



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ΠΜΣ Βιοϊατρικές Μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Η επίδραση του βιοχημικού διαύλου PD1/PD-L1 στο
μηχανισμό της αυτοφαγίας και ο ρόλος του στην
ανοσοθεραπεία του καρκίνου πνεύμονα.**

POST GRADUATE THESIS

**The role of PD-1/PDL-1 pathway in autophagy enhances immunotherapy
in lung cancer**

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

**Γεωργία Παπαγιαννοπούλου
Georgia Paragiannopoulou**

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

**Βασιλική Καραβάνα
Vasiliki Karavana**

ΑΙΓΑΛΕΩ, ΑΘΗΝΑ, 2020



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences
Postgraduate program:
Biomedical methods and technology in diagnosis



POST GRADUATE THESIS

The role of PD-1/PDL-1 pathway in autophagy enhances immunotherapy in lung cancer

GEORGIA PAPAGIANOPOULOU

16012

Pap_gio@hotmail.com

SUPERVISOR

VASILIKI KARAVANA

SECOND SUPERVISOR

FRAGKISKI ANTHOULI-ANAGNOSTOPOULOU

THIRD SUPERVISOR

NIKOLAOS THALASSINOS

AIGALEO, ATHENS, 2020

Δήλωση περί λογοκλοπής

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, δηλώνω ενυπογράφως ότι είμαι αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την ολοκλήρωση της οποίας κάθε βοήθεια είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται λεπτομερώς στην εργασία αυτή. Έχω αναφέρει πλήρως και με σαφείς αναφορές, όλες τις πηγές χρήσης δεδομένων, απόψεων, θέσεων και προτάσεων, ιδεών και λεκτικών αναφορών, είτε κατά κυριολεξία είτε βάσει επιστημονικής παράφρασης. Αναλαμβάνω την προσωπική και ατομική ευθύνη ότι σε περίπτωση αποτυχίας στην υλοποίηση των ανωτέρω δηλωθέντων στοιχείων, είμαι υπόλογος έναντι λογοκλοπής, γεγονός που σημαίνει αποτυχία στην διπλωματική μου εργασία και κατά συνέπεια αποτυχία απόκτησης Τίτλου Σπουδών, πέραν των λοιπών συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων. Δηλώνω, συνεπώς, ότι αυτή η διπλωματική εργασία προετοιμάστηκε και ολοκληρώθηκε από εμένα προσωπικά και αποκλειστικά και ότι, αναλαμβάνω πλήρως όλες τις συνέπειες του νόμου στην περίπτωση κατά την οποία αποδειχθεί, διαχρονικά, ότι η εργασία αυτή ή τμήμα της δεν μου ανήκει διότι είναι προϊόν λογοκλοπής άλλης πνευματικής ιδιοκτησίας.

Όνομα(τα) φοιτητή(των)

Γεωργία Παπαγιαννοπούλου

Ευχαριστίες

Με την υλοποίηση της διατριβής μου, θα ήθελα να απευθύνω ένα ολόψυχο ευχαριστώ σε όσους στάθηκαν δίπλα μου σ' αυτή την επίπονη προσπάθεια και με βοήθησαν να τη φέρω σε πέρας.

Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα Δρ. Βασιλική Καραβάνα, για την συμπαράσταση, καθοδήγηση και αμέριστη υλικοτεχνική υποστήριξη, χωρίς την οποία δε θα είχαν προκύψει τα αποτελέσματα της διατριβής αυτής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την καθηγήτρια Φραγκίσκη Ανθούλη-Αναγνωστοπούλου για τις σημαντικές συμβουλές, τη συμπαράσταση και την άμεση ανταπόκριση κάθε φορά που χρειαζόμουν τη βοήθειά της.

Τέλος ένα πολύ μεγάλο, βαθύ και θερμό ευχαριστώ οφείλω στον σύζυγο μου Νίκο Κόχυλα, που χωρίς την αγάπη και τη συμπαράστασή του, η εκπόνηση και ολοκλήρωση της διατριβής μου δε θα ήταν ποτέ δυνατή

Περίληψη

Ο καρκίνος του πνεύμονα έχει το διπλό χαρακτηριστικό να είναι και συχνός και εξαιρετικά κακής πρόγνωσης. Η αντιμετώπιση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου πνεύμονα (ΜΜΚΠ) περιλάμβανε 4 πυλώνες: χειρουργική, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία και στοχευμένη θεραπεία. Σε αυτούς πρόσφατα ήρθε να προστεθεί η ανοσοθεραπεία. Η κινητοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων κατά του όγκου, που επετεύχθη με την κατανόηση και αναστολή του μονοπατιού PD1/PD-L1, οδήγησε σε μια επαναστατική θεραπεία, με απτά αποτελέσματα και δυνατότητα συνδυασμού της με άλλες μορφές θεραπείας.

Αναστολείς του PD1, όπως το nivolumab και το pembrolizumab, και αναστολείς του PD-L1, όπως το atezolizumab και το durvalumab έχουν εισαχθεί στην κλινική πράξη και περαιτέρω φάρμακα και συνδυασμοί βρίσκονται εν εξελίξει.

Πολλά υποσχόμενη είναι επίσης η μελέτη του μηχανισμού της αυτοφαγίας στο καρκινικό κύτταρο. Η ρύθμιση του μηχανισμού αυτού μπορεί να χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά, με τη χρήση «παλαιών» φαρμάκων, όπως η χλωροκίνη και υδροξυχλωροκίνη και φυσικών συστατικών όπως η κουρκουμίνη. Όλες αυτές οι ανακαλύψεις σηματοδοτούν μια νέα εποχή στην αντιμετώπιση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα.

Abstract

Lung cancer has the dual characteristics of being both common and deadly. The treatment of non small cell lung cancer has traditionally encompassed four features: surgery, chemotherapy, radiotherapy and targeted treatment. To these, immunotherapy has been recently added. The PD1/PD-L1 pathway is a major player in T-lymphocytes mobilization and tumor progression. Inhibition of both PD1/PD-L1 immune checkpoints is a particularly promising treatment approach in lung cancer. The use of standard chemotherapy combined with PD-1/PDL-1 inhibition has been proposed as a potential means of enhancing therapeutic efficacy.

PD1 inhibitors, such as nivolumab and pembrolizumab, and PD-L1 inhibitors, such as atezolizumab and durvalumab are currently in clinical use. Numerous PD-1 and PD-L1 blocking antibodies are under development, each aiming to facilitate a vigorous and sustained anti-tumor immune response in patients with advanced lung cancer.

Autophagy as a form of programmed cell death participates in the pathogenesis, development and progression of lung cancer. The utilization of this pathway can be used therapeutically, in combination with “old” drugs, such as chloroquine and hydroxychloroquine, or natural ingredients such as curcumin. Therefore the new therapeutic developments mark a new era in non small cell lung cancer treatment.

Πίνακας περιεχομένων

Συνομογραφίες	XIII
Πρόλογος	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	4
ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	4
ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ	6
ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	8
ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΜΚΠ ΚΑΤΑ ΤΝΜ	12
ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	14
ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ Η ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ PD-1 / PDL-1	18
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	19
Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΩΝ PD-1/PDL-1	19
ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ PD-L1 ΜΕΣΩ ΔΙΑΥΛΩΝ ΟΓΚΟΓΟΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ	21
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ PD-L1	25
ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ PD-L1	26
ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ PD-L1	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ PD1/PD-L1 ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	30
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	31
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΠΑΝΤΗΣΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	32
Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ PD1 ΣΤΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ	33
Η ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ PD1/ PD-L1	34
Η ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ PD1/PD-L1 ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ	35
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΣ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ PD1/PD-L1	38
ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΤΟ ΜΗ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	40
ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ PD-L1	43
Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ	44
ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΜΕ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ PDL1/PD1 ΣΤΗΝ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ	51
ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ	52
Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑΣ	53
Η ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ ΣΤΟΝ ΜΗ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	55

ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ ΩΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ ΣΤΟ ΜΗ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΝΕΥΜΟΝΑ	56
ΦΑΡΜΑΚΑ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ ΣΤΟ ΜΜΠΚ	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΤΟ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΕΠΙΛΟΓΟΣ	61
ΕΠΙΛΟΓΟΣ	62
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	64

Συντομογραφίες

	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
PD-1	Programmed cell death protein 1	Πρωτεΐνη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου 1
PDL-1	Programmed death-ligand 1	Συνδέτης προγραμματισμένου θανάτου 1
CHRNA3	Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-3	Νευροποδοχέας της ακετυλοχολίνης υπομονάδα αλφα 3
CHRNA5	Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-5	Νευροποδοχέας της ακετυλοχολίνης υπομονάδα αλφα 5
CHRNB4	Neuronal acetylcholine receptor subunit beta-4	Νευροποδοχέας της ακετυλοχολίνης υπομονάδα βήτα 4
CYP1A1	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	Κυτόχρωμα P450, οικογένεια 1, υποοικογένεια A, πολυπεπτίδιο 1
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase	Κινάση αναπλαστικού λεμφώματος
EGFR	Epidermal growth factor receptor	Υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
TTF1	Thyroid transcription factor-1	Θυρεοειδικός μεταγραφικός παράγοντας -1
LCNEC	Large cell neuroendocrine carcinoma of the lung	Μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα του πνεύμονα
Cox-2	Cyclooxygenase-2	Κυκλοοξυγενάση 2
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinases	Φωσφατιδυλινοσιτόλη 3-κινάση
mTOR	Mechanistic target of rapamycin	Μηχανιστικός στόχος της ραπαμυκίνης
IGF1-R	Insulin-like growth factor 1 receptor	Υποδοχέας του ινσουλινόμορφου αυξητικού παράγοντα 1
LOH	Loss Of Heterozygosity	Απώλεια ετεροζυγωτίας
PTEN	Phosphatase and tensin homolog	Φωσφατάση και τανσίνης ομόλογο
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	Μετατροπέας σήματος και ενεργοποιητής μεταγραφής 3
NF-κB	Nuclear factor-κB	Πυρηνικός παράγοντας – κB
JAK	Janus kinase	Janus κινάση
HIF-1	hypoxia-inducible factor -1	Υποξικός παράγοντας 1
LMP1	latent membrane protein 1	Λανθάνουσα μεμβρανική πρωτεΐνη-1

Πρόλογος

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας των αναστολέων του άξονα PD-1/PDL-1 στην θεραπεία του καρκίνου πνεύμονα. Συγχρόνως εξετάστηκε και η συμμετοχή του μηχανισμού της αυτοφαγίας στην κακοήθεια του πνεύμονα.

Στα πλαίσια αυτά στο πρώτο κεφάλαιο γίνεται εκτεταμένη αναφορά στον καρκίνο του πνεύμονα. Ειδικότερα περιγράφονται οι αιτιολογικοί παράγοντες και αναλύεται η επιδημιολογική κατάσταση τόσο σε παγκόσμιο επίπεδο όσο και σε εθνικό. Εκτεταμένη αναφορά δίνεται στην ιστολογική εικόνα και κατηγοριοποίηση αυτού σύμφωνα με τα τελευταία παθολογοανατομικά δεδομένα. Το μοριακό προφίλ της πνευμονικής κακοήθειας αποδίδεται με τη διαλεύκανση της γενετικής αστάθειας και των χρωμοσωμικών ανωμαλιών που τον διέπουν. Τέλος δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στα θεραπευτικά σχήματα που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία του πνευμονικού καρκίνου τόσο σε κλινική όσο και σε ερευνητική πράξη.

Το δεύτερο κεφάλαιο διαπραγματεύεται την βιολογία του διαύλου των PD-1/PDL-1. Αναλύεται η δομή των γονιδίων και τα βιοχημικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την πρωτεϊνική έκφραση αυτών. Η γονιδιακή μεταγραφή των PD-1/PDL-1 καθώς και η επίδραση επιγενετικών παραγόντων παραθέτονται σε ξεχωριστό υποκεφάλαιο. Τέλος αναλύεται η εφαρμογή των PD-1/PDL-1 αναστολέων σαν μέσο ανοσοθεραπείας στην εν λόγω κακοήθεια.

Το τρίτο κεφάλαιο διαπραγματεύεται εξολοκλήρου την χρήση των PD-1/PDL-1 αναστολέων στην ανοσοθεραπεία του καρκίνου πνεύμονα. Μετά από μία μικρή ιστορική αναδρομή, αναλύεται ο μηχανισμός της ανοσολογικής απάντησης στην κακοήθεια του πνεύμονα. Κατόπιν συγκεκριμενοποιούνται οι μηχανισμοί κάτω από τους οποίους, ο διάυλος των PD-1/PDL-1 συμμετέχει στην ανοσολογική απάντηση. Ακολούθως διερευνάται η σημασία του μικροπεριβάλλοντος του όγκου στην δράση των PD-1/PDL-1. Εκτεταμένη μελέτη γίνεται για την δράση των αναστολέων των PD-1/PDL-1, την εφαρμογή τους στην κλινική πράξη και τα αποτελέσματα των μελετών. Τέλος αναλύεται η χρήση των αναστολέων αυτών σαν θεραπεία, συνδυαστικά με χημειοθεραπεία.

Το τέταρτο κεφάλαιο διαπραγματεύεται τον μηχανισμό της αυτοφαγίας και την συμμετοχή του άξονα PD-1/PDL-1 σε αυτόν. Διερευνάται ο μηχανισμός της αυτοφαγίας

και τα μοριακά μονοπάτια που τον ενεργοποιούν. Μνεία δίνεται στην έκφραση του μηχανισμού στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και στην χρησιμότητα του σαν προγνωστικός δείκτης κακοήθειας. Τέλος διερευνώνται τα φαρμακευτικά σκευάσματα και η αποτελεσματικότητα αυτών στην καταστολή του μηχανισμού.

Στο τελευταίο κεφάλαιο παραθέτονται τα γενικά συμπεράσματα της μελέτης με έμφαση στην θεραπευτική επανάσταση της ανοσοθεραπείας στον καρκίνο του πνεύμονα και ειδικότερα στο μη μικροκυτταρικό υπότυπο αυτού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

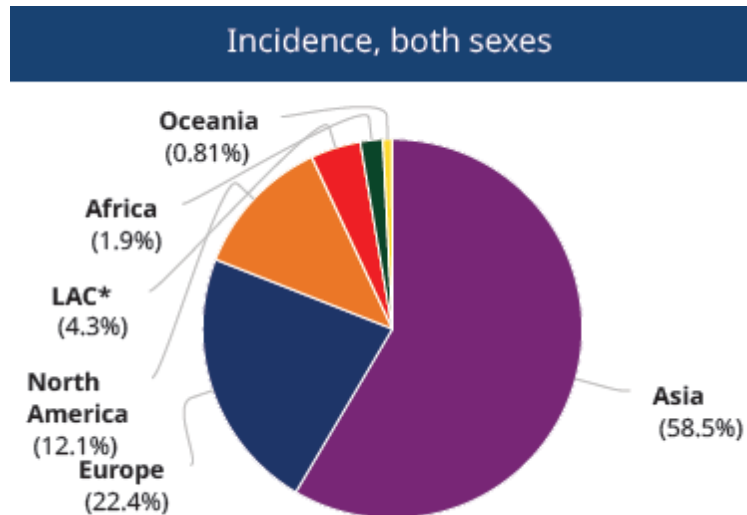
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Ο όρος καρκίνος του πνεύμονα, αναφέρεται στις κακοήθειες που πηγάζουν από τους αεραγωγούς ή το πνευμονικό παρέγχυμα. Το 95% των καρκίνων του πνεύμονα ταξινομείται σε δύο είδη: α) το μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΚΠ), που είναι πολύ επιθετικός, δίνει μεταστάσεις νωρίς κατά την πορεία της νόσου και προκαλείται κυρίως από το κάπνισμα, και β) το μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΜΚΠ), που είναι ο πιο κοινός τύπος, περιλαμβάνοντας το 85% όλων των καρκίνων του πνεύμονα. Αναπτύσσεται και δίνει μεταστάσεις πιο αργά από το μικροκυτταρικό καρκίνο. Ο διαχωρισμός αυτός είναι απαραίτητος για τη σταδιοποίηση, θεραπεία και πρόγνωση της νόσου. Παγκοσμίως, ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η κυριότερη αιτία θανάτου από καρκίνο. Αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο στους άντρες και τη δεύτερη πιο κοινή για τις γυναίκες. Προσβάλλει άτομα ηλικίας άνω των 45 ετών ενώ το 55% περίπου των περιστατικών είναι άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών. Η πενταετή επιβίωση είναι κακή και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως είναι ο τύπος του όγκου, το στάδιο ή η ύπαρξη μεταστάσεων και άλλους, καθιστώντας τον καρκίνο του πνεύμονα ένα σοβαρό επιδημιολογικό πρόβλημα.

1.1 ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί το δεύτερο σε συχνότητα καρκίνο και στα δύο φύλα και την πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο, με ποσοστό 19% των συνολικών θανάτων από καρκίνο παγκοσμίως (Torre LA, 2015; Siegel R, 2012). Το 2018 παρουσιάστηκαν παγκοσμίως 2,093,876 νέα περιστατικά αυξημένα κατά 11,6% σε σχέση με το 2017. Τα περισσότερα περιστατικά (58,5%) εντοπίζονται στην ανατολική Ασία, ενώ η Ευρώπη και η Νότια Αμερική αντιπροσωπεύουν το 22,4% και 12,1% των περιπτώσεων αντιστοίχως (Youlden DR, 2008) (Εικόνα 1). Η θνησιμότητα παραμένει υψηλή, αφού την ίδια περίοδο διαπιστώθηκαν 1,761,007 θάνατοι από καρκίνο του πνεύμονα (Ferlay J, 2015).

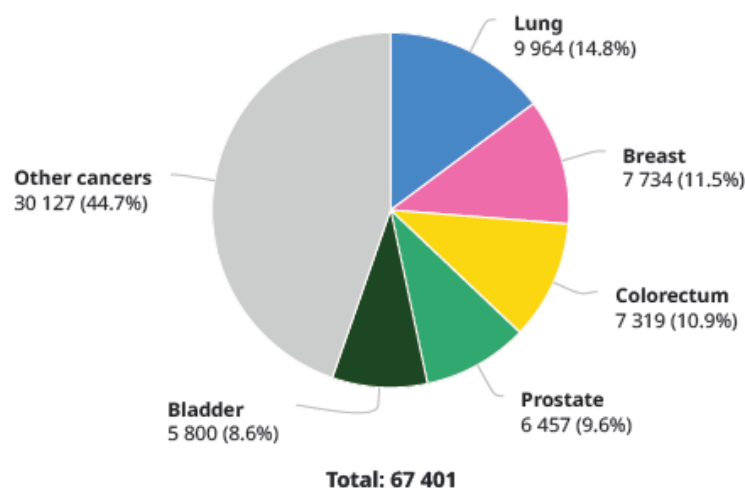


Εικόνα 1: Δημογραφική κατανομή του καρκίνου του πνεύμονα παγκοσμίως και για τα δυο φύλα. Πηγή: Επίσημη έκθεση του σχεδίου *GLOBOCAN* του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ) για το 2018. Αναδημοσίευση από την ιστοσελίδα Global Cancer Observatory. <http://globocan.iarc.fr/>.

Για τον Ελλαδικό χώρο τα δεδομένα δεν είναι ευχάριστα. Σύμφωνα με τα στοιχεία του Π.Ο.Υ, το 2018 σημειώθηκε αύξηση των κρουσμάτων καρκίνου πνεύμονα κατά 14,8%, και συνολικά 9,964 νέα περιστατικά, ενώ σημειώθηκαν 8,343 θάνατοι (Εικόνα 2). Στους άνδρες αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου και στις γυναίκες τη δεύτερη μετά τον καρκίνο μαστού. Η Ελλάδα κατέχει έναν από τους υψηλότερους ρυθμούς επίπτωσης της νόσου στον ευρωπαϊκό χώρο. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην έναρξη του καπνίσματος σε νεαρή ηλικία.

Παρά την διαθεσιμότητα νέων πρωτοποριακών διαγνωστικών μεθόδων καθώς και τις εξελίξεις στην χειρουργική, η πρόγνωση παραμένει κακή, με τη μέση πενταετή επιβίωση να κυμαίνεται μεταξύ 10-30%. Μάλιστα είναι χαρακτηριστικό ότι η επιβίωση ελάχιστα έχει βελτιωθεί σε σχέση με τη δεκαετία του '70 (Howlader N, 2020). Η επιβίωση εξαρτάται βέβαια από το στάδιο της νόσου και τη διάγνωση.

Number of new cases in 2018, both sexes, all ages



Εικόνα 2: Διάγραμμα με τον αριθμό των περιστατικών ανά τύπο καρκίνου στον ελλαδικό χώρο για το έτος 2018, σύμφωνα με τα επίσημα στοιχεία του Π.Ο.Υ. Ο καρκίνος πνεύμονα αντιπροσωπεύει το 14,8% των συνολικών κρουσμάτων. Πηγή: Επίσημη έκθεση του σχεδίου *GLOBOCAN* του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (Π.Ο.Υ) για την Ελλάδα και το έτος 2018. Αναδημοσίευση από την ιστοσελίδα Greece - Global Cancer Observatory. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/300-greece-fact-sheets.pdf>.

Στις Ηνωμένες Πολιτείες, η πενταετής επιβίωση των ασθενών είναι 55% για εντοπισμένη νόσο, 27% για λεμφαδενική διασπορά και μόλις 4% για μεταστατική νόσο. Δυστυχώς, λόγω των μη ειδικών συμπτωμάτων της νόσου, το 57% των καρκίνων πνεύμονα στις Ηνωμένες Πολιτείες διαγιγνώσκονται αφού έχουν δώσει μεταστάσεις (National Cancer Institute, 2015).

1.2 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

Είναι αποδεδειγμένη η σχέση του καπνίσματος με τον ΜΜΚΠ (Woenkhaus M, 2006). Οι χρόνιοι καπνιστές διατρέχουν 20πλάσιο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου πνεύμονα από τους μη καπνιστές. Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου σχετίζεται με την ηλικία έναρξης της καπνιστικής συνήθειας, την διάρκεια και τον αριθμό των τσιγάρων ημερησίως. Η επιδημιολογία του καρκίνου του πνεύμονα ακολουθεί την επιδημιολογία του καπνίσματος (Alberg A, 2007). Η χρήση φίλτρων από τις καπνοβιομηχανίες και η επεξεργασία του καπνού (light τσιγάρα) είχε σαν αποτέλεσμα την αλλαγή στην ιστολογική εικόνα των όγκων παγκοσμίως. Μέχρι το 1987, ο συχνότερος τύπος καρκίνου

ήταν το πλακώδες. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται αύξηση του αδενοκαρκινώματος ιδιαίτερα στις γυναίκες καπνίστριες. Η ιστολογική αυτή διαφορά αποδίδεται στις αλλαγές των τσιγάρων από τις καπνοβιομηχανίες. Η αλλαγές στα εισπνεόμενα καρκινογόνα των τσιγάρων επέφερε και ιδιαίτερη αύξηση επίσης του βρογχοκυψελιδικού υπότυπου του καρκίνου πνεύμονα με μείωση της επίπτωσης του μικροκυτταρικού τύπου.

Το καλύτερο μέτρο άμυνας κατά του καρκίνου αποτελεί βέβαια ο περιορισμός του καπνίσματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι η καρκινογένεση είναι μία πολυετής διαδικασία και προϊόν πολλών ετών καπνίσματος. Ως εκ τούτου οι όποιοι περιορισμοί στο κάπνισμα, θα δείξουν τα αποτελέσματά τους δεκαετίες αργότερα. Σε χώρες που η εκστρατεία περιορισμού του καπνίσματος ξεκίνησε τη δεκαετία του '90, όπως ο Καναδάς, η Αυστραλία, οι Ηνωμένες Πολιτείες και το Ηνωμένο Βασίλειο, τα τελευταία χρόνια εμφανίζουν μείωση στην επίπτωση του καρκίνου του πνεύμονα (Organization, International Agency for Research on Cancer, 2013). Είναι όμως απαραίτητο, και πρέπει να λειτουργήσει συνδυαστικά με μείωση και άλλων καρκινογόνων ουσιών, όπως το παθητικό κάπνισμα και η ατμοσφαιρική ρύπανση (Couraud S, 2012).

Μελέτες έχουν αποδείξει ότι εκτός από το κάπνισμα η ατμοσφαιρική ρύπανση αστικοποιημένων περιοχών, ο αμίαντος, το ραδιενεργό ραδόνιο και η διατροφή αποτελούν παράγοντες κινδύνου. Πνευμονικά νοσήματα όπως είναι η Χρόνια Αποφρακτική Πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), το άσθμα και η φυματίωση συντελούν στην ανάπτυξη κακοήθειας. Άτομα που πάσχουν από ΧΑΠ διατρέχουν από 4 ως και 6 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα, ανεξάρτητα από το αν καπνίζουν ή όχι.

Η οικογενής προδιάθεση του καρκίνου του πνεύμονα απεδείχθη πρώτη φορά το 1963 (Tokuhata GK, 1963). Έκτοτε, πολλές μελέτες ανέδειξαν τη γενετική προδιάθεση του καρκίνου του πνεύμονα, ακόμα και αφού ληφθούν υπόψη άλλοι παράγοντες, όπως κάπνισμα, φύλο, ηλικία, επάγγελμα ή ΧΑΠ (Etzel CJ, 2003; Cote ML, 2005; Schwartz AG, 1996; Jonsson S, 2004; Ooi WL, 1986). Το τελικό αποτέλεσμα ήταν 2πλάσια έως 4πλάσια πιθανότητα εκδήλωσης καρκίνου του πνεύμονα για όποιον έχει συγγενή πρώτου βαθμού με τη νόσο. Η παρουσία οικογενών μορφών καρκίνου οδήγησε στην αναζήτηση σπάνιων, κληροδοτούμενων γονιδίων υψηλής εκφραστικότητας. Το οικογενειακό ιστορικό ενοχοποιείται για την ανάπτυξη καρκίνου πνεύμονα, λόγω της παρουσίας μεταλλάξεων

των γονιδίων *CHRNA3* (Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-3), *CHRNA5* (Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-5), *CHRNA4* (Neuronal acetylcholine receptor subunit beta-4), *CYP1A1* (Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1) και του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *TP53*. Γενικότερα όμως η εγγενής αντοχή καπνιστών στον καρκίνο του πνεύμονα και η εκδήλωσή του σε μη καπνιστές μπορεί να οδηγήσει στην αναζήτηση πιο συχνών γονιδίων χαμηλής εκφραστικότητας.

Παρά τις όποιες ενέργειες για την πρόληψη, ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί μια υπαρκτή νόσο, ακόμα και σε μη καπνιστές. Μόνη εν δυνάμει θεραπεία είναι η χειρουργική εκτομή σε αρχικό στάδιο, κάτι που αποτελεί τη μειοψηφία των ασθενών (Ettinger DS, 2014). Για τους μη εξαιρέσιμους ΜΜΚΠ, η χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα παρουσιάζει βελτίωση στην επιβίωση, ενώ οι στοχευμένες θεραπείες είναι δραστικές έναντι μεταλλάξεων των γονιδίων ALK και EGFR (Reck M, 2013; Lindeman NI, 2013). Νέο όπλο φαίνεται να αποτελεί η κατανόηση των εγγενών ανοσολογικών μηχανισμών στο μικροπεριβάλλον του ΜΜΚΠ και η εισαγωγή της ανοσοθεραπείας σαν ένα επιπλέον βήμα στην αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα (Davies, 2014).

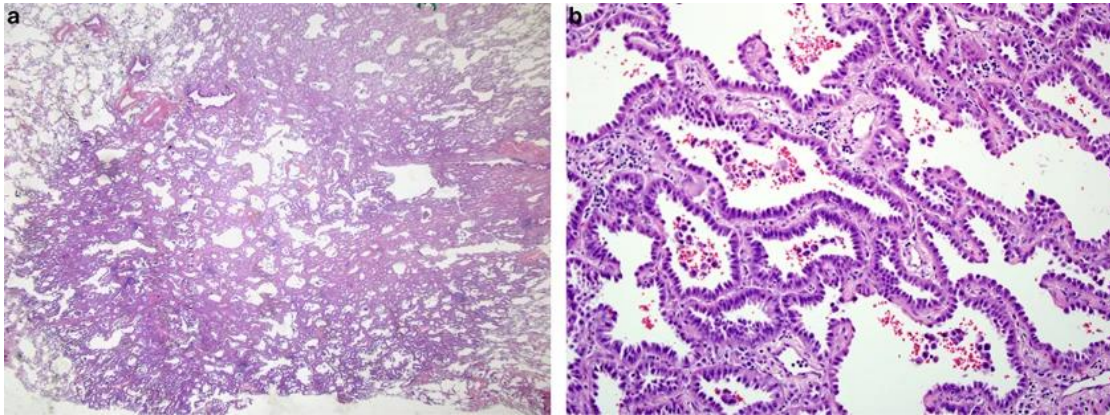
1.3 ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Οι κατευθυντήριες οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ) σε συνεργασία με τις IASLC/ ATLS /ERS διαχωρίζουν ιστολογικά τον καρκίνο του πνεύμονα σε δύο ευρείες κατηγορίες τον ΜΜΚΠ και τον ΜΚΠ (Barker JM, 2002). Για δεκαετίες η διάκριση αυτή ήταν αρκετή μια και τα θεραπευτικά σχήματα στερούνταν ειδικότητας. Η έλευση των στοχευμένων θεραπειών, δηλαδή φαρμάκων προσαρμοσμένα στην ιστολογία και γενετική του συγκεκριμένου καρκίνου του εκάστοτε ασθενούς, άλλαξε τα δεδομένα. Για παράδειγμα, ο αναστολέας VEGF (vascular endothelial growth factor) bevacizumab, έχει ένδειξη μόνο στο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα, ενώ αντίθετα, ο αναστολέας του PD1/PD-L1 μονοπατιού nivolumab, έχει ένδειξη κυρίως για το πλακώδες καρκίνωμα (Travis WD B. E.-C., 2011). Ο ΜΜΚΠ, εμφανίζεται με συχνότητα (85%), και περιλαμβάνει τους εξής υπότυπους (Liu L, 2020).

Αδενοκαρκίνωμα: αποτελεί το 40-70% των ΜΜΚΠ και ανευρίσκεται κυρίως στην περιφέρεια του πνεύμονα. Ιστολογικοί υπότυποι είναι:

- το Αδενοκαρκίνωμα in situ (AIS) (Εικόνα 3),

- το Μικροδιηθητικό Αδενοκαρκίνωμα (ΜΙΑ) Λεπιοειδές
- το Μικροθηλώδες
- το Διηθητικό βλεννώδες (πρότερο βλεννώδες ΒΑC).



Εικόνα 3: Ιστολογική εικόνα αδενοκαρκινώματος in situ, μη βλεννοπαραγωγικό. (α) Αυτός ο όγκος δείχνει ένα οριοθετημένο οζίδιο με λεπιδιακή ανάπτυξη που συνίσταται σε πάχυνση κυψελιδικών τοιχωμάτων από άτυπο πολλαπλασιασμό πνευμονοκυττάρων. (β) Υπερπλασία πνευμονοκυττάρων κατά μήκος του κυψελιδικού τοιχώματος, χωρίς διήθηση. Τομές παραφίνης με χρώση Αιματοξυλίνης-Ηωσίνης. Πηγή: Akihiko Yoshizawa, Noriko Motoi, Gregory J Riely, Cami S Sima, William L Gerald, Mark G Kris, Bernard J Park, Valerie W Rusch, William D Travis. Impact of Proposed IASLC/ATS/ERS Classification of Lung Adenocarcinoma: Prognostic Subgroups and Implications for Further Revision of Staging Based on Analysis of 514 Stage I Cases. *Modern Pathology*. 2011. 24(5):653-64.

Κοινές γενετικές μεταβολές απαντώνται συχνά σε όλους τους ιστολογικούς τύπους καρκίνου του πνεύμονα (p53, Rb, LOH-3p). Προγνωστικής αξίας παράμετροι θεωρούνται οι μεταλλάξεις του EGFR και του KRAS και υποδηλώνουν φτωχή πρόγνωση. Η αντιμετάθεση του EML4-ALK σχετίζεται με την αντίσταση στην χημειοθεραπεία, ο βαθμός θετικότητας του όγκου στον δείκτη TTF1(+). Χρειάζεται εκτομή ολόκληρου του όγκου για την εξαγωγή αυτών των συμπερασμάτων.

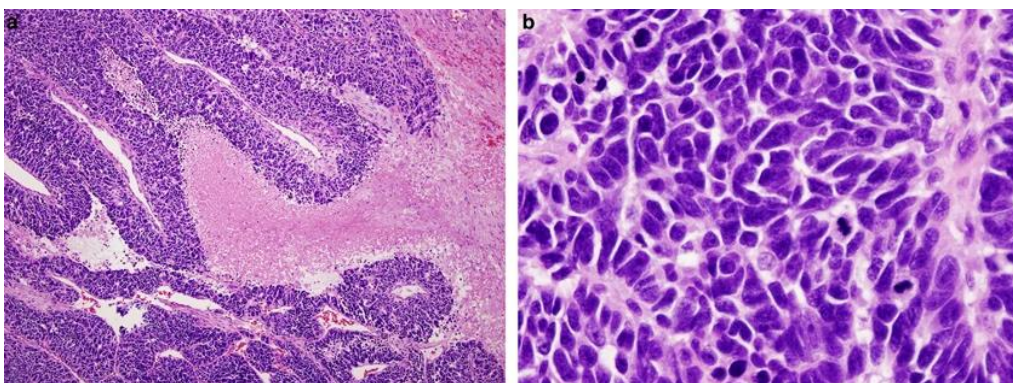
Πλακώδες καρκίνωμα: αποτελεί το 20-30% και ανευρίσκεται στο κέντρο, κοντά σε μείζονες βρόγχους. Εκδηλώνει τους δείκτες p40 και p63 και μπορεί να είναι κερατινοποιημένο ή μη κερατινοποιημένο και basaloid. Αντίθετα με τις υποδιαίρεσεις του αδενοκαρκινώματος, κανένα από τα είδη του πλακώδους δε συνδέεται με διαφορετική πρόγνωση ή αντοχή σε κάποια θεραπεία (Wang LC, 2011).

Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα: αποτελεί το 10-15% και μπορεί να βρεθεί σπουδήποτε στον πνεύμονα (Neal, Hamilton, & Rogers, 2014). Ο όρος αυτός μπορεί να τεθεί μόνο μετά εκτομή ολόκληρου του όγκου και όχι από βιοψίες ή κυτταρολογική

μελέτη. Πολλοί υπότυποί του, με τη χρήση της ανοσοϊστοχημείας διαπιστώθηκε πως αποτελούν στην πραγματικότητα αδενοκαρκινώματα ή πλακώδη καρκινώματα. Έτσι η διάγνυσή του ως ξεχωριστός υπότυπος έχει μειωθεί πολύ τα τελευταία χρόνια και αποτελεί μια «διάγνωση εξ αποκλεισμού» για καρκίνους που δεν εκδηλώνουν δείκτες αδενοκαρκινώματος, πλακώδους ή νευροενδοκρινικού καρκινώματος (Rossi G, 2014).

Νευροενδοκρινείς όγκοι. Πρόκειται για μια ετερογενή ομάδα, που περιλαμβάνει επιθηλιακούς όγκους με νευροενδοκρινική μορφολογία.

Μικροκυτταρικός καρκίνος: Αποτελεί το 20% των περιπτώσεων, σχετίζεται ισχυρά με το κάπνισμα, τείνει να εμφανίζεται σε περιοχές του θώρακα παρακείμενες στους μεγάλους αεραγωγούς και τα μεγάλα αγγεία, και συνοδεύεται συχνά από εκτεταμένη λεμφαδενοπάθεια. Από όλες τις υποκατηγορίες του καρκίνου του πνεύμονα, ο ΜΚΠ είναι εκείνος που παρουσιάζει σε μεγαλύτερο ποσοστό απομακρυσμένες μεταστάσεις κατά τη διάγνωση και συνοδεύεται συχνότερα από εκδηλώσεις παρανεοπλασματικών συνδρόμων. Από ιστολογική άποψη χαρακτηρίζεται από μικρά κύτταρα με ελάχιστο κυτταρόπλασμα, δυσδιάκριτα κυτταρικά όρια, λεπτοκοκκώδη πυρηνική χρωματίνη και δυσδιάκριτα ή απόντα πυρήνια. Τα κύτταρα είναι στρογγυλά, ωειδή και ατρακτόμορφα. Οι πυρήνες εμφανίζονται επιμηκυμένοι με αλληλοεπικάλυψη, παρουσία περισσότερων των δέκα (10) μιτώσεων ανά 2mm² και τυπικά εκτεταμένες νεκρώσεις (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα. (α) Τυπική εικόνα όγκου που αποτελείται από μικρά κακοήθη κύτταρα και εκτεταμένη νέκρωση. (β) Ο όγκος αποτελείται από μικρά κύτταρα, ατρακτόμορφωμα ή ωειδή, με λιγιστό κυτταρόπλασμα, λεπτή κοκκώδη πυρηνική χρωματίνη, συχνές μιτώσεις και πυρήνια εμφανή ή απουσιάζουν. Πηγή: William D Travis. Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. *Modern Pathology*. 2012. 25, S18–S30.

Όσον αφορά στη σταδιοποίηση του μικροκυτταρικού καρκινώματος, η εκτεταμένη διασπορά του όγκου κατά τη διάγνωση, οδήγησε στη σταδιοποίηση του ως περιορισμένη ή εκτεταμένη νόσος και όχι στη χρήση του συστήματος TNM.

Μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα του πνεύμονα (large cell neuroendocrine carcinoma of the lung – LCNEC): Ο όγκος αποτελείται από μεγάλα σε μέγεθος κύτταρα πολυγωνικού σχήματος, με άφθονο πρωτόπλασμα και προέχον πυρήνιο. Στοιχεία νευροενδοκρινικής διαφοροποίησης πρέπει να αναζητούνται με συμπληρωματικές μεθόδους ειδικών νευροενδοκρινικών δεικτών ανοσοϊστοχημείας, όπως είναι η χρωμογρανίνη και η συναπτοφυσίνη. Ταξινομούνται ως μεγαλοκυτταρικά νευροενδοκρινικά καρκινώματα μόνον τα μεγαλοκυτταρικά εκείνα καρκινώματα τα οποία εμφανίζουν νευροενδοκρινική μορφολογία (οργανοειδές πρότυπο ανάπτυξης-ροζέττες) και ανοσοϊστοχημική έκφραση χρωμογρανίνης ή συναπτοφυσίνης ή και των δύο.

Τυπικά και Άτυπα καρκινοειδή του πνεύμονα: Ως τυπικά καρκινοειδή ορίζονται οι νευροενδοκρινικοί όγκοι μεγέθους $\geq 0,5$ εκ. με απουσία νεκρώσεων, ενώ ως άτυπα καρκινοειδή αντίστοιχα οι νευροενδοκρινικοί όγκοι με ή χωρίς νεκρώσεις. Επιδημιολογικά και από πλευράς πρόγνωσης, είναι σαφώς καλύτερη η ανταπόκριση από τα υπόλοιπα μέλη της ομάδας (Carlin ME, 2015). Τόσο τα τυπικά όσο και τα άτυπα καρκινοειδή είναι δυνατόν να απαντούν κεντρικά, αλλά και περιφερειακά, η χαρακτηριστική όμως ανάπτυξη τους είναι ενδοβρογχική. Εν αντιθέσει με τα υψηλής κακοηθείας νευροενδοκρινικά καρκινώματα, τα καρκινοειδή δεν απαντούν σε συνδυασμό με άλλα καρκινώματα. Επί πλέον οι όγκοι αυτοί δεν σχετίζονται ισχυρά με το κάπνισμα.

Σαρκωματώδη καρκινώματα. Επίσης μια ετερογενής ομάδα που περιλαμβάνει το πλειόμορφο καρκίνωμα, το καρκινοσάρκωμα και το πνευμονικό βλάστωμα. Πρόκειται για σπάνιους όγκους, που αποτελούν λιγότερο από 1% των καρκίνων του πνεύμονα (Yendamuri S, 2012). Είναι κατά κανόνα δύσκολη η διάγνωσή τους από βιοψίες και η πρόγνωσή τους είναι κακή. Γενετικός έλεγχος ενδείκνυται, μια και οι όγκοι αυτοί εκδηλώνουν συχνά μεταλλάξεις στα p53, Kras και EGFR (Holst VA, 1997).

Οι εξελίξεις των τελευταίων χρόνων στην ανάπτυξη των στοχευμένων θεραπειών, αυξάνουν την πίεση στους παθολογοανατόμους για λεπτομερέστερη και πληρέστερη κατηγοριοποίηση των υποτύπων του καρκίνου του πνεύμονα, ώστε με βάση αυτό να δοθεί η ενδεικνυόμενη θεραπεία και να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή πρόγνωση. Το έργο τους καθίσταται ακόμα δυσχερέστερο καθώς ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ανεγχείρητος τη στιγμή της διάγνωσης, ενώ τα βιοπτικά υλικά δεν επαρκούν για πλήρη ανοσοϊστοχημικό και γονιδιακό έλεγχο (Travis WD & Panel, 2015).

1.4 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΜΚΠ ΚΑΤΑ ΤΝΜ.

Η όγδοη έκδοση της σταδιοποίησης των μορφών καρκίνου σύμφωνα με το American Joint Commission on Cancer (AJCC) και Union for International Cancer Control (UICC), αποδίδει την ανατομική έκταση των συμπαγών καρκίνων με συγκρίσιμο και αναπαραγώγιμο τρόπο, κάτι απαραίτητο, τόσο στην κλινική πράξη, όσο και στην έρευνα. Η παθολογοανατομική σταδιοποίηση (pTNM, pStage) βασίζεται σε πληροφορίες οι οποίες προέρχονται από την παθολογοανατομική εξέταση των ιστών που αφαιρέθηκαν από τον ασθενή κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης.

Το TNM σύστημα αναφέρεται στον ΜΜΚΠ. Ταξινομεί τη νόσο με βάση τα χαρακτηριστικά του πρωτοπαθούς όγκου (T-primary tumor, πρωτοπαθής όγκος), την παρουσία ή απουσία προσβεβλημένων λεμφαδένων (N-regional lymph nodes) και την παρουσία ή απουσία μεταστάσεων (M-distant metastasis, απομακρυσμένες μεταστάσεις). Η ταξινόμηση προήλθε από τη στατιστική ανάλυση και μελέτη περισσότερων των 100.000 περιστατικών παγκοσμίως (Rami-Porta R & International Association for the Study of Lung Cancer Staging and Prognostic Factors Committee, 2014) (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Η παθολογοανατομική σταδιοποίηση (pTNM) σύμφωνα με την 7^η ισχύουσα έως σήμερα αναθεώρηση. Η σταδιοποίηση αυτή αναφέρεται στον ΜΜΚΠ. Πηγή: Detterbeck FC, Nicholson AG, Franklin WA, Marom EM, Travis WD, Girard N, Arenberg DA, Bolejack V, Donington JS, Mazzone PJ, Tanoue LT, Rusch VW, Crowley J, Asamura H, Rami-Porta R; IASLC Staging and Prognostic Factors Committee; Advisory Boards; Multiple Pulmonary Sites Workgroup; Participating Institutions. *J Thorac Oncol.* 2016. 11(5):639-650

Πρωτοπαθής όγκος (T)	
Tx	Ο πρωτοπαθής όγκος υπονοείται από θετικό έκπλυμα στα πτύελα αλλά δεν απεικονίζεται.
T0	Χωρίς πρωτοπαθή όγκο
Tis	καρκίνωμα μη διηθητικό (in situ)
T1mi	Όγκος <3cm στη μεγαλύτερη διάμετρο, με διήθηση που δεν ξεπερνά τα 5mm (αυτό μπορεί να ισχύσει μόνο σε εξαιρεθέν παρασκεύασμα)
T1a	όγκος <1cm
T1b	όγκος 1-2cm
T1c	όγκος 2-3cm
T2	όγκος 3-5cm ή όγκος που διηθεί κύριο βρόγχο, σπλαγχνικό υπεζωκότα ή προκαλεί ατελεκτασία
T2a	όγκος 3-4cm
T2b	όγκος 4-5cm
T3	όγκος 5-7cm ή που διηθεί θωρακικό τοίχωμα ή περικάρδιο.
T4	όγκος >7cm ή που διηθεί παρακείμενα όργανα (διάφραγμα, μεσοθωράκιο, καρδιά κτλ)
Επιχώριοι Λεμφαδένες (N)	
Nx	η λεμφαδενική συμμετοχή δε μπορεί να ελεγχθεί
N1	διήθηση ομοπλευρων περιβρογχικών ή πυλαίων λεμφαδένων
N2	διήθηση λεμφαδένων του μεσοθωρακίου
N3	διήθηση ετερόπλευρων ή υπερκλείδιων λεμφαδένων
Μεταστάσεις (M)	
M0	Χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις
M1a	Έτερος όγκος στον άλλο πνεύμονα, κακοήθης πλευριτική συλλογή
M1b	Μονήρης εξωθωρακική μετάσταση
M1c	Πολλαπλές εξωθωρακικές μεταστάσεις

Η τελευταία αναθεώρηση του συστήματος TNM, αντανakλά την εντόπιση της νόσου, καθορίζει και συγκεκριμενοποιεί ομάδες ασθενών, προτείνει διαφορετική θεραπευτική προσέγγιση των ομάδων αυτών και καλύτερη ανταπόκριση της επιβίωσης με το στάδιο της νόσου.

1.5 ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Ο καρκίνος πνεύμονα χαρακτηρίζεται από γενετική αστάθεια στενά συνδεδεμένη με την εμφάνιση και εξέλιξη της νόσου αλλά όχι με τον ιστολογικό τύπο του όγκου. Οι χαρακτηριστικές διαφορές ανάμεσα στις δύο κύριες κατηγορίες πνευμονικού καρκινώματος είναι σχετικά λίγες και περιλαμβάνουν την παρουσία μεταλλάξεων του γονιδίου Ras και της υπερέκφρασης του Cox-2 στα μη μικροκυτταρικά καρκινώματα, ενώ ενίσχυση του γονιδίου MYC και μεθυλίωση της κασπάσης-8 ενός αντιαποπτωτικού γονιδίου, συμβαίνουν χαρακτηριστικά στο μικροκυτταρικό καρκίνωμα. Η οικογένεια γονιδίων RAS (KRAS, HRAS, and NRAS) ενεργοποιείται με σημειακές μεταλλάξεις στους κώδωνες 12, 13, ή 61, και στο 20% ως 30% των περιπτώσεων ΜΜΚΠ (ιδιαίτερα στα αδenoκαρκινώματα) ανευρίσκεται μετάλλαξη σε ένα μέλος της οικογένειας, ενώ τέτοια μετάλλαξη δεν παρατηρείται στα μικροκυτταρικά καρκινώματα (Richardson GE, 1993).

Η υπερέκφραση του EGFR που κωδικοποιείται από το γονίδιο *ERBB1* είναι συχνότερη στο ΜΜΚΠ παρότι στο ΜΚΠ και σχετίζεται με το στάδιο της νόσου και τον βαθμό διαφοροποίησης. Ο EGFR είναι μέλος της οικογένειας των ErbB (ή HER) υποδοχέων της τυροσινικής κινάσης και αποτελεί καταλυτικό κρίκο στην ενεργοποίηση κυτταρικών μοριακών μονοπατιών όπως το RAS / RAF / MEK μονοπάτι και το PI3K / AKT / mTOR μονοπάτι, αλλά και δύναται να επηρεαστούν και από άλλους υποδοχείς τυροσινικής κινάσης όπως ο insulin-like growth factor υποδοχέας (IGF1-R) και MET. Τα μονοπάτια αυτά επηρεάζουν την κυτταρική διαφοροποίηση του καρκινικού κυττάρου, την τοπική επέκταση, τη μεταστατική του ικανότητα, την αντίσταση στην απόπτωση και την αγγειογένεση. Οι EGFR μεταλλάξεις είναι παρούσες στο 15 % των βόρειων Αμερικάνων, και δυτικοευρωπαίων, στο 30%-50 % ανατολικών Ασιατών και ξεπερνάει το 50 % των Ασιατών που δεν κάπνισαν ποτέ (Paez JG, 2004).

Η αδρανοποίηση του γονιδίου του μεταγραφικού παράγοντα ρετινοβλαστώματος (Rb) και η υπερέκφραση του E2F1 είναι σχεδόν γενικό φαινόμενο στο ΜΚΠ. Τα περισσότερα ΜΚΠ, καθώς και τα πλακώδη καρκινώματα εμφανίζουν απώλεια μεγάλων τμημάτων του 3p χρωμοσώματος σε αλληλόμορφες θέσεις, ενώ τα περισσότερα αδenoκαρκινώματα και προ-νεοπλασματικές, προ-διηθητικές αλλοιώσεις έχουν μικρότερης έκτασης περιοχές απώλειας τμημάτων 3p σε αλληλόμορφες θέσεις. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *TP53* είναι η πιο συχνή γενετική ανωμαλία που αναγνωρίζεται

στα ΜΚΠ (Onuki N, 1999). Το σηματοδοτικό μονοπάτι της κινάσης της 3-φωσφοινοσιτίδης (PI3K) είναι πολύ συχνά ενεργοποιημένο στον ΜΜΚΠ, μέσω μεταλλάξεων στα γονίδια *PIK3CA*, *AKT1* ή *PTEN*. Είναι αξιοσημείωτο ότι το γονίδιο *PIK3CA* είναι πιο συχνά ενεργοποιημένο στο καρκίνο από πλακώδη κύτταρα παρά στο αδενοκαρκίνωμα, ενώ μεταλλάξεις που οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *PTEN*, αρνητικού ρυθμιστή του γονιδίου *PIK3CA*, εμφανίζονται σε ποσοστό 10% των καρκίνων από πλακώδη κύτταρα (Samuels, 2004).

Η μεγάλη πλειοψηφία των ΜΚΠ δείχνει απώλεια του βραχέος σκέλους του χρωμοσώματος 3 με πιθανότερους απολεσθέντες γονιδιακούς επιτόπους τα γονίδια von Hippel Lindau (3p25) και *FHIT* (3p14.2). Απώλεια ετεροζυγωτίας και των δύο αυτών γονιδίων ανιχνεύεται στο μεγαλύτερο ποσοστό των ΜΚΠ. Όμως, μολονότι η συχνότητα της LOH του 3p είναι μεγαλύτερη στην ομάδα των χαμηλής διαφοροποίησης νευροενδοκρινών καρκινωμάτων, υπάρχουν διαφορές ανάμεσα στα μεγαλοκυτταρικά και μικροκυτταρικά νευροενδοκρινικά καρκινώματα σε ότι αφορά τους γονιδιακούς επιτόπους στους οποίους παρατηρείται LOH. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το εύρημα ότι οι εγκεφαλικές μεταστάσεις του μικροκυτταρικού καρκινώματος παρουσιάζουν συχνά ενίσχυση (amplification) του DNA στο επίτοπο 17q24-25.

Διαταραχή του μονοπατιού του κυτταρικού κύκλου και κυρίως των πρωτεϊνών Rb/p16/cyclin D1 είναι από τα συχνότερα φαινόμενα στα νευροενδοκρινικά νεοπλάσματα του πνεύμονα ενώ η μελέτη του διαβιβαστικού μονοπατιού της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων E2F (E2F1, E2F3) ανέδειξε τη λειτουργική συνεργασία σε μοριακό επίπεδο των παραγόντων E2F-1, Skp2 και της ογκοπρωτεΐνης Cyclin E στα χαμηλής διαφοροποίησης νευροενδοκρινικά καρκινώματα του πνεύμονα.

Το γονίδιο ELM4/ALK έχει καταδειχθεί ως αναπνευστικό ογκογονίδιο και οι ασθενείς που το εκφράζουν παρουσιάζουν καλή ανταπόκριση στον αναστολέα της ALK κριζοτινίμπη (crizotinib). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μεταθέσεις του γονιδίου ALK συμβαίνουν μόνο σε μη καπνιστές με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα χωρίς μεταλλάξεις EGFR και δεν σχετίζονται με την εθνικότητα.

1.6 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Η θεραπευτική προσέγγιση του καρκίνου πνεύμονα, καθορίζεται από τον ιστολογικό τύπο, το στάδιο της νόσου και τη γενική κατάσταση της υγείας του ασθενούς.

Χειρουργική επέμβαση: Η χειρουργική αφαίρεση τον όγκου παραμένει η πρώτη επιλογή για τον ΜΜΚΠ, όταν βρίσκεται σε αρχικά στάδια και δεν είναι διάσπαρτος. Στα είδη των εκτομών περιλαμβάνεται η σφηνοειδής, η λοβεκτομή, η τμηματεκτομή και η πνευμονεκτομή.

Χημειοθεραπεία: Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές των Ευρωπαϊκών και Αμερικάνικων Ογκολογικών Ομάδων (ESMO, ASCO), η καθιερωμένη θεραπεία για τον τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΜΚΠ) είναι συνδυασμοί φαρμάκων με βάση την πλατίνα (εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθούν μη πλατινούχοι συνδυασμοί) που παράγουν ανταποκρίσεις μέχρι 40% και διάμεση επιβίωση 8-10 μήνες. Οι συνδυασμοί με βάση τα πλατινούχα σκευάσματα είναι προτιμότεροι έναντι συνδυασμών χωρίς πλατινούχα, δεδομένου ότι σχετίζονται με μεγαλύτερο ποσοστό ανταπόκρισης και οριακά καλύτερη επιβίωση. Το προτεινόμενο σχήμα χημειοθεραπείας για τον ΜΚΠ, κατά την ταυτόχρονη χημειοακτινοθεραπεία είναι ο συνδυασμός cisplatin/etoposide (Sun A, 2019).

Η Χημειοθεραπεία μπορεί να δοθεί μετά από τη χειρουργική επέμβαση για να μειώσει την πιθανότητα μεταστάσεων ή πριν από αυτή με σκοπό να μειωθεί το μέγεθος του όγκου και να μπορέσει ο ασθενής να υποβληθεί σε χειρουργική αφαίρεση. Σε ορισμένες περιπτώσεις η χημειοθεραπεία χρησιμοποιείται για να ανακουφίσει συμπτώματα πόνου και να προσφέρει ανακούφιση σε προχωρημένα στάδια της νόσου.

Ακτινοθεραπεία: Η εξωτερική ακτινοθεραπεία είτε με σαν τρισδιάστατη σύμμορφο ακτινοθεραπεία (3D-CRT), ή διαμορφούμενης έντασης ακτινοθεραπεία (IMRT) ή απεικονιστικά καθοδηγούμενη ακτινοθεραπεία (IGRT), καθώς και η στερεοτακτική ακτινοθεραπεία χρησιμοποιούνται με αποτελέσματα ισάξια της χειρουργικής αφαίρεσης. Όλες οι ως άνω τεχνικές στοχεύουν πολλές ακτίνες ακτινοβολίας από διαφορετικές γωνίες στο καρκίνο του πνεύμονα. Η θεραπεία ολοκληρώνεται σε 1-3 συνεδρίες. Συνδυάζεται με χημειοθεραπεία και αξιόλογα αποτελέσματα (Baker S, 2016).

Στοχευμένες θεραπείες: Οι επονομαζόμενες «στοχευμένες» θεραπείες περιλαμβάνουν φαρμακευτικές αγωγές ειδικά σχεδιασμένες για την καταστροφή του

καρκινικού όγκου και των καρκινικά προσβεβλημένων κυττάρων. Για το λόγο αυτό, προσβάλλουν μικρότερο ποσοστό υγιούς ιστού και συνεπώς, προκαλούν πολύ λιγότερες παρενέργειες (García-Campelo R, 2015).

Η Bevacizumab, εμπορική ονομασία Avastin: Συνήθως χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία, εγκρίθηκε για προχωρημένο και υποτροπιάζοντα ΜΜΚΠ.

Η Erlotinib, εμπορική ονομασία Tarceva: αναστέλλει την ανάπτυξη και κυτταρική διαίρεση των καρκινικών κυττάρων. Εγκρίνεται για προχωρημένο και υποτροπιάζοντα ΜΜΚΠ που έχει μια συγκεκριμένη γενετική μετάλλαξη του EGFR.

Το Crizotinib, εμπορική ονομασία Xalkori: Χορηγείται σε προχωρημένο ΜΜΚΠ που φέρει διαμετάθεση της EML4-ALK.

Βιολογικοί Παράγοντες: Είναι μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν συγκεκριμένο μονοπάτι. Το Bevacizumab στοχεύει το σηματοδοτικό μονοπάτι του VEGF. Το Cetuximab και Necitumumab είναι μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του EGFR. Η αναστολή του BRAF με μικρομοριακούς αναστολείς (vemurafenib, dabrafenib) από του στόματος, φαίνεται αποτελεσματική θεραπεία ασθενών με ΜΜΚΠ που δεν ανταποκρίθηκαν στην χημειοθεραπεία. Ενθαρρυντικά αποτελέσματα έχει και ο συνδυασμός του BRAF αναστολέα dabrafenib με τον MEK αναστολέα trametinib.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

Η ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ PD-1 / PDL-1

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η προγραμματισμένη πρωτεΐνη θανάτου 1 (PD-1) και οι συνδέτες της PD-L1 και PD-L2 αντιπροσωπεύουν ένα καλά χαρακτηρισμένο σημείο ανοσολογικού ελέγχου στον καρκίνο. Το μονοπάτι PD-L1 / PD-1 ελέγχει την επαγωγή και διατήρηση της ανοσοποιητικής ανοχής εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Η δραστικότητα του PD-1 και των συνδετών του, είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την κυτταροτοξική έκκριση των T κυττάρων στον καρκίνο σε εκφυλιστική αντικαρκινική ανοσοαπόκριση. Το μονοπάτι PD-L1 / PD-1, στοχεύεται αποτελεσματικά από μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία έχουν εγκριθεί για κλινική χρήση ρουτίνας.

Η ρύθμιση της έκφρασης PD-L1 είναι πολύπλοκη, ποικίλλει μεταξύ διαφορετικών τύπων όγκων και εμφανίζεται σε γενετικό, μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Σε διάφορους τύπους όγκων, έχουν αναφερθεί αλλαγές του αριθμού των αντιγράφων του PD-L1 με ποικίλη συχνότητα. Στο μεταγραφικό επίπεδο, ένας αριθμός μεταγραφικών παραγόντων φαίνεται να ρυθμίζει την έκφραση του PD-L1 συμπεριλαμβανομένων των HIF-1, STAT3, NF-κB και AP-1. Ενεργοποίηση κοινών ογκογονικών οδών όπως των JAK / STAT, RAS / ERK ή PI3K / AKT / mTOR, καθώς και η θεραπεία με κυτταροτοξικούς παράγοντες έχει επίσης αποδειχθεί ότι επηρεάζει την έκφραση του PD-L1 στους όγκους.

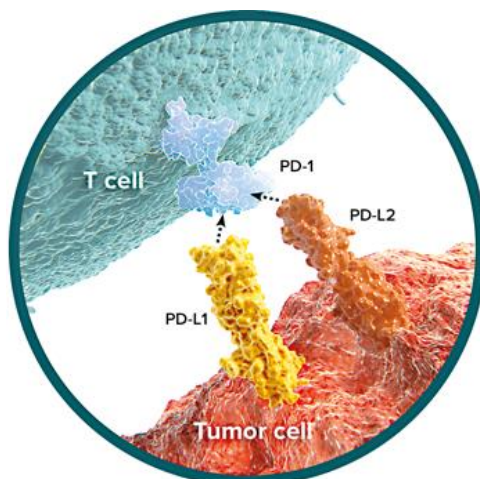
Σχετικές μελέτες κλινικών δοκιμών με αναστολείς του PD-L1 / PD-1 έχουν δείξει μέχρι στιγμής σημαντικά ασυνεπή αποτελέσματα σχετικά με την αξία της έκφρασης του PD-L1 ως δείκτης απόκρισης στη θεραπεία. Καθώς οι ενδείξεις για την αναστολή του ανοσοποιητικού σημείου διευρύνονται, η κατανόηση του τρόπου ρύθμισης της έκφρασης του PD-L1 στον καρκίνο, είναι μεγάλης σημασίας για τον καθορισμό του ρόλου του σαν προγνωστικού δείκτη αλλά και για τη βελτιστοποίηση της ανοσοθεραπείας κατά του καρκίνου.

2.1. Η ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΩΝ PD-1/PDL1

Το PD-1, αναφέρετε επίσης ως CD279, ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά σε κυτταρικές σειρές το 1992 (Ishida Y., 1992). Το PD-1 είναι 15% παρόμοιο με την αλληλουχία αμινοξέων του CD28, 20% παρόμοιο με το CTLA4 και 13% παρόμοιο με το επαγόμενο διεγέρτη των T-κυττάρων (Carreno BM, 2002). Το PD-1 είναι μια διαμεμβρανική

πρωτεΐνη 55-kDa που περιέχει ένα εξωκυττάριο αμινο-άκρο (N-terminal IgV-like domain), 288 αμινοξέων, ένα περίπου 20-αμινοξέων, στέλεχος διαχωρισμού με την κυτταροπλασματική μεμβράνη (IgV), μία διαμεμβρανική περιοχή, ενώ το ενδοκυττάριο άκρο περιέχει δύο θέσεις φωσφορυλίωσης εντοπισμένες στον ανασταλτικό ανοσοϋποδοχέα τυροσίνης και ένα μοτίφ ανοσοϋποδοχέα τυροσίνης που λειτουργεί σαν διακόπτης, ώστε κατά τη φωσφορυλίωση ρυθμίζει αρνητικά τα σήματα TCR μέσω φωσφορυλίωσης της SHP-1 και SHP-2

Το PD-1 υπάρχει σαν μονομέρες. Για τον διμερισμό του χρειάζεται σε εγγύς θέση μεμβρανικό κατάλοιπο κυστεΐνης. Το γονίδιο *PDCD1* που κωδικοποιεί την PD-1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2q37.3. 2 στον άνθρωπο και περιέχει πέντε εξόνια. Το PD-1 έχει δύο συνδέτες τους PD-L1 και PD-L2 και οι δύο είναι μέλη της οικογένειας των B7 διαμεμβρανικών πρωτεϊνών (Freeman GJ, 2000) (Εικόνα 5).

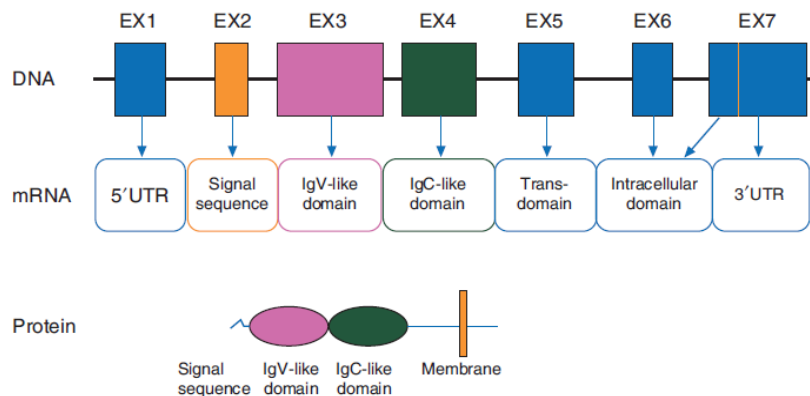


Εικόνα 5: Σχηματική παράσταση της σύνδεσης του PD-1 με τους δύο συνδέτες PD-L1 και PD-L2. Πηγή: PD-1 [CD279]/PD-L1 [CD274] Pathway. Από την ιστοσελίδα της εταιρείας Adipogen Life Sciences. <https://adipogen.com/pd-1-pd-l1-pathway/>

Ενώ η έκφραση του PD-L2 περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό στα αντιγόνοπαρουσιαστικά κύτταρα, το PD-L1 εκφράζεται σε πολλούς τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των T-κυττάρων, των B-κυττάρων, τα μονοκύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα. Η υπερέκφρασή του είναι κάτω από την επίδραση των προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως είναι η IFN γ και η IL4 μέσω του μεταγραφικού παράγοντα STAT1 και IFN regulatory factor-1 (IRF1) (Sharpe AH, 2007).

Τα PD-L1 και PD-L2 κωδικοποιούνται από τα γονίδια CD274 και PDCD1LG2 αντιστοίχως, που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 9p.24.1. Το γονίδιο CD274 αποτελείται από

επτά εξόνια, κάθε ένα από αυτά κωδικοποιεί διαφορετική περιοχή της πρωτεΐνης PDL1 (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Η δομή του PD-L1 γονιδίου, του mRNA και της πρωτεΐνης. Το γονίδιο PD-L1 αποτελείται από επτά εξόνια. Το εξόνιο 1 κωδικοποιεί το 5' μη μεταγραφικό άκρο. Από το εξόνιο 2 έως το εξόνιο 6 γίνεται κωδικοποίηση της εξής ακολουθίας, η IgV-like περιοχή, η IgC-like περιοχή, η διαμεμβρανική περιοχή και η ενδοκυττάρια περιοχή. Το εξόνιο 7 κωδικοποιεί μέρος της ενδοκυττάριας περιοχής καθώς και το 3' μη μεταγραφικό άκρο. Πηγή: J. Chen, C. C. Jiang, L. Jin & X. D. Zhang. Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. *Annals of Oncology* 27: 409–416, 2016.

Το PD-L1 μπορεί να υπάρχει σε διαλυτή μορφή (sPD-L1) στην κυκλοφορία υγιών ατόμων και παράγεται κυρίως από μονοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Τα Τ-κύτταρα δεν παράγουν σημαντικές ποσότητες sPD-L1, ακόμη και όταν ενεργοποιούνται. Αξίζει να σημειωθεί ότι η sPD-L1 διατηρεί την IgV περιοχή υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με το PD-1 και μπορεί να καταστείλει την ενεργοποίηση των Τ κυττάρων. Η έκφραση του sPD-L1 είναι συνήθως αυξημένη σε ηλικιωμένα άτομα καθώς και σε πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές όπως του ΜΜΚΠ, λεμφώματος, καρκινώματος ωοθηκών και γλοιοβλαστώματος. Τα αυξημένα επίπεδα sPD-L1 στο αίμα σχετίζονται με μετάσταση και κακή πρόγνωση στον καρκίνο του μαστού και διάχυτο λέμφωμα από μεγάλα Β-κύτταρα.

2.2. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ PD-L1 ΜΕΣΩ ΔΙΑΥΛΩΝ ΟΓΚΟΓΟΝΙΚΗΣ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ

Σηματοδοτικό μονοπάτι RAS/RAF/MEK/MAPK-ERK

Το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK παίζει κρίσιμο ρόλο στην επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Σε φυσιολογικές καταστάσεις, ενεργοποιείται από εξωκυττάρια σήματα μέσω του υποδοχέα τυροσίνης κινάσης. Σε πολλούς τύπους καρκίνου ενεργοποιείται κατά λάθος μέσω ογκογονικών μεταλλάξεων όπως είναι η ενεργοποίηση του από μεταλλαγμένο BRAF που κατά 90% συμβαίνει σε κακοήθεις όγκους. Μελέτες έχουν καταδείξει την ογκοεξαρτώμενη ενεργοποίηση του MAPK. Αναστολή του BRAF συσχετίζεται με γρήγορη αύξηση της διείσδυσης των T κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του μελανώματος και μειωμένη έκφραση PD-L1 (Sumimoto H, 2006). Χρήση αναστολέων έναντι του MEK ή μειωμένη έκφραση του ERK1/2 μειώνει τα προαναφερθέντα αποτελέσματα. Στον ΜΜΚΠ η ενεργοποίηση MAPK φαίνεται υπεύθυνη για την αυξημένη έκφραση PD-L1 σε ενεργοποιημένους EGFR όγκους πνεύμονα (Chen N, 2015).

Αξίζει να σημειωθεί ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK εμπλέκεται επίσης στην αυξημένη έκφραση του PD-L1 σε καρκινικά κύτταρα κατά τη χημειοθεραπευτική αγωγή. Για παράδειγμα, η πακλιταξέλη προκαλεί επανέκφραση του PD-L1 που αδρανοποιήθηκε από τον αναστολέα MEK U0126 (Gong W, 2011). Επιπλέον, η χαμηλή συγκέντρωση σισπλατίνης ενεργοποιεί την έκφραση του PD-L1 μέσω ενεργοποίησης του MAPK μονοπατιού (Qin X, 2009). Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η ενεργοποίηση της οδού MAPK προστατεύει τα καρκινικά κύτταρα από την καταστροφή από τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα, όχι μόνο με την αναστολή της σηματοδότησης του κυτταρικού θανάτου, αλλά και μέσω αναστολής του ανοσοποιητικής απόκρισης και ενεργοποίησης του PD-L1.

Η χρήση δύο αναστολέων έναντι του ERK και JNK, μείωσε την έκφραση του PD-L1, υποστηρίζοντας περαιτέρω τη συμβολή της σηματοδότησης MAPK στην ρύθμιση της λειτουργίας του PD-L1 (Qian Y, 2008). Επιπλέον, η αλληλεπίδραση του υποδοχέα τυροσίνης κινάσης c-Met με τον HGF (παράγοντας ανάπτυξης ηπατοκυττάρων προσδέματος) προκάλεσε την ενεργοποίηση του Ras. Σε καρκινικά κύτταρα νεφρού, η κατάργηση του Ras οδήγησε σε μείωση της ρύθμισης του c-Met και της μεσολαβούμενης από αυτό έκφρασης του PD-L1.

Η ενεργοποίηση του KRAS μπορεί επίσης να ρυθμίσει την έκφραση του PD-L1. Σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα, το KRAS , μέσω περιοχών πλούσιων σε Αδενυλικά-ουριδυλικά στοιχεία στο 3' μη μεταγραφικό άκρο του PD-L1, φαίνεται να

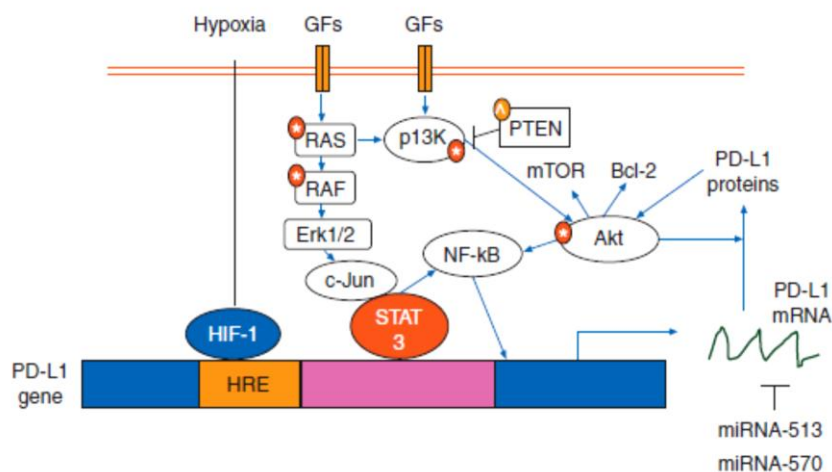
σταθεροποιεί σε μεταγραφικό επίπεδο την έκφραση του PD-L1 mRNA. Επιπροσθέτως, *in vivo*, η αναστολή των MEK και της PI3K οδήγησε σε μειωμένα επίπεδα του PD-L1 και αυξημένη αποτελεσματικότητα της ανοσίας κατά του όγκου (Liu C, 2020).

Σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/PTEN/Akt/mTOR

Ο σηματοδοτικός δίαυλος PI3K/Akt/mTOR έχει παρόμοια δράση με αυτή του MAPK, παίζοντας σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του καρκίνου μέσω της ενεργοποίησης καταρράκτη στόχων που ρυθμίζουν την κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και μετάσταση (Vivanco I, 2002). Ο σηματοδοτικός δίαυλος PI3K / Akt ενεργοποιείται από πολλές αυξητικές ορμόνες και κυτοκίνες. Στον καρκίνο, η ενεργοποίησή του προκαλείται συχνά από την απώλεια ή την απενεργοποίηση μέσω μεταλλάξεων του PTEN. Ο ρόλος του μονοπατιού PI3K / Akt στη ρύθμιση του PD-L1 προτάθηκε όταν η αναστολή του PI3K σε κύτταρα μελανώματος, αρνητικά στο BRAF, οδήγησε σε μείωση της έκφρασης του PD-L1. Σε άλλη μελέτη αναστολή του Akt ή αναστολή του mTOR με rapamycin, οδηγεί σε μειωμένη έκφραση ή αναστολή του PD-L1, αντίθετα knockdown του γονιδίου PTEN, επιφέρει υπερέκφραση του PD-L1 (Song M, 2013).

Η επίδραση του μονοπατιού PI3K / Akt στην ρύθμιση της έκφρασης του PD-L1 πιθανόν να γίνεται τόσο σε επίπεδο μεταγραφικό όσο και μεταφραστικό. Επί παραδείγματι ενεργοποιημένη Akt σε καρκινικές κυτταρικές σειρές του παχέος εντέρου, το PD-L1 υπερεκφράζεται χωρίς να επηρεάζονται τα επίπεδα mRNA αυτού. Πιθανολογείται ότι ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB, που βρίσκεται στον σηματοδοτικό άξονα του Akt, ρυθμίζει το PD-L1 σε επίπεδο μεταγραφικό (Εικόνα 7).

Επιπλέον, η αναστολή του mTOR με rapamycin, μειώνει τα επίπεδα του PD-L1, τόσο σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές όσο και σε πειραματικά μοντέλα ποντικού με ΜΜΚΠ. Συνδυασμένη θεραπεία με rapamycin και αντι -PD-1 αντίσωμα αναστέλλει την αύξηση του όγκου σε ποντικούς. Είναι πιθανό, το μονοπάτι PI3K / Akt να ρυθμίζει την έκφραση του PD-L1 με τρόπο που εξαρτάται από τον τύπο και το είδος του κυττάρου.



Εικόνα 7: Σχηματική παράσταση με τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την έκφραση του PD-L1 σε καρκινικά κύτταρα. Οι οδοί σηματοδότησης των MAPK και PI3K εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκφρασης του PD-L1. Και οι δύο ενεργοποιούνται από γονιδιακές μεταλλάξεις και αυξητικούς παράγοντες. Η ενεργοποίηση του MAPK επάγει το c-Jun το οποίο δρα μαζί με το STAT3 επιφέροντας την αύξηση της μεταγραφής του PD-L1. Η ενεργοποίηση του Akt επεμβαίνει στο mRNA του PD-L1 αυξάνοντας την μεταφραστική ικανότητά του, ενώ οι παραγόμενες πρωτεΐνες με τη σειρά τους αυξάνουν την ενεργοποίηση του Akt. Το ενεργοποιημένο Akt μπορεί επίσης να δράσει στον NF-κB. Η υποξία διεγείρει τον μεταγραφικό παράγοντα HIF-1 ο οποίος με την σειρά του επάγει το PD-L1. Οι μεταγραφικοί παράγοντες STAT3 και NF-κB μπορούν επίσης να δρουν απευθείας στον υποκινητή του PD-L1 γονιδίου. Τα miRNA-513 και miRNA-570 μπορούν να αποικοδομήσουν το PD-L1 mRNA. Πηγή: Ioannis Zerdas, Alexios Matikas, Jonas Bergh, George Z. Rassidakis, Theodoros Foukakis. Genetic, transcriptional and post-translational regulation of the programmed death protein ligand 1 in cancer: biology and clinical correlations. *Oncogene*. (2018) 37:4639–4661.

Σηματοδοτικό μονοπάτι του Epidermal growth factor receptor (EGFR)

Στον ΜΜΚΠ, ο EGFR συνήθως μεταλλάσσεται και συσχετίζεται με την αύξηση της PD-L1 στους όγκους αυτούς. Σε πειραματικά μοντέλα ποντικού με καρκίνο πνεύμονα που φέρει μεταλλαγμένο τον EGFR, το PD-L1 υπερεκφράζεται, ενώ η θεραπεία με αντίσωμα αντι-PD-1 περιορίζει την ανάπτυξη του όγκου. Σε βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα που φέρουν έκτοπη έκφραση μεταλλαγμένου EGFR, το PDL1 υπερεκφράζεται, ενώ η θεραπεία με αναστολείς της κινάσης τυροσίνης έναντι του EGFR επιδρά αρνητικά στον PDL1 (Akbay EA, 2013).

Έχει αποδειχθεί στον ΜΜΚΠ, ότι η δράση του μεταλλαγμένου EGFR στην λειτουργία έκφρασης του PD-L1 εξαρτάται από την ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK. Η αναστολή του ERK1 / 2 / c-Jun είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του PD-L1 σε καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα που υπερεκφράζουν τον PD-L1. Άλλη μελέτη κατέδειξε

ότι η ρύθμιση της έκφρασης του PD-L1 μέσω του EGFR, επέρχεται μέσω της ενεργοποίησης της ιντερλευκίνης-6 (IL-6) / Janus Kinase (JAK) / STAT3.

2.3. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ PD-L1

Μελέτες απέδειξαν ότι πολλά μονοπάτια σηματοδότησης ρυθμίζουν την έκφραση του PD-L1 στα καρκινικά κύτταρα, πρωτίστως σε μεταγραφικό επίπεδο. Ένας αριθμός μεταγραφικών παραγόντων έχουν αποδειχθεί ότι εμπλέκονται, επισημαίνοντας τον σημαντικό ρόλο τους στην διαφυγή των καρκινικών κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα.

Τα αυξημένα επίπεδα HIF-1 σχετίζονται με αυξημένη έκφραση PD-L1 και προκαλούν μείωση της λειτουργίας των T-κυττάρων, υποδηλώνοντας ότι τα υποξικά περιβάλλοντα, τα οποία οδηγούν σε αύξηση της έκφρασης του HIF-1, μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε καταστολή του ανοσοποιητικού, αυξημένο πολλαπλασιασμό, και αναστολή της απόπτωσης. Το HIF-1 είναι ένας σημαντικός ογκογόνος παράγοντας και η αναστολή του έχει εφαρμοστεί για τη θεραπεία του καρκίνου. Ρυθμίζει την PD-L1 μέσω σύνδεσής του με το hypoxia response element (HRE) που βρίσκεται στον υποκινητή του γονιδίου του PD-L1 (Noman MZ, 2014).

Το STAT3 έχει επίσης αναγνωριστεί ότι ρυθμίζει το PD-L1 μεταγραφικά όταν συνδέεται με τον υποκινητή του γονιδίου του PD-L1. Έρευνες έχουν δείξει ότι η LMP1 (Λανθάνουσα μεμβρανική πρωτεΐνη-1) αυξάνει την έκφραση του PD-L1 με ταυτόχρονη αύξηση του φωσφορυλιωμένου STAT3 (pSTAT3). Αντίθετα αναστολή του pSTAT3 από τον αναστολέα του JAK3 CP-690550, μείωσε την επαγόμενη από LMP1 PD-L1 έκφραση.

Ο NF-κΒ είναι ένας κύριος παράγοντας μεταγραφής που ενεργοποιείται σε αρκετούς τύπους καρκίνου, προάγει την φλεγμονή, αναστέλλει την απόπτωση και μειώνει την αποτελεσματικότητα της αντικαρκινικής ανοσίας. Η οικογένεια του NFκΒ αποτελείται από επτά μέλη, με το πιο αντιπροσωπευτικό να είναι το p65 RelA/p50. Το p65 RelA/p50 είναι ένα κυτταροπλασματικό ετεροδιμερές που μετατοπίζεται στον πυρήνα και δρα σαν μεταγραφικός παράγοντας του κΒ μετά από πολυμερισμό του ΙκΒ-α αναστολέα. Σε κύτταρα μελανώματος, η υπερέκφραση του PDL1 από τον NFκΒ προκαλείται από την επίδραση της IFN-γ και είναι ανεξάρτητη από την δράση των STAT3

και c-Jun. Μελέτες με στοχευμένη αναστολή των μονοπατιών σηματοδότησης του MAPK και PI3K είχαν μικρό αντίκτυπο στην έκφραση PD-L1 (Fan Y, 2013).

Ο ρόλος των HDACs στην τροποποίηση των μη-ιστονικών στόχων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις όγκου-ξενιστή, έχουν πρόσφατα ερευνηθεί. Μελέτες σε κύτταρα μελανώματος απέδειξαν ότι τόσο η αναστολή όσο και η εξάντληση του HDAC6 οδήγησαν σε μειωμένα επίπεδα του PD-L1 *in vitro* και *in vivo*. Επαγωγή του PD-L1 από την HDAC6 γίνεται με την μεσολάβηση του STAT3 και αμφότερα τα HDAC6 και STAT3 προσδένονται στον υποκινητή του γονιδίου του PD-L1. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το HDAC έχει πλειοτροπικά αποτελέσματα και επιδρά τόσο στην έμφυτη όσο και στην προσαρμοστική ανοσοαπόκριση και μπορεί έτσι να επηρεάσει τα επίπεδα του PD-L1 μέσω των ιντερφερονών (Woan KV, 2012).

Οι εξαρτώμενες από την κυκλίνη κινάσες (CDK) έχουν βασικό ρόλο στην λειτουργία του κυτταρικού κύκλου. Η εξαρτώμενη από κυκλίνη κινάση 5 (Cdk5) είναι μια κινάση σερίνης θρεονίνης που έχει σημαντικό ρόλο σε πολλές λειτουργίες του κυττάρου και του κεντρικού νευρικού συστήματος. Μελέτη σε κύτταρα μυελοβλαστώματος, η μείωση του Cdk5 οδήγησε στην αύξηση της έκφρασης του interferon regulatory factor 2 και interferon regulatory factor binding protein 2 με ταυτόχρονη αναστολή της έκφρασης του PD-L1. Το Cdk5 ήταν επομένως απαραίτητο για την αυξημένη έκφραση του PD-L1 μετά από διέγερση με IFN- γ .

Ο άξονας STA1 / IRF1 και η αναστολή του οδήγησαν σε απόρριψη του ογκοεξαρτούμενου από CD4 + T-κύτταρα μυελοβλάστωμα σε μοντέλα ποντικίου.. Αυτά τα δεδομένα επισημαίνουν τον σημαντικό ρόλο της Cdk5 σαν μελλοντικό στόχο για θεραπευτικές παρεμβάσεις σε συνδυασμό με αναστολείς των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού. Επιπλέον, η αναστολή του CDK4 / 6 έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι ενισχύει την αντικαρκινική ανοσία μέσω αυξημένης κυτταροτοξικότητας των T-κυττάρων και καταστολής των Treg (Goel S, 2017).

2.4. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ PD-L1

Η επιγενετική ρύθμιση του PD-L1 έχει επίσης αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στην έκφραση του στα καρκινικά κύτταρα. Αρκετά microRNAs (miRs) συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκφρασης του PD-L1. Τα MiR είναι 22-24 νουκλεοτίδια σε μήκος και είναι μη

κωδικοποιημένα μονόκλωνα RNA, που ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση. Μπορούν να δεσμευτούν σε ένα mRNA γονιδιακό στόχο και να εποικοδομήσουν το mRNA ή να αποτρέψουν τη μετάφρασή του. Τα MiR-513, miR-570, miR-34a και miR-200 έχουν αντίστροφη σχέση με την έκφραση του PD-L1 (Wang X, 2015). Τα miR είναι συμπληρωματικά τριών μη μεταφραστικών περιοχών του PD-L1 επιφέροντας καταστολή της πρωτεϊνικής έκφρασης αυτού. Εισαγωγή του miR-513 σε κυτταρική σειρά Jurkat είχε σαν αποτέλεσμα την κατάργηση της έκφρασης του PD-L1 επαγόμενης από την IFN-γ. Αντίθετα εισαγωγή του αντι-miR-513 σε χολαγγειοκύτταρα αυξάνει την έκφραση του PD-L1. Το MiR-570 έχει παρόμοια δράση. Μεταλλάξεις στις τρεις μη μεταγραφικές περιοχές του PD-L1 είχε σαν αποτέλεσμα τη διακοπή της πρόσδεσης του miR-570, οδηγώντας σε υπερέκφραση του PD-L1. Η συνέργεια του PD-L1 με το MiR-200 έχει αποδειχθεί ότι προωθεί την μετάσταση του καρκίνου, ενώ αντιθέτως το MiR-197 μειώνει την έκφραση του PD-L1.

Η N-γλυκοσυλίωση αντιπροσωπεύει μια σημαντική μετα-μεταφραστική τροποποίηση που καθορίζει τον σχηματισμό της πρωτεΐνης, τη λειτουργικότητα και την αλληλεπίδραση της με άλλες πρωτεΐνες. Πρόσφατα αποδείχθηκε μία νέα σχέση μεταξύ της διαδικασίας-της γλυκοζυλίωσης και της ουμπικουιλίνωσης στην ρύθμιση του PD-L1. Σε κύτταρα καρκίνου του μαστού, η N-γλυκοζυλίωση του PD-1 οδήγησε σε σταθεροποίηση της πρωτεΐνης και αποφυγή της αποδόμησής του από το πρωτεάσωμα 26S. Αντίθετα, μη γλυκοζυλιωμένες μορφές που σχετίζονται με τη συνθετάση του γλυκογόνου κινάση 3 βήτα (GSK3β), η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει τον PD-L1 είχε σαν αποτέλεσμα την αποδόμησή του. Αναστολή της λειτουργίας της GSK3β επαυξάνει την ανοσοκαταστολή από τα καρκινικά κύτταρα τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Επιπλέον, απενεργοποίηση της σηματοδότησης της GSK3β από τον EGFR, αναστρέφει τη σταθεροποίηση του PD-L1 και οδηγεί σε βελτιωμένες αντικαρκινικές αποκρίσεις. Σε μια μελέτη, η N- γλυκοζυλιωμένη PD-L1 (gPD-L1) αποδείχθηκε ότι αυξάνει την αλληλεπίδραση PD-L1/PD-1, με συνέπεια την ανοσοκαταστολή σε τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού. Η στόχευσή με μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του gPD-L1 προτείνεται ως πολλά υποσχόμενος στόχος μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού στην θεραπεία του καρκίνου (Li CW, 2018).

2.5. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ PD-L1

Η καινούργια εποχή στην ανοσοθεραπεία μπορεί να χαρακτηριστεί σαν «η αρχή του τέλους» για την θεραπεία του καρκίνου. Μία σειρά από φαρμακευτικούς παράγοντες είναι διαθέσιμοι προς χρήση για πολλαπλές ενδείξεις ενώ συσσωρεύεται κλινική εμπειρία. Η αυξημένη έκφραση του PD-L1 έχει συσχετιστεί με κακή πρόγνωση σε διάφορους όγκους, όπως μελάνωμα, καρκίνος των ωοθηκών και νεφρού, καρκίνος του πνεύμονα, ρινοφαρυγγικός καρκίνος. Η αναστολή του PD-L1 με αντισώματα βελτίωσε τα ποσοστά της συνολικής επιβίωσης σε ασθενείς με καρκίνο.

Παρά την πρόοδο στη γενετική και επιγενετική ρύθμιση της έκφρασης του PD-L1, υπάρχουν αρκετά κενά στη βιβλιογραφία που πρέπει να καλυφτούν από εντατική εργαστηριακή έρευνα. Για παράδειγμα, τα μονοπάτια μεταγωγής σηματοδότησης που εμπλέκονται στην ρύθμιση του PDL-1 είναι εν μέρει κατανοητά. Η καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών σηματοδότησης θα μπορούσε να προσφέρει καλύτερη ρύθμιση της έκφρασης του PD-L1, ιδιαίτερα από τα σηματοδοτικά μονοπάτια των MAPK και PI3K / Akt . Θα πρέπει, η αναστολή των οδών αυτών να μειώνει την έκφραση του PD-L1. Πράγματι, οι αναστολείς του υποδοχέα της τυροσίνης κινάσης έδωσαν καλά θεραπευτικά αποτελέσματα σε καρκίνους του πνεύμονα με υψηλή έκφραση PD-L1. Επομένως, η αναστολή των οδών σηματοδότησης θα μπορούσε να έχει διπλά αποτελέσματα, πρώτον: αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και δεύτερον: αναστέλλοντας την έκφραση του PD-L1.

Ωστόσο, τα μόρια σηματοδότησης που εμπλέκονται στην ρύθμιση του PD-L1 μπορεί να διαφέρουν από αυτόν του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K /Akt, η αναστολή της Akt μείωσε την έκφραση του PD-L1 ενώ το mTOR δεν το έκανε. Επιπλέον η καλύτερη γνώση του μοριακού μηχανισμού των σηματοδοτικών οδών θα μπορούσε να παρέχει το βιολογικό σκεπτικό για καλύτερη στρατηγική στις συνδυασμένες ανοσοθεραπείες στον καρκίνο. Επίσης, λίγα είναι γνωστά για τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της πρωτεΐνης του PD-L1 συμπεριλαμβανομένης της φωσφορυλίωσης της σε θέσεις τυροσίνης ή σερίνης / θρεονίνης, η ακετυλίωση της, η ουμπικουιλίνωση και η SUMOιλίωση. Είναι επίσης σε μεγάλο βαθμό άγνωστο πώς η μετα-μεταφραστική τροποποίηση όχι μόνο ρυθμίζει τα επίπεδα του PD-L1 στα κύτταρα του όγκου, αλλά και πώς επηρεάζει την φυσιολογική του λειτουργία ή την αλληλεπίδρασή του με τον υποδοχέα PD-1. Εξάλλου εκτός από το PD-

L1, η μη γενετικοί μηχανισμοί που διέπουν τη λειτουργία και έκφραση του PD-L2 σε συμπαγείς όγκους και κακοήθειες αιμοποιητικής οδού πρέπει να διερευνηθούν, καθώς και οι δύο προσδένονται ανταγωνιστικά στον ίδιο υποδοχέα, PD1, και επομένως τα σχετικά επίπεδα των δύο πρωτεϊνών μπορεί να επηρεάσουν συγκεκριμένη ανοσοθεραπευτική προσέγγιση.

Στην κλινική πράξη ένα ζήτημα της αναστολής της έκφρασης του PD-L1 είναι η ανοχή στα φάρμακα. Η επίκτητη ανοχή στα φάρμακα υπήρξε σημαντικό πρόβλημα για τις στοχευμένες θεραπείες. Για παράδειγμα, στο μελάνωμα η θεραπεία με BRAF οδήγησε σε ποσοστό ανταπόκρισης 50% -80%. Ωστόσο, σχεδόν όλοι οι ασθενείς απέκτησαν επίκτητη ανοχή στα φάρμακα μετά από 6 μήνες, με αποτέλεσμα την αποτυχία της θεραπείας. Η ανοχή στους αναστολείς του PD-L1, υφίσταται αλλά δεν είναι καλά μελετημένη.

Έχει προταθεί ότι η ανοσοθεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με στοχευμένη θεραπεία. Μείωση της έκφρασης του PD-L1 μέσω αναστολής της σηματοδότησης μπορεί να συνδυαστεί με θεραπεία αντι-PD-L1 ή αντι-PD-1. Αυτό μπορεί να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της θεραπείας κρατώντας τον άξονα PD-L1 / PD-1 σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Όμως παρά την πρόοδο τόσο σε επίπεδο θεραπείας όσο και σε βιολογικό επίπεδο χρειάζεται μεγαλύτερη κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης του PD-L1 ώστε να ανοίξει ο δρόμος για συνδυαστικές θεραπείες και στοχευμένες θεραπείες κατά κινασών ή μεταγραφικών παραγόντων.

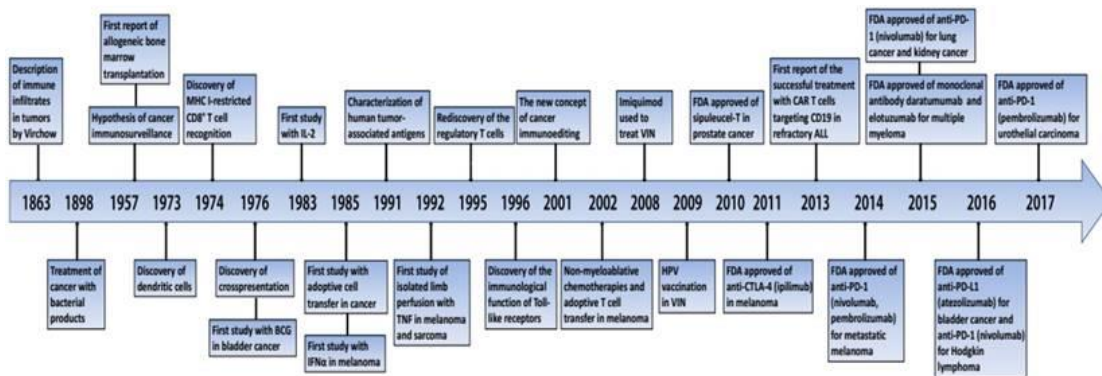
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ PD1/PD-L1 ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανοσοθεραπεία στον καρκίνο αποτελεί μια μεγάλη καινοτομία στην αντιμετώπιση πολλών μορφών καρκίνου. Η ιδέα βέβαια είναι πολύ παλαιότερη, όταν το 1891 ο χειρουργός William Coley επιχείρησε έγχυση σαρκωμάτων με βακτηριακά προϊόντα και παρατήρησε μείωση του μεγέθους του όγκου. Έπρεπε να περάσει όμως σχεδόν ένας αιώνας για να αρχίσει να διαφαίνεται ο ρόλος των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων στον ανοσιακό μηχανισμό. Στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν αντιγόνα συμπαγών όγκων, ώστε να γίνει προσπάθεια αντιμετώπισής τους με ανοσολογικές θεραπείες και συγχρόνως ανακαλύφθηκε η σημασία της ικανότητας του όγκου να αντιστέκεται και να διαφεύγει της ανοσιακής απάντησης του οργανισμού.

Τα τελευταία χρόνια δοκιμάστηκαν πολλές θεραπείες, που περιλαμβάνουν τη χορήγηση κυτοκινών, εμβολίων και T-λεμφοκυττάρων. Οι περισσότερες από αυτές τις θεραπείες δεν γνώρισαν επιτυχία, κυρίως λόγω της άγνοιας για τα ανοσιακά σημεία ελέγχου. Από το 2011 που έλαβε έγκριση η ipilimumab, ένα anti-CTLA-4 αντίσωμα στη θεραπεία του μελανώματος, πέντε ανοσοθεραπείες βασισμένες στο μονοπάτι του PD1/PD-L1, έλαβαν έγκριση για πολλές μορφές καρκίνου. Η ανοσοθεραπεία για τον ΜΜΚΠ πήρε έγκριση το 2015 στις Ηνωμένες Πολιτείες, την Ευρωπαϊκή Ένωση και την Ιαπωνία (Yoshiko Iwai, 2017) (Εικόνα 8)



Εικόνα 8: Ιστορική αναδρομή στην εξέλιξη της ανοσολογίας στον καρκίνο. Πηγή: Hongming Zhang, Jibei Chen. J Cancer 2018

Στις μέρες μας, η ανοσοθεραπεία έχει πάρει θέση μεταξύ της χειρουργικής, της ακτινοθεραπείας, της χημειοθεραπείας και της στοχευμένης θεραπείας ως ένας εκ των πυλώνων της αντιμετώπισης του καρκίνου. Η ιδιαιτερότητά της έγκειται στο γεγονός ότι δε δρα στο ίδιο το καρκινικό κύτταρο, αλλά στο λεμφοκύτταρο, το στρατιώτη του

ανοσοποιητικού συστήματος. Και μάλιστα, όχι με ενίσχυση των λεμφοκυττάρων, αλλά με άρση των αναστολέων που παράγονται από τον όγκο.

Η συνδυασμένη χορήγηση δύο ανοσοθεραπειών με διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης, το anti-CTLA4 ipilimumab με το anti-PD1 nivolumab έδρασαν αποτελεσματικά στην θεραπεία του μελανώματος, με πιο μακροχρόνια αποτελέσματα. Η επιτυχία της ανοσοθεραπείας στην αντιμετώπιση του καρκίνου οδήγησε το 2018 να μοιραστούν το Νόμπελ Ιατρικής, ο James P. Allison, του αντικαρκινικού κέντρου MD Anderson και ο Tasuku Honjo, του πανεπιστημίου του Κιότο για «την ανακάλυψη της αντικαρκινικής θεραπείας με αναστολή της αρνητικής ανοσορρύθμισης».

3.1. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΠΑΝΤΗΣΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

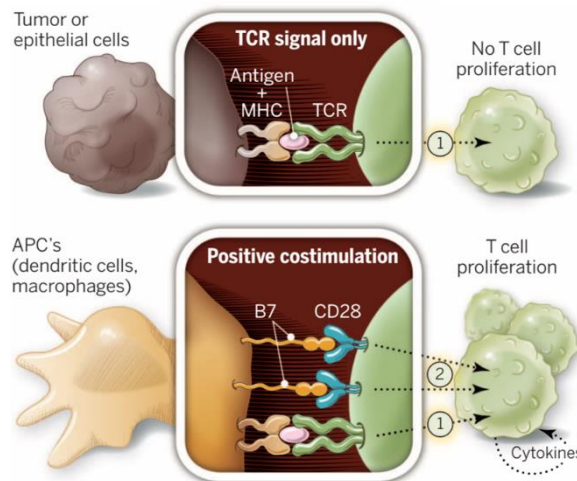
Το καρκινικό κύτταρο αποκτά τη δυνατότητα να αποφύγει την καταστροφή από το ανοσολογικό σύστημα. Αυτή η διαδικασία λέγεται cancer immunoeediting, και συντελείται σε τρεις διαδοχικές φάσεις, «καταστροφή», «ισορροπία» και «διαφυγή». Στην πρώτη φάση, η αναγνώριση των μεταλλαγμένων κυττάρων οδηγεί στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα δενδριτικά κύτταρα παρουσιάζουν καρκινικά αντιγόνα μέσω του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας στα T-helper CD4+ κύτταρα και επάγουν τα CD8+ κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα, τα οποία σε συνδυασμό με τα NK κύτταρα και τα μακροφάγα καταστρέφουν τα καρκινικά κύτταρα.

Τα νεοπλασματικά κύτταρα, μέσω της φυσικής επιλογής, αποκτούν μεταλλάξεις που οδηγούν σε κλώνους κυττάρων, ανθεκτικών στην επίθεση του ανοσοποιητικού. Κατά τη διάρκεια αυτής της «ισορροπίας» τα καρκινικά κύτταρα επιζούν σε μια λειτουργική κατάσταση νάρκης. Η ίδια η επίθεση του ανοσοποιητικού είναι αυτή που ωθεί τη γονιδιακή αστάθεια του όγκου στη δημιουργία ανθεκτικών κλώνων, ικανών να διαφύγουν την αναγνώριση και καταστροφή. Στη φάση της διαφυγής τα καρκινικά κύτταρα παρακάμπτουν το ανοσοποιητικό και πολλαπλασιάζονται ανεμπόδιστα, προκαλώντας τελικά την κλινικά έκδηλη νόσο. Οι τρόποι που μπορεί να επιτευχθεί αυτό είναι με εξαφάνιση των αντιγόνων του όγκου, κάνοντας δηλαδή τον όγκο αόρατο στο ανοσοποιητικό ή με έκφραση ανοσοκατασταλτικών λιγασών, όπως είναι η CTLA-4 και το PD-L1 (Pagni F, 2019).

3.2 Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ PD1 ΣΤΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΛΕΜΦΟΚΥΤΤΑΡΩΝ

Το ανοσοποιητικό σύστημα οφείλει να λειτουργεί μέσα σε πολύ στενά όρια. Οφείλει να αντιδρά αποτελεσματικά έναντι σε καθετί «ξένο» ώστε να εξαλείφει απειλές προς τον οργανισμό. Η ανεξέλεγκτη δράση του όμως, θα οδηγήσει σε σοβαρή βλάβη του οργανισμού λόγω της αυτοανοσίας. Η ανοσολογική ανοχή επιτυγχάνεται μέσω πολλαπλών διακριτών μηχανισμών, τόσο κεντρικών, όσο και περιφερικών. Κεντρικά, η ανοχή επιτυγχάνεται μέσω αρνητικής επιλογής αυτοάνοσων κλώνων λεμφοκυττάρων στο θύμο. Όμως απαιτούνται και περιφερικοί μηχανισμοί. Αυτοί είναι τα ρυθμιστικά Τ κύτταρα, ανέργεια Τ-κυττάρων, περιφερική εξάλειψη κλώνων και ανασταλτικά εξωγενή ρυθμιστικά σήματα.

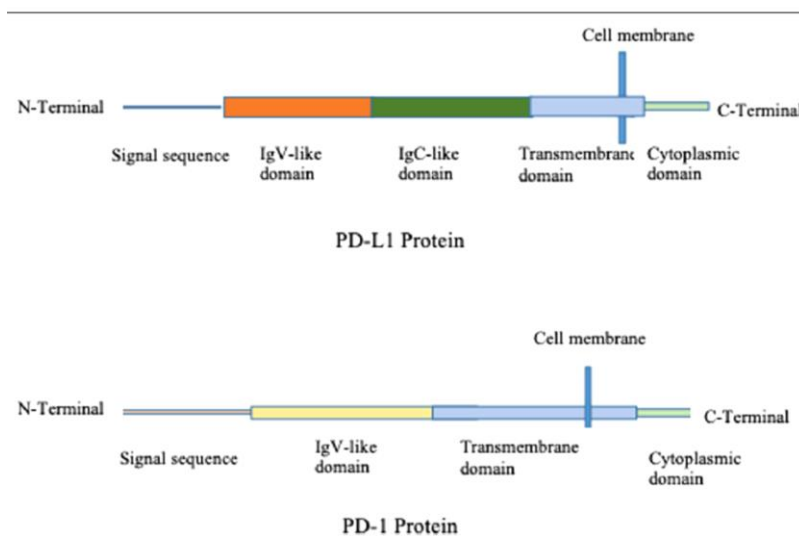
Η ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων αποτελεί μια διαδικασία δύο βημάτων. Η αναγνώριση του αντιγόνου ενωμένου με το μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC) δεν επαρκεί για την ενεργοποίηση των naïve Τ-λεμφοκυττάρων. Απαιτείται και ένα δεύτερο σήμα, δηλαδή η ενεργοποίηση του CD28 του Τ-λεμφοκυττάρου από τα B7 μόρια (CD80 και CD86) που ανευρίσκονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (Greenwald RJ, 2005). (Εικόνα 9). Εκτός από τα σήματα που ενεργοποιούν τα Τ-λεμφοκύτταρα, υπάρχουν και δεύτερα σήματα που οδηγούν στην αναστολή τους.



Εικόνα 9: Η ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων λαμβάνει χώρα μόνο μετά από αλληλεπίδραση του υποδοχέα με το αντιγόνο στα πλαίσια του μείζονος συστήματος ιστοσυμβατότητας (σήμα 1) και συνενεργοποίηση μέσω του CD28 (σήμα 2). Πηγή: Padmanee Sharma, James P. Allison. The future of immune checkpoint therapy. Science, 2015; 348 (6230).

3.3. Η ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ PD1/ PD-L1 Το PD1 ανακαλύφθηκε το 1992 και μόνο το 2000, με την ανακάλυψη της λιγάσης PD-L1 αποδείχθηκε ότι αποτελεί ένα ακόμη immune checkpoint με ανασταλτική δράση στα Τ-λεμφοκύτταρα. Το PD1 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I που εμφανίζεται σε ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα (Εικόνα 10).

Αποτελείται από μία μεταβλητή τύπου Ig και ένα ενδοκυττάριο τμήμα που επάγει ένα ανασταλτικό μονοπάτι τυροσινικής κινάσης SHP2. Είναι απαραίτητο για τον περιφερικό έλεγχο της δράσης των λεμφοκυττάρων ώστε να αποφευχθεί η αυτοανοσία. Ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου που κωδικοποιεί το PD1 αναπτύσσουν νεφρίτιδα και αρθρίτιδα που προσομοιάζει με συστηματικό ερυθρεμάτωδη λύκο και καρδιομυοπάθεια σε προχωρημένη ηλικία. Μία παράπλευρη διαπίστωση από ποντίκια με έλλειψη του PD1 ήταν ότι η αυτοανοσία τους εκδηλωνόταν αργά και περιοριζόταν σε συγκεκριμένα όργανα. Αυτό έγειρε την ελπίδα ότι η αναστολή του PD1 δε θα συνοδευόταν από βαριές επιπλοκές (Nishimura H, 2001).



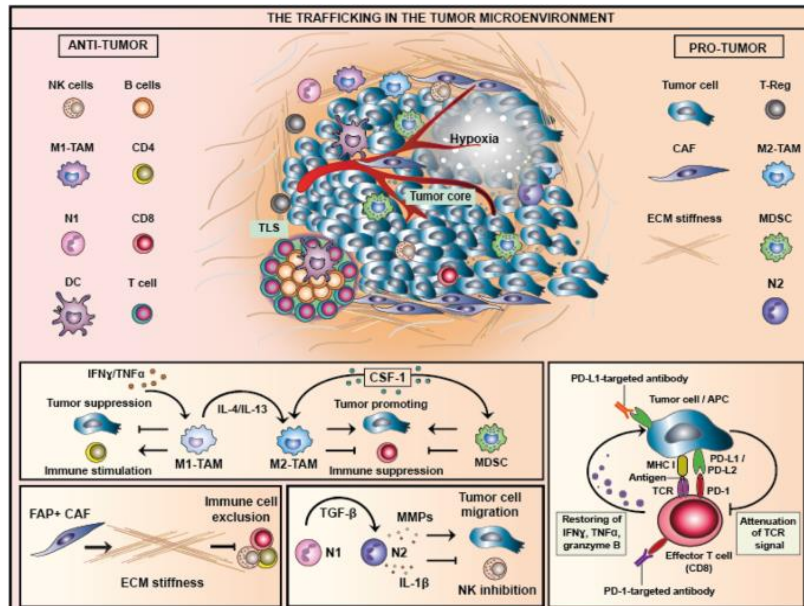
Εικόνα 10: Η πρωτεϊνική δομή των PD-L1 και PD1. Είναι και οι δύο διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Και οι δύο διαθέτουν ενδοκυττάριο, διαμεμβρανικό και εξωκυττάριο τμήμα. Η κύρια διαφορά είναι ότι το PD-L1 διαθέτει 2 εξωκυττάρια τμήματα (IgV και IgC), ενώ το PD1 διαθέτει μόνο ένα. Πηγή: Akintunde Akinleye & Zoab Rasool. Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics. Journal of Hematology & Oncology, 2019; 12: (92).

Ο υποδοχέας PD1 έχει δύο λιγάσες, τον PD-L1 (B7-H1, CD274) και τον PD-L2 (B7-DC, CD273). Από αυτές, μόνο ο PD-L1 φαίνεται να έχει κλινική σημασία στην

ανοσοθεραπεία του καρκίνου. Πολλά κύτταρα, όπως είναι επιθηλιακά, ένδοθηλιακά και καρκινικά κύτταρα εκφράζουν την λιγάνη αυτή, μετά από έκθεσή τους στην κυτταροκίνη ιντερφερόνη- γ που παράγεται από ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα και NK κύτταρα. Είναι χαρακτηριστικό ότι ο υποδοχέας PD1 δεν υπάρχει στην επιφάνεια μη ενεργοποιημένων Τ-λεμφοκυττάρων, αλλά μάλιστα δημιουργείται 6-12 ώρες μετά την σύνδεσή τους με το αντιγόνο (Honda T, 2014).

3.4. Η ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ PD1/PD-L1 ΣΤΟ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

Το μικροπεριβάλλον του καρκίνου αποτελείται από μια πληθώρα κυττάρων. Εκτός από το καρκινικό κύτταρο από το οποίο προήλθε ο όγκος, αλλοιωμένο από πολλαπλές μεταλλάξεις, περιλαμβάνει επίσης και ένδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες και φυσικά κύτταρα του ανοσοποιητικού. Τα κύτταρα αυτά είναι σπάνια στην αρχή αλλά σταδιακά αθροίζονται στον όγκο. Στην πλειονότητα είναι φονείς (natural killer – NK cells), μακροφάγα και φυσικά Τ-λεμφοκύτταρα (Sharma P, 2015) (Εικόνα 11)



Εικόνα 11: Το μικροπεριβάλλον του όγκου είναι ένα σύνθετο σύστημα καρκινικών και φυσιολογικών στρωματικών κυττάρων, όπως ένδοθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες, με ιδιαίτερο χαρακτηριστικό τη διήθηση από λευκοκύτταρα. Πηγή: Filippo Galli, Jesus Vera Aguilera, Belinda Palermo, Svetomir N Markovic, Paola Nisticò, Alberto Signore. Relevance of immune cell and tumor microenvironment imaging in the new era of immunotherapy. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 2020; 18;39(1):89.

Πειράματα με ανοσοανεπαρκή ποντίκια έδειξαν ότι ήταν πιο επιρρεπή στην καρκινογένεση από τα ανοσοεπαρκή. Αυτό καταδεικνύει ότι τα T-λεμφοκύτταρα συμμετέχουν στην καταστροφή των καρκινικών κυττάρων και τον έλεγχο της ανάπτυξης του όγκου. Ειδικά τα T-λεμφοκύτταρα επιτίθενται σε καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν πεπτίδια του όγκου, δεσμευμένα πάνω σε μόρια του MHC. Τα αντιγόνα αυτά υπάγονται σε δύο κατηγορίες:

a) Πρώτον, μη μεταλλαγμένες πρωτεΐνες, που όμως δεν απολαμβάνουν την πλήρη ανοχή των λεμφοκυττάρων, γιατί πχ φυσιολογικά η έκφρασή τους στους ιστούς είναι πολύ περιορισμένη.

b) Δεύτερον, πρωτεΐνες εντελώς νέες προς τον οργανισμό. Οι πρωτεΐνες αυτές σπανίως έχουν ιογενή προέλευση, όπως στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Στις περισσότερες περιπτώσεις όμως μεταλλάξεις στο DNA του καρκινικού κυττάρου οδηγούν στη δημιουργία, νέων, άγνωστων στον οργανισμό, πολυπεπτιδίων. Όλες αυτές οι νέες πρωτεΐνες καλούνται νεοαντιγόνα.

Τα νεοαντιγόνα είναι σημαντικά στον έλεγχο του όγκου, αφού δεν καλύπτονται από την κεντρικώς ελεγχόμενη ανοχή των T-λεμφοκυττάρων. Μεγάλο σταθμό αποτέλεσε η ανάπτυξη της exome-guided neoantigen identification τεχνικής απομόνωσης και πρόβλεψης των νεοαντιγόνων με κλινική σημασία. Με την τεχνική αυτή ανακαλύπτονται οι μεταλλάξεις στο τμήμα του DNA που παράγει πρωτεΐνες (εξόνια) μετά από φιλτράρισμα με ειδικούς αλγορίθμους ή με φασματομετρία μάζας, αναγνωρίζονται τα πεπτίδια τα οποία, συνδυασμένα με το MHC, θα επάγουν τη δράση των T-λεμφοκυττάρων.

Ο όγκος όμως καταφέρνει να επιβιώνει, είτε με “editing- επεξεργασία” των νεοαντιγόνων του, είτε με ανασταλτική ρύθμιση των αντίστοιχων πληθυσμών T-λεμφοκυττάρων. Το T-λεμφοκύτταρο που θα προσπαθήσει να διηθήσει τον όγκο και να ασκήσει την αντικαρκινική του δράση έχει να αντιμετωπίσει εμπόδια, όπως το στρώμα, τα ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα και τις ανασταλτικές κυτταροκίνες. Το πρώτο μόριο με κλινική σημασία ήταν το CTLA-4, το οποίο συνδέεται με το CD28 και ασκεί ισχυρή ανασταλτική δράση στα T-λεμφοκύτταρα (Walunas TL, 1994).

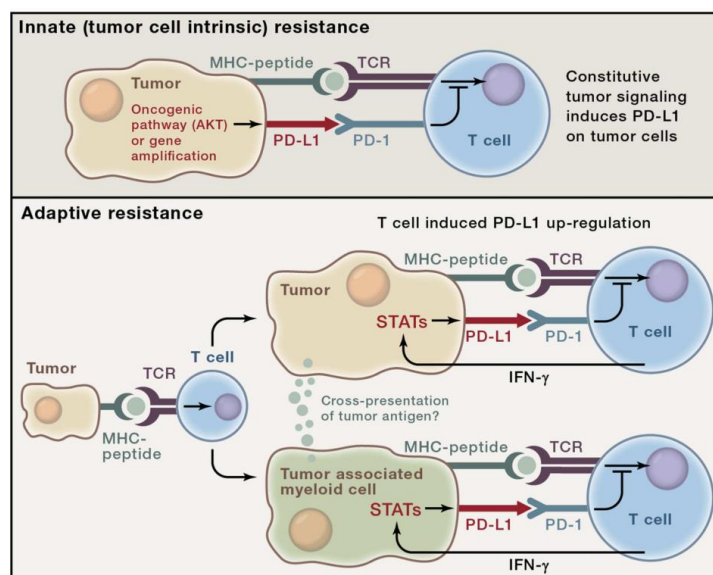
Ο PD-L1 αποτέλεσε το δεύτερο κλινικά σημαντικό μόριο. Από ετών έχει ανακαλυφθεί ότι πολλοί συμπαγείς όγκοι παράγουν PD-L1, ενώ ο υποδοχέας PD1 εκφράζεται σε T-λεμφοκύτταρα που διηθούν τον όγκο. Παράγεται από τα καρκινικά

κύτταρα μιας πληθώρας συμπαγών όγκων, όπως το μελάνωμα, το ουροθηλιακό καρκίνωμα, προστατικοί όγκοι, του πνεύμονα, των νεφρών και των ωοθηκών.

Η δράση της ένωσης του PD1 με τον PD-L1 λαμβάνει χώρα κυρίως στο μικροπεριβάλλον του όγκου και όχι στους περιοχικούς λεμφαδένες, όπως το CTLA-4. Τα T-λεμφοκύτταρα που διηθούν τον όγκο, κατά κανόνα εκδηλώνουν τον υποδοχέα PD1 στην επιφάνειά τους και θεωρούνται ότι έχουν «εξαντληθεί» από το συνεχή ερεθισμό από τα καρκινικά αντιγόνα. Αυτός ο μηχανισμός φυσιολογικά περιορίζει τις παράπλευρες απώλειες από τη δράση των T-λεμφοκυττάρων στη λοίμωξη και προστατεύει τον εξαντλημένο πληθυσμό των T-λεμφοκυττάρων, όπως φαίνεται σε μοντέλα χρόνιας ιογενούς λοίμωξης (Keir ME, 2008). Νεότερες μελέτες ανέδειξαν ότι και μακροφάγα, υπό τη δράση του PD-L1, οδηγούν σε ενεργή εκδίωξη των T-λεμφοκυττάρων από το μικροπεριβάλλον του όγκου.

Οι μηχανισμοί με τους οποίους, ο όγκος παράγει PD-L1 είναι δύο: ο ενδογενής (intrinsic) και ο προσαρμοστικός (adaptive). Με τον ενδογενή μηχανισμό, γενετικές μεταλλάξεις ή ενεργοποίηση μονοπατιών, όπως το AKT και STAT3, οδηγούν στην παραγωγή PD-L1. Δεν έχει επιβεβαιωθεί *In vivo*, η σημασία αυτού του μηχανισμού. Ο προσαρμοστικός μηχανισμός αναφέρεται στην παραγωγή PD-L1 από τα κύτταρα του όγκου σαν απάντηση στην ιντερφερόνη-γ. Μιας και η ιντερφερόνη-γ παράγεται μόνο από Th1 CD4 βοηθητικά κύτταρα, NK κύτταρα και ενεργοποιημένα CD8 κύτταρα, αυτός ο μηχανισμός εκλαμβάνεται από πλευράς του όγκου, σαν εχθρικό μικροπεριβάλλον.

Επίσης έχει φανεί ότι παραγωγή του PD-L1 από μυελοειδή και δενδριτικά κύτταρα και όχι από καρκινικά κύτταρα, καταλήγει στο ίδιο αποτέλεσμα αναστολής της δράσης των T-λεμφοκυττάρων (Spranger S, 2013). Αυτό ενισχύεται από το γεγονός πως σε πρόσφατες μελέτες σε ασθενείς με ΜΜΚΠ, ανεδείχθη η συμμετοχή της αλληλεπίδρασης του B7 αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων, με το CD28 των T-λεμφοκυττάρων στον αποκλεισμό της PD1 δραστηριότητας. Η αλληλεπίδραση αυτή δεν σχετίζεται με το γεγονός ότι θεωρητικά οι PD1 αναστολείς δρουν στο μικροπεριβάλλον του όγκου και όχι σε αντιγονοπαρουσιαστικά όργανα, όπως οι λεμφαδένες. Όλα τα ανωτέρω αναδεικνύουν πόσο πραγματικά λίγα είναι γνωστά για τη δράση της ανοσοθεραπείας στον καρκίνο. (Εικόνα 12)

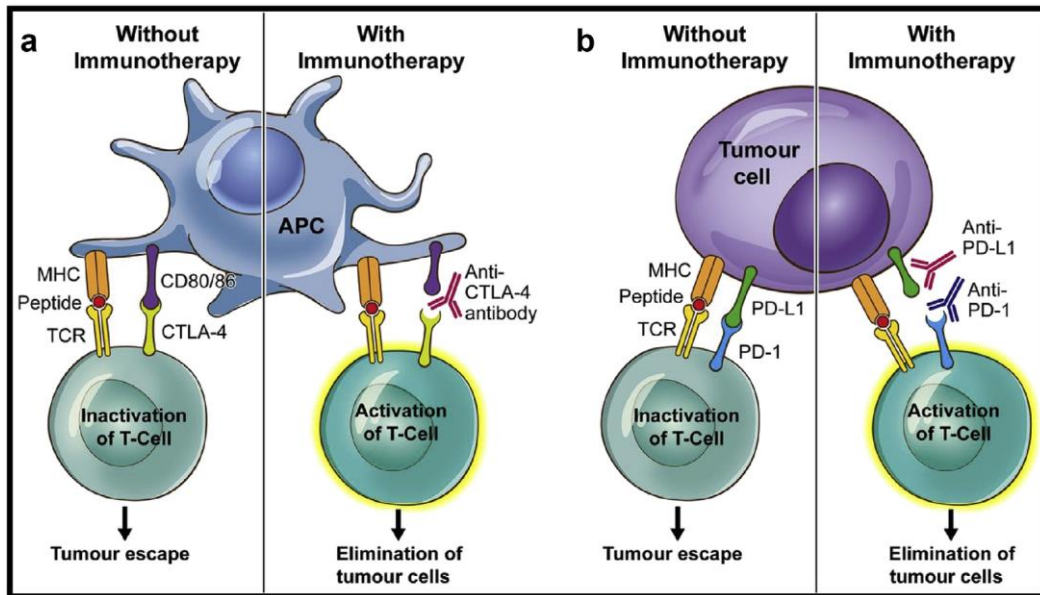


Εικόνα 12: Απεικόνιση του ενδογενούς (πάνω) και του προσαρμοστικού (κάτω) τρόπου ανοσιακής αντοχής. Ενδογενής αντίσταση: παραγωγή PD-L1 από τα καρκινικά κύτταρα, ανεξάρτητα της ανοσιακής προσβολής. Προσαρμοστική αντίσταση: Η παραγωγή PD-L1 επάγεται από την IFN- γ και παράγεται, όχι μόνο από τα καρκινικά κύτταρα, αλλά και από λευκοκύτταρα. Πηγή: S.L. Topalian, C.G. Drake, D.M. Pardoll. Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. Cancer Cell. 2015; 27 (4).

3.5. ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟΣ ΑΠΟΚΛΕΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ PD1/PD-L1

Η ανοσολογική αντίδραση του οργανισμού στο μελάνωμα είναι γνωστή από τη δεκαετία του 1980. Προσπάθειες όμως να δημιουργηθούν εμβόλια που να χρησιμοποιούν αυτή τη δράση απέδωσαν πτωχά αποτελέσματα. Αυτό άλλαξε με τη χρήση των anti-CTLA4 και anti-PD1 θεραπειών. Αυτές οι θεραπείες μπλοκάρουν ανασταλτικά σήματα στην ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων. Επιτρέπουν έτσι στα T-λεμφοκύτταρα που διηθούν τον όγκο να παρακάμψουν ρυθμιστικούς μηχανισμούς και να προτάξουν αποτελεσματική αντικαρκινική απάντηση. Απεδείχθη έτσι μια βασική αρχή της ανοσοθεραπείας, ότι ο ασθενής διαθέτει μια πλειάδα T κυττάρων εξειδικευμένων να πολεμήσουν τον όγκο αν δεν υπήρχαν οι ανασταλτικοί μηχανισμοί. Μετά την αρχή με το CTLA-4 οι ορίζοντες άνοιξαν πραγματικά με την αναστολή του μονοπατιού PD1/PD-L1, το οποίο σε πειράματα σε ποντίκια, ανέδειξε εξαρχής εξειδικευμένη δράση σε μεγαλύτερο εύρος καρκίνων και ασφαλέστερο προφίλ. Το γεγονός ότι πολλαπλά σκευάσματα είναι σε χρήση σήμερα αποτελεί ένδειξη της αποτελεσματικότητάς τους (Topalian S., 2015). Η διακοπή του PD1 οδηγεί σε μία αναζωογόνηση των εξουθενωμένων CD8 T-λεμφοκυττάρων (Εικόνα 13). Η δράση των αναστολέων PD1 είναι ισχυρότερη όταν η

ανοσολογική απάντηση έχει ήδη διεγερθεί αλλά κρατιέται σε καταστολή από τον PD1 και τις λιγάσες της, PD-L1 και PD-L2 (Tumeh PC, 2014).



Εικόνα 13: Δράση των αναστολέων PD1, PD-L1, CTLA-4 που ενεργοποιούν τα T-λεμφοκύτταρα, μπλοκάροντας τους ανασταλτικούς μηχανισμούς. Πηγή: Alexandra L. Lewis, Jamie Chaff, Monica Girotra, Gregory W. Fischer. Immune checkpoint inhibitors: a narrative review of considerations for the anaesthesiologist. BJA . 2020.

Η παρουσία λεμφοκυττάρων που διηθούν τον όγκο, και καταδεικνύουν ανοσολογική απάντηση δεν είναι απαραίτητη για τον αποκλεισμό της δράσης του PD1. Φαίνεται ότι υπάρχουν υποπληθυσμοί CXCR5+ PD-1+ CD8 T-λεμφοκυττάρων που απαντούν άμεσα στον αποκλεισμό του PD1. Η ενεργοποίηση αυτή όμως δεν κρατάει για πάντα και ένα εξαντλημένο T-λεμφοκύτταρο, μπορεί τελικά να αναπτύξει «ανοσία» έναντι του αποκλεισμού της PD1. Αυτό μπορεί να εξηγήσει και τα παροδικά αποτελέσματα της ανοσοθεραπείας σε προχωρημένο καρκίνο (Sen DR, 2016). Επίσης, ενώ ο αποκλεισμός του PD1 οδηγεί κυρίως σε αύξηση των CD8 T-λεμφοκυττάρων, η παρουσία των CD4 helpers είναι απαραίτητη για τη λειτουργία τους, χωρίς να είναι σαφής ο μηχανισμός.

Ο μηχανισμός του αποκλεισμού του PD-L1 (PD-L1 blockade) περιπλέκει ακόμη περισσότερο την κατάσταση. Το PD-L1, μοιάζει να είναι φαινοτυπικά όμοια με αυτόν του PD1. Είναι μια κύρια λιγάση στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Ο τρόπος δράσης της όμως παρουσιάζει καίριες διαφορές και προκλήσεις, όπως για παράδειγμα αν απαιτείται

έκφραση του PD-L1 από τον ξενιστή ή αρκεί το PD-L1 που παράγει ο όγκος για τον αποκλεισμό της δράσης της PD-L1 (Lin H, 2018). Αυτά δείχνουν ότι οι κυτταρικές επιδράσεις του αποκλεισμού των PD1 / PD-L1 είναι πολύ πιο σύνθετες από ότι πιστεύαμε μέχρι τώρα.

Το πρώτο αυτοαντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε σε άνθρωπο ήταν το anti-PD1 αντίσωμα nivolumab. Οι πρώτες μελέτες ανέδειξαν δράση σε πολλούς διακριτούς τύπους καρκίνου, όπως το μελάνωμα, του νεφρού και τον κολοορθικό καρκίνο (Brahmer JR, 2010). Τα ελπιδοφόρα πρώτα βήματα μελετών σε ασθενείς με ΜΜΚΠ και η χρήση του είτε σαν μονοθεραπεία είτε σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία, καθώς και οι γνώσεις στο πεδίο της μοριακής βιολογίας, βρίσκονται στο στάδιο μελετών.

3.6. ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΣΤΟ ΜΗ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ PD1

Nivolumab: Πρόκειται για τον πρώτο αναστολέα του PD1 υποδοχέα που δοκιμάστηκε. Είναι ένα μονοκλωνικό, πλήρως ανθρώπινο αντίσωμα IgG4, με υψηλή ειδικότητα και συνάφεια κατά του υποδοχέα PD1. Έχει επιβεβαιωμένη δραστικότητα με καλή ανοχή σε πολλούς τύπους καρκίνων. Το ενδιαφέρον για το ΜΜΚΠ εκτινάχθηκε το 2012 με τη μελέτη φάσης I, checkmate 003, one arm μελέτη, όπου το nivolumab δοκιμάστηκε σε διάφορους τύπους καρκίνων, ανάμεσά τους και το ΜΜΚΠ (Toralian SL, 2012). Χαρακτηριστικά της μελέτης ήταν η προχωρημένη νόσος και η προηγηθείσα θεραπεία. Από τους 296 ασθενείς που συμμετείχαν, 76 έπασχαν από ΜΜΚΠ. Από αυτούς εμφάνισαν ανταπόκριση οι 14 (18%) με καλό προφίλ ασφάλειας. Αλλά και στο μεταστατικό πλακώδες ΜΜΚΠ, η μελέτη checkmate 063 ανέδειξε αποτελεσματικότητα και ασφάλεια του nivolumab.

Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα του nivolumab, έδωσαν έναυσμα για περαιτέρω μελέτες. Ακολούθησαν μελέτες που πήραν έγκριση ως θεραπεία 2^{ης} γραμμής στον ΜΜΚΠ σταδίου IV. Η checkmate 017 και checkmate 057 είναι μελέτες φάσης III (Borghaei H, 2015). Η checkmate 017 είναι μια τυχαιοποιημένη μελέτη όπου έγινε σύγκριση ανάμεσα στο nivolumab και στη docetaxel σε άτομα με προχωρημένο (στάδιο IIIB/IV) πλακώδες ΜΜΚΠ που είχαν ήδη λάβει χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα. Η ομάδα του nivolumab ανέδειξε καλύτερη συνολική επιβίωση (overall survival, OS) με

διάμεση τιμή τους 9,2 μήνες έναντι 6 μηνών της ομάδας της docetaxel. Η checkmate 057 είναι επίσης μια τυχαιοποιημένη μελέτη που σύγκρινε το nivolumab με docetaxel σε σταδίου IV μη πλακώδη ΜΜΚΠ ως θεραπεία 2^{ης} γραμμής σε ασθενείς που είχαν ήδη λάβει χημειοθεραπεία. Και πάλι η ομάδα του nivolumab παρουσίασε καλύτερη συνολική επιβίωση, με διάμεση τιμή τους 12,2 μήνες, έναντι 9,4 μηνών στην ομάδα της docetaxel. Ένα ενδιαφέρον παράπλευρο αποτέλεσμα ήταν η καλύτερη ανταπόκριση στο nivolumab των ΜΜΚΠ, θετικών στο PD-L1.

Περαιτέρω αποτελέσματα όμως ήταν δύσκολο να εξαχθούν, μιας και δεν είχε προηγηθεί διαστρωμάτωση του δείγματος ανάλογα με την έκφραση του PD-L1 κατά την τυχαιοποίηση. Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν την Food and Drugs administration και τη European Medicines Agency στην έγκριση του nivolumab το 2015 ως θεραπεία 2^{ης} γραμμής στο ΜΜΚΠ, τόσο στο πλακώδες, όσο και στο αδενοκαρκίνωμα “wild type” για EGFR και ALK. Ο επανέλεγχος των μελετών checkmate 017 και 057 ανέδειξε ότι η ανταπόκριση στο nivolumab είναι ιδιαίτερα ανθεκτική με 2ετή επιβίωση 23% στο πλακώδες και 29% στο μη πλακώδες ΜΜΚΠ, και 3ετη 17% συνολικά (Horn L, 2017). Ακόμη και ασθενείς με ηπατικές μεταστάσεις, που παρουσιάζουν χειρότερη πρόγνωση, εμφάνισαν 8% 3ετή επιβίωση. Τέλος φαίνεται ότι οι ασθενείς που επιτυγχάνουν 3ετή επιβίωση σταθεροποιούνται, ενώ η 4ετή επιβίωση ανέρχεται στο 14% συνολικά. Ως εκ τούτου από το 2015 έχει λάβει έγκριση ως θεραπεία 2ης γραμμής στον προχωρημένο ΜΜΚΠ.

Ακολούθησε η δοκιμή του nivolumab σαν φάρμακο στην 1^η γραμμή θεραπείας στον προχωρημένο ΜΜΚΠ με τη μελέτη checkmate 026, μια φάσης III, τυχαιοποιημένη μελέτη, η οποία διαχώρισε ασθενείς με προχωρημένο ΜΜΚΠ και θετικό PD-L1 να λάβουν είτε nivolumab ως μονοθεραπεία, είτε χημειοθεραπεία. Δεν ανέδειξε υπεροχή του nivolumab έναντι της χημειοθεραπείας, παρά το ασφαλέστερο προφίλ. (ολική επιβίωση 14,4 έναντι 13,2 μήνες με ΧΜΘ) (Carbone D.P., 2017).

Pembrolizumab: Είναι ένα υψηλά ειδικευμένο εξανθρωποποιημένο μονοκλωνικό IgG4-κ αντίσωμα κατά του PD1, που παρεμποδίζει τη σύνδεση του με το PD-L1. Πρόκειται για ακόμα ένα αντίσωμα κατά του PD1 που έδειξε καλά αποτελέσματα στη φάσης Ιβ μελέτη keynote-001 το 2015. Η μελέτη αυτή έθεσε και το θέμα της σημασίας ενός βιοδείκτη θετικότητας για τον PD-L1, μιας και ανέδειξε ανταπόκριση 45,2% στους ασθενείς με θετικότητα στο PD-L1>50% σε σχέση με 19,4% συνολική

ανταπόκριση (Garon EB, 2015). Ακολούθησε η μελέτη keynote-010, μια τυχαιοποιημένη, φάσης II/III, όπου έγινε σύγκριση του pembrolizumab με docetaxel σε ασθενείς με προχωρημένο ΜΜΚΠ που είχαν ήδη λάβει τουλάχιστον δύο κύκλους χημειοθεραπείας με βάση την πλατίνα. Η μεγάλη διαφορά σε σχέση με τις checkmate 017/057 ήταν ότι οι ασθενείς δεν διαχωρίστηκαν με βάση τον ιστολογικό τύπο, αλλά ήταν προαπαιτούμενη η θετικότητα για το PD-L1>1% και οι ασθενείς διαστρωματώθηκαν με cut off το 50%. Τα αποτελέσματα ήταν θετικά με μέση επιβίωση 8,2 μήνες στην ομάδα της docetaxel έναντι 10,4 μήνες για αυτή του pembrolizumab 2mg/kg και 12,7 μήνες για την ομάδα pembrolizumab 10mg/kg. Ειδικά στην ομάδα με θετική έκφραση του PD-L1>50%, η μέση επιβίωση ήταν 14,9 μήνες για το pembrolizumab 2mg/kg και 17,3 μήνες για το pembrolizumab 10mg/kg. Η ιστολογία του ΜΜΚΠ δεν αποτέλεσε παράγοντα αποτελεσματικότητας. Η μελέτη αυτή έδωσε στο pembrolizumab την έγκριση για χρήση ως θεραπεία 2^{ης} γραμμής, σε ασθενείς που είναι θετικοί για το PD-L1>1% (Cortinovis D & Group, 2017).

Ο ρόλος του pembrolizumab ως μονοθεραπεία πρώτης γραμμής αξιολογήθηκε με τις μελέτες keynote-024 και keynote-042. Στην keynote-024 συμμετείχαν ασθενείς που δεν είχαν λάβει προηγούμενη θεραπεία, με πλακώδη και μη πλακώδη τύπο καρκίνου και που δεν παρουσίαζαν μεταλλάξεις στο EGFR ή στο ALK. Όλοι οι ασθενείς έπρεπε να είναι θετικοί στο PD-L1>50%. Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν 1:1 σε 2 ομάδες. Αυτούς που θα λάβουν pembrolizumab και σε αυτούς που θα λάβουν χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα. Τα αποτελέσματα ήταν θετικά για το pembrolizumab, το οποίο είχε 44% ανταπόκριση, έναντι 27,8% της πλατίνας, με λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες. Τα αποτελέσματα αυτά έδωσαν την έγκριση στο pembrolizumab για θεραπεία 1^{ης} γραμμής σε ασθενείς ισχυρά θετικούς για PD-L1 (>50%).

Ο επανέλεγχος της keynote-024 ανέδειξε αυξημένη συνολική επιβίωση σε αυτή την ομάδα των ασθενών. Η keynote-042 επέκτεινε την keynote-024 μελέτη. Αυτή τη φορά περιλαμβάνονταν στην 1^η γραμμή, ασθενείς με θετικότητα στο PD-L1>20% και PD-L1>1%. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν αυξημένη συνολική επιβίωση στην ομάδα με PD-L1>50% (20 μήνες, έναντι 12,1 με χημειοθεραπεία), αλλά για το PD-L1 1-49% δεν υπήρχε διαφορά στην επιβίωση. Ειδικά για το πλακώδες ΜΜΚΠ, όπου οι επιλογές και η επιβίωση ήταν παραδοσιακά χειρότερες από τον μη πλακώδη τύπο, η ευεργετική δράση

του pembrolizumab έχει επιβεβαιωθεί και από άλλες μελέτες (keynote-028,158,604) (Chung HC P.-P. S.-M., 2020).

3.7. ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ PD-L1

Μετά την ανάπτυξη των αναστολέων του PD1 ακολούθησε η ανάπτυξη φαρμάκων που εμποδίζουν το μονοπάτι PD1/PD-L1 δεσμεύοντας τον PD-L1 αντί του PD1. Η λογική πίσω από μια πιθανή υπεροχή τους έναντι των υπαρχόντων αναστολέων της PD1, είναι ένας σταθερότερος και αποτελεσματικότερος αποκλεισμός. Επίσης το γεγονός ότι το μονοπάτι PD1/PD-L2 δεν παραβλάπτεται μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των πνευμονικών κυρίως αυτοάνοσων ανεπιθύμητων ενεργειών.

Atezolizumab: πρόκειται για ένα μονοκλωνικό IgG1 ανθρωποποιημένο αντίσωμα κατά του PD-L1. Δοκιμάστηκε, όπως και οι προηγούμενοι αναστολείς, σε προχωρημένο ΜΜΚΠ, έναντι της docetaxel ως θεραπεία 2^{ης} γραμμής, με τη μελέτη POPLAR. Η φάσης II μελέτη ανέδειξε καλύτερα αποτελέσματα και ασφαλέστερο προφίλ του atezolizumab έναντι της docetaxel. Ο βαθμός έκφρασης του PD-L1 αποτέλεσε σημαντικό παράγοντα, με μέση επιβίωση τους 15,5 μήνες στους ασθενείς με θετικότητα στο PD-L1>50% και 9,7 μήνες για θετικότητα στον PD-L1<1%, όσο και της ομάδας του docetaxel. Στην ίδια γραμμή ακολούθησε και η φάσης III μελέτη OAK, όπου το atezolizumab συγκρίθηκε με το docetaxel ως θεραπεία 2^{ης} γραμμής για προχωρημένο ΜΜΚΠ. Ανέδειξε επίσης καλύτερη μέση επιβίωση έναντι του docetaxel με μέση επιβίωση 15,7 μήνες έναντι 10,3 μήνες του docetaxel. Ακόμα και στην ομάδα των PD-L1 αρνητικών ασθενών η μέση επιβίωση ήταν 12,6 μήνες έναντι 8,9 μήνες του docetaxel (Rittmeyer A, 2017). Οι μελέτες αυτές καθιέρωσαν το atezolizumab ως θεραπεία 2^{ης} γραμμής για το ΜΜΚΠ.

Ως 1^{ης} γραμμής θεραπεία σε προχωρημένο ΜΜΚΠ δοκιμάστηκε στα πλαίσια της φάσης II της μελέτης BIRCH, όπου αναφέρθηκε 26% ανταπόκριση σε PD-L1 θετικούς ασθενείς και 19% σε αρνητικούς. Ίδια αποτελέσματα ανέδειξε η μελέτη FIR φάσης I, ίδιου σχεδιασμού με τη BIRCH. Οι φάσης III μελέτες IMpower 110 και 111 είναι εν εξελίξει και τα αποτελέσματά τους θα είναι καθοριστικά στο ρόλο που θα παίξει το atezolizumab ως μονοθεραπεία 1^{ης} γραμμής.

Durvalumab: πρόκειται για ένα πλήρως ανθρώπινο μονοκλωνικό IgG1 αντίσωμα που συνδέεται με μεγάλη συνάφεια και εκλεκτικότητα με το PD-L1, μπλοκάροντας την αλληλεπίδρασή του με το PD1. Μετά τις μελέτες φάσης I και II, ακολούθησε η μελέτη

PACIFIC φάσης III που δοκίμασε το durvalumab ως θεραπεία 2^{ης} γραμμής μετά από χημειοθεραπεία σε ανεγχείρητους σταδίου III ΜΜΚΠ. Ανέδειξε 3ετή επιβίωση 83,1% έναντι 74,6% του placebo. Ο ρόλος όμως του durvalumab ως θεραπεία 1^{ης} γραμμής δεν πιστοποιήθηκε, αφού η μελέτη MYSTIC δεν ανέδειξε πλεονέκτημα του durvalumab έναντι κλασικής χημειοθεραπείας, είτε ως μονοθεραπεία, είτε σε συνδυασμό με tremelimumab (Rizvi NA, 2020).

Η σύγκριση μεταξύ των αναστολέων PD1 και αναστολέων PD-L1 είναι δύσκολη, κυρίως γιατί δεν έχουν γίνει πειραματικές μελέτες που να συγκρίνουν ευθέως τις δύο κατηγορίες, οπότε οποιαδήποτε σύγκριση γίνεται εμμέσως με βάση δημοσιευμένες μελέτες. Γι' αυτό ίσως τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα, με άλλους ερευνητές να βρίσκουν ελαφρά υπεροχή των αναστολέων PD1 και άλλοι υπεροχή των αναστολέων PD-L1. Υπάρχουν ακόμη προτάσεις χρήσης των αναστολέων PD-L1 ως salvage therapy σε ασθενείς όπου οι αναστολείς PD1 δεν ήταν αποτελεσματικοί.

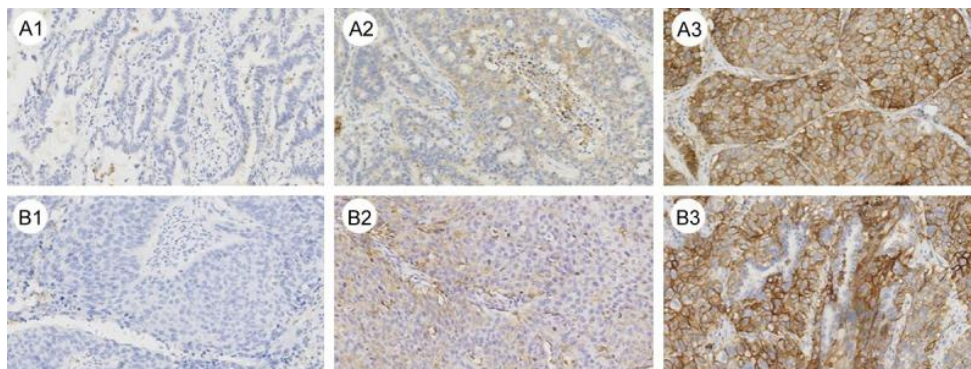
3.8. Η ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Ταυτόχρονα με την ανάπτυξη των αναστολέων PD1/PD-L1 αναπτύχθηκαν και οι μέθοδοι προσδιορισμού της έκφρασης του PD-L1 του όγκου σε μια προσπάθεια καθορισμού των ασθενών στους οποίους η ανοσοθεραπεία θα είναι αποτελεσματική. Σύμφωνα με τις υπάρχουσες οδηγίες, ο προσδιορισμός του επιπέδου του PD-L1 του όγκου, απαιτείται μόνο για τη χρήση του pembrolizumab. Αυτό μάλιστα αποτέλεσε μια τεράστια καινοτομία, μια και πρώτη φορά στην ιστορία της ιατρικής ένα φάρμακο εγκρίνεται με βάση ένα συγκεκριμένο χαρακτηριστικό του όγκου, ανεξαρτήτως από την ιστολογία του ή το όργανο από το οποίο προήλθε. Παρολαυτά, σε όλες τις μελέτες, μόνο ένα ποσοστό των ασθενών ανταποκρίθηκαν στην ανοσοθεραπεία. Είναι επομένως απαραίτητος ένα δείκτης που να προβλέπει αυτούς που θα ωφεληθούν από την ανοσοθεραπεία.

Η έκφραση του PD-L1 μετράται με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας σε δείγμα του όγκου, όπου υπολογίζεται το ποσοστό του όγκου που εκδηλώνει στην επιφάνειά του τον PD-L1, δηλαδή το tumor proportion score (TPS) (Εικόνα 14).

Κάθε αναστολέας των PD1/PD-L1 που κυκλοφορεί αυτή τη στιγμή συνοδεύεται από ένα ή περισσότερα συνοδά κιτ ανοσοϊστοχημείας. Το pembrolizumab συνοδεύεται από τα 22C3 pharmDx και SP263 κιτ, που αποτελούν και προαπαιτούμενα για τη χρήση

του. Το nivolumab από τα 28-8 pharmDx και SP263, το atezolizumab από το SP142 και το durvalumab από το SP263. Αυτά δεν είναι προαπαιτούμενα αλλά μπορεί να υποστηρίξουν στην κλινική απόφαση.

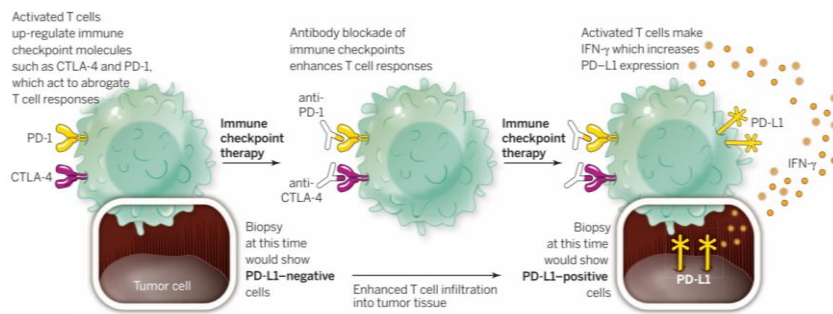


Εικόνα 14: Αντιπροσωπευτικά δείγματα ανοσοιστοχημικής χρώσης PD-L1 σε ΜΜΚΠ. Αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα(A1-A3). Πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα (B1-B3). A1, B1: PD-L1 αρνητική ανοσοχρώση; A2, B2: χαμηλή έκφραση του PD-L1; A3, B3: Αυξημένα θετική μεμβρανική εντόπιση του PD-L1. Μεγέθυνση $\times 20$. Τομές παραφίνης. Πυρήνες βαμμένοι με Αιματοξυλίνη. Πηγή: Qian Chen, Yi-Yun Fu, Qiao-Ni Yue, Qian Wu, Yuan Tang, Wei-Ya Wang, Yong-Sheng Wang, Li-Li Jiang: Distribution of PD-L1 expression and its relationship with clinicopathological variables: an audit from 1071 cases of surgically resected non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2019;12(3):774-786.

Οι μελέτες που καθιέρωσαν τους αναστολείς των PD1/PD-L1 στο ΜΜΚΠ φανέρωσαν και τις αδυναμίες του βιοδείκτη. Αν και η τάση ήταν ότι η θετικότητα για του PD-L1 συνοδεύεται από καλύτερα και πιο μακροχρόνια ογκολογικά αποτελέσματα, πολλές μελέτες, ειδικά στους όγκους από πλακώδη κύτταρα, ανέδειξαν αποτελέσματα ανεξάρτητα του PD-L1, ενώ περιπτώσεις όγκων με έκφραση θετικότητας στο PD-L1<1% ανέδειξαν αποτελέσματα καλύτερα της docetaxel. Φαίνεται λοιπόν ότι ο PD-L1 αποτελεί έναν ασθενή βιοδείκτη, περισσότερο προγνωστικό, παρά προβλεπτικό.

Οι πιθανοί λόγοι για αυτό είναι πολλοί. Καταρχάς η παρουσία πολλαπλών κит εγείρει το ερώτημα για το αν υπάρχει συνέπεια και συγκρισιμότητα των αποτελεσμάτων που προήλθαν από διαφορετικά κит, όπως φαίνεται από το πρόγραμμα Blueprint. Διαφορά μεταξύ παθολογοανατόμων μπορεί να υπάρξει, ειδικά με το κит SP142, το οποίο ανιχνεύει PD-L1, όχι μόνο στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, όπως τα υπόλοιπα, αλλά και στα ανοσοκύτταρα που διηθούν τον όγκο. Άλλο πρόβλημα αποτελεί το γεγονός ότι το 1/3 των ΜΜΚΠ διαγιγνώσκονται, όχι σε ιστολογικό, αλλά σε

κυτταρολογικό δείγμα που προήλθε από FNA με χρήση αξονικού τομογράφου ή βρογχοσκόπησης. Ο μικρός αριθμός κυττάρων στο κυτταρολογικό δείγμα μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα συμπεράσματα περί της PD1 θετικότητας ή μη του όγκου. Η φάση του όγκου στην οποία ελήφθη η βιοψία μπορεί να δείχνει ένα αρνητικό PD-L1, το οποίο μπορεί να θετικοποιηθεί μόλις ενεργοποιηθούν τα T-λεμφοκύτταρα. (Εικόνα 15)



Εικόνα 15: Η βιοψία πριν τη χορήγηση ανοσοθεραπείας μπορεί να είναι αρνητική για PD-L1 λόγω μη επαρκούς ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων. Η πρόοδος της νόσου και η χορήγηση ανοσοθεραπείας μπορεί να θετικοποιήσει τον όγκο λόγω διήθησης αυτού από ενεργοποιημένα T-λεμφοκύτταρα και παραγωγής από αυτά IFN-γ. Πηγή: : Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. Science 2015; 348(6230):56-61

Ένας νέος, πολλά υποσχόμενος βιοδείκτης είναι το tumor mutational burden (TMB). Ορίζεται ως ο ολικός αριθμός σωματικών μη συνώνυμων μεταλλάξεων σε κάθε κωδικοποιήσιμη περιοχή του DNA του όγκου. Η θεωρία είναι ότι όγκοι με περισσότερες μεταλλάξεις είναι πιο πιθανό να εκδηλώσουν νεοαντιγόνα και άρα επάγουν μια πιο έντονη ανοσολογική απάντηση μετά από χορήγηση αναστολέων PD1/PD-L1 και CTLA-4. Ανέδειξε καλά αποτελέσματα στη μελέτη CheckMate 227 όπου ο συνδυασμός nivolumab/ipilimumab ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικός ως 1^{ης} γραμμής θεραπεία σε ασθενείς με ΜΜΚΠ με TMB (>10mut/Mb), ανεξάρτητα από τη θετικότητα για PD1.

Όγκοι που οφείλονται σε χρόνια έκθεση σε καρκινογόνα χαρακτηρίζονται από υψηλό TMB όπως το μελάνωμα, που οφείλεται σε υπεριώδη ακτινοβολία και παρουσιάζει πάνω από 400mut/Mb και ο ΜΜΚΠ που οφείλεται στο κάπνισμα. Για αυτό ΜΜΚΠ σε πρώην ή νυν καπνιστές παρουσιάζουν υψηλότερο TMB (10,5mut/Mb) από ΜΜΚΠ σε μη καπνιστές (0,6mut/Mb). Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται αυτή τη στιγμή είναι οι εξής: Whole exome sequencing (WES) όπου συγκρίνεται ο όγκος με μη καρκινικά κύτταρα του ίδιου ατόμου όσον αφορά το συνολικό γονιδίωμα. Αν και η μέθοδος είναι

αξιόπιστη, είναι εξαιρετικά δαπανηρή, χρονοβόρα και απαιτεί όγκο γονιδιώματος που μπορεί να μην είναι εφικτός από το υλικό μιας βιοψίας. Είναι δύσκολο επομένως να χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη. Έτσι άρχισαν να δοκιμάζονται πιο στοχευμένες μέθοδοι, όπως το gene-targeting sequencing. Σε αυτή την περίπτωση αναζητούνται μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια που αποτελούν τις «στάνταρ» θέσεις μετάλλαξης με βάση προσχηματισμένα panels, αντί να ελεγχθεί όλο το γονιδίωμα. Ήδη κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι η μέθοδος αυτή καταλήγει στα ίδια αποτελέσματα με whole exome sequencing (Chalmers ZR, 2017).

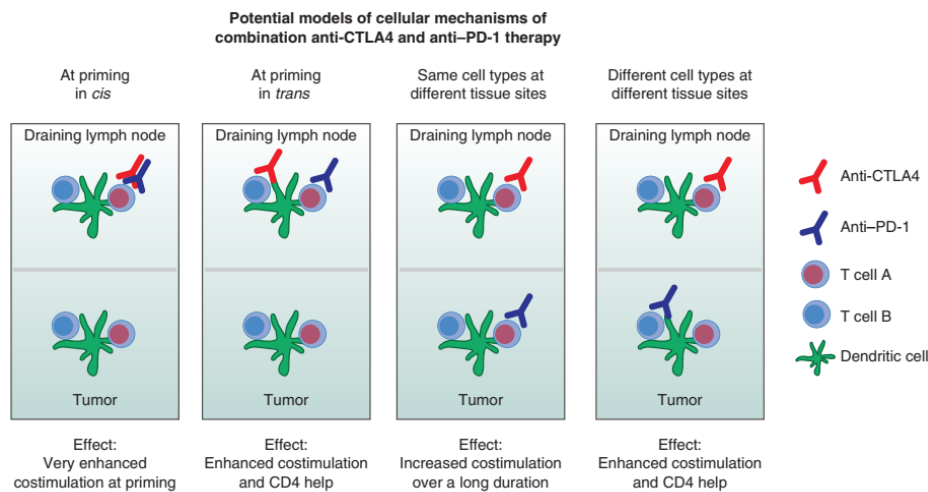
Η έρευνα για αξιόπιστους βιοδείκτες στην ανοσοθεραπεία συνεχίζεται. Δοκιμάζονται επίσης και τα επίπεδα των PD1 και PD-L1 στον ορό του ασθενή ως ένας εύκολος δείκτης που να παρακολουθεί δυναμικά την πορεία του ασθενούς και την ανταπόκρισή του στη θεραπεία χωρίς την ανάγκη νέων βιοψιών. Άλλοι βιοδείκτες υπό μελέτη είναι ο T-effector και η interferon- γ gene signature έχουν συνδεθεί με μεγαλύτερη συνολική επιβίωση. Το πιθανότερο είναι όμως ότι θα χρειαστεί συνδυασμός βιοδεικτών για την καλύτερη επιλογή των ασθενών που θα ωφεληθούν περισσότερο από την ανοσοθεραπεία. (πίνακας 2)

Πίνακας 2: Προγνωστικοί βιοδείκτες για την καλύτερη απάντηση των ασθενών στην ανοσοθεραπεία. Πηγή: Niki Gavrielatou, Stergios Doumas, Panagiota Economopoulou, Periklis G. Foukas, Amanda Psyrri. Biomarkers for immunotherapy response in head and neck cancer. Cancer treatment reviews 2020

Tumour related factors	IFN- γ gene signature	high	low
	PD-L1 expression (CPS)	high	low
	TMB	high	low
Tumour microenvironment	Gene expression signature	inflamed	non-inflamed
	Immune landscape	<ul style="list-style-type: none"> ↑ CD3, CD8, FOXP3 ↑ T-cell clonality ↑ M1 macrophages ↑ TLS 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ MDSCs ↑ M2 macrophages ↑ N2 neutrophils
Host factors	HPV profile	HPV +ve	HPV -ve
	Microbiome	e.g. <i>Akkermansia muciniphila</i> <i>Enterococcus hirae</i>	e.g. <i>Bacteroidales</i>
		Most likely Immunotherapy responders	Most likely Immunotherapy non-responders

3.9. ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΜΕ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

Από τη δημιουργία του πρώτου ανοσοθεραπευτικού φαρμάκου, του ipilimumab, ετέθη η ιδέα του συνδυασμού του με χημειοθεραπεία (ΧΜΘ) ή στοχευμένη θεραπεία. Η ΧΜΘ επάγει την έκφραση του PD-L1 στον όγκο, ένα μηχανισμό που μπορεί να αντιμετωπιστεί με ταυτόχρονη χορήγηση αντι PD1/PD-L1 παράγοντα. Επίσης η καταστροφή καρκινικών κυττάρων με άλλη μέθοδο θα οδηγούσε σε περισσότερα αντιγόνα στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα και έτσι ισχυρότερη ανοσολογική απάντηση. Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι συνδυασμένος αποκλεισμός των μονοπατιών PD1 και CTLA4 με συνδυασμό ανοσοθεραπευτικών μπορεί να επιφέρει καλύτερο αντικαρκινικό αποτέλεσμα. (Εικόνα 16).



Εικόνα 2: Πιθανοί κυτταρικοί μηχανισμοί που μεσολαβούν στην απόρριψη του όγκου σε απάντηση συνδυασμένης αντι-CTLA-4 και αντι-PD-1 ανοσοθεραπείας. Τα μοντέλα περιγράφονται από αριστερά προς τα δεξιά: (1) Τα ίδια T κύτταρα στοχεύονται στη θέση ενεργοποίησής τους, οδηγώντας σε αυξημένη διείσδυση του ανοσοθεραπευτικού φαρμάκου, (2) Διαφορετικοί πληθυσμοί T-κυττάρων στοχεύονται εντός του τόπου ενεργοποίησής τους, οδηγώντας δυνητικά σε συνεργιστικά αποτελέσματα μέσω εξωγενών κυτταρικών διεργασιών, (3) Τα ίδια T κύτταρα στοχεύονται αλλά με διαφορετική χωροχρονική κινητική οδηγώντας ίσως σε παρατεταμένη συνδιεγερτική σηματοδότηση και (4) Διαφορετικοί πληθυσμοί T-κυττάρων στοχεύονται σε διαφορετικούς ιστούς (π.χ. αποκλεισμός PD-1 που ενεργεί κυρίως σε προϋπάρχοντα κύτταρα CD8 που διεισδύουν στον όγκο ενώ το CTLA-4 δρα σε CD4 δραστικά T σε δευτερογενή λεμφοειδή όργανα). Τα υποσύνολα των κυττάρων T υποδηλώνονται ως «Α» και «Β», δεδομένου ότι οι ακριβείς πληθυσμοί που στοχεύονται άμεσα πρέπει να καθοριστούν πλήρως, ιδίως στο πλαίσιο της κινητικής της θεραπείας και σε διαφορετικές περιοχές ιστών. Τα πιθανά αποτελέσματα σημειώνονται κάτω από κάθε σενάριο. Πηγή: Spencer C. Wei, Colm R. Duffy and James P. Allison. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov* Sep;8(9):1069-1086. 2018.

Το nivolumab δοκιμάστηκε σε μία μελέτη φάσης Ιβ σε συνδυασμό με κλασική ΧΜΘ, remetrexed, bevacizumab και docetaxel. Δεν παρουσιάστηκε σοβαρή τοξικότητα από τους συνδυασμούς αλλά το δείγμα ήταν πολύ μικρό για έλεγχο του κλινικού αποτελέσματος. Αυτό επετεύχθη με την checkmate 012 όπου συνδυάστηκε nivolumab με διάφορους συνδυασμούς ΧΜΘ σε προχωρημένο ΜΜΚΠ και επιβεβαιώθηκε ασφαλές προφίλ και αποτελεσματικότητα, ειδικά με το συνδυασμό nivolumab και πακλιταξέλη-καρβοπλατίνη, όπου η διετής επιβίωση ήταν 62%. Ακολούθησε η φάσης ΙΙΙ checkmate-227 που σύγκρινε το συνδυασμό nivolumab-ΧΜΘ και nivolumab-ipilimumab έναντι ΧΜΘ. Τα πρώιμα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά, ακόμη και στους ασθενείς με PD-L1<1%. Ανέδειξε επίσης και η σημασία του νέου βιοδείκτη TMB (Rizvi NA H. M., 2016).

Το pembrolizumab σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία στην keynote-021 φάσης ΙΙ μελέτη, τυχαιοποίησε τους ασθενείς με ΜΜΚΠ μη πλακώδους τύπου, σε ομάδα που θα λάβει μόνο ΧΜΘ (carboplatin-remetrexed) και σε ομάδα που θα λάβει ΧΜΘ + pembrolizumab. Η θετικότητα ή μη για την PD-L1 δεν ελήφθη υπόψιν. Η ανταπόκριση ήταν θετική για την ομάδα του pembrolizumab (55% έναντι 29% μόνο με ΧΜΘ), ακόμα και στους ασθενείς, αρνητικούς για PD-L1, με παρόμοια ανοχή στην αγωγή. Τα ελπιδοφόρα αποτελέσματα έδωσαν το έναυσμα για δύο φάσης ΙΙΙ μελέτες. Η keynote-189 εφαρμόστηκε σε ασθενείς με μη πλακώδους τύπου ΜΜΚΠ και απουσία μεταλλάξεων των EGFR και ALK. Ανέδειξε αυξημένη συνολική επιβίωση στην ομάδα του pembrolizumab +ΧΜΘ έναντι της ομάδας που έλαβε μόνο ΧΜΘ, ανεξαρτήτως του επιπέδου έκφρασης του PD-L1. Η keynote-407 είναι μια αντίστοιχη μελέτη για το πλακώδες ΜΜΚΠ, με θετικά αποτελέσματα για την ομάδα του pembrolizumab + ΧΜΘ, ανεξαρτήτως της έκφρασης του PD-L1. Ο συνδυασμός των δύο αυτών μελετών παγιώνει τη θέση του συνδυασμού ΧΜΘ + pembrolizumab σαν 1^{ης} γραμμής θεραπεία για το μεταστατικό ΜΜΚΠ, που έλαβε έγκριση σε συνδυασμό με ΧΜΘ, ανεξαρτήτως της θετικότητας στον PD-L1 (Planchard D & Committee, 2018).

Το atezolizumab δοκιμάστηκε στη μελέτη Impower 131 φάσης ΙΙΙ ως 1^{ης} γραμμής θεραπεία για προχωρημένο πλακώδες ΜΜΚΠ σε συνδυασμό με ΧΜΘ έναντι μονοθεραπείας ΧΜΘ. Τα πρώιμα αποτελέσματα ανέδειξαν αύξηση κατά 29% του PFS (progression free survival) χωρίς αξιόλογη αύξηση της τοξικότητας έναντι της στάνταρ ΧΜΘ. Αντίστοιχα αποτελέσματα, με αύξηση του PFS κατά 40% έδειξε και η Impower 132, φάσης ΙΙΙ μελέτη, ίδιου σχεδιασμού με την Impower 131, αλλά αφορά ΜΜΚΠ μη

πλακώδους τύπου. Πιο μακροχρόνια αποτελέσματα ανέδειξε η Impower 130, όπου ο συνδυασμός atezolizumab με ΧΜΘ που απέδωσε μέση επιβίωση 18,6 μήνες έναντι 13,9 μηνών της ΧΜΘ. Ακολούθησε η Impower 150, που έλεγξε τη δραστικότητα και ασφάλεια του συνδυασμού atezolizumab, ΧΜΘ και bevacizumab ως θεραπεία 1^{ης} γραμμής για μεταστατικό μη πλακώδες, ΜΜΚΠ. Χάρη στα θετικά της αποτελέσματα το 2018 καθιερώθηκε ως θεραπεία 1^{ης} γραμμής σε συνδυασμό με ΧΜΘ και Bevacizumab στο μεταστατικό, μη πλακώδη ΜΜΚΠ, χωρίς μεταλλάξεις των EGFR και ALK (Socinski MA & Group, 2018).

Το durvalumab δε μπόρεσε να συνδυαστεί επιτυχώς με άλλες θεραπείες. Στη μελέτη MYSTIC, ο συνδυασμός durvalumab με trememlimumab δεν απέδωσε κάποιο όφελος έναντι της ΧΜΘ και ο συνδυασμός του με στοχευμένη θεραπεία (osimertinib για EGFR-θετικούς ΜΜΚΠ) απέβη πολύ τοξικός και η μελέτη TATTON ανεστάλη.

Η ανοσοθεραπεία αποτελεί ένα νέο όπλο στη φαρέτρα του ογκολόγου που λειτουργεί με τελείως διαφορετικό τρόπο από ότι χρησιμοποιούνταν μέχρι τώρα στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Είναι αναμενόμενο επομένως ότι θα δοκιμαστούν όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί της ανοσοθεραπείας με τις ήδη υπάρχουσες τεχνικές. Ένα μεγάλο καλό είναι ότι ο συνδυασμός της ανοσοθεραπείας με χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία, ακόμα και όταν δεν έδειξε θετικά αποτελέσματα, δεν ανέδειξε απαγορευτική τοξικότητα. Αυτό δεν ισχύει όταν συνδυαστεί με στοχευμένη θεραπεία, όπου τα σχήματα που δοκιμάστηκαν αποδείχτηκαν ιδιαίτερα τοξικά. Δίλημμα στη χορήγηση ανοσοθεραπείας πρόκειται να αποτελέσουν οι ΜΜΚΠ με μεταλλάξεις στο EGFR ή στο ALK.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ PDL1/PD1

ΣΤΗΝ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ

4. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ

Η αυτοφαγία είναι μια φυσιολογική διαδικασία, κοινή σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Μέσω του μηχανισμού αυτού, το κύτταρο χρησιμοποιεί τα λυσοσώματα για τη διάσπαση και ανακύκλωση πρωτεϊνών και οργανιδίων. Με τον τρόπο αυτό διατηρείται η λειτουργικότητα των οργανιδίων, αποτρέπεται η συσσώρευση τοξικών ουσιών από τα κυτταρικά απόβλητα και παρέχονται υποστρώματα ώστε να διατηρηθεί η σωστή λειτουργία του μεταβολισμού σε περιπτώσεις αστίας. Πολλαπλά ερεθίσματα μπορούν να πυροδοτήσουν την αυτοφαγία περιλαμβανομένων: την έλλειψη θρεπτικών ουσιών, την προσαρμογή στο περιβάλλον, το γήρας, την ανάπτυξη, τις διάφορες παθήσεις και την παρουσίαση αντιγόνων.

Εκτός από την ανακύκλωση των κυτταρικών συστατικών, η αυτοφαγία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη γενετική σταθερότητα του κυττάρου και στην καρκινογένεση. Στην διαδικασία της καρκινογένεσης, πρόσφατες μελέτες αναδεικνύουν ότι η αυτοφαγία διαδραματίζει έναν διττό ρόλο στον καθορισμό του πεπρωμένου των κυττάρων, αφού κάτω από διαφορετικές συνθήκες μπορεί είτε να λειτουργήσει ως μηχανισμός επιβίωσης του καρκινικού κυττάρου, είτε να επάγει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

Υπάρχουν τρία είδη αυτοφαγίας. Η μακροαυτοφαγία, η μικροαυτοφαγία και η υποβοηθούμενη αυτοφαγία (chaperone-mediated autophagy – CMA). Η μικροαυτοφαγία είναι η απευθείας ενσωμάτωση από τα λυσοσώματα και η υποβοηθούμενη αυτοφαγία είναι η απευθείας αναγνώριση συγκεκριμένων πρωτεϊνών που παραδίδονται στα λυσοσώματα. Μακράν καλύτερα μελετημένη και κλινικά σημαντική είναι η μακροαυτοφαγία. Έτσι, από τούδε και εφεξής, ο όρος αυτοφαγία θα εννοεί τη μακροαυτοφαγία εκτός αν εξηγείται διαφορετικά. (Εικόνα 17).

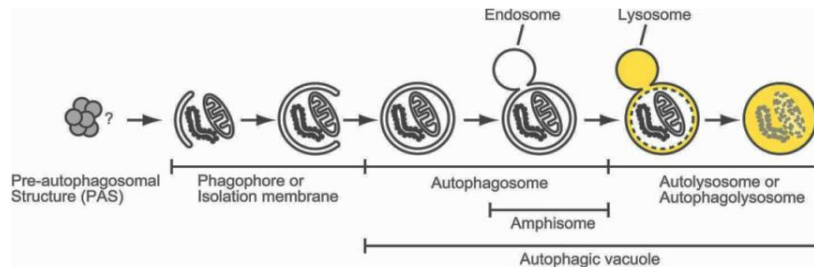


Εικόνα 3: Επαγωγείς και τύποι αυτοφαγίας Πηγή: Ελένη Α. Φράγκου, Άνθος Χριστοφίδης, Αμαλία Ραπτοπούλου, Δημήτριος Τ. Μπούμπας, <http://www.ere.gr/>.

4.1. Ο ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑΣ

Η μακροαυτοφαγία ξεκινά με τη de novo δημιουργία μιας διπλής μεμβράνης, που ονομάζεται φαγοφόρο (phagofore) ή μεμβράνη απομόνωσης (isolation membrane). Η μεμβράνη αυτή αναπτύσσεται και εγκλωβίζει κυτταρόπλασμα ή/και οργανίδια που προορίζονται για αποδόμηση και κατά την ολοκλήρωσή της δημιουργεί ένα κυστίδιο, το αυτοφαγόσωμα. φάση αυτή γίνεται μόνο εγκλεισμός και όχι λύση. Στη συνέχεια, αυτό συντήκεται με το λυσόσωμα δημιουργώντας το αυτολυσόσωμα. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο το αυτολυσόσωμα δε διαφέρει από το αυτοφαγόσωμα μορφολογικά. Έτσι η λειτουργία αυτή, άρα και ο βαθμός αυτοφαγίας στο κύτταρο, είναι δύσκολο να μετρηθεί, αν και έχουν προταθεί κάποιες μέθοδοι. Αποτέλεσμα της σύντηξης της εξωτερικής μεμβράνης του αυτοφαγοσώματος με τη μεμβράνη του λυσοσώματος είναι να απελευθερωθεί στο εσωτερικό του λυσοσώματος ένα κυστίδιο απλής μεμβράνης που ονομάζεται αυτοφαγικό σώμα (autophagic body). Το αυτοφαγικό σώμα λύεται και το περιεχόμενό του αποδομείται από τα υδρολυτικά ένζυμα του λυσοσώματος και τα προκύπτοντα μακρομόρια επιστρέφουν στο κυτταρόπλασμα για να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες λειτουργίες του κυττάρου, όπως η σύνθεση πρωτεϊνών ή η παραγωγή ενέργειας, δηλαδή ανακυκλώνοντα. Η φάση αυτή είναι η λιγότερο μελετημένη, όσον

αφορά στον τρόπο που γίνεται αυτό, όσο και στη συμμετοχή της αυτοφαγίας στην ανακύκλωση σακχάρων και λιπιδίων, πέραν των πεπτιδίων. (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Η διαδικασία της αυτοφαγίας σε κύτταρα θηλαστικών. Ένα τμήμα του κυτταροπλάσματος, συμπεριλαμβανομένων των οργανιδίων περιβάλλεται από ένα φαγοφώρο και δημιουργείται ένα αυτοφαγόσωμα. Κατόπιν η εξωτερική μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος συντήκεται με το ενδόσωμα. Αυτό με τη σειρά του ενώνεται με ένα λυσόσωμα. Ακολουθεί αυτοπεψία του περιεχομένου του αυτοφαγοσώματος. Πηγή: Noboru Mizushima. Autophagy: process and function. *Genes & Dev.* 21: 2861-2873. 2007.

Η αυτοφαγία πυροδοτείται από μια πλειάδα ερεθισμάτων. Το πλέον μελετημένο ερευνητικά ερέθισμα είναι η στέρηση από το κύτταρο θρεπτικών ουσιών. Και εδώ η σχέση ερεθίσματος-αντίδρασης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Ελλείψεις σε διαφορετικά αμινοξέα πυροδοτούν διαφορετική αντίδραση σε διαφορετικά κύτταρα. Η διαδικασία της αυτοφαγίας ελέγχεται από τις Atg πρωτεΐνες (autophagy-related proteins) που πρωτοανακαλύφθηκαν στη μαγιά. Πρόσφατα έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 30 Atg πρωτεΐνες. Η πρωτεΐνη beclin-1 είναι το ορθόλογο αυτών στα θηλαστικά (Pattingre, 2005). Στον πολυκύτταρο οργανισμό η αυτοφαγία ελέγχεται από ορμόνες όπως η ινσουλίνη και το γλυκαγόνο, ο σύμπλοκο της Atg1, το σύμπλοκο Vps34 τάξεως III PI3K και κυρίως μέσω του μονοπατιού του mTOR (Scott, 2004).

Η πρωτεΐνη mTOR είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης, και είναι ο πρώτος και ο πλέον μελετημένος μηχανισμός ρύθμισης της αυτοφαγίας. Η δραστηριότητα της mTOR αναστέλλει την αυτοφαγία σε βασικές ή πλούσιες σε θρεπτικά συστατικά συνθήκες, ενώ η αναστολή της mTOR πυροδοτεί την αυτοφαγία. Η πρωτεΐνη mTOR λειτουργεί με δύο τρόπους.

Πρώτος τρόπος: προκαλεί άμεσα ή έμμεσα υπερφοσφωρυλίωση της πρωτεΐνης Atg13. Η Atg13 αλληλεπιδρά με μικρή συγγένεια με την Atg1. Η μικρή αυτή αλληλεπίδραση οδηγεί στην αναστολή της αυτοφαγίας. Η αναστολή της πρωτεΐνης TOR

μέσω στέρησης θρεπτικών ουσιών ή χρήσης του αναστολέα της ραπαμυσίνης οδηγεί σε μερική αποφωσφορυλίωση της Atg13 και επιτρέπει την επαγωγή της αυτοφαγίας.

Δεύτερος τρόπος: Η mTOR δρα σε έναν καταρράκτη μεταγωγής σήματος, ο οποίος ελέγχει τη φωσφορυλίωση πολλών ενεργοποιητών όπως είναι οι Tap42, Sit4, Ure2 και Gln3. Οι ενεργοποιητές αυτοί ρυθμίζουν τη μεταγραφή και μετάφραση ορισμένων πρωτεϊνών που απαιτούνται για την αυτοφαγία.

Την τελευταία δεκαετία, το ενδιαφέρον για την αυτοφαγία κορυφώθηκε λόγω της επίδρασής της, θετικής και αρνητικής, στην καρκινογένεση και στην ανθεκτικότητα των όγκων στις υπάρχουσες θεραπείες (Lorin S, 2013). Χάρισε δε το βραβείο Νόμπελ Ιατρικής στο Yoshinori Ohsumi για τις ανακαλύψεις του στο μηχανισμό της αυτοφαγίας. Μνεία πρέπει να γίνει και για την απόπτωση. Πρόκειται για μια αλληλουχία γεγονότων που περιγράφηκε το 1972 και περιλαμβάνει την κατάτμηση του πυρήνα, την αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης, τη συρρίκνωση του κυττάρου και τη δημιουργία του αποπτωτικού σωματίου που σηματοδοτεί το θάνατο και τη λύση του κυττάρου. Ως μηχανισμός, είναι αλληλένδετη με την αυτοφαγία. Υπόκειται σε πλειάδα ενδο- και έξωκυττάρων σημάτων, πολλά από τα οποία είναι κοινά με την αυτοφαγία, και συμμετέχει στις ίδιες διαδικασίες προσαρμογής, γήρανσης, ελέγχου ποιότητας και ομοιόστασης με την αυτοφαγία, όχι σε επίπεδο οργανιδίου, αλλά κυττάρου. Έτσι σε πολλά σημεία μελέτης της αυτοφαγίας, ανευρίσκεται άμεσα αλληλοεξαρτόμενη με την απόπτωση.

4.2. Η ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ ΣΤΟΝ ΜΗ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Η αυτοφαγία αποτελεί ένα φυσιολογικό μηχανισμό που μπορεί να βοηθήσει το κύτταρο να επιβιώσει σε αντίξοες συνθήκες, αλλά και να επισπεύσει τον κυτταρικό θάνατο. Στο ΜΜΚΠ φαίνεται να επιδρά, τόσο θετικά, όσο και αρνητικά, σε όλα τα στάδια, από την ογκογένεση, μέχρι και την ανάπτυξη του όγκου. Καταρχάς, οι μεταλλάξεις που εμφανίζονται στο ΜΜΚΠ επηρεάζουν και τη διαδικασία της αυτοφαγίας. Το TP53 είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που ανευρίσκεται μεταλλαγμένο στο 45-70% των αδenoκαρκινωμάτων και στο 60-80% των πλακωδών. Παράγει την P53 πρωτεΐνη η οποία όταν βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα αναστέλλει την αυτοφαγία, ενώ σε καταστάσεις stress, μεταναστεύει στον πυρήνα όπου προάγει την αυτοφαγία. Μεταλλάξεις του TP53

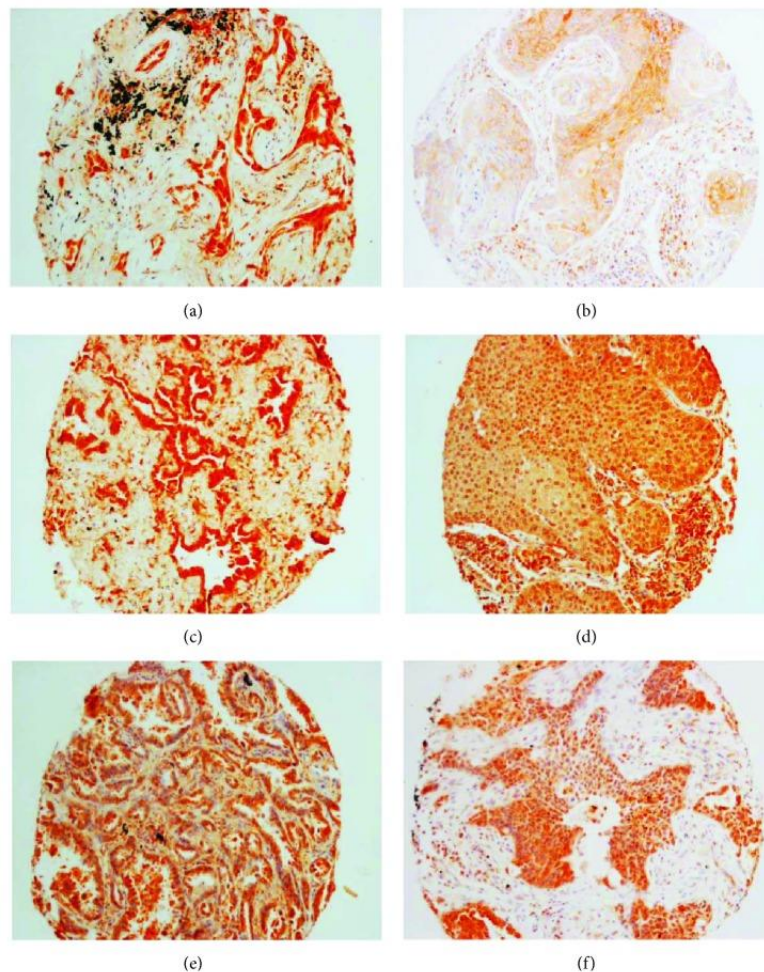
γονιδίου μπορεί να επάγουν την αυτοφαγία και να αναστείλουν την απόπτωση, ενισχύοντας την πρόοδο της νόσου και την αντοχή στη θεραπεία (Jackson, et al., 2005).

Πολλές σημαντικές κλινικά μεταλλάξεις του EGFR, του ULK1 ή του KRAS, χρησιμοποιούν για τη δράση τους το μονοπάτι του mTOR. Όπως προαναφέρθηκε η δράση του mTOR είναι σημαντική στον μηχανισμό της αυτοφαγίας. Πρέπει όμως να αναφερθεί ότι υψηλή και παρατεταμένη αυτοφαγία προάγει τελικά την απόπτωση και τον κυτταρικό θάνατο. Οι μεταλλάξεις του Ras οδηγούν σε αύξηση της αυτοφαγίας και ανθεκτικότητα του καρκινικού κυττάρου. Η καταστολή της αυτοφαγίας σε ποντίκια με ΜΜΚΠ με μετάλλαξη του Ras οδήγησε σε μείωση της προόδου του όγκου. Πιθανός μηχανισμός φαίνεται να είναι η συσσώρευση δυσλειτουργικών μιτοχονδρίων (Guo J. Y, 2013). Επίσης η αύξηση της αυτοφαγίας φαίνεται να είναι απάντηση και μηχανισμός αντοχής στη χορήγηση αναστολέων τυροσινικής κινάσης του EGFR (Zou Y, 2013). Αν και όλα συνηγορούν πως χειρισμός της αυτοφαγίας μπορεί να έχει αντικαρκινική δράση, η αυτοφαγία μπορεί να αξιολογηθεί μόνο εντός κατάλληλου πλαισίου. Η δημιουργία του κατάλληλου πλαισίου με τη συγχορήγηση ενός άλλου παράγοντα, μπορεί να αναδείξει την πραγματική αντικαρκινική δράση του χειρισμού της αυτοφαγίας.

4.3. Η ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ ΩΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ ΣΤΟ ΜΗ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

Η αυτοφαγία αποτελεί ένα μηχανισμό επιβίωσης του καρκινικού κυττάρου σε αντίξοο περιβάλλον. Δεν είναι γνωστό όμως αν πρόκειται για αξιόπιστο προγνωστικό δείκτη για τη μελλοντική πορεία ενός ασθενούς με ΜΜΚΠ. Το πρώτο πρόβλημα είναι η μέτρηση της αυτοφαγίας στο καρκινικό κύτταρο. Η εξέταση εκλογής μέχρι τώρα είναι το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, όπου μετράται ο αριθμός των αυτοφαγοσωμάτων (Menzies FM, 2012). Η εξέταση αυτή όμως στερείται ειδικότητας. Μορφολογικά είναι αδύνατη η διάκριση των αυτοφαγοσωμάτων από τα αυτολυσοσώματα. Μία αύξησή τους επομένως μπορεί να σημαίνει αύξηση της αυτοφαγίας ή άθροιση των αυτοφαγοσωμάτων λόγω μείωσης της σύνδεσης με λυσοσώματα, άρα μείωση της αυτοφαγίας. Επίσης είναι δύσκολη η διάκριση αυτοαντισωμάτων από άλλες δομές. Η ταυτοποίηση πρωτεϊνών που συνδέονται με την αυτοφαγία (Atg) αποτελεί ιδανική λύση.

Η δημιουργία αντισωμάτων έναντι πρωτεϊνών του μηχανισμού της αυτοφαγίας καθιστά δυνατή την ποσοτική μέτρηση με απλή μικροσκόπηση μέσω ανοσοϊστοχημείας ή μέσω στυπώματος κατά Western (Western blott). Μία τέτοια πρωτεΐνη είναι η LC3A (microtubule associated protein 1 chain 3 alpha). Η LC3A-I αποτελεί βασικό συστατικό της ωρίμανσης του αυτοφαγοσώματος και μπορεί να αποτελέσει δείκτη αυτοφαγίας σε πολλά στάδια της διαδικασίας ανάλογα με τη διασπορά και τη θέση που ανιχνεύεται στο κύτταρο (He H, 2003). (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Αντιπροσωπευτικές εικόνες από την ανοσοϊστοχημική έκφραση της autophagy-associated proteins σε πρωτοπαθείς όγκους ΜΜΚΠ. (a) Έκφραση της πρωτεΐνης LC3A στο αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα. (b) Έκφραση της πρωτεΐνης LC3A στο πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα. (c) Έκφραση της πρωτεΐνης LC3B στο αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα. (d) Έκφραση της πρωτεΐνης LC3B στο πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα. (e) Έκφραση της πρωτεΐνης Beclin-1 στο αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα. (f) Έκφραση της πρωτεΐνης Beclin-1 στο πλακώδες καρκίνωμα πνεύμονα. Πηγή: Yuan Chen, Kai Leonie Schnitzler, Yunxia Ma, Miljana Nenkov, Bernhard Theis, and Iver Petersen. The Clinical Influence of Autophagy-Associated Proteins on Human Lung Cancer. Dis Markers. 2018; 9 : 8314963.

Στον μηχανισμό της αυτοφαγίας, σημαντικό ρόλο παίζουν η δημιουργία δομών δίκην πέτρας (stone-like structures – SLSs). Οι SLSs είναι στρογγυλές άμορφες δομές, εντός κυτταροπλασματικών κενοδοπιών και θετικές στο αντίσωμα LC3A. Η ύπαρξή τους αναδεικνύει πλούσια και παθολογική αυτοφαγία και είναι συχνά σε καρκινικά κύτταρα. Η αξιοπιστία του σαν θετικός ή αρνητικός δείκτης επιθετικότητας του όγκου, ποικίλει και εξαρτάται από το είδος του όγκου. Ειδικά στο ΜΜΚΠ, φαίνεται ότι αποτελεί ένα αξιόπιστο προγνωστικό δείκτη αυξημένης επιθετικότητας και κακής πρόγνωσης. Σύμφωνα με μια μελέτη του Καρπαθίου και συνεργατών, σε δείγμα 113 εκτομηθέντων ΜΜΚΠ, κατέληξε στα εξής συμπεράσματα: 1^{ov}: Η παρουσία SLSs από μόνη της έχει προγνωστική σημασία. 2^{ov}: έχουν συχνότερη έκφραση στα πλακώδη σε σχέση με τα αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα. 3^{ov}: Σε χειρουργηθέντες όγκους σταδίου I και II, η παρουσία 5 ή περισσότερων SLSs συνδέεται με χειρότερη πρόγνωση (15 μήνες έναντι 88) (Karpathiou G, 2011). Τα αποτελέσματα αυτά δεν επιβεβαιώνονται από μία άλλη μελέτη σε δείγμα 466 ΜΜΚΠ σταδίου I και II. Στην μελέτη αυτή, η παρουσία SLSs ήταν σπάνια και δεν επηρέαζε την επιβίωση. Αντίθετα, η διάχυτη έκφραση της LC3 (δηλαδή δείκτης πριν την έναρξη της αυτοφαγίας) έδειξε να αποτελεί ευνοϊκό προγνωστικό δείκτη. Όμως επιβεβαιώνεται το γεγονός ότι η μείωση της αυτοφαγίας συντελεί σε αύξηση της επιβίωσης (Schläfli AM, 2016). Τέλος μια πρόσφατη μελέτη του Überall και συνεργατών του, σε 116 δείγματα με ΜΜΚΠ σταδίου I έως II ανέδειξε την παρουσία SLSs σε ποσοστό 48%, και συσχετίζεται με κακή πρόγνωση και γι τα τρία στάδια του ΜΜΚΠ που μελετήθηκαν (Überall I, 2019).

Η έκφραση της πρωτεΐνης beclin-1 ενοχοποιήθηκε σαν ένας μηχανισμός αντοχής του ΜΜΚΠ στη χημειοθεραπεία με πλατίνα. Προτάθηκε μάλιστα ότι η καταστολή της και η καταστολή της αυτοφαγίας μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της ευαισθησίας στη χημειοθεραπεία (Chen L, 2019). Αξίζει να σημειωθεί ότι η beclin-1 έχει θετικούς και αρνητικούς ρυθμιστές οι οποίοι με την σειρά τους επηρεάζουν θετικά ή αρνητικά τον μηχανισμό της αυτοφαγίας. Ως εκ τούτου είναι δύσκολο να συμπεράνει κανείς εάν και κατά πόσο μπορεί να αποτελέσει προβλεπτικό δείκτη για την κακοήθεια. Χρειάζονται περισσότερες μελέτες για την πλήρη διασαφήνιση του ρόλου της. Στον ΜΜΚΠ, τα δεδομένα συγκλίνουν στο ότι αυτοφαγία των καρκινικών κυττάρων αποτελεί προστατευτικό μηχανισμό και συνδέεται με μεγαλύτερη επιθετικότητα και χειρότερη

πρόγνωση. Επομένως ο αποκλεισμός της μπορεί να αποτελεί άλλο ένα όπλο κατά του ΜΜΚΠ.

4.4. ΦΑΡΜΑΚΑ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ ΣΤΟ ΜΜΚΠ

Οι πρώτες ανακαλύψεις για το ρόλο της αυτοφαγίας στο ΜΜΚΠ έθεσε το ερώτημα εάν ο φαρμακευτικός χειρισμός του μηχανισμού θα ασκούσε αντικαρκινική δράση. Τόσο η αναστολή, όσο και η επαγωγή της αυτοφαγίας μπορούν να έχουν, υπό συνθήκες, ευεργετική δράση σε προχωρημένους καρκίνους. Όμως, η συντριπτική πλειοψηφία των φαρμάκων δρα αναστέλλοντας την αυτοφαγία. Σύμφωνα με τις υπάρχουσες ενδείξεις, τα φάρμακα αυτά κατά κανόνα δεν ασκούν από μόνα τους αντικαρκινική δράση αλλά επικουρούν στο έργο της ΧΘΠ ή της στοχευμένης θεραπείας.

Χλωροκίνη και υδροξυχλωροκίνη: Πρόκειται για ανθελονοσιακά φάρμακα που αναστέλλουν την ένωση του λυσοσώματος με το αυτοφαγόσωμα, καταστέλλοντας έτσι την αυτοφαγία (Yang YP, 2013). Επί του παρόντος είναι τα μόνα κλινικά διαθέσιμα αντικαρκινικά φάρμακα με δράση στην αυτοφαγία. Επιπλέον η χλωροκίνη αυξάνει τη δράση άλλων χημειοθεραπευτικών παραγόντων και ασκεί αντικαρκινική δράση ανεξάρτητη του μηχανισμού της αυτοφαγίας (Maes H, 2014). Έχει δοκιμαστεί συνδυαστικά με την πακλιταξέλη, όπου μειώνει την επίκτητη αντοχή του ΜΜΚΠ σε αυτή, χωρίς να αυξάνει σημαντικά την τοξικότητα, και με την ερλοτινίμη με παρόμοια αποτελέσματα, καθώς και με το σχήμα γεφτινίμης και πλατίνας (Wen-Xing Ding, 2009).

Αντίθετα η υδροξυχλωροκίνη, παρά την αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητά της, παρουσιάζει το φαρμακοκινητικό φαινόμενο της μη δοσοεξαρτόμενης καταστολής της αυτοφαγίας και της διαφορετικής μέγιστης δοσολογίας μέχρι τοξικότητας ανάλογα με το ποιο φάρμακο συγχορηγείται. Οι συνηθέστερες ανεπιθύμητες δράσεις είναι γαστρεντερικές διαταραχές, κόπωση και καταστολή του μυελού. Έχει δοκιμαστεί στον προχωρημένο ΜΜΚΠ μόνη της, ή σε συνδυασμό με EGFR παράγοντες (Deretic, 2011). Η μέγιστη δόση που έχει δοθεί ποτέ είναι 600mg δις ημερησίως.

Κουρκουμίνη: Μνεία πρέπει να γίνει και στην αντικαρκινική δράση της κουρκουμίνης, μιας φυσικής πολυφαινόλης, συστατικού του γνωστού μπαχαρικού κουρκουμά. Η αντικαρκινική δράση της κουρκουμίνης έχει αναδειχθεί σε πολλές μελέτες (Li Y, 2018). Ο μηχανισμός δράσης της είναι περίπλοκος και φαίνεται να επηρεάζει το

μηχανισμό της απόπτωσης και της δέσμευσης των ελεύθερων ριζών στο καρκινικό κύτταρο. Η δράση της έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του πολλαπλασιασμού και της μεταστατικής δυναμικής του όγκου, καθώς και την αύξηση της ευαισθησίας του σε συγχρησιμοποιούμενη χημειοθεραπεία (Wei Zhang, 2018). Πειράματα με το MOMI-1, ένα τεχνητό παράγωγο της κουρκουμίνης ανέδειξε αντικαρκινική δράση στο ΜΜΚΠ με δόσοεξαρτώμενο χειρισμό της αυτοφαγίας και όχι της απόπτωσης. Σε αντίθεση με τις χλωροκίνη και υδροξυχλωροκίνη, επέφερε τον κυτταρικό θάνατο με αύξηση και όχι μείωση της αυτοφαγίας. Παρά τα ελπιδοφόρα αποτελέσματα, για την εξαγωγή συμπερασμάτων χρειάζεται να ολοκληρωθούν οι τρέχουσες μελέτες που βρίσκονται σε φάση I ή II. Επιπλέον πρέπει να ερευνηθεί η φαρμακοκινητική των φαρμάκων αυτών και η απορρόφησή τους από τον όγκο.

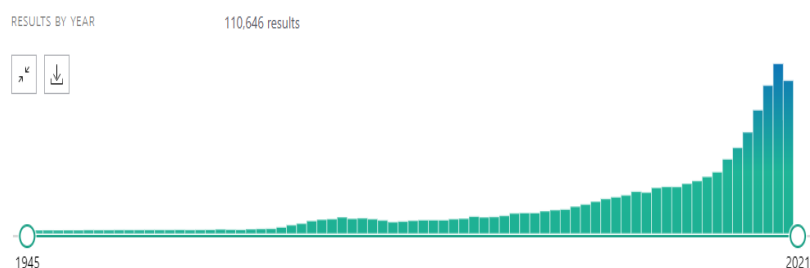
Ένα σύνολο πειραματικών δεδομένων δείχνουν ότι τα κύτταρα του όγκου εκμεταλλεύονται την αυτοφαγία με σκοπό την αντίσταση στην απόπτωση που προκαλείται από την ΧΘΠ. Επί πλέον, υποδεικνύουν ότι η φαρμακολογική αναστολή της αυτοφαγίας ευαισθητοποιεί τα καρκινικά κύτταρα όσον αφορά στην τοξικότητα του θεραπευτικού σχήματος. Προς το παρόν λείπουν αξιόπιστοι βιοδείκτες αποτελεσματικότητας των αναστολέων της αυτοφαγίας, αν και η αναστολή της δεν είναι απαραίτητα ωφέλιμη για την καταστολή της ογκογένεσης. Φαίνεται ότι ανάλογα με την έκταση της βλάβης του κυττάρου, η αυτοφαγία μπορεί να διαδραματίζει έναν κυτταροπροστατευτικό ή κυτταροτοξικό ρόλο όσον αφορά στον καθορισμό του κυτταρικού πεπρωμένου. Τέλος για την κλινική εφαρμογή φαρμακευτικών αναστολέων της αυτοφαγίας χρειάζεται διασαφήνιση και χειρισμός του μηχανισμού της μέσα από την πρόοδο μελετών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΤΟ

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΕΠΙΛΟΓΟΣ

5. ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Η ανοσοθεραπεία έφερε επανάσταση στην αντιμετώπιση του καρκίνου. Καταρχάς γιατί έφερε άμεσα και χειροπιαστά αποτελέσματα στην επιβίωση ασθενών με μεταστατικό ΜΜΚΠ, μια νόσο με παραδοσιακά κακή πρόγνωση. Αλλά τα ελπιδοφόρα αποτελέσματα των μελετών αυτών αποτελούν μόνο την κορυφή του παγόβουνου. Πρόκειται για ένα μεγάλο βήμα στην κατανόηση της βιολογίας του καρκίνου και των μηχανισμών επιβίωσης και διασποράς των καρκινικών κυττάρων, σε βαθμό μάλιστα που να μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη. Ένα «όνειρο» της ογκολογίας υπήρξε από δεκαετίες η χρήση του ανοσοποιητικού στη θεραπεία του καρκίνου. Το όνειρο αυτό επιτέλους γίνεται πραγματικότητα και οι εξελίξεις που έχουμε να περιμένουμε τα επόμενα έτη θα είναι καταγιστικές. (εικόνα 20)



Εικόνα 20: Εργασίες στο pubmed ανά έτος ως απάντηση στην αναζήτηση “immunotherapy cancer”. Χαρακτηριστικά αναδεικνύεται μία αύξηση από 2.899 μελέτες το 2009 σε 11.126 το 2019. Πηγή: www.pubmed.gov

Καταρχάς η μελέτη των ήδη χρησιμοποιούμενων PD1 και PD-L1 ανοσοθεραπευτικών φαρμάκων στην κλινική πράξη αποτελεί ένα πεδίο με σχεδόν ανεξάντλητο δυναμικό. Η δοκιμή των ανοσοθεραπευτικών φαρμάκων σε όλα τα ήδη καρκίνων, σε όλα τους τα στάδια, μόνα ή σε συνδυασμό μεταξύ τους ή με άλλες θεραπείες (χειρουργική, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία και στοχευμένες θεραπείες) θα απασχολούν τους ερευνητές για πολλά χρόνια ακόμη. Αυτό θα ενισχυθεί ακόμη περισσότερο με την έλευση περισσότερων PD1 και PD-L1 φαρμάκων που είναι εν εξελίξει αυτή τη στιγμή.

Το γεγονός ότι η ανοσοθεραπεία μπορεί πια να εφαρμοστεί σε οποιοδήποτε όγκο, ανεξαρτήτως ιστολογίας του, εγείρει την ανάγκη για αξιόπιστους βιοδείκτες που θα κατευθύνουν την ανοσοθεραπεία προς τους πληθυσμούς που θα ωφεληθούν

περισσότερο. Η θετικότητα του όγκου για PD-L1 είναι ένα δείκτης που χρησιμοποιείται σήμερα, αλλά πάσχει από θέμα αξιοπιστίας και σταθερότητάς του σε διάφορες φάσεις του όγκου. Νέοι βιοδείκτες, όπως τα tumor infiltrating lymphocytes, tumor mutational burden immune gene signatures και multiplex immunohistochemistry προβλέπεται να κατευθύνουν την ανοσοθεραπεία, βελτιστοποιώντας τα οφέλη της (Gibney, Weiner, & Atkins, 2016).

Η κατανόηση της διαδικασίας της αυτοφαγίας ως αμυντικός μηχανισμός του καρκινικού κυττάρου έχει επίσης δώσει καρπούς, με διάφορα φάρμακα υπό μελέτη, έτοιμα να χρησιμοποιηθούν προς όφελος του ογκολογικού ασθενούς. Ακόμα και φυσικές ουσίες, όπως η κουρκουμίνη, που πάντα «υποπτευόμασταν» ότι βοηθούν κατά του καρκίνου, τώρα μπορούν να ποσοτικοποιηθούν και να χρησιμοποιηθούν, αφού, χάρη στη γνώση της αυτοφαγίας, ο τρόπος δράσης τους έχει αποκαλυφθεί.

Αλλά, πέρα από τα άμεσα και χειροπιαστά αποτελέσματα της χρήσης του μονοπατιού PD1/PD-L1 και της αυτοφαγίας, το τελικό αποτέλεσμα είναι ένα: ο καρκίνος ως νόσος δεν είναι «άγνωστος» και δεν είναι «επάρατος». Και ήδη η αντικαρκινική δράση του ανοσοποιητικού μπαίνει σε εφαρμογή με τη μελέτη των κυτοκινών και των chimeric antigen receptor T-cells (Berraondo P, 2019; Kostis P, 2018).

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Akbay EA, K. S. (2013). Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. . *Cancer Discov.*, pp. 3:1355–63.
- Alberg A, F. J. (2007). *American College of Chest Physicians. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition)*.
- Baker S, D. M. (2016). A Critical Review of Recent Developments in Radiotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer. *Radiat Oncol*, p. 6;11(1):115.
- Barker JM, S. G. (2002). Lung cancer staging. *Curr Opin Pulm Med.*, pp. 8(4):287-93.
- Berraondo P, S. M.-G.-R.-S. (2019). Cytokines in clinical cancer immunotherapy. *Br J Cancer*, pp. 120(1):6-15.
- Borghaei H, P.-A. L. (2015). Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, p. 373: 1627e39.
- Brahmer JR, D. C. (2010). Phase I study of single-agent anti22 programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: Safety, clinical activity, pharmacodynamics and immunologic correlates. *J Clin Oncol*, pp. 28:3167–3175.
- Caplin ME, B. E.-Y. (2015). Pulmonary neuroendocrine (carcinoid) tumors: European neuroendocrine tumor society expert consensus and recommendations for best practice for typical and atypical pulmonary carcinoid. . *Ann Oncol* , pp. 26:1604–1620.
- Carbone D.P., R. M.-A.-A. (2017). CheckMate 026 Investigators., First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med*, pp. 376 (25) 2415–2426.
- Carreno BM, C. M. (2002). The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol.* , pp. 20: 29–53.
- Chalmers ZR, C. C. (2017). Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med*, p. 19;9(1):34.
- Chen L, H. X. (2019). The PVT1/miR-216b/Beclin-1 regulates cisplatin sensitivity of NSCLC cells via modulating autophagy and apoptosis. *Cancer Chemother Pharmacol.*, pp. 83(5):921-931.
- Chen N, F. W. (2015). Up-regulation of PD-L1 by EGFR Activation Mediates the Immune Escape in EGFR-driven NSCLC: Implication for Optional Immune Targeted Therapy for NSCLC Patients with EGFR Mutation. Implication for Optional Immune Targeted Therapy for NSCLC Pat. *J Thorac Oncol*, pp. 10: 910–923.
- Chung HC, L.-M. J.-c.-1., 36(15 Suppl.), 8.–8. J., & 15(4):618-627. (n.d.). Chung HC, Lopez-Martin JA, Kao SCH et al. Phase II study of pembrolizumab in advanced small-cell lung cancer (SCLC): KEYNOTE-158. *J. Clin. Oncol.* 2018;36(15 Suppl.), 8506–8506. *J Thorac Oncol* 2020 Apr;15(4):618-627.

- Chung HC, P.-P. S.-M. (2020). Pembrolizumab After Two or More Lines of Previous Therapy in Patients With Recurrent or Metastatic SCLC: Results From the KEYNOTE-028 and KEYNOTE-158 Studies. *J Thorac Oncol*, pp. 15(4):618-627.
- Cortinovis D, G. V., & Group, I. L. (2017). New perspectives in the second-line treatment of non squamous NSCLC patients: results from a large Italian Lung Cancer Working Group. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*, pp. 109;35-41..
- Cote ML, K. S. (2005). Risk of lung cancer among white and black relatives of individuals with early-onset lung cancer. *JAMA*, pp. 293(24):3036-3042.
- Couraud S, Z. G. (2012). Lung cancer in never smokers--a review. *J.Eur J Cancer*, pp. 48(9):1299-311.
- Davies, M. (2014). New modalities of cancer treatment for NSCLC: focus on immunotherapy. *Cancer Manag Res*, pp. 6:63-75.
- Deretic, V. (2011). "Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes". *Immunological Reviews*, pp. 240;92-104.
- Ettinger DS, W. D. (2014). Non-small cell lung cancer, version 1.2015. *J Natl Compr Canc Netw.*, pp. 12:1738-61.
- Etzel CJ, A. C. (2003). Risk for smoking-related cancer among relatives of lung cancer patients. *Cancer Res*, pp. 63(23):8531-8535.
- Fan Y, M. R. (2013). NF-kappaB and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. *Protein Cell*, pp. 4:176-85.
- Ferlay J, S. I. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, pp. 136:E359-86.
- Freeman GJ, L. A. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*, pp. 192: 1027-1034.
- García-Campelo R, B. R.-A. (2015). SEOM Clinical Guidelines for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) 2015. *Clin Transl Oncol*, pp. 17 (12): 1020-9 .
- Garon EB, R. N.-F. (2015). KEYNOTE-001 Investigators. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*, p. 372:2018e28.
- Gibney, G., Weiner, L., & Atkins, M. (2016). Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol*, pp. 17(12):e542-e551.
- Goel S, D. M.-F. (2017). CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. *Nature*, pp. 548:471-5.
- Gong W, S. Q. (2011). Paclitaxel Induced B7-H1 Expression in Cancer Cells via the MAPK Pathway. *J Chemother*, pp. 23: 295-299.
- Greenwald RJ, F. G. (2005). The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*, pp. 23:515-48.

- Guo J. Y, K.-U. G. (2013). Autophagy suppresses progression of K-ras-induced lung tumors to oncocytomas and maintains lipid homeostasis. *Genes & Development*, pp. 27(13);1447–1461 .
- He H, Y. D. (2003). Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B. *J. Biol. Chem*, pp. 278 (31);29278–29287.
- Holst VA, F. S. (1997). p53 and K-ras mutational genotyping in pulmonary carcinosarcoma, spindle cell carcinoma, and pulmonary blastoma: implications for histogenesis. . *Am J Surg Pathol* , pp. 21:801–811.
- Honda T, E. J.-P. (2014). Tuning of antigen sensitivity by T cell receptor-dependent negative feedback controls T cell effector function in inflamed tissues. *Immunity*, pp. 40:235–247.
- Horn L, S. D.-A. (2017). 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* , pp. 35:3924-3933.
- Howlader N, N. A.-2. (2020). *National Cancer Institute. Bethesda, MD*. Retrieved from SEER Cancer Statistics Review (CSR) 1975-2017: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2017/
- Ishida Y., A. Y. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*, pp. 11:3887–3895. .
- Jackson, E., Olive, K., Tuveson, D., Bronson, R., Crowley, D., Brown, M., & Jacks, T. (2005). The differential effects of mutant p53 alleles on advanced murine lung cancer. . *Cancer Res*, pp. 65;10280–10288.
- Jonsson S, T. U. (2004). Familial risk of lung carcinoma in the Icelandic population. *JAMA*, pp. 292(24)2977–2983.
- Karpathiou G, S. E. (2011). Light-chain 3A autophagic activity and prognostic significance in non-small cell lung carcinomas. *Chest* , pp. 140: 127–134.
- Keir ME, B. M. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*, pp. 26:677–704.
- Kosti P, M. J. (2018). Perspectives on Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy for Solid Tumors. *Front Immunol* , p. 22;9:1104.
- Li CW, L. S. (2018). Eradication of triple-negative breast cancer cells by targeting glycosylated PD-L1. . *Cancer Cell*, pp. 33:187–201.

- Li Y, D. A. (2018). Evaluation of curcumin, a natural product in turmeric, on Burkitt lymphoma and acute myeloid leukemia cancer stem cell markers. *Future Oncol*, pp. 14(23);2353–2360.
- Lin H, W. S. (2018). Host expression of PD-L1 determines efficacy of PD-L1 pathway blockade-mediated tumor regression. *J Clin Invest*, pp. 128(2):805–15.
- Lindeman NI, C. P. (2013). 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 Thorac Oncol.*, pp. 8:823–59.
- Liu C, Z. S. (2020). The superior efficacy of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy in KRAS-mutant non-small cell lung cancer that correlates with an inflammatory phenotype and increased immunogenicity. *Cancer Lett.*, pp. 1;470:95-105.
- Liu L, W. J. (2020). Clinicopathological features and prognostic analysis of 247 small cell lung cancer with limited-stage after surgery. *Hum Pathol.*, pp. 25;108:84-92.
- Lorin S, H. A. (2013). Autophagy regulation and its role in cancer. *Semin Cancer Biol*, pp. 23:361–379.
- Maes H, K. A. (2014). Tumor vessel normalization by chloroquine independent of autophagy. *Cancer Cell*, pp. 11;26(2):190-206.
- Menzies FM, M. K. (2012). Measurement of autophagic activity in mammalian cells. *Curr. Protoc. Cell Biol*, p. 15;15.16.
- National Cancer Institute. (2015, Nov 25). *SEER Cancer Stat. Lung and Bronchus Cancer*. Retrieved from <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>
- Neal, R., Hamilton, W., & Rogers, T. (2014). Lung cancer. *BMJ*, pp. 349, g6560.
- Nishimura H, O. T. (2001). Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science*, pp. 12;291(5502):319-22.
- Noman MZ, C. S. (2014). Targeting hypoxia at the forefront of anticancer immune responses. *Oncol Immunology*, pp. 3(e954463): 1–3.
- Onuki N, W. I. (1999). Genetic changes in the spectrum of neuroendocrine lung tumors. *Cancer*, pp. 85:600-607.
- Ooi WL, E. R.-W. (1986). Increased familial risk for lung cancer. *J Natl Cancer Inst*, pp. 76(2):217–222.
- Organization, W. H. (2013, Dec 13). *International Agency for Research on Cancer*. Retrieved from Cancer mortality database: <http://www-dep.iarc.fr/WHODb/WHODb.htm>.
- Organization, W. H. (2013). *International Agency for Research on Cancer (2013) Cancer mortality database*. Retrieved from <http://www-dep.iarc.fr/WHODb/WHODb.htm>

- Paez JG, J. P. (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* , pp. 304:1497-500.
- Pagni F, G.-R. E. (2019). Targeting Immune-Related Biological Processes in Solid Tumors: We do Need Biomarkers. . *Int. J. Mol. Sci.* , pp. 20, 5452. .
- Pattingre, S. T. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, pp. 122: 927–939.
- Planchard D, P. S.-F., & Committee, E. G. (2018). Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, pp. 29 Suppl 4:iv192-iv237.
- Qian Y, D. J. (2008). TLR4 signaling induces B7-H1 expression through MAPK pathways in bladder cancer cells. *Cancer Invest.*, pp. 26:816–21.
- Qin X, L. C. (2009). Cisplatin induces programmed death-1-ligand 1 (PD-L1) over-expression in hepatoma H22 cells via Erk/MAPK signaling pathway. . *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* , pp. 56: OL1366–OL1372.
- Rami-Porta R, B. V., & International Association for the Study of Lung Cancer Staging and Prognostic Factors Committee, A. B. (2014). International Association for the Study of Lung Cancer Staging and Prognostic Factors Committee, Advisory Board Members and Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: the new database to inform the eighth edition of the TNM classif. *J Thorac Oncol.*, pp. 9: 1618-24.
- Reck M, H. D. (2013). Management of non-small-cell lung cancer: recent developments. *The Lancet.*, pp. 382:709–19.
- Richardson GE, J. B. (1993). The biology of lung cancer. *Semin Oncol.*, p. 20:105.
- Rittmeyer A, B. F. (2017). Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicenter randomized controlled trial. *Lancet (London, England)* , pp. 389; 255–265.
- Rizvi NA, C. B. (2020). Durvalumab with or without tremelimumab vs platinum-based chemotherapy as first-line treatment for metastatic non-small cell lung cancer: MYSTIC Investigator. *JAMA Oncol* , pp. 1;6(5):661-674.
- Rizvi NA, H. M. (2016). Nivolumab in Combination With Platinum-Based Doublet Chemotherapy for First-Line Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*, pp. 1;34(25):2969-79.
- Rossi G, M. M. (2014). clinically oriented classification integrating immunohistochemistry and molecular biology. *Virchows Arch* , pp. 464:61–68.
- Samuels, Y. W. (2004). High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*, pp. 304(5670): 5548,9.

- Schläfli AM, A. O. (2016). Prognostic value of the autophagy markers LC3 and p62/SQSTM1 in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, p. 28;7(26):395.
- Schwartz AG, Y. P. (1996). Familial risk of lung cancer among nonsmokers and their relatives. *Am J Epidemiol* , pp. 144(6):554–562.
- Scott, R. S. (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev. Cell* , pp. 7: 167–178.
- Sen DR, K. J. (2016). The epigenetic landscape of T cell exhaustion. *Science*, pp. 354:1165–9.
- Sharma P, A. J. (2015). The future of immune checkpoint therapy. *Science* , pp. 348:56–61.
- Sharpe AH, W. E. (2007). The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* , pp. 8: 239–245.
- Siegel R, N. D. (2012). Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, pp. 62:10–29.
- Socinski MA, J. R.-A.-S.-C., & Group, I. S. (2018). Atezolizumab for first-line treatment of metastatic nonsquamous NSCLC. *N Engl J Med*, pp. 378(24):2288–301.
- Song M, C. D. (2013). PTEN loss increases PD-L1 protein expression and affects the correlation between PD-L1 expression and clinical parameters in colorectal cancer. *PLoS One*, p. 8 (6):e6582.
- Spranger S, S. R. (2013). Up-regulation of PD-L1, IDO, and TIGIT in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. *Sci Transl Med*, p. 5:200ra116.
- Sumimoto H, I. F. (2006). The BRAF–MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *J Exp Med* , pp. 203: 1651–1656.
- Sun A, D.-A. L. (2019). Initial Management of Small-Cell Lung Cancer (Limited- And Extensive-Stage) and the Role of Thoracic Radiotherapy and First-Line Chemotherapy: A Systematic Review. *Curr Oncol*, pp. 26(3):e372-e384. Retrieved from *Curr Oncol*. 2019; Jun;26(3):e372-e384.
- Tokuhata GK, L. A. (1963). Familial aggregation of lung cancer in humans. *J Natl Cancer Inst*, pp. 30:289–312.
- Topalian S., D. C. (2015). Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*, pp. 13:450–461.
- Topalian SL, H. F. (2012). Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med*, pp. 366(26): 2443–2454.
- Torre LA, B. F.-T. (2015). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, pp. 65:87–108.
- Travis WD, B. E., & Panel, W. (2015). The 2015 World Health Organization. Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol.*, pp. 10(9):1243-1260.

- Travis WD, B. E.-C. (2011). International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thoracic Oncol*, pp. 6(2):244-85.
- Tumeh PC, H. C. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* , pp. 515:568–71.
- Überall I, G. M. (2019). Tumor autophagy is associated with survival outcomes in patients with resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, pp. 129: 85–91.
- Vivanco I, S. C. (2002). The phosphatidylinositol 3-kinase–AKT pathway in human cancer. . *Nat Rev Cancer* , pp. 2: 489–501.
- Walunas TL, L. D. (1994). Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsle CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, pp. 1; 405–413. .
- Wang LC, W. L. (2011). Analysis on the clinical features of 22 basaloid squamous cell carcinoma of the lung. *J Cardiothorac Surg*, p. 6:10.
- Wang X, L. J. (2015). Tumor suppressor miR-34a targets PD-L1 and functions as a potential immunotherapeutic target in acute myeloid leukemia. . *Cell Signal* , pp. 27: 443–452.
- Wei Zhang, H. S. (2018). Curcumin enhances cisplatin sensitivity of human NSCLC cell lines through influencing Cu-Sp1-CTR1 regulatory loop. *Phytomedicine*, pp. 15;48:51-61.
- Wen-Xing Ding, H.-M. N.-M. (2009). “Oncogenic transformation confers a selective susceptibility to the combined suppression of the proteasome and autophagy. *Molecular Cancer Therapeutics*, pp. 8(7);2036–2045.
- Woan KV, S. E. (2012). Modulation of antigen-presenting cells by HDAC inhibitors: implications in autoimmunity and cancer. . *Immunol Cell Biol*, pp. 90:55–65.
- Woenckhaus M, K.-H. L. (2006). Smoking and cancer-related gene expression in bronchial epithelium and non-small-cell lung cancers. *J Pathol.* , pp. 210(2):192-204.
- Yang YP, H. L. (2013). Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacol Sin*, pp. 34:625–635.
- Yendamuri S, C. L. (2012). Outcomes of sarcomatoid carcinoma of the lung: a surveillance, epidemiology, and end results database analysis. *Surgery*, pp. 152:397–402.
- Yoshiko Iwai, J. H. (2017). Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *Journal of Biomedical Science* , p. 24:26.
- Youlden DR, C. S. (2008). The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends. *J Thorac Oncol*, pp. 3:819–31. .

Zou Y, L. Y.-S. (2013). The autophagy inhibitor chloroquine overcomes the innate resistance of wild-type EGFR nonsmall-cell lung cancer cells to erlotinib. *Journal of Thoracic Oncology*, pp. 8(6); 693-702.