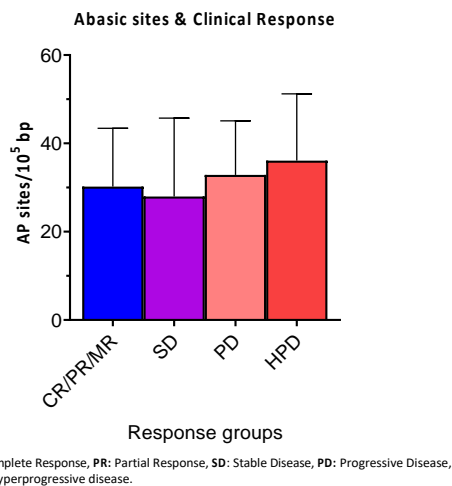
Διάγραμμα 17: Συσχέτιση επιπέδων οξειδωτικού στρες των PBMCs στο baseline εκφρασμένα με την αναλογία GSH/GSSG και κλινικό όφελος του Nivolumab.



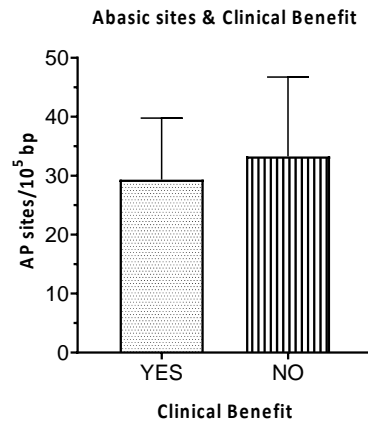
Διάγραμμα 18: Συσχέτιση επιπέδων οξειδωτικού στρες των PBMCs στο baseline εκφρασμένα με την αναλογία GSH/GSSG και συνολική επιβίωση.

### AP θέσεις

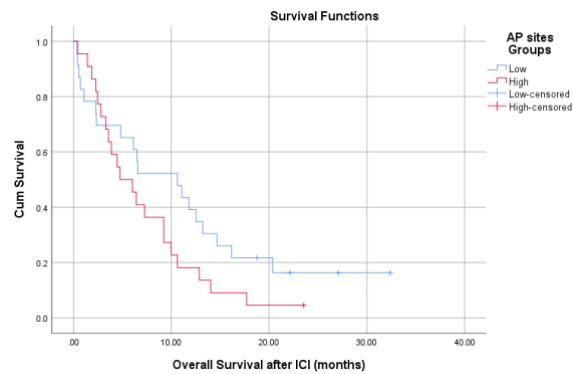
Οι συσχετίσεις AP θέσεων και των διαφόρων κλινικών αποκρίσεων δεν είχαν στατιστικά σημαντική σημασία.



Διάγραμμα 19: Συσχετισμός AP θέσεων και κλινικής απόκρισης στο Nivolumab.



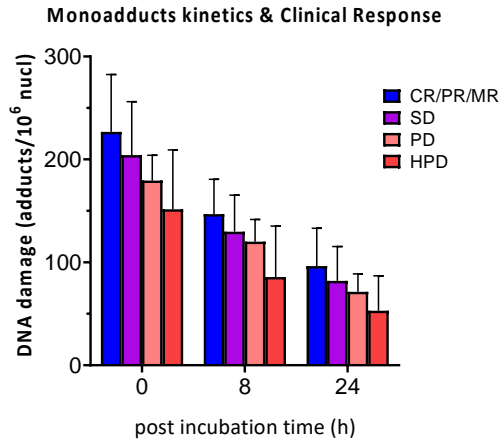
Διάγραμμα 20: Συσχετισμός AP θέσεων με το κλινικό όφελος από τοNivolimab.



Διάγραμμα 21: Συσχετισμός AP θέσεων και συνολικής επιβίωσης.

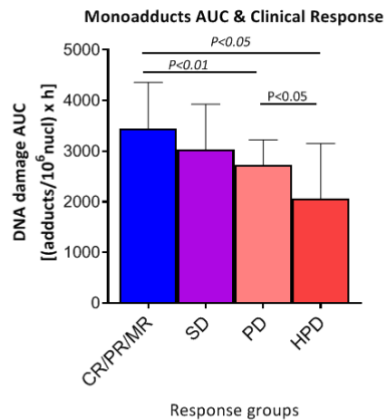
### **Επιδιόρθωση NER**

Επιπλέον, φαίνεται να βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στην ικανότητα επιδιόρθωσης μέσω NER μεταξύ CR/PR/MR και PD ( $P < 0,01$ ) ή CR/PR/MR και HPD ασθενών ( $P < 0,05$ ), καθώς και μεταξύ PD και HPD ( $P < 0,05$ ).



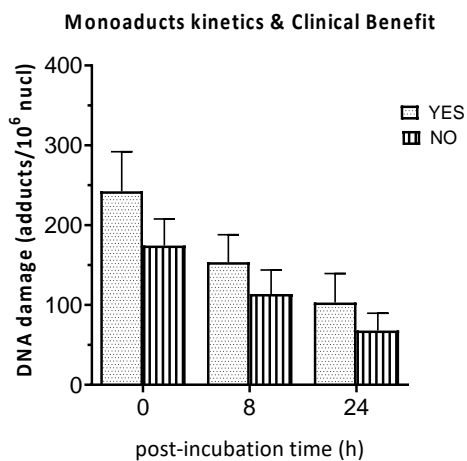
CR: Complete Response, PR: Partial Response, SD: Stable Disease, PD: Progressive Disease, HPD: Hyperprogressive disease.

Διάγραμμα 22: Κινητική των επαγόμενων από σισπλατίνη monoadducts και κλινική ανταπόκριση.

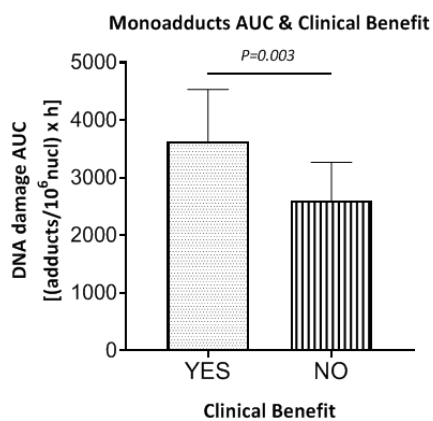


CR: Complete Response, PR: Partial Response, SD: Stable Disease, PD: Progressive Disease, HPD: Hyperprogressive disease.

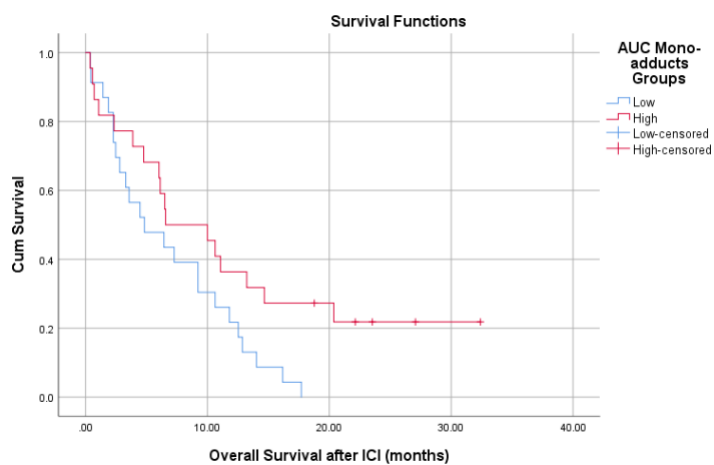
Διάγραμμα 23: Συσώρευση monoadducts, εκφρασμένα σε AUC και κλινική ανταπόκριση.



Διάγραμμα 24: Κινητική των επαγόμενων από σισπλατίνη monoadducts και κλινικό όφελος.



Διάγραμμα 25: Συσσώρευση monoadducts, εκφρασμένα σε AUC και κλινικό όφελος.

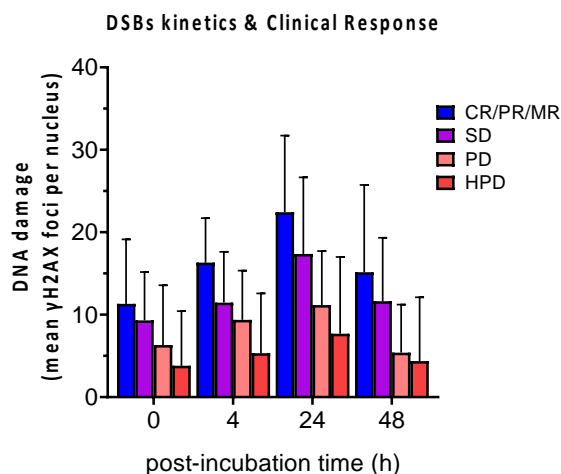


Διάγραμμα 26: Συσχετισμός NER και συνολικής επιβίωσης.

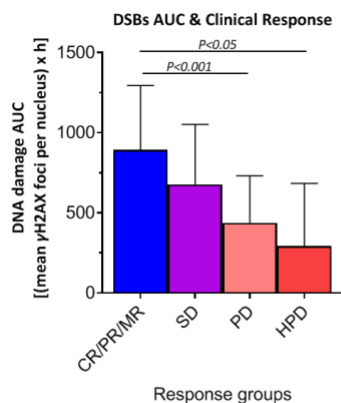


### Επιδιόρθωση DSBs (DSB/R)

Βρέθηκαν επίσης σημαντικές διαφορές στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης των DNA DSB μεταξύ CR/PR/MR και PD ( $P < 0,001$ ) καθώς και μεταξύ CR/PR/MR και HPD ασθενών ( $P < 0,05$ ). Είναι ενδιαφέρον ότι οι χαμηλότερη ικανότητες επιδιόρθωσης NER και DSB των PBMC των ασθενών συσχετίστηκαν με υψηλότερη πιθανότητα κλινικού οφέλους (NER:  $P = 0,003$ / DSBs  $P = 0,017$ ) και παρατεταμένη συνολική επιβίωση (NER:  $P = 0,001$ / DSBP= $0,045$ ).

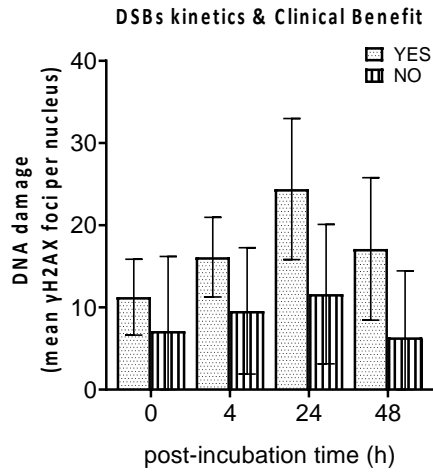


Διάγραμμα 28: Κινητική DSBs επαγόμενων από σισπλατίνη και κλινική ανταπόκριση.

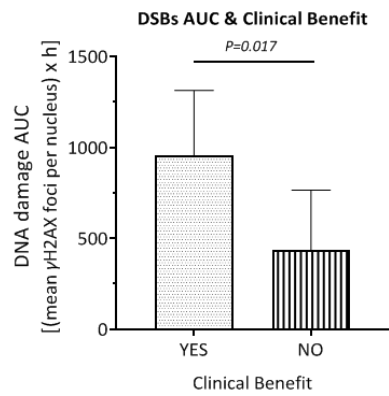


CR: Complete Response, PR: Partial Response, SD: Stable Disease, PD: Progressive Disease, HPD: Hyperprogressive disease.

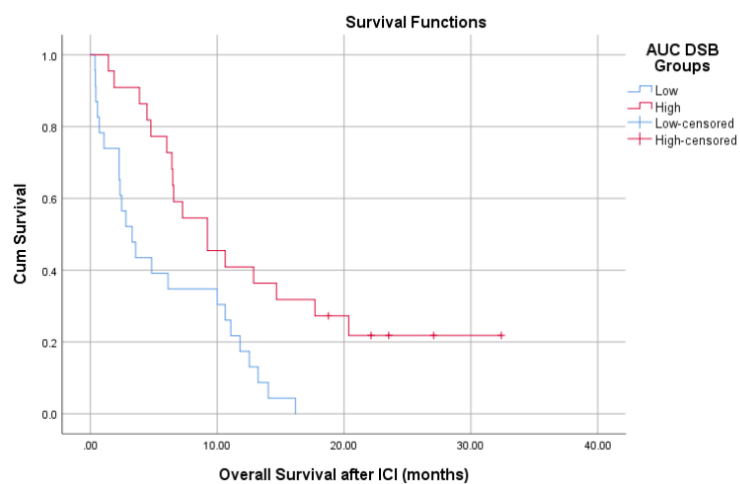
Διάγραμμα 29: Συσώρευση DSBs εκφρασμένων σε AUC και κλινική ανταπόκριση.



Διάγραμμα 30: Κινητική DSBs επαγόμενων από σισπλατίνη και κλινικό όφελος.



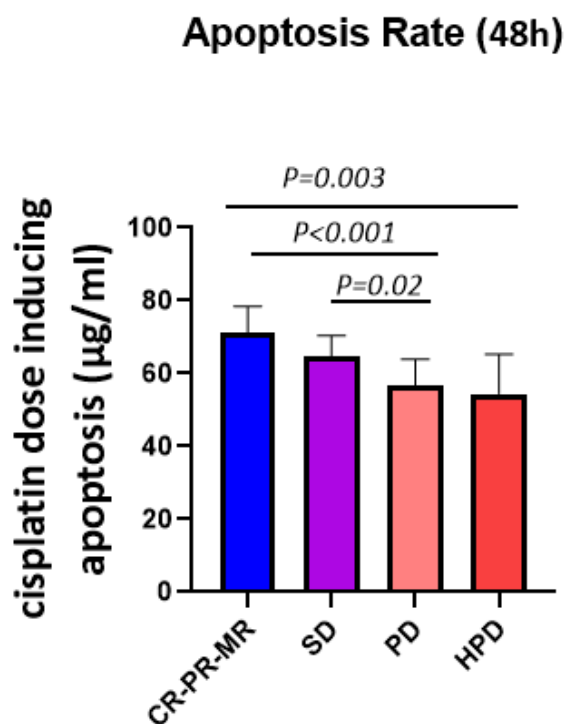
Διάγραμμα 31: Συνολικός αριθμός DSBs εκφρασμένων σε AUC και κλινικό όφελος.



Διάγραμμα 32: Συσχετισμός DSBs και συνολικής επιβίωσης.

## Απόπτωση

Έπειτα από τον διαχωρισμό των ασθενών στο baseline σε CR/PR/MR και HRD, στη χρονική στιγμή των 48 ωρών, απαιτούνται υψηλότερες δόσεις σισπλατίνης για να πυροδοτηθεί η απόπτωση σε PBMCs των CR/PR/MR ασθενών σε σύγκριση με τους ασθενείς PD, υποδεικνύοντας ότι οι ασθενείς CR/PR/MR χαρακτηρίζονται από τη χαμηλότερη ικανότητα απόπτωσης.



Διάγραμμα 33: Απόπτωση σε 8 CR/PR/MR και 7 HPD ασθενείς 48 ώρες μετά από χορήγηση cisplatin.

## 4. Συζήτηση

Γενικά, οι ασθενείς με HNSCC αντιμετωπίζονται με χειρουργική επέμβαση, ακολουθούμενη από επικουρική ακτινοβολία ή συνδυασμένη χημειοθεραπεία και ακτινοβολία (CRT), ανάλογα με το στάδιο της νόσου (Anderson et al, 2021). Η CRT ήταν η κύρια προσέγγιση για τη θεραπεία καρκίνων που εμφανίζονται στον φάρυγγα ή τον λάρυγγα, με τους HPV-θετικούς ασθενείς να παρουσιάζουν καλύτερη πρόγνωση σε σύγκριση με τους HPV-αρνητικούς. Με εξαίρεση τους ασθενείς με καρκίνο της στοματικής κοιλότητας πρώιμου σταδίου, που συνήθως επιδέχονται χειρουργική επέμβαση και τους ασθενείς με καρκίνο του λάρυγγα, που αντιμετωπίζονται μόνο με χειρουργική επέμβαση ή ακτινοβολία, η πλειονότητα των ασθενών με HNSCC χρειάζονται πολυτροπικές θεραπευτικές προσεγγίσεις (Anderson et al, 2021).

Επιπλέον, έχει εντοπιστεί η σημασία του ανοσοποιητικού συστήματος στην παθογένεση και τη θεραπευτική αντιμετώπιση του HNSCC, οδηγώντας σε προσπάθειες για τη θεραπεία αυτής της κακοήθειας χρησιμοποιώντας διαφορετικές προσεγγίσεις για την ενεργοποίηση της ενδογενούς ανοσίας. Πράγματι, οι αναστολείς σημείου ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος Pembrolizumab και Nivolumab χρησιμοποιούνται επί του παρόντος για τη θεραπεία υποτροπιάζοντος/ μεταστατικού HNSCC. Και τα δύο φάρμακα είναι μονοκλωνικά αντισώματα που μπλοκάρουν την πρωτεΐνη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (PD-1), αποτρέποντας έτσι την αλληλεπίδραση με τους συνδέτες PD-L1 και PD-L2 που αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των Τ λεμφοκυττάρων και επάγουν απόπτωση των ειδικών για αντιγόνο τελεστών Τ κυττάρων (Prasad et al, 2017). Το 2016, τόσο το Pembrolizumab όσο και το Nivolumab εγκρίθηκαν από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) για τη θεραπεία του μεταστατικού ή υποτροπιάζοντος HNSCC, ακολουθούμενη από χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα. Αυτές οι εγκρίσεις βασίστηκαν στα αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών KEYNOTE-040 και CHECKMATE-141, οι οποίες απέδειξαν το όφελος επιβίωσης της θεραπείας με anti-PD-1 σε σύγκριση με την τυπική χημειοθεραπεία (Pai et al., 2019; Gillison et al., 2018). Το 2019, με βάση τη μελέτη KEYNOTE-048, το Pembrolizumab εγκρίθηκε από τον FDA ως θεραπεία πρώτης γραμμής για ασθενείς με μεταστατικό ή υποτροπιάζοντα HNSCC μόνο του ή σε συνδυασμό με

χημειοθεραπεία (Cohen et al., 2019). Είναι ενδιαφέρον ότι οι ανοσοαναστολείς των σημείων ελέγχου έδειξαν ανθεκτική αντικαρκινική δράση σε όσους ασθενείς με HNSCC ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία, με περισσότερο από το 70% των ανταποκρίσεων να διαρκούν για περισσότερο από ένα χρόνο (Bauml et al., 2019). Ωστόσο, το συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης στους πληθυσμούς που μελετήθηκαν ήταν μικρότερο από 20% (Kim et al., 2020), υποδηλώνοντας ότι χρειάζονται πρόσθετα μέσα για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας της ανοσοθεραπείας. Μια πιθανή προσέγγιση προς αυτό το σκοπό βασίζεται στην εκμετάλλευση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ανοσοποιητικού συστήματος και του μηχανισμού απόκρισης βλάβης DNA (DDR).

Το κυτταρικό DDR είναι ένα δίκτυο μοριακών οδών που απαιτείται για τη διατήρηση της γενετικής πληροφορίας που κωδικοποιείται από το DNA (Pateras et al., 2015). Το DDR ξεκινά με την ανίχνευση βλάβης του DNA μέσω ειδικών αισθητήρων, ακολουθούμενη από την επαγωγή ενός καταρράκτη μεταγωγής σήματος και την ενεργοποίηση διαφόρων οδών που εμπλέκονται στην προστασία του γονιδιώματος, συμπεριλαμβανομένου του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, των μηχανισμών επιδιόρθωσης DNA, της απόπτωσης ή της κυτταρικής γήρανσης (Ciccica and Elledge, 2010). Από την άλλη πλευρά, το απορρυθμισμένο/ διαταραγμένο δίκτυο DDR σχετίζεται με την εμφάνιση και την εξέλιξη αρκετών ανθρώπινων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου (Pateras et al., 2015). Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, έχουμε δείξει σε προηγούμενες μελέτες ότι τα μονοπύρρηνα κύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) από ασθενείς με HNSCC κατά τη διάγνωση εμφάνισαν απορρυθμισμένες παραμέτρους που σχετίζονται με το DDR και υψηλότερα επίπεδα οξειδωτικού στρες σε σύγκριση με υγιή άτομα (Pysyri et al., 2021).

Τα συσσωρευμένα στοιχεία δείχνουν ότι το δίκτυο DDR αλληλεπιδρά ισχυρά με το ανοσοποιητικό σύστημα, επηρεάζοντας έτσι τις ανοσολογικές αποκρίσεις του ξενιστή και δυνητικά παρέχοντας ένα εργαλείο για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας της ανοσοθεραπείας. Ειδικότερα, μελέτες στο HNSCC έδειξαν ότι η γονοτοξική βλάβη του DNA που προκαλείται από φάρμακα και οι σχετικές κυτταρικές αποκρίσεις αυξάνουν την ανοσογονικότητα του όγκου και ενισχύουν την αποτελεσματικότητα της θεραπείας με αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος (Nenclares et al., 2022). Έχει εντοπιστεί ένας αριθμός μηχανισμών στους οποίους βασίζεται αυτή η αλληλεπίδραση, συμπεριλαμβανομένης της επαγωγής ανοσογονικού κυτταρικού θανάτου (Galluzzi et al.,

2017), της αύξησης της αντιγονοπαρουσίασης (Liu et al., 2010), των αλλαγών στο περιβάλλον των κυτοκινών μέσα στο μικροπεριβάλλον του όγκου (Malaquin et al., 2015), τη μείωση της ρύθμισης των κατασταλτικών myeloid-derived κυττάρων (MDSC) και των ρυθμιστικών T-κυττάρων (Tregs) (Banissi et al., 2009; Vincent et al., 2010), την τροποποιημένη έκφραση των παραγόντων των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος PD-1/ PD-L1 (Sheng et al., 2016; Ghebeh et al., 2021) και την αύξηση του φορτίου νεοαντιγόνων του όγκου (Rizvi et al., 2015).

Ο συνδυασμός ανοσοθεραπείας και χημειοθεραπείας έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές νεοπλασίες. Για παράδειγμα, η προσθήκη Pembrolizumab στη χημειοθεραπεία με καρβοπλατίνη και πακλιταξέλη έχει αυξήσει τον αριθμό των ασθενών με κλινική ανταπόκριση σε καρκίνο του μαστού σταδίου II και III (Schmid et al., 2020). Επιπλέον, στον εξαιρετικό μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, ο συνδυασμός αναστολέων PD-1/PD-L1 με χημειοθεραπεία έδειξε ευνοϊκά ποσοστά απόκρισης (Shu et al., 2020; Rothschild et al., 2021; Romero Román et al., 2021). Σε άλλη πρόσφατη μελέτη, ~ 70% των ασθενών με εξαιρετικό HNSCC, οι οποίοι υποβλήθηκαν σε συνδυαστική θεραπεία με Nivolumab, Carboplatin και Paclitaxel, εμφάνισαν μείζονα παθολογική απόκριση (MPR) ή κλινική μερική ανταπόκριση (Zinner et al., 2020).

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το HNSCC συνδέεται ισχυρά με το οξειδωτικό στρες, καθώς ο καπνός και το αλκοόλ που είναι γνωστό ότι αυξάνουν την παραγωγή ROS, ορίζονται σαφώς ως αιτιολογικοί παράγοντες για αυτήν την κακοήθεια (Singh et al., 2016). Το αυξημένο οξειδωτικό στρες των ασθενών με HNSCC σε σχέση με τους υγιείς μάρτυρες θα μπορούσε επίσης να εξηγήσει, τουλάχιστον εν μέρει, τα αυξημένα επίπεδα DSBs που βρέθηκαν στους ασθενείς μας, αφού τα ROS προκαλούν τέτοιους τύπους βλάβης στο DNA (Hedge et al., 2012). Επίσης, διαπιστώσαμε ότι το μειωμένο οξειδωτικό στρες μεταξύ των ασθενών σχετίζεται με ανταπόκριση στη θεραπεία με Nivolumab, μεγαλύτερο κλινικό όφελος και συνολική επιβίωση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι οι ασθενείς με HNSCC με χαμηλότερο οξειδωτικό στρες είχαν χαμηλότερο κίνδυνο τοπικής και περιφερειακής υποτροπής του όγκου μετά τη θεραπεία, υποδηλώνοντας μια πιο επιθετική συμπεριφορά όγκων με υψηλό οξειδωτικό στρες (Dequanter et al., 2017). Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα και με πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου μας σε HNSCC ασθενείς (Psyrris et al., 2021).

Όπως και σε προηγούμενη μελέτη μας (Psyrris et al., 2021), αξιολογήθηκε επίσης η αποτελεσματικότητα των θεμελιωδών μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA, δηλαδή της επιδιόρθωσης NER και DSB/R. Το NER επιδιορθώνει ένα ευρύ φάσμα αλλοιώσεων DNA, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που παράγονται από ROS και προϊόντα προσθήκης DNA που σχηματίζονται από το κάπνισμα και γονοτοξικά φάρμακα (Scharer et al., 2013). Οι προηγούμενες μελέτες μας έχουν δείξει ότι η αποτελεσματικότητα του NER είναι κρίσιμη για την επιβίωση των κυττάρων (Souliotis et al., 2016; Gkatzamanidou et al., 2014). Εδώ, οι ασθενείς με HNSCC εμφάνισαν μειωμένη ικανότητα NER σε σύγκριση με τους HC, με τους ανταποκρινόμενους στο Nivolumab να παρουσιάζουν χαμηλότερη δραστηριότητα NER από τους μη ανταποκρινόμενους. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η ικανότητα επιδιόρθωσης με το μηχανισμό NER εμπλέκεται τόσο στην παθογένεια του HNSCC όσο και στην αντοχή στην ανταπόκριση στη θεραπεία με Nivolumab.

Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι η παρατεταμένη ενεργοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης DSB μπορεί να διευκολύνει την απόκτηση και την εξέλιξη ενός όγκου ή/και την επαγωγή ενός ανθεκτικού στα φάρμακα φαινοτύπου (Shammas et al., 2009). Σε συμφωνία με αυτά τα δεδομένα, βρήκαμε αυξημένη ικανότητα επιδιόρθωσης DSB ασθενών με HNSCC σε σύγκριση με HC, όπως και σε προηγούμενη μελέτη (Psyrris et al., 2021), με αποτέλεσμα χαμηλότερο φορτίο DSBs που προκαλείται από φάρμακα στα κύτταρα των ασθενών.

Επίσης, παρατηρήσαμε χαμηλότερα ποσοστά απόπτωσης σε ασθενείς με HNSCC από ότι σε HC, εύρημα που συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι η αποφυγή της απόπτωσης είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκίνου (Stefanou et al., 2022; Psyrris et al., 2021; Hanahan et al., 2011). Αυτό που είναι αξιοσημείωτο είναι πως στη χρονική στιγμή των 48 ωρών απαιτούνται υψηλότερες δόσεις σισπλατίνης για να οδηγήσουν σε απόπτωση τα PBMCs των ασθενών που ανταποκρίθηκαν στο Nivolumab (CR/PR/MR) σε σχέση με τους HPD ασθενείς, υποδεικνύοντας την ανθεκτικότητα των PBMCs των ασθενών που ανταποκρίθηκαν στο Nivolumab συγκριτικά με τους ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν, συσχετίζοντας την ικανότητα επιβίωσης των PBMCs με την ανταπόκριση στο Nivolumab.

Ένας από τους περιορισμούς της μελέτης μας είναι η ετερογένεια των εγγεγραμμένων ασθενών ως προς το στάδιο. Οι βιοδείκτες DDR αξιολογήθηκαν σε σχέση με τη θεραπευτική ανταπόκριση μόνο σε ασθενείς που έλαβαν Nivolumab και απαιτείται

επικύρωση των αποτελεσμάτων μας σε μελλοντικές μεγαλύτερες μελέτες. Επιπλέον, δεδομένου ότι οι παράμετροι DDR εξετάστηκαν μόνο σε PBMCs, ένας άλλος περιορισμός της παρούσας μελέτης είναι ότι δεν είναι σαφές εάν τα σήματα DDR που εμφανίζονται σε ιστούς όγκου από ασθενείς με HNSCC αντανακλώνται στα PBMCs. Αξίζει να σημειωθεί, πως προηγούμενες μελέτες σε συμπαγείς όγκους έχουν δείξει ότι η παρακολούθηση των παραμέτρων DDR στο αίμα μπορεί να είναι δυνητικά χρήσιμη στην πρόγνωση του ασθενούς (Fikrova et al., 2014; Allione et al., 2018; Buchynska et al., 2014) και στην πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία (Stefanou et al., 2015; Lui et al., 2017; Lobachevsky et al., 2020). Επομένως, μια βασική πρόκληση για το μέλλον είναι να εξετάσουμε τις παραμέτρους DDR τόσο σε βιοψίες όγκου όσο και στα PBMCs από τους ίδιους ασθενείς με HNSCC.

Συμπερασματικά, οι αλλαγές στα σήματα DDR εμπλέκονται στην απόκριση στη ανοσοθεραπεία HNSCC και μπορούν να αξιοποιηθούν ως νέοι θεραπευτικοί στόχοι και αποτελεσματικοί μη επεμβατικοί βιοδείκτες. Με δεδομένο ότι έχουν βρεθεί ελλείψεις στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA που διαμορφώνουν την ανοσολογική απόκριση, αυτά τα αποτελέσματα μπορεί να οδηγήσουν στην ταυτοποίηση εργαλείων που βασίζονται σε DDR για την επιλογή υποψηφίων στην ανοσοθεραπείας.



## Βιβλιογραφία

1. Allione A, Pardini B, Viberti C, et al. The prognostic value of basal DNA damage level in peripheral blood lymphocytes of patients affected by bladder cancer. *UrolOncol*. 2018;36:241.e15-241.e23.
2. Anderson G, Ebadi M, Vo K, et al. An Updated Review on Head and Neck Cancer Treatment with Radiation Therapy. *Cancers (Basel)*. 2021;13(19):4912.
3. Banissi C, Ghiringhelli F, Chen L, et al. Treg depletion with a low-dose metronomic temozolomide regimen in a rat glioma model. *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58(10):1627-1634.
4. Bauml JM, Aggarwal C, Cohen RB. Immunotherapy for head and neck cancer: where are we now and where are we going?. *AnnTranslMed*. 2019;7(Suppl 3):S75.
5. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res*. 1988;48(11):3282-3287.25.
6. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2006;354(6):567-578.
7. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2020;70(4):313.
8. Buchynska L, Brieieva O, Glushchenko N, et al. DNA repair deficiency in peripheral blood lymphocytes of endometrial cancer patients with a family history of cancer. *BMC Cancer*. 2014;14:765.
9. Burrell RA, McGranahan N, Bartek J, et al. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*. 2013;501:338-345.
10. Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, et al. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2019;394(10212):1915-1928.
11. Ceccaldi R, Rondinelli B, D'Andrea AD. Repair pathway choices and consequences at the double-strand break. *Trends Cell Biol*. 2016;26: 52-64.
12. Chakraborty A, Tapryal N, Venkova T, et al. Classical non-homologous end-joining pathway utilizes nascent RNA for error-free double-strand break repair of transcribed genes. *Nat Commun*. 2016;7:13049.
13. Chakraborty A, Tapryal N, Venkova T, et al. Classical non-homologous end-joining pathway utilizes nascent RNA for error-free double-strand break repair of transcribed genes. *Nat Commun*. 2016;7:13049.
14. Chakravarthi BV, Nepal S, Varambally S. Genomic and epigenomic alterations in cancer. *Am J Pathol*. 2016;186:1724-1735.
15. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *EnvironMolMutagen*. 2017;58(5):235-263.
16. Ciccia A, ElledgeSJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *MolCell*. 2010;40(2):179-204.

17. Cohen EEW, Bell RB, Bifulco CB, et al. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC). *J ImmunotherCancer*. 2019;7(1):184.
18. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, et al. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2004;350:1937-1944.
19. De Bont R, van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*. 2004;19:169-185.
20. Dequanter D, Dok R, Nuyts S. Basal oxidative stress ratio of head and neck squamous cell carcinomas correlates with nodal metastatic spread in patients under therapy. *Onco Targets Ther*. 2017;10:259-263.
21. Fakhry C, Zhang Q, Nguyen-Tan PF, et al. Human papillomavirus and overall survival after progression of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2014;32(30):3365-3373.
22. Ferlay J, Ervik M, Lam F, et al. *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, <<https://gco.iarc.fr/today>> (2018).
23. Ferris RL, Blumenschein G Jr, Fayette J, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*. 2016;375(19):1856-1867.
24. Fikrova P, Stetina R, Hrnčiarik M, et al. DNA crosslinks, DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes of non-small cell lung cancer patients treated with platinum derivatives. *Oncol Rep*. 2014;31: 391-396.
25. Galluzzi L, Buqué A, Kepp O, et al. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(2):97-111.
26. Ghebeh H, Lehe C, Barhoush E, et al. Doxorubicin downregulates cell surface B7-H1 expression and upregulates its nuclear expression in breast cancer cells: role of B7-H1 as an anti-apoptotic molecule. *Breast Cancer Res*. 2010;12(4):R48.
27. Gillison ML, Blumenschein G Jr, Fayette J, et al. CheckMate 141: 1-Year Update and Subgroup Analysis of Nivolumab as First-Line Therapy in Patients with Recurrent/Metastatic Head and Neck Cancer. *Oncologist*. 2018;23(9):1079-1082.
28. Gillison ML, Trotti AM, Harris J, et al. Radiotherapy plus cetuximab or cisplatin in human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (NRG Oncology RTOG 1016): a randomised, multicentre, non-inferiority trial [published correction appears in *Lancet*. 2020 Mar 7;395(10226):784]. *Lancet*. 2019;393(10166):40-50.
29. Gkatzamanidou M, Sfrikakis PP, Kyrtopoulos SA, et al. Chromatin structure, transcriptional activity and DNA repair efficiency affect the outcome of chemotherapy in multiple myeloma. *Br J Cancer*. 2014;111: 1293-1304.
30. Guha N, Boffetta P, Wünsch Filho V, et al. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. *Am J Epidemiol*. 2007;166(10):1159-1173.
31. Halliwell B, GutteridgeJMC. *Free radicals in biology and medicine*. OxfordUniversityPress, USA; 2015.
32. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646-674.
33. Harper JW, ElledgeSJ. The DNA damage response: ten years after. *MolCell*. 2007;28(5):739-745.

34. Hashimoto S, Anai H, Hanada K. Mechanisms of interstrand DNA crosslink repair and human disorders. *Genes Environ.* 2016;38:9.
35. Hegde ML, Izumi T, Mitra S. Oxidized base damage and single-strand break repair in mammalian genomes: role of disordered regions and posttranslational modifications in early enzymes. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2012;110:123-153.
36. Helleday T. Homologous recombination in cancer development, treatment and development of drug resistance. *Carcinogenesis.* 2010;31(6):955-960.
37. Hiddinga BI, Pauwels P, Janssens A, et al. O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT): A drugable target in lung cancer?. *LungCancer.* 2017;107:91-99.
38. <https://iivs.org/assays/respiratory-toxicology-2/oxidative-stress/>
39. Isayeva T, Li Y, Maswahu D, et al. Human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers: a systematic literature review. *Head Neck Pathol.* 2012;6 Suppl 1(Suppl 1):S104-S120.
40. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature.* 2009;461(7267):1071-1078.
41. Jeggo PA, Pearl LH, Carr AM. DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. *Nat Rev Cancer.* 2016;16:35-42.
42. Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(5):335-346.
43. Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res.* 2001;478:23-43.
44. Kim H, Kwon M, Kim B, et al. Clinical outcomes of immune checkpoint inhibitors for patients with recurrent or metastatic head and neck cancer: real-world data in Korea. *BMC Cancer.* 2020;20(1):727.
45. Krokan HE, Bjørås M. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(4):a012583. Published 2013 Apr 1.
46. Kwon J, Bakhom SF. The cytosolic DNA-sensing cGAS/STING pathway in cancer. *Cancer Discov.* 2020;10:26-39.
47. Ledermann JA, Pujade-Lauraine E. Olaparib as maintenance treatment for patients with platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. *Ther Adv Med Oncol.* 2019;11:1758835919849753.
48. Liou GY, Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res.* 2010;44(5):479-496.
49. Liu WM, Fowler DW, Smith P, et al. Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses. *Br J Cancer.* 2010;102(1):115-123.
50. Liu Z, Liu H, Han P, et al. Apoptotic capacity and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer.* 2017;72:166-176.
51. Lobachevsky PN, Bucknell NW, Mason J, et al. Monitoring DNA damage and repair in peripheral blood mononuclear cells of lung cancer radiotherapy patients. *Cancers (Basel).* 2020;12:2517.
52. Malaquin N, Carrier-Leclerc A, Dessureault M, et al. DDR-mediated crosstalk between DNA-damaged cells and their microenvironment. *Front Genet.* 2015;6:94.
53. Nenclares P, Rullan A, Tam K, et al. Introducing Checkpoint Inhibitors Into the Curative Setting of Head and Neck Cancers: Lessons Learned, Future Considerations. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2022;42:1-16.

54. Nirmala JG, Lopus M. Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Biol Toxicol.* 2020;36(2):145-164.
55. Pai SI, Faivre S, Licitra L, et al. Comparative analysis of the phase III clinical trials of anti-PD1 monotherapy in head and neck squamous cell carcinoma patients (CheckMate 141 and KEYNOTE 040). *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):96.
56. Papanikolaou C, Rapti V, Stellas D, et al. Delineating the SARS-CoV-2 Induced Interplay between the Host Immune System and the DNA Damage Response Network. *Vaccines (Basel).* 2022;10(10):1764.
57. Park HS, Kim SR, Lee YC. Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology.* 2009;14(1):27-38.
58. Patel MR, Falchook GS, Wang JS-Z, et al. Open-label, multicenter, phase I study to assess safety and tolerability of adavosertib plus durvalumab in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol.* 2019;37(suppl 15):2562.
59. Pateras IS, Havaki S, Nikitopoulou X, et al. The DNA damage response and immune signaling alliance: is it good or bad? Nature decides when and where. *PharmacolTher.* 2015;154:36-56.
60. Peltanova B, Raudenska M, Masarik M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Mol Cancer.* 2019;18(1):63.
61. Prasad V, Kaestner V. Nivolumab and pembrolizumab: Monoclonal antibodies against programmed cell death-1 (PD-1) that are interchangeable. *Semin Oncol.* 2017;44(2):132-135.
62. Psyrris A, Gkatzamanidou M, Papaxoinis G, et al. The DNA damage response network in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *ESMOOpen.* 2021;6(2):100075.
63. Puzanov I, Diab A, Abdallah K, et al. Managing toxicities associated with immune checkpoint inhibitors: consensus recommendations from the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) Toxicity Management Working Group. *J Immunother Cancer.* 2017;5(1):95.
64. Ray Chaudhuri A, Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18: 610-621.
65. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science.* 2015;348(6230):124-128.
66. Romero Román A, Campo-Cañaveral de la Cruz JL, Macía I, et al. Outcomes of surgical resection after neoadjuvant chemoimmunotherapy in locally advanced stage IIIA non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2021;60(1):81-88.
67. Rothschild SI, Zippelius A, Eboulet EI, et al. SAKK 16/14: Durvalumab in Addition to Neoadjuvant Chemotherapy in Patients With Stage IIIA(N2) Non-Small-Cell Lung Cancer-A Multicenter Single-Arm Phase II Trial. *J Clin Oncol.* 2021;39(26):2872-2880.
68. Saâda-Bouزيد E, Defaucheux C, Karabajakian A, et al. Hyperprogression during anti-PD-1/PD-L1 therapy in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol.* 2017;28(7):1605-1611.
69. Saleh K, Daste A, Martin N, et al. Response to salvage chemotherapy after progression on immune checkpoint inhibitors in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer.* 2019;121:123-129.

70. Schärer OD. Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013; 5: a012609.
71. Schmid P, Cortes J, Puztai L, et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2020;382(9):810-821.
72. Sfikakis PP, Vlachogiannis NI, Ntouros PA, et al. Microvasculopathy-Related Hemorrhagic Tissue Deposition of Iron May Contribute to Fibrosis in Systemic Sclerosis: Hypothesis-Generating Insights from the Literature and Preliminary Findings. *Life (Basel).* 2022;12(3):430.
73. Shamas MA, Shmookler Reis RJ, Koley H, et al. Dysfunctional homologous recombination mediates genomic instability and progression in myeloma. *Blood.* 2009;113:2290-2297.
74. Sheng J, Fang W, Yu J, et al. Expression of programmed death ligand-1 on tumor cells varies pre and post chemotherapy in non-small cell lung. *Sci Rep.* 2016;6:20090.
75. Shin E, Kim J. The potential role of YAP in head and neck squamous cell carcinoma. *Exp Mol Med.* 2020;52(8):1264-1274.
76. Shu CA, Gainor JF, Awad MM, et al. Neoadjuvant atezolizumab and chemotherapy in patients with resectable non-small-cell lung cancer: an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2020;21(6):786-795.
77. Shuck SC, Short EA, Turchi JJ. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *CellRes.* 2008;18(1):64-72.
78. Singh AK, Pandey P, Tewari M, et al. Free radicals hasten head and neck cancer risk: a study of total oxidant, total antioxidant, DNA damage, and histological grade. *J Postgrad Med.* 2016;62:96-101.
79. Sliwinski T, Markiewicz L, Rusin P, et al. Impaired nucleotide excision repair pathway as a possible factor in pathogenesis of head and neck cancer. *Mutat Res.* 2011;716:51-58.
80. Souliotis VL, Vlachogiannis NI, Pappa M, et al. DNA Damage Response and Oxidative Stress in Systemic Autoimmunity. *Int J Mol Sci.* 2019;21(1):55.
81. Souliotis VL, Vougas K, Gorgoulis VG, et al. Defective DNA repair and chromatin organization in patients with quiescent systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2016;18:182.
82. Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, et al. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol.* 2019;25:101084.
83. Stefanou DT, Bamias A, Episkopou H, et al. Aberrant DNA damage response pathways may predict the outcome of platinum chemotherapy in ovarian cancer. *PLoS One.* 2015;10:e0117654.
84. Stefanou DT, Kouvela M, Stellas D, et al. Oxidative Stress and Deregulated DNA Damage Response Network in Lung Cancer Patients. *Biomedicines.* 2022;10(6):1248.
85. Stein AP, Saha S, Kraninger JL, et al. Prevalence of Human Papillomavirus in Oropharyngeal Cancer: A Systematic Review. *Cancer J.* 2015;21(3):138-146.
86. Swartz JE, Pothen AJ, van Kempen PM, et al. Poor prognosis in human papillomavirus-positive oropharyngeal squamous cell carcinomas that overexpress hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ . *Head Neck.* 2016;38(9):1338-1346.
87. Tubbs A, Nussenzweig A. Endogenous DNA damage as a source of genomic instability in cancer. *Cell.* 2017;168:644-656.
88. Velleuer E, Dietrich R. Fanconi anemia: young patients at high risk for squamous cell carcinoma. *Mol Cell Pediatr.* 2014;1(1):9.

89. Vincent J, Mignot G, Chalmin F, et al. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res.* 2010;70(8):3052-3061.
90. Virós D, Camacho M, Zarranandia I, et al. Prognostic role of MMP-9 expression in head and neck carcinoma patients treated with radiotherapy or chemoradiotherapy. *Oral Oncol.* 2013;49(4):322-325.
91. Vlachogiannis NI, Gatsiou A, Silvestris DA, et al. Increased adenosine-to-inosine RNA editing in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.* 2020;106:102329.
92. Wang Y, Leung JW, Jiang Y, et al. FANCM and FAAP24 maintain genome stability via cooperative as well as unique functions. *Mol Cell.* 2013;49(5):997-1009.
93. Wong IC, Ng YK, Lui VW. Cancers of the lung, head and neck on the rise: perspectives on the genotoxicity of air pollution. *Chin J Cancer* 2014; 33, 476–480.
94. Wu G, Fang YZ, Yang S, et al. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 2004;134(3):489-492.
95. Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, et al. Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nat Cell Biol.* 2008;10(3):295-305.
96. Yarchoan M, Johnson 3rd BA, Lutz ER, et al. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. *Nat Rev Cancer.* 2017;17:209-222.
97. Zhao H, Shen J, Deininger P, Hunt JD. Abasic sites and survival in resected patients with non-small cell lung cancer. *CancerLett.* 2007;246(1-2):47-53.
98. Zinner R, Johnson JM, Tuluc M, et al. Neoadjuvant nivolumab (N) plus weekly carboplatin (C) and paclitaxel (P) in resectable locally advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol.* 2020 38:15\_suppl, 6583-6583.
99. Zuo L, Prather ER, Stetskiv M, et al. Inflammaging and Oxidative Stress in Human Diseases: From Molecular Mechanisms to Novel Treatments. *Int J MolSci.*2019;20(18):4472.