



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών
ΜΠΣ Βιοϊατρικές μέθοδοι και τεχνολογία στη διάγνωση



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

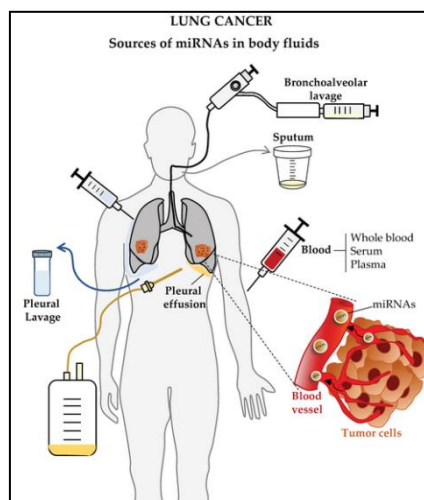
MicroRNAs στον καρκίνο του πνεύμονα.

Νέοι πιθανοί βιοδείκτες για τη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα γενικά και των συνηθών ιστολογικών τύπων του.

POST GRADUATE THESIS

MicroRNAs in lung cancer.

New potential biomarkers for the diagnosis and treatment of lung cancer in general and its common histological types.



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

ΔΑΣΚΑΛΟΠΟΥΛΟΥ ΙΩΑΝΝΑ/DASKALOPOULOU IWANNA

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

ΑΝΘΟΥΛΗ-ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΠΟΥΛΟΥΦΡΑΓΚΙΣΚΗ/ANTHOULI-ANAGNOSTOPOULOU FRAGKISKI

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2022



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



POST GRADUATE THESIS

MicroRNAs in lung cancer.
New potential biomarkers for the diagnosis and treatment of lung cancer in general and its
common histological types.

DASKALOPOULOU IWANNA

Registration Number: dml20028

Email : iwannadask@outlook.com.gr

FIRST SUPERVISOR

ANTHOULI - ANAGNOSTOPOULOU FRAGKISKI

SECOND SUPERVISOR

THALASSINOS NIKOLAOS

THIRD SUPERVISOR

KRIEMBARDIS ANASTASIOS

AIGALEO 2022

Επιτροπή εξέτασης

	Ονόματα εξεταστών	Υπογραφή
1 ^{ος} Εξεταστής	Φραγκίσκη Ανθούλη- Αναγνωστοπούλου	
2 ^{ος} Εξεταστής	Νικόλαος Θαλασσινός	

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Δασκαλοπούλου Ιωάννα του Νικολάου με αριθμό μητρώου dml20028 φοιτήτριας του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Βοϊατρικές μέθοδοι και Τεχνολογία στη Διάγνωση του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου μέχρι να ολοκληρωθεί και έπειτα από αίτηση μου στη Βιβλιοθήκη και έγκριση του επιβλέποντα καθηγητή.

Η Δηλούσα

ΔΑΣΚΑΛΟΠΟΥΛΟΥ ΙΩΑΝΝΑ

Περίληψη

Η μεγαλύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως είναι ο καρκίνος του πνεύμονα. Οι θεραπευτικές παρεμβάσεις για τον καρκίνο του πνεύμονα δεν είναι στο ίδιο επίπεδο, κυρίως λόγω της επανεμφάνισης/υποτροπής, της χημειοθεραπείας και της καθυστερημένης διάγνωσης.

Η συνήθης έρευνα επικεντρώνεται στα miRNAs, τα οποία είναι σύντομα δίκλινα μόρια (20-24 ριβονουκλεοτίδια) που ελέγχουν μετα-μεταγραφικά το mRNA για να επηρεάσουν μοριακούς στόχους (ογκοκατασταλτικά γονίδια, ογκογονίδια) που εμπλέκονται σε διαδικασίες ογκογένεσης όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η μετάσταση και η αγγειογένεση. Σύμφωνα με πολυάριθμες έρευνες, τα MiRNAs μπορεί να διαδραματίσουν νέο ρόλο στην ανίχνευση, την πρόγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητο να διερευνηθεί εντατικά η έκφραση των miRNAs σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη αντικαρκινικών στρατηγικών. Η τρέχουσα έρευνα επικεντρώνεται στην ανάλυση της λειτουργίας των miRNAs στον καρκίνο του πνεύμονα ως διαγνωστικών, προγνωστικών και θεραπευτικών βιοδεικτών.

Λέξεις κλειδιά: καρκίνος πνεύμονα, miRNAs, διάγνωση, πρόγνωση, θεραπεία

Abstract

Lung cancer dominates cancer-related mortality worldwide. Treatment interventions for lung cancer are not at the same level, mainly due to recurrence, chemotherapy and late diagnosis.

The focus of current research is on microRNAs (miRNAs), which are small double-stranded structures (20–24 ribonucleotides) that regulate molecular targets (tumor suppressor genes, oncogenes) involved in the development of cancer by controlling mRNA after transcription. These processes include cell proliferation, apoptosis, metastasis, and angiogenesis. Many studies suggest the emerging role of miRNAs in the diagnosis, prognosis and treatment of lung cancer. Therefore, it is necessary to intensively investigate the expression of miRNAs in patients with lung cancer with the ultimate goal of developing anticancer strategies. This research focuses on the potential use of miRNAs as lung cancer diagnostic, prognostic, and therapeutic biomarkers.

Key words; lung cancer, miRNAs, diagnosis, prognosis, therapeutics

Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας.....	iv
Περίληψη	v
Abstract	vi
Συνομογραφίες	ix
Πρόλογος-Εισαγωγή	1
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	3
Κεφάλαιο 1. Ο καρκίνος του Πνεύμονα.....	3
1.1 Εισαγωγή	3
1.2 Όγκοι Πνεύμονα και Ιστολογικοί Τύποι.....	5
1.3 Μοριακή Παθογένεια στον καρκίνο Πνεύμονα.....	10
1.4 Διάγνωση και Σταδιοποίηση καρκίνου του πνεύμονα.....	13
Κεφάλαιο 2. Τα micro-RNAs (miRNAs).....	19
2.1 Ιστορική αναδρομή.....	19
2.2 Βιογένεση miRNAs.....	20
2.2.1 Κανονικό μονοπάτι σηματοδότησης (canonical pathway)	20
2.2.2 Μη κανονικό μονοπάτι σηματοδότησης (non-canonical pathway).....	21
2.3 Μηχανισμός Δράσης miRNAs	22
2.3.1 Μεταφραστική Αναστολή ή Ενεργοποίηση	22
2.3.2 Καταστολή ή Ενίσχυση της Μεταγραφής.....	24
2.3.3. Ρύθμιση εναλλακτικού ματίσματος- alternative splicing.....	28
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	30
Κεφάλαιο 3. Σκοπός της Διπλωματικής Εργασίας	30
Κεφάλαιο 4. Μεθοδολογία και Περιορισμοί	30
Κεφάλαιο 5. Τα micro-RNAs στον καρκίνο του πνεύμονα.....	31
5.1 Ρόλος των miRNAs στην καρκινογένεση	31
5.2 Βασικά microRNA στον καρκίνο του πνεύμονα.....	42
5.3 Κυκλοφορούντα miRNAs στον καρκίνο του πνεύμονα.....	45
Κεφάλαιο 6. Ρόλος Micro-RNAs ως πιθανοί βιοδείκτες για τη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα	49
6.1 Κυκλοφορούντα miRNAs ως διαγνωστικοί βιοδείκτες του καρκίνου του πνεύμονα	49
6.1.1 Αίμα, ορός και πλάσμα	51
6.1.2 Άλλα σωματικά υγρά	57

6.2 Κυκλοφορούντα miRNAs ως προγνωστικοί βιοδείκτες του καρκίνου του πνεύμονα	60
6.3 Κυκλοφορούντα miRNAs ως θεραπευτικοί βιοδείκτες του καρκίνου του πνεύμονα	62
6.4 Τα miRNAs θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα.....	64
6.5 Προκλήσεις στη θεραπεία καρκίνου του πνεύμονα βασισμένη σε miRNAs	66
Συζήτηση-Συμπεράσματα	69
Βιβλιογραφικές Αναφορές.....	71
Πηγές Εικόνων	91

Συντομογραφίες

	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
CT	Computed tomography	Αξονική Τομογραφία
Cf-miRNAs	Cell-free microRNAs	Ελεύθερα μικρο-RNAs
EMT	Epithelial to Mesenchymal Transition	Επιθηλιακή προς Μεσεγχυματική Μετάβαση
SCLC	Small Cell Lung Cancer	Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer	Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
TKI	tyrosine kinase inhibitors	αναστολέας της ενζυματικής δράσης κινάσης τυροσίνης
SqCC	Squamous Cell Cancer	ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα
AAH	atypical adenomatous hyperplasia	άτυπη αδενωματώδη υπερπλασία
TTF-1	thyroid transcription factor 1	θυρεοειδικός μεταγραφικός παράγοντας 1
MIA	Minimally invasive adenocarcinoma	ελάχιστα διηθητικό
LCC	Large cell carcinoma	αδενοκαρκίνωμα
SCC	Small cell Carcinoma	Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα
LCNEC	large cell neuroendocrine carcinoma	Μικροκυτταρικό καρκίνωμα μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα
HGNET	high-grade neuroendocrine tumor	υψηλού βαθμού νευροενδοκρινικός όγκος
EGFR	epidermal growth factor receptor	υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
HLA	Human Leukocyte Antigens	Αντιγόνα Ιστοσυμβατότητας
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase	κινάση τυροσίνης του αναπλαστικού λεμφώματος
TRKA	Tropomyosin receptor <i>kinase</i> A	κινάση A των υποδοχέων τροπομυοσίνης
IMA	invasive mucinous adenocarcinoma	διηθητικό βλενώδες αδενοκαρκίνωμα
PET	Positron Emission Tomography	Τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων
TBNB	Transbronchial needle biopsy	Βρογχοσκόπηση με βιοψία δια βελόνης
TBNA	Transbronchial needle aspiration	Διαβρογχική αναρρόφηση με βελόνα
VATS	Video-assisted thoracoscopic surgery	
lncRNAs	long non-coding RNAs	
MRE	miRNA recognition elements	

υποβοηθούμενη με βίντεο
θωρακοσκόπηση
μακρά μη κωδικοποιητικά RNA
στοιχεία αναγνώρισης miRNA

TGS	transcriptional gene silencing	μεταγραφική αποσιώπηση γονιδίου
TGA	transcriptional gene activation	μεταγραφική ενεργοποίηση
RITS	RNA-induced transcriptional silencing complex	γονιδίου επαγόμενο από RNA σύμπλεγμα
PTGS	post-transcriptional gene silencing	μεταγραφικής αποσιώπησης
CSC	cancer stem cell	μετα-μεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση καρκινικό βλαστικό κύτταρο
HMGA2	High-mobility group AT-hook 2	Πρωτεΐνη κωδικοποιούμενη από το γονίδιο HMGA2
PTEN	Phosphatase and tensin homolog	ομόλογη της τενσίνης, φωσφατάση
PI3K	phosphoinositide 3-kinases	φωσφοϊνοσιτιδικές 3-κινάσες
E2F	genes that encodes a family of transcription factors	μεταγραφικοί παράγοντες E2F
Akt	Protein kinase B(PKB),serine-threonine kinase	πρωτεΐνη Akt
TGF-β	Transforming growth factor beta	μετασχηματιζόμενος αυξητικός παράγοντας βήτα
HIF	Hypoxia-inducible factor	παράγοντας επαγόμενος από την υποξία
FOXO1/03	Forkhead box proteins O1 and O3	μεταγραφικοί παράγοντες FOXO1/03 με δομή forkhead
HER3(ERBB3)	human epidermal growth factor receptor 3, Receptor tyrosine-protein kinase erbB-3	Υποδοχέας τυροσίνης-πρωτεϊνικής κινάσης ERBB-3
CDK	Cyclin-dependent kinase	κυκλινοεξαρτώμενη κινάση
p53	Tumor protein p53	πρωτεΐνη όγκου P53
ZEB1	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1	πρωτεΐνη ZEB1
ZEB2	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2	πρωτεΐνη ZEB2
Rho	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2	οικογένεια Rho GTPασών
ERa	Ras homologous (Rho) GTPase	υποδοχέας οιστρογόνων τύπου α
IGFR	protein family Estrogen receptor alpha	υποδοχέας του αυξητικού
VEGF	insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor	παράγοντα 1 που μοιάζει με ινσουλίνη
EV	Vascular endothelial growth factor	αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
MVB	extracellular vesicle	εξωκυττάριο κυστίδιο
NPM1	multivesicular bodie	πολυκυστιδιακό σωματίο
ICAM-1	RNA-binding protein nucleophosmin	πρωτεΐνη NPM1

qPCR	intercellular adhesion molecule 1 polymerase chain reaction	πρωτεΐνη ICAM-1 αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
NGS	real-time quantitative polymerase chain reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο
cDNA	next generation sequencing	Αλληλούχηση επόμενης γενιάς
RT	complementary DNA	Συμπληρωματικό DNA
AD	reverse transcription	Αντίστροφη μεταγραφή
HDL	adenocarcinoma	Αδενοκαρκίνωμα
AUC	High-density lipoprotein	λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας, χοληστερίνη
TNM	Area under the curve	περιοχή κάτω από την καμπύλη (στατιστικός όρος)
RNAi	tumor (T), node (N), and distant metastasis (M) classification	ταξινόμηση όγκων κατά TNM
ASO	RNA interference	
SiRNA	Antisense oligonucleotide	παρεμβολή RNA
EGFR	Small interfering RNA	αντιπληροφοριακό
PD	epidermal growth factor receptor	ολιγονουκλεοτίδιο
PD1/PD-L1	progressive disease	Μικρό παρεμβαλλόμενο RNA υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
BAL	protein 1/programmed cell death	ασθένεια σε εξέλιξη
BL	protein 1 ligand	πρωτεΐνη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου PD1/PDL1
MPE	Bronchoalveolar lavage bronchial lavage	διαγνωστική βρογχοκυψελιδική πλύση
BPE	malignant pleural effusion	βρογχικό έκπλυμα
CYFRA 21-1	benign pleural effusion	Κακοήθης πλευριτική (υπεζωκοτική) συλλογή
CEA	cytokeratin 19 fragment	Καλοήθης πλευριτική συλλογή
PLC	carcinoembryonic antigen Pleural lavage cytology	Καρκινικό αντιγόνο 21-1 καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο κυτταρολογική εξέταση υπεζωκότα

Πρόλογος-Εισαγωγή

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου λόγω κακοήθειας παγκοσμίως (Gayosso-Gómez et al.,2021). Το γεγονός ότι η πλειονότητα των ασθενών διαγιγνώσκεται σε προχωρημένα στάδια της νόσου είναι η κύρια αιτία του υψηλού ποσοστού θνησιμότητας (Goldstraw et al.,2016). Αυτή η καθυστερημένη διάγνωση οφείλεται σε συνδυασμό απουσίας συγκεκριμένων κλινικών συμπτωμάτων στα πρώιμα στάδια και έλλειψης αποτελεσματικών μεθόδων προσυμπτωματικού ελέγχου και επιβεβαιωτικής διάγνωσης που συχνά αναβάλλεται καθώς απαιτεί τη λήψη δειγμάτων ιστού με επεμβατικές τεχνικές (Goldstraw et al.,2016). Η χαμηλής δόσης υπολογιστική τομογραφία (CT) είναι μια εξέταση διαλογής που είναι σήμερα διαθέσιμη και συνιστάται κυρίως σε βαρείς καπνιστές υψηλού κινδύνου, αλλά επειδή έχει τη δυνατότητα να υπερδιαγνώσει ή να παράγει ψευδώς θετικά αποτελέσματα, υπάρχει κίνδυνος βλάβης από την επανειλημμένη έκθεση σε ακτινόβια και η χρήση της συνδέεται με υψηλότερο κόστος υγειονομικής περίθαλψης (Kanodra et al., 2015; Mazzone et al., 2018).

Είναι σημαντικό ότι ο ιστολογικός υπότυπος του όγκου, το στάδιο της νόσου και η παρουσία κατασκευάσιμων μεταλλάξεων χρησιμοποιούνται για την κατηγοριοποίηση της θεραπευτικής προσέγγισης για τον καρκίνο του πνεύμονα. Η πρόγνωση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το στάδιο κατά την αρχική διάγνωση για αυτό συνήθως παρατηρείται να είναι πτωχή λόγω της καθυστερημένης διάγνωσης (Walters et al.,2013). Για την έγκαιρη και ακριβή διάγνωση, ταξινόμηση, πρόγνωση και πρόβλεψη της θεραπευτικής ανταπόκρισης στον καρκίνο του πνεύμονα, απαιτούνται επομένως άλλοι βιοδείκτες.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται έντονη χρήση νέων βιοδεικτών που λαμβάνονται από βιολογικά δείγματα μέσω ελάχιστα επεμβατικών ή μη επεμβατικών μεθόδων, όπως περιφερικό αίμα ή άλλα σωματικά υγρά, περιορίζοντας έτσι κινδύνους που συνδέονται με τη διενέργεια βιοψίας πνευμονικού ιστού ή διαδικασιών εκτομής (Gayosso-Gómez et al.,2021).

Μετά τον εντοπισμό των miRNAs χωρίς κύτταρα (cf-miRNAs), γνωστά και ως κυκλοφορούντα miRNAs στην κυκλοφορία του αίματος, το 2008, ανακαλύφθηκε ότι οι συγκεντρώσεις αυτών των miRNAs στον ορό και το πλάσμα μπορούν να κάνουν διάκριση μεταξύ ατόμων με καρκίνο του πνεύμονα, του προστάτη και του παχέος εντέρου και υγιών

ατόμων (Chen et al.,2008; Mitchell et al.,2008). Κατά τη δημιουργία βιοδεικτών για τον καρκίνο, τα κυκλικά miRNA είναι επιθυμητοί στόχοι λόγω της υψηλής σταθερότητάς τους στο πλάσμα και τον ορό, της ανθεκτικότητάς τους σε συνθήκες αποθήκευσης και της επεκτασιμότητάς τους (Chen et al.,2008; Mitchell et al.,2008). Επιπλέον, κυκλοφορούντα miRNAs υπάρχουν σε πολλά άλλα σωματικά υγρά όπως στο σάλιο, στα ούρα, στις υπεζωκοτικές συλλογές, στα πτύελα και στη βρογχοκυψελιδική έκπλυση, μεταξύ άλλων, με τις αλλαγές στα επίπεδά τους να έχουν συσχετιστεί με τη διάγνωση καρκίνων, όπως συμβαίνει και με τα miRNA ορού και πλάσματος (Ortiz-Quintero et al.,2016), συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του πνεύμονα (Han et al.,2013; Shen et al.,2014; Roman-Canal et al.,2019). Επιπλέον, ανακαλύφθηκε ότι τα cf-miRNAs μεταφέρονται από τα καρκινικά κύτταρα στο μικροπεριβάλλον του όγκου και παραδίδονται στα κύτταρα-δέκτες, ελέγχοντας τη γονιδιακή έκφραση. Τα ελεύθερα miRNAs έχουν συνδεθεί με διαδικασίες που σχετίζονται με τον καρκίνο, όπως η μετάσταση, η επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT), η αγγειογένεση και η διαφυγή από την ανοσολογική απόκριση ως μέρος της διακυτταρικής επικοινωνίας στον καρκίνο, όπως ακριβώς συμβαίνει και με τα ενδογενή miRNAs (Ortiz-Quintero et al., 2020).

Κατά συνέπεια, η δυνητική κλινική σημασία των κυκλικών miRNAs ως μη επεμβατικών βιοδεικτών του καρκίνου του πνεύμονα αποκαλύπτεται από τη σταθερή και μετρήσιμα διαμορφωμένη παρουσία τους στο περιφερικό αίμα και σε άλλα σωματικά υγρά. Στην παρούσα διπλωματική εργασία συνοψίζεται ο πιθανός ρόλος των miRNAs ως βιοδείκτες για τη διάγνωση, την πρόγνωση και τη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα γενικότερα καθώς και των συνήθων ιστολογικών τύπων του.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1. Ο καρκίνος του Πνεύμονα

1.1 Εισαγωγή

Οι όγκοι που αναπτύσσονται στους βρόγχους ή στο παρέγχυμα του πνεύμονα αναφέρονται ως βρογχογενή καρκινώματα ή καρκίνος του πνεύμονα. Σε ολόκληρο τον κόσμο, είναι η συχνότερη αιτία καρκίνου στους άνδρες και η έκτη συχνότερη αιτία στις γυναίκες. Επιπλέον, ευθύνεται για το 20% περίπου της θνησιμότητας που προκαλείται από άλλες κακοήθειες (Siddiqui et al., 2022). Είναι αξιοσημείωτο να αναλογιστεί κανείς ότι στις αρχές του 20ού αιώνα, ο καρκίνος του πνεύμονα ήταν μια αρκετά ασυνήθιστη κατάσταση. Η απότομη αύξησή του κατά τις επόμενες δεκαετίες σχετίζεται κυρίως με την αύξηση του καπνίσματος στους άνδρες και τις γυναίκες (Miller et al., 2016- Kocher et al., 2015).

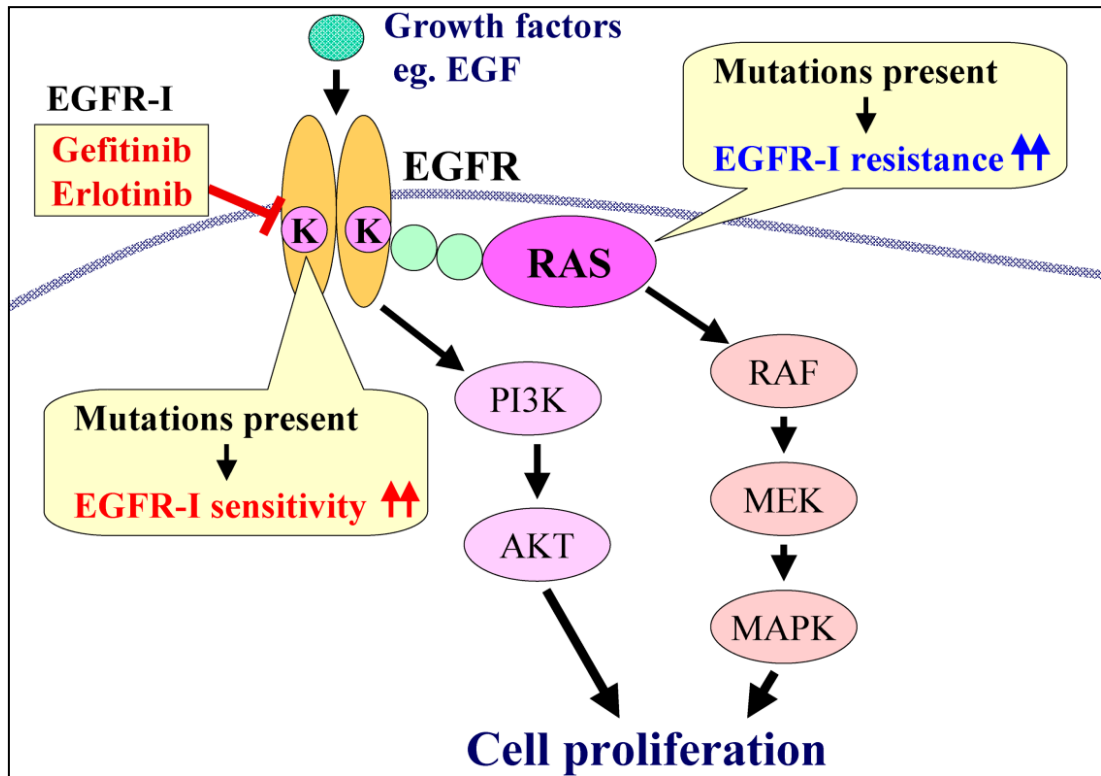
Ο καρκίνος του πνεύμονα προκαλείται συχνότερα από το κάπνισμα. Σύμφωνα με τους Alberg et al. (2003), το κάπνισμα θεωρείται ότι είναι η κύρια αιτία για το 90% των περιστατικών καρκίνου του πνεύμονα. Οι άνδρες καπνιστές διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο. Επιπλέον, ο κίνδυνος αυξάνεται με την έκθεση σε πρόσθετες καρκινογόνες ουσίες, όπως ο αμίαντος. Λόγω των περίπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του καπνίσματος, των περιβαλλοντικών μεταβλητών και της γενετικής, δεν υπάρχει σύνδεση μεταξύ του αριθμού των πακέτων που καπνίζονται ετησίως και του καρκίνου του πνεύμονα. Σύμφωνα με τους Alberg et al. (2003), το παθητικό κάπνισμα αυξάνει τον κίνδυνο καρκίνου του πνεύμονα κατά 20-30%. Η ακτινóβια για τη θεραπεία του μη πνευμονικού καρκίνου, ιδίως του λεμφώματος Non-Hodgkins και του καρκίνου του μαστού (Lorigan et al., 2005), είναι μια άλλη σκέψη. Ο καρκίνος του πνεύμονα συνδέεται επίσης με την έκθεση σε μέταλλα όπως το χρώμιο, το νικέλιο, το αρσενικό και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες. Παρά το γεγονός ότι δεν καπνίζουν, παθήσεις των πνευμόνων όπως η ιδιοπαθής πνευμονική ίνωση αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα (Burns et al., 2000).

Το ραδόνιο και ο αμίαντος είναι επίσης γνωστοί παράγοντες κινδύνου για καρκίνο του πνεύμονα. Ο κίνδυνος καρκίνου του πνεύμονα αυξάνεται δόσοεξαρτώμενα από την έκθεση στον αμίαντο, ιδίως από την επαγγελματική έκθεση (Wagner et al., 1997). Ένας

μικρός αλλά σημαντικός κίνδυνος καρκίνου του πνεύμονα συνδέθηκε με την έκθεση σε ραδόνιο σε ορυχεία ουρανίου (Grosche et al., 2006). Το ραδόνιο έχει επίσης δειχθεί ότι συσσωρεύεται στα σπίτια ως προϊόν αποσύνθεσης ουρανίου και ραδίου, ενώ μια μετα-ανάλυση ευρωπαϊκών ερευνών ανέφερε σημαντικούς κινδύνους από το ραδόνιο, ιδιαίτερα για τους καπνιστές, με το τελευταίο να ευθύνεται για περίπου το 2% όλων των θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα (Darby et al., 2005).

Σύμφωνα με τους Siegel et al. (2017), ο καρκίνος του πνεύμονα, ο οποίος αποτελεί περίπου το 12,4% του συνόλου των διαγνώσεων καρκίνου στη χώρα, είναι η πιο συχνά διαγνωσμένη κακοήθεια και ο κύριος λόγος θανάτων που σχετίζονται με τον καρκίνο. Ο καρκίνος του πνεύμονα συνέχισε να αποτελεί τη μεγαλύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως το 2020, αντιπροσωπεύοντας σχεδόν 1,8 εκατομμύρια θανάτους (Global Cancer Statistics report, Sung et al., 2020). Ιστορικά, η εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα φαίνεται να αφορά μόνο τον ανεπτυγμένο κόσμο. Πρόσφατα δεδομένα παρουσιάζουν πως η συχνότητα του καρκίνου του πνεύμονα αυξάνεται δραματικά, με το 49,9%, να διαγιγνώσκονται στον υπανάπτυκτο κόσμο (Barta et al., 2019).

Η παθογένεια του καρκίνου του πνεύμονα είναι εξαιρετικά περίπλοκη και ελάχιστα κατανοητή. Είναι γνωστό ότι η δυσπλασία του επιθηλίου των πνευμόνων είναι αποτέλεσμα της συχνής έκθεσης σε τοξίνες, όπως ο καπνός του τσιγάρου. Η συνεχής έκθεση έχει ως αποτέλεσμα γενετικές αλλοιώσεις και επηρεάζει τη σύνθεση των πρωτεϊνών (Cagle et al., 2013). Με τη σειρά του, αυτό διαταράσσει τον κυτταρικό κύκλο και ενθαρρύνει την ανάπτυξη καρκίνου. Σύμφωνα με τους Lindeman κ.ά. (2018), οι συχνότερες γενετικές αλλοιώσεις που συνδέονται με την ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα είναι οι MYC, BCL2 και p53 για τον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (SCLC) και οι EGFR (δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης), KRAS και p16 για τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) [Εικόνα 1]. Αξίζει να σημειωθεί πως φαρμακευτικοί αναστολείς της ενζυματικής δράσης κινάσης τυροσίνης (TKIs) χρησιμοποιούνται σαν αντινεοπλασματικές θεραπείες, σε ασθενείς που έχουν ορισμένες μεταλλάξεις του, καθώς αναστέλλουν την ενδοκυττάρια σηματοδότηση του EGFR και την ογκογόνο επίδρασή του στο κύτταρο.



Εικόνα 1 Μονοπάτι EGFR και μεταλλάξεις KRAS

(Inoue A, Nukiwa T et al.,2005)

Οι πρωτεΐνες RAS είναι χαμηλού μοριακού βάρους GTPάσες που συνδέονται με την εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. Στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, παίζουν ρόλο στη ρύθμιση των πρωτεϊνών που βρίσκονται κατάντη των effectors, όπως η κινάση RAF/MAP και η κινάση PI3, οι οποίες επηρεάζονται από έναν αριθμό υποδοχέων κυτταρικής επιφάνειας, συμπεριλαμβανομένου του EGFR. Έως και το 30% των αδενοκαρκινωμάτων του πνεύμονα έχουν μεταλλάξεις του γονιδίου K-RAS, οι οποίες θεωρούνται κακοί προγνωστικοί δείκτες. Οι μπάρες T αντιπροσωπεύουν αναστολή, ενώ τα βέλη αντιπροσωπεύουν διέγερση. Αναστολέας του γονιδίου EGFR-I; MAPK κινάση ή MEK.

1.2 Όγκοι Πνεύμονα και Ιστολογικοί Τύποι

Η ιστοπαθολογική ταξινόμηση των καρκίνων του πνεύμονα βασίζεται σε κυτταρικούς και μοριακούς υποτύπους, κάτι που αποτελεί ουσιαστικό μέρος της διάγνωσης και της διαχείρισης των καρκίνων του πνεύμονα. Ο τύπος SCLC, ο οποίος αντιπροσωπεύει το 15% όλων των καρκίνων του πνεύμονα, και ο τύπος μη SCLC, ο οποίος αντιπροσωπεύει το 85% όλων των καρκίνων του πνεύμονα, είναι οι δύο κύριες ιστολογικές

κατηγορίες για τον καρκίνο του πνεύμονα. Το αδενοκαρκίνωμα, το πλακώδες κυτταρικό καρκίνωμα (SqCC) και το γιγαντοκυτταρικό καρκίνωμα είναι όλα παραδείγματα του NSCLC. Τα NSCLC είναι λιγότερο συχνά μεταστατικά στη διάγνωση και γι' αυτό συχνότερα χειρουργήσιμα με μικρότερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία, ενώ τα SCLC είναι συχνότερα μεταστατικά άρα συνήθως ανεγχείρητα.

Οι έρευνες υποδηλώνουν ότι ο καρκίνος του χαρακτηρίζεται από ιστολογική και μοριακή ετερογένεια ακόμη και εντός του ίδιου ιστολογικού υποτύπου. Η ιστοπαθολογική ταξινόμηση του καρκίνου του πνεύμονα αναθεωρήθηκε και δημοσιεύτηκε ως ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ). Πολλές σημαντικές αναθεωρήσεις έγιναν σε αυτήν την ταξινόμηση για να αντικατοπτρίζουν πρόσφατες ανακαλύψεις που σχετίζονται με τη μοριακή παθολογία (επίπεδα αλλοίωσης DNA, μεθυλίωσης DNA, έκφρασης mRNA, έκφρασης microRNA και έκφρασης πρωτεΐνης) του καρκίνου του πνεύμονα (Travis et al.,2015).

Οι όγκοι του πνεύμονα χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες σύμφωνα με το σύστημα κατηγοριοποίησης των όγκων του πνεύμονα 2021 του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ):

- I. Πρόδρομες αδενικές βλάβες
- II. Αδενοκαρκίνωμα
- III. Αδενοπλακώδη καρκινώματα
- IV. Πρόδρομες πλακώδεις βλάβες
- V. Ακανθοκυτταρικά καρκινώματα
- VI. Μεγαλοκυτταρικά καρκινώματα
- VII. Σαρκωματοειδή καρκινώματα
- VIII. Νευροενδοκρινικά νεοπλάσματα του πνεύμονα
- IX. Όγκοι τύπου σιελογόνων αδένων
- X. Νευροενδοκρινικοί όγκοι
- XI. Νευροενδοκρινικά καρκινώματα και
- XII. άλλοι όγκοι του επιθηλίου

Σύμφωνα με τον ΠΟΥ, η αναγνώριση των ιστολογικών χαρακτηριστικών, η μέτρηση του βάθους της εισβολής και ο τρόπος εξάπλωσης έχουν προγνωστική αξία. Για

παράδειγμα, αναφέρεται ότι η εξάπλωση του όγκου μέσω των εναέριων χώρων σχετίζεται με υψηλότερο ποσοστό υποτροπής μετά από περιορισμένες εκτομές και θα πρέπει να αναφέρεται στην παθολογική αξιολόγηση. Επίσης, οι υποτύποι των διαυγών κυττάρων, της ραβδοειδούς μορφολογίας και της μορφολογίας με κύτταρα σφραγιστήρος δακτυλίου έχουν διακοπεί από την πιο πρόσφατη ταξινόμηση του ΠΟΥ καθώς φαίνεται να είναι κυτταρολογικά χαρακτηριστικά που μπορεί να εμφανιστούν σε οποιοδήποτε αδενοκαρκίνωμα. Η ταξινόμηση του ΠΟΥ δίνει σημαντική έμφαση στην ανοσοϊστοχημική χρώση για την ταξινόμηση των καρκίνων που μπορεί να μην έχουν τυπικά κυτταρολογικά χαρακτηριστικά στη μικροσκοπία φωτός. Στο σύστημα ταξινόμησης του ΠΟΥ του 2015, τα μέτριας κυτταρικής διαφοροποίησης καρκινώματα επαναταξινομήθηκαν ως καρκινώματα πλακωδών κυττάρων εάν είχαν έκφραση p40, ενώ ως αδενοκαρκινώματα με συμπαγή υποτύπο εάν είχαν έκφραση του θυρεοειδικού μεταγραφικού παράγοντα 1, και ως νευροενδοκρινικά καρκινώματα εάν ήταν θετικά σε χρωμογρανίνη και συναπτοφυσίνη (Siddiqui et al.,2022).

Πρόδρομες αδενικές βλάβες

Αποτελούνται από καρκίνο in situ και άτυπη αδενωμάτωδη υπερπλασία (AAH). Το αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα Η υπερπλασία AAH είναι μια διηθητική βλάβη που έχει συνήθως μέγεθος μικρότερο από 5 mm. Το αδενοκαρκίνωμα in situ είναι τυπικά μια εν τω βάθει βλάβη που έχει μέγεθος μικρότερο ή ίσο με 3 cm και μπορεί να είναι βλεννώδης ή μη βλεννώδης. Έχει "λεπιδικό" πρότυπο ανάπτυξης, το οποίο χαρακτηρίζεται από περιορισμένη ανάπτυξη κατά μήκος των κυψελιδικών πόρων. Τα κυψελιδικά διαφράγματα είναι άθικτα και είναι μη διηθητικό (Siddiqui et al., 2022).

Αδενοκαρκίνωμα (Adenocarcinoma)

Ξεκινά από αδενικά κύτταρα, τα οποία είναι κύτταρα που εκκρίνουν διάφορες ουσίες όπως η βλέννη, και αποτελεί περίπου το 30-35% καρκινωμάτων πνεύμονα. Η παθολογία του αδενοκαρκινώματος αποτελείται είτε από σχηματισμό νεοπλασματικού αδενικού ιστού, έκφραση πνευμονιοκυτταρικού δείκτη (θυρεοειδικός μεταγραφικός παράγοντας 1 -TTF-1) με ή χωρίς έκφραση ναψίνης ή έκφραση ενδοκυτταροπλασματικής βλεννίνης. Η έκταση και η αρχιτεκτονική της ανάπτυξης του νεοπλασματικού αδενικού ιστού καθορίζουν αν πρόκειται για βλεννώδη ή μη βλεννώδη ιστό. Είναι δυνατόν τα βλεννώδη αδενοκαρκινώματα να έχουν θηλώδη, μικροπυρηνική ή συμπαγή αρχιτεκτονική. Ο ΠΟΥ δεν υποστηρίζει την κατηγοριοποίηση των βλεννογόνων

καρκινωμάτων με βάση τον τρόπο ανάπτυξης ενός όγκου. Άλλες λιγότερο συχνές μορφές αδενοκαρκινώματος περιλαμβάνουν κολλοειδές, εντερικό, λεμφοεπιθηλιακό (Mullangi et al.,2021; Siddiqui et al.,2022).

Το αδενοκαρκίνωμα με ελάχιστη διήθηση (μικρότερη από 5 mm) και κυρίαρχο πρότυπο ανάπτυξης, παρόμοιο με άλλες παρόμοιες αδενικές αλλοιώσεις, είναι γνωστό ως ελάχιστα διηθητικό αδενοκαρκίνωμα (MIA), το οποίο είναι ένα πολύ μικρό, πολύ μικρό αδενοκαρκίνωμα που είναι μικρότερο ή ίσο με 3 cm. Ως λεπιδικό κυρίαρχο αδενοκαρκίνωμα ορίζεται η διήθηση που είναι μεγαλύτερη από 5 mm. Οι βλεννώδεις όγκοι που δεν είναι MIA περιλαμβάνονται στο διηθητικό βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα (βλεννώδης καρκίνος αδένων). Η βλάβη θα πρέπει να κατηγοριοποιείται ως μικτό αδενοκαρκίνωμα εάν υπάρχει ποσοστό άνω του 10% βλεννώδους και μη βλεννώδους μορφής ανάπτυξης (Mullangi et al., 2021).

Αδενοπλακώδες Καρκίνωμα (Adenosquamous Carcinoma)

Τα αδενοπλακώδη, αδενοακανθοκυτταρικά, καρκινώματα είναι όγκοι του πνεύμονα προερχόμενο από περισσότερο από 10% αδενικά και πλακώδη κύτταρα(τα κύτταρα που καλύπτουν την εσωτερική επιφάνεια των αεραγωγών) . Αυτός είναι ένας ασυνήθιστος και εξαιρετικά επιθετικός όγκος του πνεύμονα και οι τρέχουσες συστάσεις προτείνουν επικουρική χημειοθεραπεία με μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία ολόκληρου του εγκεφάλου λόγω του υψηλού κινδύνου υποτροπής και εγκεφαλικής μετάστασης με αυτόν τον υποτύπο (Filosso et al.,2011).

Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα ή Καρκίνωμα εκ πλακώδους επιθηλίου πνεύμονα (SqCC)

Η παθολογία των πλακωδών κυττάρων ορίζεται από την παρουσία κερατίνης και/ή μεσοκυτταρικών δεσμοσωμάτων στην κυτταρολογική εξέταση ή από ανοσοϊστοχημεία με απόδειξη έκφρασης p40, p63, CK5, CK5/6 ή δεσμογλεΐνης. Οι υποτύποι του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος περιλαμβάνουν μη κερατινοποιημένο, κερατινοποιημένο και βασαλοειδές (Siddiqui et al.,2022). Μεγάλης κλίμακας κεντρική νέκρωση μπορεί να παρατηρηθεί σε καρκινώματα πλακωδών κυττάρων. Οι όγκοι του πανκοστού και η υπερασβεστιαϊμία είναι δύο πιθανά συμπτώματα του ακανθοκυτταρικού καρκίνου. Ένας όγκος στην ανώτερη πνευμονική αύλακα είναι γνωστός ως όγκος Pancoast.

Ο εγκέφαλος είναι η πιο κοινή θέση υποτροπής μετά την επέμβαση σε περιπτώσεις όγκων Pancoast (Sabbula et al.,2022).

Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (LCC)

Το LCC είναι ένα κακοήθες επιθηλιακό νεόπλασμα που δεν διαθέτει κυτταρολογικά χαρακτηριστικά που το καθιστούν παρόμοιο με τους νευροενδοκρινείς, πλακώδεις ή αδενικούς καρκίνους. Δεν διαθέτουν τα κυτταρολογικά χαρακτηριστικά ενός μικροκυτταρικού καρκινώματος και δεν εκφράζουν συχνά p40 και TTF-1 στην ανοισθησιολογία. Συνήθως, το LCC αποτελείται από σφαιρικά έως πολυγωνικά κύτταρα με αξιοσημείωτους πυρήνες. Το κυτταρόπλασμα των μεγάλων, χωρίς χαρακτηριστικά κυττάρων (Rajdev et al., 2018) είναι άφθονο.

Σαρκωματοειδές Καρκίνωμα (Sarcomatoid Carcinoma)

Πρόκειται για ασυνήθιστα καρκινώματα με χαρακτηριστικά σαρκώματος και κακοήθους επιθηλιακής συνιστώσας. Οι υποτύποι περιλαμβάνουν πλειομορφικό καρκίνωμα, καρκινοσάρκωμα και πνευμονικό βλάστωμα (Siddiqui et al.,2022).

Μικροκυτταρικό Καρκίνωμα (SCC)

Στρογγυλά, ωσειδή ή γωνιώδη κύτταρα που έχουν περίπου το μέγεθος ενός λεμφοκυττάρου ηρεμίας και διαθέτουν μέτρια ποσότητα κυτταροπλάσματος αποτελούν το SCLC. Δεν υπάρχουν εμφανείς πυρήνες. Έχει προέλευση από πρόδρομα νευροενδοκρινικά κύτταρα βρογχικού βλεννογόνου και περιέχουν νευροενδοκρινικά κοκκία.Οδηγεί σε έκτωπη παραγωγή ορμονών Τα SCLC είναι εκτεταμένα με περιοχές νέκρωσης. Συνήθως βάφονται θετικά με χρωμοκρανίνη ή συναπτοφυσίνη (Aisner et al.,1990). Αποτελεί το 15-30% περιπτώσεων καρκίνου πνεύμονα, είναι λιγότερο συχνά μεταστατικό στη διάγνωση και γι' αυτό συχνότερα χειρουργήσιμο με μικρότερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία (Rudin et al.,2021).

Νευροενδοκρινείς Όγκοι

Στην ταξινόμηση της ΠΧΚ, προστέθηκαν ως νέα κατηγορία οι "νευροενδοκρινείς όγκοι". Υπάρχουν τρία είδη διηθητικών νευροενδοκρινών όγκων: SCLC, νευροενδοκρινικό καρκίνωμα μεγάλων κυττάρων (LCNEC) και τυπικοί και άτυποι καρκινοειδείς όγκοι. Η κλινική σημασία της διάχυτης ιδιοπαθούς διάχυτης πνευμονικής υπερπλασίας των νευροενδοκρινών κυττάρων είναι ελάχιστη, διότι είναι ασυνήθης και ανίατη. Η διάκριση

μεταξύ ενός κακοήθους όγκου και ενός υψηλού βαθμού νευροενδοκρινικού όγκου (HGNET), ο οποίος περιλαμβάνει το SCLC και το LCNEC, είναι κρίσιμη τόσο στην παθολογία όσο και στην κλινική διαχείριση. Οι καρκινοειδείς όγκοι έχουν συχνά καλή πρόγνωση και συχνά εμφανίζονται σε ασθενείς χωρίς ιστορικό καπνίσματος, ενώ ο HGNET είναι ένας από τους πιο επιθετικούς υποτύπους και χαρακτηρίζεται από ιστορικό βαρέως καπνίσματος στον ασθενή (Inamura et al., 2017).

1.3 Μοριακή Παθογένεια στον καρκίνο Πνεύμονα

Στο πέρασμα των χρόνων έχουν εντοπιστεί γονιδιωματικές και άλλες μοριακές αλλοιώσεις μεταξύ πολλών διαφορετικών τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του πνεύμονα, όπως παρουσιάζονται παρακάτω.

Αδενοκαρκίνωμα

Όσον αφορά το αδενοκαρκίνωμα, η δημοσίευση ενός πλήρους μοριακού προφίλ 230 αδενοκαρκινωμάτων του πνεύμονα από το The Cancer Genome Atlas (TCGA) το 2014 αποκάλυψε υψηλά ποσοστά χρωμοσωμικών ανωμαλιών (μέσος όρος: 8,9 μεταλλάξεις ανά μεγαβάση) και την ανακάλυψη 18 στατιστικά σημαντικών γενετικών αλλοιώσεων: TP53 (46%), KRAS (33%), KEAP1 (17%), STK11 (17%), EGFR (14%), NF1 (11%), BRAF (10%), SETD2 (9%), RBM10 (8%), MGA (8%), MET (7%), ARID1A (7%), PIK3CA (7%), SMARCA4 (6%), RB1 (4%), CDKN2A (4%), U2AF1 (3%) και RIT1 (2%) (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2014).

Επιπλέον, οι γενετικές αλλαγές που προκαλούν το σηματοδοτικό μονοπάτι RTK/RAS/RAF ήταν παρούσες σε περίπου 75% των αδενοκαρκινωμάτων του πνεύμονα. Στο 62% των περιπτώσεων, υπήρχαν γενετικές αλλαγές που υποστηρίζουν το μονοπάτι RTK/RAS/RAF. Οι μεταλλάξεις KRAS, EGFR και BRAF αποτελούσαν το 32, 11 και 7,0% αυτών, αντίστοιχα. Η διαγραφή του εξωνίου 14 MET (4,3%), η μετάλλαξη ERBB2 (ή HER2) (1,7%), η σύντηξη ROS1 (1,7%), η σύντηξη ALK (1,3%), η μετάλλαξη MAP2K1 (0,9%), η σύντηξη RET (0,9%), η μετάλλαξη NRAS (0,4%) και η μετάλλαξη HRAS (0,4%) ήταν μεταξύ των άλλων γενετικών αλλαγών που υποστηρίζουν την οδό RTK/RAS/RAF. Μια άλλη μελέτη διαπίστωσε ότι τα γονίδια ERBB2 (0,9%) και MET (2,2%) ενισχύθηκαν στο μονοπάτι RTK/RAS/RAF. Οι συγγραφείς ανακάλυψαν επίσης νέες γενετικές αλλαγές σε αυτό το μονοπάτι, συμπεριλαμβανομένων των μεταλλάξεων NF1 και RIT1. Το μονοπάτι

RTK/RAS/RAF ελέγχεται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο NF1, του οποίου η συχνότητα μεταλλάξεων ήταν 8,3%. Αντίστοιχα, βρέθηκαν μεταλλάξεις του RIT1 σε ποσοστό 2,2% και το RIT1 αποτελεί συστατικό της οδού RTK/RAS/RAF. Κατά συνέπεια, το μονοπάτι RTK/RAS/RAF υποστηρίζεται από γενετικές αλλαγές στο 75% των αδеноκαρκινωμάτων του πνεύμονα. Αυτή η μελέτη σχετικά με τον ολοκληρωμένο μοριακό χαρακτηρισμό του αδеноκαρκινώματος του πνεύμονα διεύρυνε τους πιθανούς θεραπευτικούς στόχους του αδеноκαρκινώματος του πνεύμονα (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2014) .

Ακόμα, όσον αφορά στις γενετικές αλλαγές και την ιστολογία του αδеноκαρκινώματος του πνεύμονα, η **μετάλλαξη EGFR [Εικόνα 1]** είναι μία από τις πιο κοινές μεταλλάξεις-οδηγούς και το αδеноκαρκίνωμα με μετάλλαξη EGFR συνήθως χαρακτηρίζεται από ανατολικοασιατική εθνικότητα, γυναικείο φύλο και ιστορικό μη/ελαφρού καπνίσματος (Shigematsu et al.,2005). Παθολογικά, τα αδеноκαρκινώματα πνεύμονα με μετάλλαξη EGFR τυπικά παρουσιάζουν ανοσοχρώση πυρηνικού TTF-1 (NKX2-1) και τύπο κυττάρου ονυχίου (Inamura et al.,2010).

Ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα

Το ολοκληρωμένο μοριακό προφίλ 178 περιπτώσεων SqCC από το TCGA δημοσιεύθηκε το 2012 (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2012). Όπως μπορεί να αναμένεται από το ιστορικό του βαρέως καπνίσματος σε ασθενείς με SqCC, τα SqCCs χαρακτηρίζονται από πολύπλοκες γονιδιωματικές αλλοιώσεις. Οι συγγραφείς εντόπισαν πράγματι κατά μέσο όρο 360 μεταλλάξεις εξωνίων, 165 γονιδιωματικές αναδιατάξεις και 323 τμήματα αλλαγής αριθμού αντιγράφων ανά όγκο. Με συχνότητα μετάλλαξης TP53 90%, ανακάλυψαν 11 στατιστικά σημαντικές γενετικές μεταλλάξεις: CDKN2A, PTEN, PIK3CA, KEAP1, MLL2, HLA-A, NFE2L2, NOTCH1, RB1 και PDYN. Οι συγγραφείς βρήκαν νέες μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας στο κύριο γονίδιο ιστοσυμβατότητας HLA-A τάξης I. Επιπλέον, πραγματοποίησαν αναλύσεις μονοπατιών και ανακάλυψαν μονοπάτια που συνδέονται με την οξειδωτική βλάβη, συμπεριλαμβανομένων των KEAP1 και NFE2L2 στο 34% των περιπτώσεων, της οδού ανάπτυξης πλακώδους κυττάρου, που περιλαμβάνει υπερέκφραση των SOX2 και TP63 στο 44% των περιπτώσεων, και της οδού PI3K/AKT στο 47% των περιπτώσεων. ... αδρανοποίηση του CDKN2A στο 72% των ασθενών με SqCC.

Μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα

Το 2012, αναφέρθηκαν εκτενείς γονιδιωματικές αναλύσεις από δύο ομάδες. Στο SCLC, το SOX2 βρέθηκε να είναι ένα συχνά ενισχυμένο γονίδιο από τους Rudin et al. (Rudin

et al., 2012). Η *in vitro* καταστολή του SOX2 εμπόδισε τον πολλαπλασιασμό των κυτταρικών σειρών SCLC με υπερέκφραση SOX2. Επιπλέον, εντόπισαν μια επαναλαμβανόμενη σύντηξη RLF-MYCL1 σε SCLC με αλληλουχία RNA. Με τη σύντηξη RLF-MYCL1, το MYCL1 αποσιωπήθηκε *in vitro* σε κυτταρικές σειρές SCLC για τη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Από την άλλη, οι Peifer et al. ανέφεραν επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν τροποποιητές ιστόνης, συμπεριλαμβανομένων των CREBBP, EP300 και MLL, υποδηλώνοντας την τροποποίηση ιστόνης ως κύριο χαρακτηριστικό του SCLC (Peifer et al.,2012). Το 2015, από τους George et al. αναλύθηκε η αλληλουχία του γονιδιώματος 110 SCLC και βρήκαν ολοκληρωμένα γονιδιωματικά προφίλ (George et al. 2015) . Χαρακτηριστικό σημάδι του βαρέως καπνίσματος, οι μεταλλάξεις C:G>A:T ανακαλύφθηκαν στο 28% όλων των μεταλλάξεων κατά μέσο όρο, και το SCLC χαρακτηρίζεται από πολύ περίπλοκες γονιδιωματικές αλλαγές. Σχεδόν οι SCLC που μελετήθηκαν εμφάνισαν παράλληλη απενεργοποίηση του TP53 και του RB1. Γονιδιωματικές αλλοιώσεις του ογκοκατασταλτικού γονιδίου TP73 παρατηρήθηκαν στο 13% των SCLC. Μεταξύ των γονιδιωματικών αλλαγών του TP73, εντοπίστηκε γονιδιωματική αναδιάταξη του TP73 Δ ex2/3. Η στοχευμένη προσέγγιση TP73-ex2/3 είναι μια πολλά υποσχόμενη θεραπεία του SCLC, επειδή το TP73-ex2/3 προάγει την καρκινογένεση. Οι συγγραφείς παρατήρησαν επίσης αδρανοποιητικές μεταλλάξεις των γονιδίων της οικογένειας NOTCH, οι οποίες κατέστειλαν τη νευροενδοκρινική διαφοροποίηση μέσω της ρύθμισης της έκφρασης ASCL1 στο 25% των SCLC (Crabtree et al.,2016).

Διαμεταθέσεις γονιδίων

Τα γονίδια σύντηξης-διαμετάθεσης αναγνωρίστηκαν πρόσφατα ως ογκογονικοί οδηγοί. Στο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα, έχουν αναφερθεί αναδιαταγμένα γονίδια, συμπεριλαμβανομένων των ALK, ROS1, RET, NTRK1 και NRG1. Το αδενοκαρκίνωμα με διαμετάθεση ALK αποτελεί το 4-5% των αδενοκαρκινωμάτων (Takeuchi et al.,2012). Το αδενοκαρκίνωμα λόγω διαμετάθεσης ROS1 και RET περιλαμβάνει περίπου το 1% (Kohno et al.,2012). Αυτά τα αναδιατεταγμένα αδενοκαρκινώματα ανταποκρίνονται κλινικά καλά στις μορφολογικά στοχευμένες θεραπείες. Το αδενοκαρκίνωμα με διαμετάθεση ALK χαρακτηρίζεται από κυτταρική γενεαλογία TTF-1, βλεννογόνο δομή με μοτίβο κυττάρων βλεννίνης, ιστορικό μη/ελαφρού καπνίσματος και έναρξη σε νεαρή ηλικία (Inamura et al.,2009). Παρόμοια στην ιστολογία με τα αδενοκαρκινώματα ALK, τα

αδενοκαρκινώματα με μετατόπιση ROS1 και RET εμφανίζουν βλεννώδη αδρανή σκώληκα ή ιστολογία συμπαγών κυττάρων (Tsuta et al., 2014).

Οι Vaishnavi et al. (2013) ανακάλυψαν τη σύντηξη NTRK1 στον καρκίνο του πνεύμονα. Οι Shim et al. βρήκαν ένα αδενοκαρκίνωμα με μετάθεση του NTRK1 που αντιστοιχούσε στον υπότυπο IMA (Shim et al., 2015). Μια κινάση TRKA είναι η NTRK1. Κατά συνέπεια, οι αναστολείς της κινάσης TRKA μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη θεραπεία του αδενοκαρκινώματος όπου η NTRK1 είναι αναδιατεταγμένη. Το IMA διακρίνει επίσης το αδενοκαρκίνωμα με αναδιαταγμένο NRG1 (Fernandez-Cuesta et al., 2014). Οι Nakaoku et al. αξιολόγησαν 34 παραδείγματα IMA χωρίς μεταλλάξεις KRAS χρησιμοποιώντας αλληλουχία ολόκληρου του μεταγραφώματος εν μέρει επειδή οι μεταλλάξεις KRAS σε IMA είναι συχνές (Nakaoku et al., 2014). Οι ερευνητές ανακάλυψαν πέντε ογκογόνα τρανσποζόνια: CD74-NRG1, SLC3A2-NRG1, EZR-ERBB4, TRIM24-BRAF και KIAA1468-RET. Με τη μετάθεση, τα γονίδια αυτά έγιναν απρόσιτα στις αμοιβάδες από τις μεταλλάξεις KRAS. Από τα IMA άγριου τύπου KRAS, μεταθέσεις NRG1 βρέθηκαν στο 17,6% (6/34) αυτών.

Οι κλινικές εφαρμογές για τα τμήματα NRG1, ERBB4, BRAF και RET είναι ιδιαίτερα υποσχόμενες, επειδή αποτελούν δυνητικούς μοριακούς στόχους. Μεταξύ Καυκάσιων και Ασιατών, καθώς και μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών, υπάρχουν διαφορές στις γενετικές αλλαγές που συμβάλλουν στην εμφάνιση αδενοκαρκινωμάτων του πνεύμονα. Για παράδειγμα, γενετικές αλλαγές στους EGFR, ALK, ROS1 και RET εντοπίζονται συχνά σε αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα σε μη καπνιστές, ενώ μεταλλάξεις KRAS παρατηρούνται συχνά σε αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα σε καπνιστές. Οι συχνότητες των γενετικών αλλοιώσεων οδηγών στους Καυκάσιους προσδιορίστηκαν στη μελέτη TCGA (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2014) ενώ το αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα στους Ασιάτες χαρακτηρίζεται από υψηλή συχνότητα μεταλλάξεων EGFR (περίπου 50%) και χαμηλή συχνότητα μεταλλάξεων KRAS (περίπου 10%) (Inamura et al., 2017).

1.4 Διάγνωση και Σταδιοποίηση καρκίνου του πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί μία από τις κύριες αιτίες θανάτου τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες, με τον τύπο NSCLC να ευθύνεται για το 85% των διαγνωσμένων περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα (Alberg et al., 2003). Ο γενικός

στόχος είναι η έγκαιρη διάγνωση και η ακριβής σταδιοποίηση. Σε ασθενείς με διαχειρίσιμα συμπτώματα και χωρίς προβλήματα, η αρχική αξιολόγηση ολοκληρώνεται εντός έξι εβδομάδων. Αντίθετα, μόνο το 26% και το 8% των κακοηθειών εντοπίζονται στα στάδια I και II, αλλά το 28% και το 38% εντοπίζονται στα στάδια III και IV, αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, μόνο ένα μικρό ποσοστό ασθενών έχει πρόσβαση σε θεραπευτική χειρουργική επέμβαση.

Ακολουθούν οι διάφορες κατηγορίες αξιολόγησης του καρκίνου του πνεύμονα:

1. **Ακτινολογική σταδιοποίηση**
2. **Επεμβατική σταδιοποίηση**

Στόχοι της αρχικής αξιολόγησης είναι ο προσδιορισμός κλινικής έκτασης και του σταδίου της νόσου, της βέλτιστης θέσης στόχου και του τρόπου 1ης βιοψίας ιστού, ενώ πρέπει να διερευνηθούν και ειδικοί ιστολογικοί υπότυποι, η παρουσία συννοσηροτήτων, και παρανεοπλασματικών συνδρόμων, και τέλος να ληφθούν υπόψιν οι αξίες και προτιμήσεις των ασθενών σχετικά με τη θεραπεία.

Ακτινολογική Σταδιοποίηση. Κάθε ασθενής για τον οποίο υπάρχει υποψία ότι έχει καρκίνο του πνεύμονα πρέπει να υποβάλλεται στις ακόλουθες εξετάσεις:

1. **Αξονική τομογραφία του θώρακα** ενισχυμένη με σκιαγραφικό που εκτείνεται στην άνω κολική περιοχή και στο επίπεδο των επινεφριδίων. Η εισβολή του πρωτοπαθούς όγκου ή των μεταστατικών λεμφαδένων στο μεσοθωράκιο μπορεί να διακριθεί από τις αγγειακές δομές με ενδοφλέβια (IV) σκιαγραφική ενίσχυση. Το βασικό πλεονέκτημα της αξονικής τομογραφίας είναι ότι παρέχει ακριβή ανατομικό προσδιορισμό του όγκου εντός του θώρακα, γεγονός που βοηθά τους κλινικούς ιατρούς στην επιλογή της καλύτερης θέσης για τη βιοψία. Η αξονική τομογραφία σκοπεύει στην αναγνώριση της έκτασης του όγκου, της ανατομικής του θέσης και της συμμετοχής των λεμφαδένων. Η συμμετοχή των λεμφαδένων αποτελεί βασικό παράγοντα στη διαδικασία σταδιοποίησης κατά TNM. Η συνολική ευαισθησία και ειδικότητα της αξονικής τομογραφίας για τον εντοπισμό κακοήθειας είναι 55% και 81%, αντίστοιχα, με αποτέλεσμα η CT να μην αποτελεί ιδανική εξέταση για τη σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα. Αξίζει να σημειωθεί πως τα στάδια στο σύστημα TNM (T: μέγεθος του όγκου και πιθανές διηθήσεις, N: πιθανές μεταστάσεις σε λεμφαδένες, M: πιθανές απομακρυσμένες μεταστάσεις) ταξινομούνται από τον αριθμό μηδέν μέχρι τον αριθμό τέσσερα. Όσο μικρότερος ο αριθμός τόσο λιγότερο προχωρημένο το στάδιο και τόσο καλύτερη η πρόγνωση. Τα στάδια των

λεμφαδένων I-IV σταδιοποιούνται επιμέρους και σε άλλα στάδια (π.χ. IIIA ή IIIB). Σύμφωνα με τους Lababede et al., τα στάδια έχουν ως εξής (Lababede et al., 2018)[**Εικόνα 2**]:

ΠΡΩΤΟΠΑΘΗΣ ΟΓΚΟΣ (TUMOR-T)	
T0	Δεν υπάρχει πρωτοπαθής όγκος.
Tis	Καρκίνωμα in situ: Τα νεοπλασματικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται στη φυσική τους θέση, δηλαδή "In situ", "in its place"
T1	Ο όγκος στη μεγαλύτερη διάμετρό του έχει μέγεθος \leq από 3 cm.
T1a (mi)	Ελάχιστα διηθητικό αδενοκαρκίνωμα (minimal invasive adenocarcinoma)
T1a (ss)	Επιφανειακή ανάπτυξη όγκου οιοσδήποτε μεγέθους που περιορίζεται στη τραχεία ή το τοίχωμα των βρόγχων (superficial spreading tumor in central airways)
T1a	Ορίζεται όγκος \leq 1cm
T1b	Ορίζεται όγκος >1 cm αλλά \leq 2cm
T1c	Ορίζεται όγκος >2 cm αλλά \leq 3cm
T2	Ο όγκος που στη μεγαλύτερη διάμετρό του έχει μέγεθος $>$ από 3 cm αλλά \leq από 5 cm, ή με ένα από τα παρακάτω χαρακτηριστικά: <ul style="list-style-type: none"> ✓ διήθηση του σπλαχνικού υπεζωκότα ✓ προσβολή του κύριου βρόγχου (όχι της τρόπιδας) ✓ συνοδεύεται από ατελεκτασία που εκτείνεται έως τη πύλη του πνεύμονος.
T2a	Ορίζεται όγκος >3 αλλά \leq 4 cm.
T2b	Ορίζεται όγκος >4 αλλά \leq 5 cm.
T3	Ο όγκος που στη μεγαλύτερη διάμετρό του έχει μέγεθος $>$ από 5 cm αλλά \leq από 7 cm, ή ο όγκος με ένα από τα παρακάτω χαρακτηριστικά: <ul style="list-style-type: none"> ✓ διήθηση του θωρακικού τοιχώματος. ✓ διήθηση του περικαρδίου. ✓ διήθηση του φρενικού νεύρου ή με ✓ δορυφορικά οζίδια στον ίδιο λοβό.
T4	Ο όγκος που στη μεγαλύτερη διάμετρό του έχει μέγεθος $>$ από 7 cm, ή ο όγκος με ένα από τα παρακάτω χαρακτηριστικά: διήθηση του μεσοθωρακίου, του διαφράγματος, της καρδιάς, των μεγάλων αγγείων, του παλινδρομού λαρυγγικού νεύρου, της τρόπιδας, της τραχείας, του οισοφάγου, της σπονδυλικής στήλης ή με δορυφορικά οζίδια σε άλλο λοβό αλλά ομόπλευρα ως προς τη πρωτοπαθή βλάβη.

Εικόνα 2 Σταδιοποίηση του όγκου (T) του καρκίνου του πνεύμονα (Μπαλταγιάννης, Ν., & Μανούσου, Α. Καρκίνος του πνεύμονα, 2018)

Στάδιο 0 καρκίνου πνεύμονα

Καλείται νόσος "in situ", που σημαίνει πως το καρκίνωμα βρίσκεται στη θέση του, άρα δεν έχει διηθήσει ή επεκταθεί πέρα του σημείου ανάπτυξής του.

Στάδιο I καρκίνου πνεύμονα

Μικροί όγκοι σε μέγεθος στον ένα πνεύμονα χωρίς επέκταση σε λεμφαδένες. Αναλόγως μεγέθους υπάρχει περαιτέρω ταξινόμηση σε όγκους σταδίου IA (έως 3 cm) ή IB (3-4 cm). Οι όγκοι σ' αυτό το στάδιο περιβάλλονται από πνευμονικό παρέγχυμα ή σπλαγχνικό υπεζωκότα (το εσωτερικό περίβλημα του πνεύμονα), μπορεί να υπάρχει διήθηση κύριου βρόγχου ή να έχουν προκαλέσει ατελεκτασία (κατάσταση κατά την οποία κάποιο τμήμα του πνεύμονα ή και ολόκληρος ο πνεύμονας συμπίπτει με αποτέλεσμα να μειώνεται ο όγκος του) ή αποφρακτική πνευμονίτιδα.

Στάδιο II καρκίνου πνεύμονα

Ο όγκος περιορίζεται στον ένα πνεύμονα χωρίς μεταστάσεις. Διαιρείται σε δύο περαιτέρω στάδια: το στάδιο IIA (4-5 cm) και το IIB.

Στάδιο III καρκίνου πνεύμονα

Παρατηρείται επέκταση του όγκου εντός του θώρακα αλλά όχι σε απομακρυσμένες περιοχές του σώματος. Πολλές φορές περιγράφεται και ως τοπικά προχωρημένος καρκίνος πνεύμονα. Διαιρείται σε τρία στάδια: το στάδιο IIIA (>7 χωρίς εξάπλωση σε επιχώριους λεμφαδένες), το IIIB, και το IIIC.

Οι όγκοι σταδίου IIIA είναι:

Μεγαλύτεροι από 7cm στη μεγαλύτερη διάσταση και δεν έχουν εξαπλωθεί σε επιχώριους λεμφαδένες. Μπορεί να διηθείται το διάφραγμα, ο μεσοθωρακικός υπεζωκότας, το τοιχωματικό περικάρδιο, τα μεγάλα αγγεία, ή να υπάρχουν κι άλλοι όγκοι στον ίδιο πνεύμονα αλλά σε διαφορετικό λοβό.

Μπορεί να είναι μεγαλύτεροι από 5 cm στη μεγαλύτερη διάσταση και να έχουν εξαπλωθεί σε περιβρογχικούς λεμφαδένες και/ή σε λεμφαδένες στην πύλη του πνεύμονα ή/και ενδοπνευμονικούς λεμφαδένες του πνεύμονα που έχει τον όγκο. Οι όγκοι μπορεί να διηθούν τον τοιχωματικό υπεζωκότα (εξωτερικό περίβλημα του πνεύμονα) ή γειτονικές δομές του θωρακικού τοιχώματος ή μπορεί να υπάρχουν κι άλλοι όγκοι στον ίδιο λοβό. Μπορεί επίσης να διηθείται το διάφραγμα, ο μεσοθωρακικός υπεζωκότας, το τοιχωματικό περικάρδιο, τα μεγάλα αγγεία ή να υπάρχουν κι άλλοι όγκοι στον ίδιο πνεύμονα αλλά σε διαφορετικό λοβό.

Μπορεί να μην είναι μεγαλύτεροι από 5 cm στη μεγαλύτερη διάμετρο και να έχουν επεκταθεί σε λεμφαδένες του μεσοθωρακίου, που περιλαμβάνουν υποτροπιδικούς λεμφαδένες, κοντά στον πνεύμονα με τον πρωτοπαθή όγκο. Μπορεί ο καρκίνος να

βρίσκεται και μόνο στον πνεύμονα ή να έχει επεκταθεί σε κύριο βρόγχο ή στον τοιχωματικό υπεζωκότα ή να έχει προκαλέσει ατελεκτασία ή και πνευμονίτιδα.

Οι όγκοι σταδίου IIIB είναι:

Μεγαλύτεροι από 5 cm στη μεγαλύτερη διάμετρο και έχουν επεκταθεί σε λεμφαδένες του μεσοθωρακίου, που περιλαμβάνουν υποτροπιδικούς λεμφαδένες, κοντά στον πνεύμονα με τον πρωτοπαθή όγκο. Οι όγκοι δύναται να διηθούν τον τοιχωματικό υπεζωκότα (εξωτερικό περίβλημα του πνεύμονα) ή γειτονικές δομές του θωρακικού τοιχώματος ή μπορεί να υπάρχουν κι άλλοι όγκοι στον ίδιο λοβό. Μπορεί επίσης να διηθείται το διάφραγμα, ο μεσοθωρακικός υπεζωκότας, το τοιχωματικό περικάρδιο, τα μεγάλα αγγεία ή να υπάρχουν κι άλλοι όγκοι στον ίδιο πνεύμονα αλλά σε διαφορετικό λοβό.

Ίσως να μην ξεπερνούν σε μέγεθος τα 5 cm στη μεγαλύτερη διάσταση και να εμφανίζουν επέκταση σε λεμφαδένες στο μεσοθωράκιο ή στην πύλη των πνευμόνων, κοντά στον πνεύμονα με τον πρωτοπαθή όγκο. Μπορεί επίσης να είναι διηθημένοι υπερκλείδιοι ή σκαληνοί λεμφαδένες. Μπορεί ο καρκίνος να βρίσκεται και μόνο στον πνεύμονα ή να έχει επεκταθεί σε κύριο βρόγχο ή στον τοιχωματικό υπεζωκότα ή να έχει προκαλέσει ατελεκτασία ή και πνευμονίτιδα.

Οι όγκοι σταδίου IIIC είναι:

Μεγαλύτεροι από 5 cm στη μεγαλύτερη διάμετρο και έχουν επεκταθεί σε λεμφαδένες στο μεσοθωράκιο ή την πύλη των πνευμόνων, κοντά στον πνεύμονα με τον πρωτοπαθή όγκο. Μπορεί επίσης να είναι διηθημένοι υπερκλείδιοι ή σκαληνοί λεμφαδένες. Οι όγκοι μπορεί να διηθούν τον τοιχωματικό υπεζωκότα (εξωτερικό περίβλημα του πνεύμονα) ή γειτονικές δομές του θωρακικού τοιχώματος ή μπορεί να υπάρχουν κι άλλοι όγκοι στον ίδιο λοβό. Μπορεί επίσης να διηθείται το διάφραγμα, ο μεσοθωρακικός υπεζωκότας, το τοιχωματικό περικάρδιο, τα μεγάλα αγγεία ή να υπάρχουν κι άλλοι όγκοι στον ίδιο πνεύμονα αλλά σε διαφορετικό λοβό.

Στάδιο IV καρκίνου πνεύμονα

Σε αντίθεση με τα πρώιμα στάδια του καρκίνου του πνεύμονα, παρατηρείται επέκταση του καρκίνου σε πληθώρα σημεία του σώματος σ' αυτό το στάδιο. Οι όγκοι στον πνεύμονα μπορεί να είναι οποιουδήποτε μεγέθους και δύναται να υφίσταται διήθηση σε λεμφαδένες. Το στάδιο IV αναλύεται περαιτέρω στα στάδια IVA και IVB.

Οι **όγκοι σταδίου IVA** έχουν επεκταθεί είτε από τον ένα στον άλλο πνεύμονα ή στον υπεζωκότα, όπου σχηματίζουν δευτεροπαθείς όγκους τοπικά, είτε στο περικάρδιο σχηματίζοντας και εκεί δευτεροπαθείς όγκους πλευριτικό υγρό ή περικαρδιακό υγρό. Επίσης οι όγκοι στο στάδιο αυτό μπορεί να έχουν επεκταθεί σε μια περιοχή εκτός του θώρακα, όπως σε ένα επινεφρίδιο ή οστό.

Οι **όγκοι σταδίου IVB** έχουν επεκταθεί σε πλήθος οργάνων εκτός της θωρακικής κοιλότητας.

2. Απεικόνιση με PET ή PET-CT, όταν υπάρχουν συμπτώματα ή εντοπισμένες ανωμαλίες ή όταν η αξονική τομογραφία θώρακος αποκαλύπτει ενδείξεις προχωρημένης νόσου, χρησιμοποιείται για την αναζήτηση πιθανών μεταστάσεων. Η in vivo πρόβλεψη των νοσηρών και μεταστατικών διεργασιών είναι δυνατή με τη χρήση σαρώσεων PET. Προσφέρει μια λιγοστή ανατομική ανάλυση, αλλά πληροφορίες σχετικά με τη μεταστατική δραστηριότητα του κύριου όγκου, τη συμμετοχή του μεσοθωρακίου και τις πιθανές απομακρυσμένες μεταστάσεις. Η ασαφής απεικόνιση δεν αποτελεί πλέον πρόβλημα χάρη στους τελευταίους ολοκληρωμένους σαρωτές PET/CT. Με τον ακριβή εντοπισμό των μεταστάσεων και την εξάλειψη της πιθανότητας θεραπευτικής χειρουργικής επέμβασης, η απεικόνιση με PET έχει μειώσει σημαντικά τη συχνότητα των περιττών θωρακοτομών. Η σάρωση PET είναι επίσης χρήσιμη για τον αποκλεισμό υποτροπιάζοντων όγκων μετά την αρχική θεραπεία. Μπορεί επίσης να αναγνωρίσει την υποτροπή σε σχέση με τις μεταβολικές αλλαγές μετά την ακτινοθεραπεία. Σε άτομα με ενεργή λοίμωξη και φλεγμονή και αυξημένη γλυκόλυση, συμβαίνουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Μια πρόσφατη βιοψία λεμφαδένων μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικό αποτέλεσμα στη σάρωση PET. Οι ψευδώς αρνητικές σαρώσεις PET συμβαίνουν όταν υπάρχει μειωμένη ροή αίματος όπως με καρκινοειδείς όγκους και ορισμένα αδενοκαρκινώματα και μικρότερους λεμφαδένες.

Επεμβατική Σταδιοποίηση. Η λήψη ιστολογικής ή παθολογικής επιβεβαίωσης της κακοήθειας (βιοψία), η επιβεβαίωση της σταδιοποίησης και η ιστολογική διαφοροποίηση του όγκου (βαθμός) ακολουθούν μετά την αξονική τομογραφία και το PET. Αυτό επιτυγχάνεται με τη βρογχοσκόπηση, βρογχοσκόπηση με βιοψία (TBNA, TBNB) διαγνωστική βιοψία δια βελόνης, θωρακοσκόπηση προς βιοψία, Μεσοθωρακοσκόπηση, Θωρακοσκόπηση ή υποβοηθούμενη με βίντεο θωρακοσκόπηση (VATS).

Κεφάλαιο 2. Τα micro-RNAs (miRNAs)

Τα microRNAs (μικρο-RNAs, miRNAs) είναι μικρά μονόκλιωνα μη κωδικοποιά μόρια RNA που περιέχουν περίπου 22 νουκλεοτίδια και έχουν σημαντικό ρόλο στην αποσιώπηση του RNA και στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Ανακαλύφθηκε το πρώτο microRNA (miRNA), εγκαινιάζοντας μια νέα εποχή της μοριακής βιολογίας. Έχουν

εντοπιστεί πάνω από 3500 ανθρώπινα miRNAs και πιστεύεται ότι συνεργάζονται για τον έλεγχο του ενός τρίτου των γονιδίων του γονιδιώματος. Τα miRNAs έχουν συνδεθεί με πολλές ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, και επιδιώκεται η χρήση τους ως κλινικά διαγνωστικά και ως θεραπευτικοί στόχοι.

2.1 Ιστορική αναδρομή

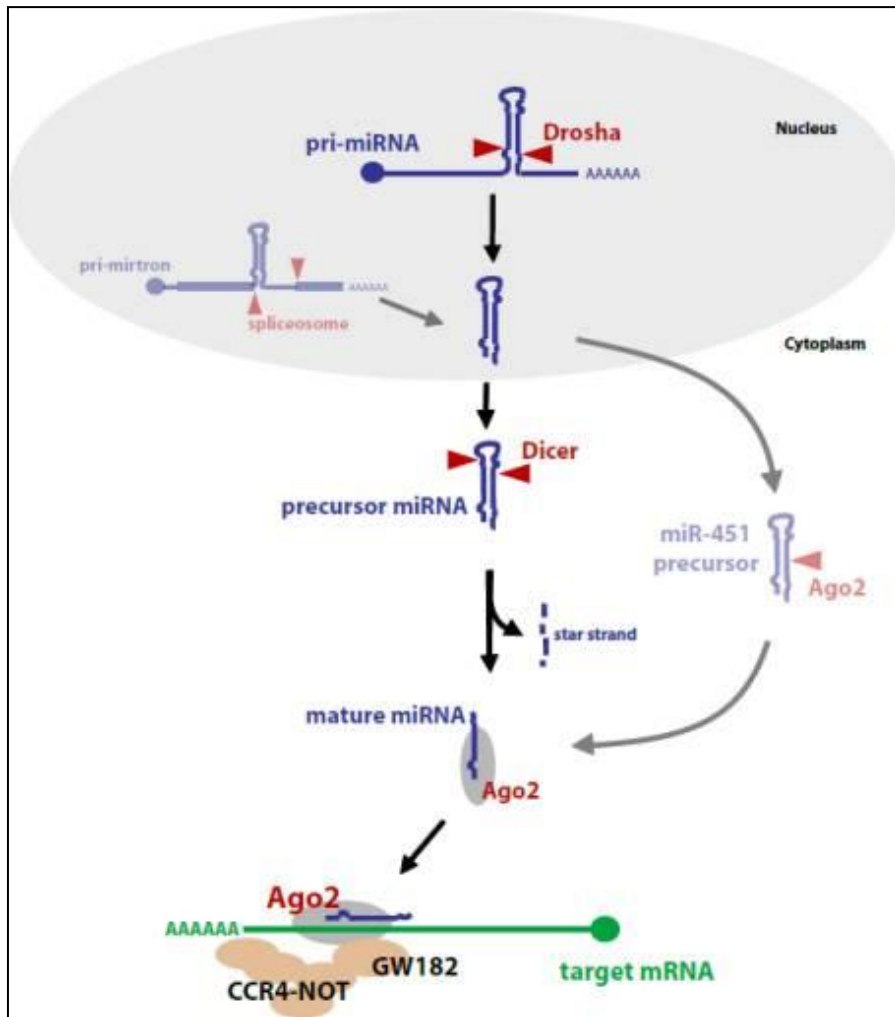
Το πρώτο miRNA ανακαλύφθηκε πριν από περισσότερα από 35 χρόνια στο νηματώδη *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) με την ταυτοποίηση του αναπτυξιακού ρυθμιστή *lin-4* (Horvitz et al.,1980). Το *Lin-4* θεωρήθηκε αρχικά ότι είναι ένα τυπικό γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνη, αλλά απροσδόκητα διαπιστώθηκε από τα εργαστήρια των Runkun και Ambros ότι στην πραγματικότητα κωδικοποιεί ένα ρυθμιστικό RNA 22 νουκλεοτιδίων αντί για πρωτεΐνη (Lee et al., 1993). Έδειξαν ότι το *lin-4* RNA μπορούσε να είναι συμπληρωματικό ως προς την αλληλουχία βάσεων με το mRNA για ένα άλλο γονίδιο στο αναπτυξιακό δίκτυο του *C. elegans*, το *lin-14*, και να ελέγξει την παραγωγή της πρωτεΐνης LIN-14 (Wightman et al.,1993). Αν δεν είχε βρεθεί ένα δεύτερο miRNA, το *let-7*, το εύρημα αυτό θα είχε μικρή επίδραση εκτός της επιστημονικής κοινότητας του *C. elegans* (Reinhart et al., 2000). Ένα αξιοσημείωτο παράδειγμα είναι το *let-7*, το οποίο διατηρείται σε ένα ευρύ φάσμα ειδών, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου (Pasquinelli et al., 2000). Αυτό υποδηλώνει ότι αυτή η κατηγορία βραχέων ρυθμιστικών RNAs έχει μια πιο καθολική λειτουργία στη βιολογία. Ο εντοπισμός της οδού RNAi ήταν το δεύτερο απροσδόκητο εύρημα που έλαβε χώρα περίπου την ίδια εποχή. Συγκεκριμένα, τα ~21 νουκλεοτιδικά RNA ενεργοποιούν τον μηχανισμό αποσιώπησης (Hammond et al.,2000;Zamore et al.,2000). Αυτές οι δύο οδοί έχουν αποδειχθεί από τότε ότι είναι διαφορετικοί βραχίονες της ίδιας οδού αποσιώπησης γονιδίου (Grishok et al.,2001). Στη συνέχεια, πολλές χιλιάδες miRNAs ανακαλύφθηκαν σε πληθώρα οργανισμών και υπάρχουν επί του παρόντος περισσότερα από 2500 σχολιασμένα miRNA στο ανθρώπινο γονιδίωμα (Griffiths-Jones et al.,2006). Δεδομένου ότι κάθε miRNA προβλέπεται ότι ρυθμίζει την έκφραση εκατοντάδων γονιδίων-στόχων, η οδός miRNA στο σύνολό της είναι ένας κρίσιμος μηχανισμός για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης (Bartel et al.,2004; Hammond et al.,2015).

2.2 Βιογένεση miRNAs

Τα πρωτογενή miRNAs (pri-miRNAs) δημιουργούνται ως αποτέλεσμα της μεταγραφής γονιδιωματικών περιοχών εντός ή μεταξύ γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, η οποία ξεκινά τη βιογένεση των miRNAs. Σύμφωνα με τους Visone κ.ά. (2009), η RNA πολυμεράση II και η RNA πολυμεράση III θεωρείται ότι είναι οι κύριοι παράγοντες μεταγραφής για τα prim-miRNAs. Η πρωτεΐνη Drosha, μια ειδική ριβονουκλεάση της οικογένειας ενδονουκλεασών RNase III, κόβει ενζυματικά το μεταγραφόμενο pri-miRNA σε ένα μικρότερο τμήμα (~70 νουκλεοτίδια). Αυτή η φουρκέτα προ-miRNA στη συνέχεια εξάγεται στο κυτταρόπλασμα από την πρωτεΐνη Exportin-5 με τρόπο εξαρτώμενο από Ran-GTP και διασπάται σε ένα δίκλωνο RNA (double stranded RNA-dsRNA), με διπλή ονομασία miRNA, το οποίο ονομάζεται miRNA/miRNA*. Η πρωτεΐνη ενδονουκλεάση RNase III Dicer, η οποία διαθέτει μια περιοχή ελικάσης και μια περιοχή πρόσδεσης dsRNA, είναι υπεύθυνη για την εκτέλεση αυτής της δραστηριότητας. Ο ένας κλώνος του διπλού miRNA/miRNA* επιλέγεται στη συνέχεια για να λειτουργεί ως ώριμο miRNA και κατά προτίμηση φορτώνεται στο σύμπλεγμα ριβονουκλεοπρωτεϊνών miRNA (miRNP), ενώ ο άλλος κλώνος είναι πιθανόν αποικοδομημένος. Ως μέρος του συμπλέγματος miRNP, μεμονωμένα ή πολλαπλά αντίγραφα miRNA συνδέονται με mRNA 3' μη μεταφρασμένες περιοχές (3'UTR). Αυτά που συνδέονται με τέλεια συμπληρωματικότητα οδηγούν σε αποικοδόμηση του mRNA, ενώ η ατελής σύνδεση οδηγεί σε αναστολή της μετάφρασης (Visone et al., 2009). Ειδικότερα η βιογένεση των miRNA ταξινομείται σε κανονικό και μη κανονικό μονοπάτι.

2.2.1 Κανονικό μονοπάτι σηματοδότησης (canonical pathway)

Στο κανονικό μονοπάτι κατά τη βιογένεση miRNAs, το ώριμο miRNA δεσμεύεται στο σύμπλεγμα αποσιώπησης που προκαλείται από RNA (RISC) όπου κατευθύνει το σύμπλοκο στα mRNA-στόχους, οδηγώντας σε μεταφραστική καταστολή και αποικοδόμηση του mRNA στόχου. Ειδικότερα, η πολυμεράση RNA II είναι υπεύθυνη για τη μεταγραφή των miRNAs, όπως φαίνεται στο κέντρο της Εικόνας 2. Το πρόδρομο miRNA παράγεται όταν το ένζυμο Drosha διασπά το μεταγράφημα του pri-miRNA. Το προριμιο miRNA προσκολλάται στο σύμπλοκο χειριστή RISC μετά τη διάσπαση του Dicer, όπου ελέγχει τη μεταφραστική καταστολή των mRNA-στόχων (Hammond et al., 2015).



Εικόνα 3 Οδοί βιογένεσης των miRNAs

(Hammond et al.,2015)

2.2.2 Μη κανονικό μονοπάτι σηματοδότησης (non-canonical pathway)

Δύο καλά χαρακτηρισμένες μη κανονικές διαδρομές βιογένεσης φαίνονται στο ημιδιαφανές γράφημα της **Εικόνας 3**. Το στάδιο επεξεργασίας της Drosha παραλείπεται από τα mirtrons και μια αντίδραση ζευγαρώματος δημιουργεί το πρόδρομο miRNA (pre-miRNA). Τα επόμενα στάδια βιογένεσης είναι όμοια με το κανονικό μονοπάτι σηματοδότησης. Η δεύτερη μη κανονική διαδρομή που παρουσιάζεται είναι συγκεκριμένη για το miR-451. Σε μια ξεχωριστή διαδικασία, το Argonaute 2 (AGO2) δεσμεύει άμεσα και διασπά αυτό το πρόδρομο miRNA. Το υπόλοιπο RNA κόβεται ξανά για να δώσει ένα ώριμο miRNA (Hammond et al.,2015).

2.3 Μηχανισμός Δράσης miRNAs

Μέχρι πρόσφατα, υπήρχε η άποψη ότι τα microRNAs (miRNAs) δρουν κυρίως στο κυτταρόπλασμα σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Είναι ενδιαφέρον ότι τα miRNAs μπορούν να έχουν ρυθμιστική επίδραση τόσο στο κύτταρο (δηλαδή στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα) στο οποίο παράγονται, όσο και σε γειτονικά κύτταρα. Η ενδοκυτταρική μεταφορά του miRNA μεσολαβείται από κανάλια συνδέσεων χάσματος (gap junctions channels) ή εξωσώματα (Lemcke et al., 2018). Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι ενώ τα ώριμα miRNA μπορούν να ελέγχουν έναν ή περισσότερους στόχους mRNA, μπορούν επίσης να συνδέονται και να ελέγχουν πολλαπλά μεταγράμματα mRNA (Sadakierska-Chudy et al., 2020).

Σύμφωνα με τις εκτιμήσεις των Garcia-Lopez et al. (2013) και Lemcke et al. (2018), κάθε miRNA μπορεί να ανιχνεύει 100 έως 200 θέσεις-στόχους μεταγραφών. Σε 1000 αντίγραφα ανά κύτταρο, μπορεί να πραγματοποιηθεί η ανασταλτική επίδραση στην έκφραση. Τα miRNA μπορούν να αναγνωρίσουν και να συνδεθούν με τα 3'UTR, 5'UTR και την αλληλουχία που κωδικοποιείται του mRNA των στόχων τους, καθώς και σε περιοχές υποκινητή. Λαμβάνοντας υπόψη την ποικιλία και τον εντοπισμό των miRNAs, τον τύπο κυττάρου και την κυτταρική κατάσταση, οι δυνατότητές τους να ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων είναι απεριόριστες (Sadakierska-Chudy et al., 2020).

2.3.1 Μεταφραστική Αναστολή ή Ενεργοποίηση

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα ώριμα miRNA σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα με τις πρωτεΐνες Argonaute (AGO) που ονομάζεται σύμπλοκο αποσιώπησης μεσολαβούμενο από miRNA (miRISC) και το οποίο αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων των DICER, TRBP, PACT και GW182. Μία ειδική περιοχή του miRNA η οποία περιλαμβάνει τα νουκλεοτίδια μεταξύ 2 και 8, μετρώντας από το 5' άκρο του miRNA συνδέεται συμπληρωματικά με τα στοιχεία αναγνώρισης miRNA (MREs) που βρίσκονται σε στόχους mRNA. Η σύνδεση του συμπλέγματος miRISC στο 3'UTR οδηγεί σε διάσπαση του mRNA ή αποδιάταξη του mRNA και τελικά αναστολή της μετάφρασης. Για παράδειγμα, η πλήρης συμπληρωματικότητα της ειδικής αυτής περιοχής προς την περιοχή MRE προκαλεί δραστηριότητα ενδονουκλεάσης AGO-2 με αποτέλεσμα τη διάσπαση του mRNA και την αποσταθεροποίηση της αλληλεπίδρασης AGO2-miRNA που τελικά προάγει

την αποικοδόμηση του miRNA (Jo et al.,2015; O'Brien et al.,2018). Αντίθετα, η ατελής συμπληρωματικότητα αποτρέπει τη δραστηριότητα της ενδονουκλεάσης AGO-2 αλλά ξεκινά τη στρατολόγηση της οικογένειας πρωτεϊνών GW182 που οδηγεί σε αποδιάταξη του mRNA. Η πρωτεΐνη GW182 αλληλεπιδρά με την PABPC (polyadenylate-binding protein), η οποία συμβάλλει στην προσέλκυση των συμπλόκων πολυ(A)-δεαδενυλάσης (PAN2-PAN3 και CCR4-NOT) προκειμένου να αποαδενυλιωθεί αποτελεσματικά το mRNA. Στη συνέχεια, το 5'-capping αναγνωρίζεται και απομακρύνεται από τα mRNA μεταγράμματα από τα ένζυμα αποκάλυψης του mRNA (DCP1-DCP2), καθιστώντας το mRNA ευάλωτο στην καταστροφή από την 5'-3' εξωριβονουκλεάση 1 (XRN1) (Behm-Ansmant et al., 2006; Braun et al., 2012).

Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη, η πλειονότητα (66-90%) της επαγόμενης από miRNA καταστολής της μετάφρασης προκαλείται από αναδιάταξη του mRNA (Eichhorn et al., 2014). Επιπλέον, το miRISC μπορεί να αναστείλει τη μετάφραση στο στάδιο έναρξης πιθανώς μέσω της διάστασης των ευκαρυωτικών παραγόντων έναρξης 4A (eukaryotic initiation factors 4A, eIF4A-I και eIF4A-II) καθιστώντας δύσκολη τη σάρωση ριβοσώματος και τη συναρμολόγηση του συμπλέγματος έναρξης μετάφρασης eIF4F (Fukao et al.,2014).

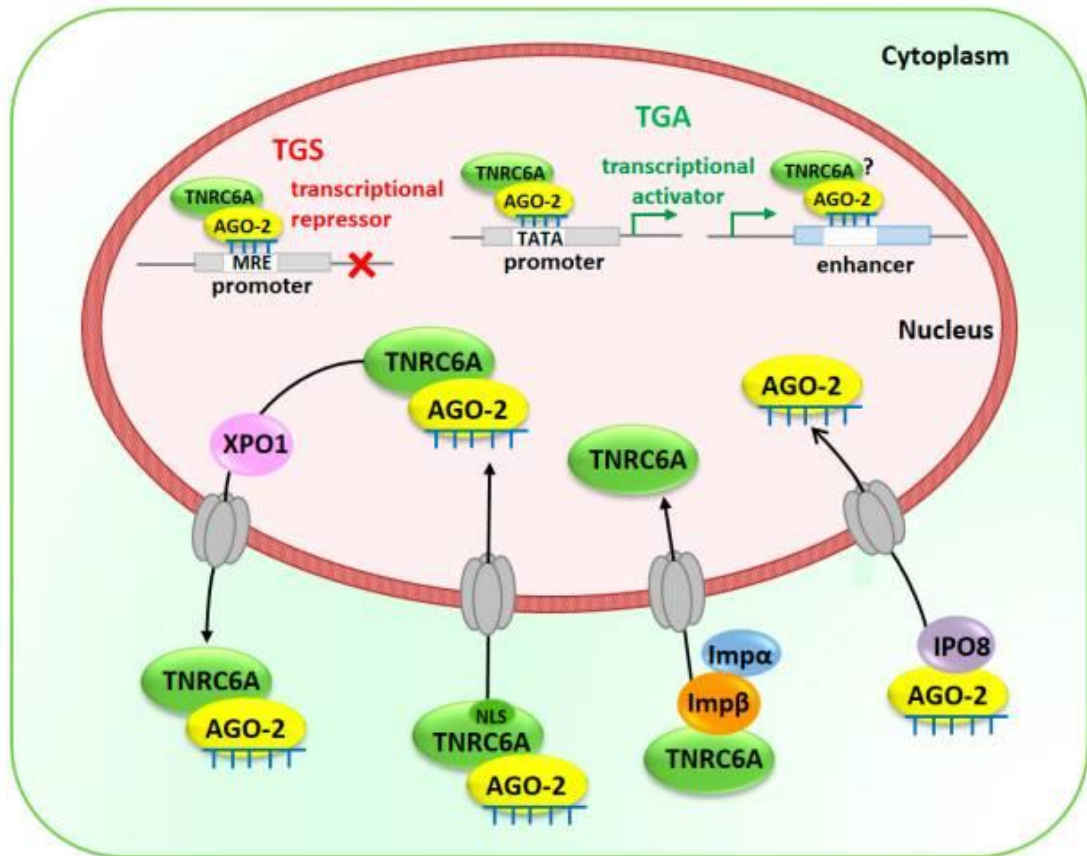
Ακόμα, τα miRNAs μπορούν επίσης να συνδεθούν σε στοχευόμενες θέσεις στην περιοχή κωδικοποίησης και να αναστείλουν τη μετάφραση. Πιθανώς, οι αλληλουχίες στόχου στις περιοχές κωδικοποίησης χρησιμοποιούνται όταν το 3'UTR είναι πολύ μικρό ή προσαρμόζεται στην αφθονία πρωτεΐνης εναλλακτικών παραλλαγών ματίσματος (Brummer et al.,2014). Επιπλέον, μια μελέτη των Sprengler et al. έχει αποκαλύψει μια αφθονία θέσεων-στόχων miRNA σε περιοχές που κωδικοποιούν γονίδια (Sprengler et al.,2016). Προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι ορισμένες έρευνες έχουν διαπιστώσει ότι τα miRNAs που δεσμεύονται σε περιοχές 3'UTR ή 5'UTR μπορούν να ενισχύσουν τη γονιδιακή έκφραση επιταχύνοντας τη μετάφραση των πρωτεϊνών (Vasudevan et al., 2007).

Έχει δειχθεί ότι η ενεργοποίηση της μετάφρασης δύναται να εξαρτάται από την κατάσταση του κυτταρικού κύκλου και τις πρωτεΐνες που συνδέονται με το σύμπλεγμα AGO2-miRNA εντός του 3'UTR. Η ενεργοποίηση της μεταγραφής μέσω miRNA έχει παρατηρηθεί επίσης σε πληθώρα κυττάρων, όπως τα ανώριμα ωκύτταρα του *Xenopus* (π.χ., *Myt1* mRNA μέσω του συμπλέγματος AGO-miR16-FXR1) (Truesdell et al.,2012). Επιπλέον, έχει φανεί πως τα miRNA που συνδέονται με το 5'UTR μπορούν να ενισχύσουν τη μετάφραση μέσω διαφόρων μηχανισμών. Για παράδειγμα, η ειδική δέσμευση

ηπατικού miR-122 στο RNA του ιού της ηπατίτιδας C προστατεύει το μονόκλωνο 5' άκρο από δραστηριότητες κυτταροπλασματικής εξωνουκλεάσης (αυξάνοντας τη σταθερότητα του RNA έναντι του Xrn1) και ενισχύει τη στρατολόγηση ριβοσωμάτων καθώς και πιθανώς παρέχει ένα ικρίωμα για τη δέσμευση άλλων ουσιαστικών παραγόντων για τη διεκπεραίωση της μετάφρασης (Henke et al.,2008; Machlin et al.,2011; Valinezhad Orang et al.,2014). Ένα άλλο παράδειγμα είναι ο miR-10a, ο οποίος διευκολύνει τη μετάφραση των mRNA των ριβοσωμικών πρωτεϊνών απουσία αμινοξέων αλληλεπιδρώντας με το μοτίβο 5' τερματικής ολιγοπυριμιδίνης (5'TOP) (Orom et al., 2008). Ακόμα, το miR-346, που παράγεται κυρίως σε εγκεφαλικούς ιστούς, συνδέεται με το 5'UTR του mRNA της RIP140 (receptor interacting protein 140 -RIP140) εδραιώνοντας τη σύνδεση με τα πολυσώματα και τελικά ενεργοποιώντας τη μετάφραση μέσω ενός ανεξάρτητου από το AGO2 τρόπο (Tsai et al.,2009).

2.3.2 Καθιέρωση ή βελτίωση της Μεταγραφής

Σύμφωνα με μελέτες έχει βρεθεί ότι βασικά στοιχεία του συμπλόκου αποσιώπησης του miRNA μεταδίδονται και προς τις δύο κατευθύνσεις. Έχει αποδειχθεί ότι αρκετές πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων των Importin-8, Importin α/β (Imp α /Imp β) και Exportin-1 (XPO1) μεσολαβούν στη μεταφορά βασικών συστατικών RISC από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, επιπλέον, το XPO1 είναι σε θέση να μεταφέρει το πυρηνικό RISC (σύμπλεγμα miRNA-Ago-TNRC6A) στο κυτταρόπλασμα (Schraivogel et al.,2014). Από τη μία πλευρά, η πρωτεΐνη TNRC6A, επίσης γνωστή ως GW182,που αναφέρθηκε και στην Ενότητα 2.3.1,, μπορεί να μεταφερθεί ανεξάρτητα στον πυρήνα δεσμεύοντας απευθείας με την Imp β και αλληλεπιδρώντας με την Imp α (Schraivogel et al.,2015). Αντίθετα, μέσω της δικής του αλληλουχίας σήματος πυρηνικού εντοπισμού, το TNRC6A διευκολύνει την είσοδο των miRNA που περιέχουν AGO-2 στον πυρήνα (Nishi et al., 2013). Επιπλέον, η AGO-2 μπορεί να εισαχθεί στον πυρήνα μέσω IPO8 μόνο όταν φορτώσει ώριμο miRNA (Wei et al.,2014). Η **Εικόνα 4** απεικονίζει τους διαφορετικούς τρόπους παρουσίας πρωτεϊνών RISC και miRNA από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα.



Εικόνα 4 Μετακίνηση των miRNAs και των συστατικών του συμπλόκου RISC στον πυρήνα

Sadakerska-Chudy et al.,2020

Επιπλέον, προτείνεται ότι ο πυρηνικός εντοπισμός του miRNA μπορεί επίσης να ελεγχθεί από αλληλουχίες σήματος πυρηνικού εντοπισμού σε μόρια miRNA ή πλήρη επεξεργασία των προ-miRNA στον πυρήνα. Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι διάφορα μοτίβα, συμπεριλαμβανομένων των μοτίβων AGUGUU-motif, 5'-UUUGCAUAGU-3' και 5'-AGGUUGKSUG-3' (όπου K είναι μια ουριδίνη ή μια γουανίνη) καθώς και η συναινετική ακολουθία ASUS (όπου S είναι η κυτοσίνη ή μια γουανιδίνη) παρουσιάζονται σε πολλά miRNA και εμπλέκονται στην πυρηνική μετατόπιση (Jeffries et al.,2011; Turunen et al.,2019). Αν και αναγνωρίζονται πλέον πολλοί διαφορετικοί μοριακοί μηχανισμοί, εξακολουθεί να πιστεύεται ότι οι πρωτεΐνες δέσμησης RNA (RBPs) είναι υπεύθυνες για τον έλεγχο της μετατόπισης των miRNAs. Υπάρχουν πολλοί άγνωστοι που πρέπει να ερευνηθούν σε σχέση με την επεξεργασία των προ-miRNA μορίων και τη σύνδεσή τους με το πυρηνικό σύμπλοκο RISC. Η αλληλεπίδραση miRNA-υποκινητή μεσολαβούμενη από

AGO μπορεί καταστέλλει είτε να ενεργοποιεί τη μεταγραφή ανάλογα με τη θέση της περιοχής στόχου και την επιγενετική κατάσταση του υποκινητή (Li et al.,2017).

Η ανάλυση σε επίπεδο γονιδιώματος αποκάλυψε ότι οι ανθρώπινοι υποκινητές περιέχουν θέσεις αντιστοίχισης miRNA, υποδηλώνοντας ότι η ρύθμιση της μεταγραφής με τη μεσολάβηση miRNA είναι πιθανό να είναι ένα κοινό φαινόμενο. Από τη μια πλευρά, οι Benhamed et al. έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες AGO-2 και το miRNA let-7f εμπλέκονται στη μεταγραφική καταστολή των γονιδίων που προάγουν τον πολλαπλασιασμό που ρυθμίζονται από το σύμπλεγμα καταστολέα αμφιβληστροειδούς (Rb)/E2F στη γήρανση (Benhamed et al.,2012). MREs για το let-7f έχουν εντοπιστεί στους υποκινητές δύο γονιδίων-στόχων E2F CDC2 και CDCA8. Ομοίως, ο πυρηνικός miR-522 αναστέλλει την Pol II και τον παράγοντα μεταγραφής από το να συνδεθούν με το γονίδιο CYP2E1, συνδεόμενος με τον υποκινητή του για τη δημιουργία ενός υβριδίου DNA:RNA (Miao et al., 2016). Αντίθετα, οι Zhang et al. (2014) διαπίστωσαν ότι ένας αριθμός miRNAs, συμπεριλαμβανομένων των let-7i, miR-138, miR-92a και miR-181d, συνδέονται σε μοτίβα TATA-box και ενισχύουν τη δραστηριότητα του υποκινητή της ιντερλευκίνης-2, της ινσουλίνης, της καλσιτονίνης ή του c-Myc. Επιπλέον, ο υποκινητής του γονιδίου της κυκλίνης B περιέχει μια αλληλουχία που αλληλεπιδρά με τους miR-744-5p και miR-466d-3p για τη ρύθμιση της μεταγραφής ανοδικά (Huang et al., 2012). Ακόμη πιο πρόσφατα, αποδείχθηκε ότι ορισμένα miRNAs, συμπεριλαμβανομένων των miR-26a-1, miR-339, miR-3179, miR-24-1 και miR-24-2, είχαν τη δύναμη να αυξάνουν τη γονιδιακή ρύθμιση και να επάγουν την έκφραση κοντινών γονιδίων. Επιπλέον, αυτή η μελέτη έδειξε ότι το miR-24-1 (που βρίσκεται στην περιοχή του ενισχυτή) αυξάνει την έκφραση των γονιδίων FBP1 και FANCC και πυροδοτεί άμεση αλλαγή κατάστασης χρωματίνης του ενισχυτή FBP1 που ενεργοποιεί τη μεταγραφή.

Ένα άλλο αξιοσημείωτο γεγονός είναι ότι η μεταγραφική αποσιώπηση γονιδίου (TGS) και η μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίου (TGA) μπορούν να επιτευχθούν με επιγενετική ρύθμιση μεσολαβούμενη από miRNA. Στην πραγματικότητα, τα ένζυμα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης που απαρτίζουν το σύμπλοκο μεταγραφικής καταστολής επαγόμενης από RNA (RITS) ελέγχονται από miRNA (π.χ. HDAC1, EHMT2 και EZH2) και DNA μεθυλοτρανσφεράση (DNMT3A), στον υποκινητή που οδηγεί στη μετάβαση της δομής της ενεργού χρωματίνης σε σιωπηλή (Roberts et al.,2014). Οι διαδικασίες κυτταρικής διαφοροποίησης απαιτούν τον μηχανισμό TGS με τη μεσολάβηση

miRNA. Για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια της κοκκοποίησης, η αλληλεπίδραση του miR-223-RISC με τον υποκινητή του πυρηνικού παράγοντα I-A (NFI-A) έχει ως αποτέλεσμα τη στρατολόγηση συμπλόκου της ομάδας Polycomb και ενζύμων τροποποίησης της ιστόνης που καταστέλλουν τη μεταγραφή του NFI-A, ένα σημαντικό βήμα για την κοκκιοκυτταρική διαφοροποίηση (Zardo et al.,2012). Έχει προταθεί ότι ένα συγκεκριμένο miRNA μπορεί να πυροδοτήσει την TGS σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μέσω της αντιγραφής της χρωματίνης ή της de novo μεθυλίωσης του DNA. Στην πραγματικότητα, το miR-10a με AGO-1 και AGO-3 μειώνει την έκφραση HOX4 σε κύτταρα ανθρώπινου μαστού μεσολαβώντας στην de novo μεθυλίωση του DNA και συσσώρευση κατασταλτικών σημαδιών χρωματίνης (H3K27me3 και H3K9me2, διμεθυλοιστόνη H3 λυσίνη 9) στον υποκινητή της (Tan et al.,2009).

Εναλλακτικά, το σύμπλοκο AGO-miRNA μπορεί να στρατολογήσει ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο που περιέχει μεταγραφικούς ενεργοποιητές (όπως μεταγραφικούς παράγοντες) σε lncRNA (long non-coding RNA), το οποίο διαταράσσει τη στρατολόγηση πρωτεϊνών αποσιώπησης (όπως η PRC2), ή μπορεί να ενεργοποιήσει την έκφραση των τόπων-στόχων (Ramchandran et al., 2017). Στον πυρήνα, τα lncRNA ρυθμίζουν την επιγενετική αποσιώπηση γειτονικών γονιδίων μέσω της στρατολόγησης παραγόντων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης σε κοντινή απόσταση από τους υποκινητές τους. Για το miR-744 και το γονίδιο CCnb1, απαιτούνται ενεργά πρότυπα χρωματίνης (συμπεριλαμβανομένου του H3K4me3) και η πρόσληψη των πρωτεϊνών πρόσδεσης AGO και Pol II RNA στους υποκινητές των γονιδίων για τη μεσολαβούμενη από miRNA TGA (Huang et al., 2012). Επιπλέον, το miR-373 ενεργοποιεί τη μεταγραφή των γονιδίων E-cadherin και CSC2 μόνο μέσω εμπλουτισμού του RNA Pol II στους υποκινητές τους, ενώ το miR-205 επάγει την έκφραση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων IL24 και IL32 στοχεύοντας συγκεκριμένες θέσεις στους προαγωγείς τους ως καλά εμπλουτισμός του RNA Pol II και τροποποιήσεις ενεργού χρωματίνης (Majid et al.,2010).

Παρόμοια με τα κυτταροπλασματικά miRNA, τα πυρηνικά miRNA μπορούν επίσης να μεσολαβήσουν στη μετα-μεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση (PTGS) που προκαλεί την αποδόμηση των mRNA-στόχων. Αρκετές μελέτες υποδηλώνουν ότι τα miRNA συμβάλλουν στη ρύθμιση των προδρόμων miRNA και των μεταγραφών του lncRNA (Roberts et al.,2014). Για παράδειγμα, το πυρηνικό miR-709 ποντικού εμπλέκεται στη μετα-μεταγραφική ρύθμιση του pri-miR-15a/miR-16-1, δεσμεύεται σε ένα στοιχείο

αναγνώρισης 19-nt και εμποδίζει την επεξεργασία των πρωτογενών μεταγραφών, επομένως, τα πυρηνικά miRNA μπορούν επηρεάζουν τη βιογένεση άλλων miRNA υποδηλώνοντας ιεραρχικές δομές μεταξύ των miRNA (Tang et al.,2012). Επιπλέον, ορισμένα lncRNA του πυρήνα ρυθμίζονται επίσης από σύμπλοκα AGO-miRNA που αλληλεπιδρούν με συμπληρωματικές αλληλουχίες miRNA που βρίσκονται στα lncRNA, μειώνοντας έτσι τη σταθερότητα και τη λειτουργία τους (Catalanotto et al.,2016).

2.3.3. Ρύθμιση εναλλακτικού ματίσματος- alternative splicing

Ελέγχοντας τη μετάφραση πολλαπλών συστατικών ωρίμανσης, τα miRNAs μπορούν να ελέγχουν έμμεσα την εναλλακτική ωρίμανση. Παρ' όλα αυτά, ολοένα και περισσότερα στοιχεία υποδεικνύουν την πιθανότητα τα σύμπλοκα AGO-miRNA να ασκούν άμεσο έλεγχο στη ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος στον πυρήνα μέσω τόσο επιγενετικών όσο και μη επιγενετικών μηχανισμών. Μια μελέτη συν-ανοσοκατακρήμνισης εντόπισε πολλαπλούς παράγοντες ματίσματος που σχετίζονται με το AGO, ενώ πειράματα υπερέκφρασης των AGO-1, AGO-2 και DICER1 επιβεβαίωσαν τη συμμετοχή τους σε αποφάσεις ματίσματος σε εναλλακτικά ματισμένα εξόνια (Allo et al.,2009; Ameyar-Zazoua et al.,2012). Στον άνθρωπο, τον ανθρώπινο εγκέφαλο και τα ανθρώπινα καρδιακά κύτταρα, οι θέσεις πρόσδεσης miRNA είχαν προηγουμένως ανακαλυφθεί μέσω μοριακών ερευνών μέσα σε ενδοτρονικές περιοχές (Chi et al.,2009; Boudreau R.L et al.,2014). Προτείνεται ότι η συμπίεση της δομής της χρωματίνης με τη μεσολάβηση miRNAs σε συγκεκριμένες συνδέσεις εξονίου-ιντρονίου επιβραδύνει τον ρυθμό επιμήκυνσης του RNA Pol II, γεγονός που ευνοεί την ενσωμάτωση εξονίων. Παραδόξως, η παράκαμψη εξονίου μπορεί να επιτευχθεί με μονόκλινα ολιγονουκλεοτίδια (single stranded siRNA, ss-siRNA), τα οποία ενσωματώνονται από το AGO-2 στο κυτταρόπλασμα, στη συνέχεια μεταφέρονται στον πυρήνα όπου το σύμπλεγμα AGO2-ss-siRNA συνδέεται με το mRNA στόχο και διαταράσσει τη σύνδεση με τη μηχανή ματίσματος (Liu et al.,2015).

Συνολικά, οι παραπάνω γνώσεις απεικονίζουν τους πολύπλοκους ρυθμιστικούς μηχανισμούς γονιδιακής έκφρασης με μεσολάβηση miRNA στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα. Τα miRNAs μπορούν να ενεργοποιήσουν ή να αναστείλουν τη γονιδιακή έκφραση τόσο στο μεταγραφικό όσο και στο μετα-μεταγραφικό στάδιο και εμπλέκονται σε πολλές σημαντικές κυτταρικές ρυθμιστικές διαδικασίες (Sadakierska-Chudy et al., 2020). Έτσι, η απορρύθμιση της βιογένεσης και της λειτουργίας των miRNAs μπορεί να προκαλέσει

διαταραχές στις διαδικασίες οδηγώντας σε πληθώρα ανθρωπίνων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του πνεύμονα. Ως εκ τούτου, τα miRNA είναι πολύτιμα ως διαγνωστικοί και προγνωστικοί βιοδείκτες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, του σακχαρώδους διαβήτη, των καρδιαγγειακών παθολογιών και των νευρολογικών διαταραχών. Επιπλέον, σύμφωνα με τους Sadakierska-Chudy et al. (2020), τα miRNAs θεωρούνται νέοι στόχοι για καινοτόμα φάρμακα και θεραπευτικά σχέδια.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 3. Σκοπός της Διπλωματικής Εργασίας

Τα micro-RNAs (miRNAs) αποτελούν κατηγορία μη κωδικοποιών μορίων RNA που έχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και αλληλεπιδρούν δυναμικά με τα γονίδια-στόχους. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι αφενός η διερεύνηση της έκφρασης και εμπλοκής των miRNAs στον καρκίνο του πνεύμονα, και αφετέρου η αποσαφήνιση του ρόλου τους ως πιθανών βιοδεικτών για τη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα.

Κεφάλαιο 4. Μεθοδολογία και Περιορισμοί

Τα δεδομένα για την παρούσα Ανασκόπηση ταυτοποιήθηκαν από αναζητήσεις στις Βάσεις δεδομένων PubMed, Scopus και Google Scholar με τον όρο «microRNA» σε συνδυασμό με τους όρους «cancer», «lung cancer», «circulating», «biomarkers», «therapeutics». Συμπεριλήφθηκαν review articles, research articles και systematic reviews. Έγινε επίσης αναζήτηση στις βιβλιογραφικές αναφορές των άρθρων που εντοπίστηκαν. Το μικροκυτταρικό καρκίνωμα και το μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα ήταν οι μόνες ιστορικές μορφές που καλύφθηκαν σε αγγλόφωνα άρθρα. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε περιορισμός ως προς την ημερομηνία δημοσίευσης, καθώς λήφθηκαν υπόψη μόνο άρθρα της τελευταίας δεκαετίας.

Κεφάλαιο 5. Τα micro-RNAs στον καρκίνο του πνεύμονα

5.1 Ρόλος των miRNAs στην καρκινογένεση

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει κρίσιμους ρόλους για τα miRNAs στη ρύθμιση βασικών κυτταρικών διεργασιών όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η μετανάστευση, η απόπτωση, ο μεταβολισμός και η στρεσογόνος απόκριση (Di Leva et al.,2014). Τα miRNAs έχει αποδειχθεί ότι λειτουργούν ως βασικοί ρυθμιστές στην παθογένεση ασθενειών , ιδιαίτερα του καρκίνου (Garzon et al.,2009; Plank et al.,2013; Fernández-Hernando et al.,2013; Tao et al.,2013).

Τα miRNA φέρνουν νέες γνώσεις στην έρευνα για τον καρκίνο. Τα προηγούμενα χρόνια, βρέθηκε ότι πάνω από το 50% των γονιδίων miRNA βρίσκονται σε περιοχές του γονιδιώματος που σχετίζονται με τον καρκίνο και σχηματίζουν κεντρικούς κόμβους στα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη καρκίνου στον άνθρωπο (Di Leva et al.,2014). Στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ), οι Calin et al.(2002) έχουν μάλιστα υποθέσει ότι η απορρύθμιση των miRNA μπορεί να διαδραματίσει θεμελιώδη ρόλο στην ανάπτυξη, εξέλιξη και εξάπλωση πολλών τύπων καρκίνου(Tan et al.,2018) Συγκεκριμένα, έδειξαν ότι τα miR-15a και miR-16-1 υπορυθμίστηκαν ή διαγράφηκαν στην πλειονότητα των ασθενών με ΧΛΛ. Ωστόσο, είναι δύσκολο να αποσαφηνιστεί ο πολύπλοκος ρόλος των miRNA στον καρκίνο. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα miRNA ρυθμίζουν πολλά μονοπάτια μοριακής σηματοδότησης του καρκίνου στοχεύοντας ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια (Zhang et al.,2007), συμπεριλαμβανομένων των βιολογικών οδών (Leal et al.,2013), της αγγειογένεσης (Anand et al.,2013), της EMT , της μετάστασης (Ding et al.,2014) και της αντίστασης στη φαρμακευτική θεραπεία (Raza et al.,2014).

Έχει προταθεί ότι τα χαρακτηριστικά του ανθρώπινου καρκίνου περιλαμβάνουν έξι βιολογικές ικανότητες που αποκτήθηκαν κατά την ανάπτυξη του όγκου, συμπεριλαμβανομένης της διατήρησης της πολλαπλασιαστικής ικανότητας, της αποφυγήςκαταστολής ανάπτυξης, της αντίστασης στον κυτταρικό θάνατο, της ενεργοποίησης της εισβολής και της μετάστασης και της πρόκλησης αγγειογένεσης (Peng et al.,2016). Δεδομένης της μη φυσιολογικής έκφρασης miRNA στους όγκους, πιστεύεται ότι τα απορυθμισμένα miRNAs θα μπορούσαν να επηρεάσουν ένα ή περισσότερα από τα χαρακτηριστικά του καρκίνου για την έναρξη και την εξέλιξη του όγκου. Ανάλογα με τα

γονίδια-στόχους τους, τα miRNA θα μπορούσαν να λειτουργήσουν είτε ως ογκογονίδια είτε ως ογκοκατασταλτικά υπό ορισμένες συνθήκες.

Κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Το σημαντικότερο χαρακτηριστικό του καρκίνου είναι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η ανωμαλία του είναι ο πρωταρχικός παράγοντας της καρκινογένεσης. Προκειμένου να εξισορροπηθεί η ενθάρρυνση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και η καταστολή του, η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζεται περίπλοκα από εσωτερικά σήματα και εξωκυτταρικά μόρια σήματος. Όταν η κυτταρική ανάπτυξη ή διαίρεση είναι εκτός ελέγχου, τα κύτταρα ενδέχεται να αναπτύξουν καρκίνο. Με τα χρόνια των μελετών, γίνεται προφανές ότι ορισμένα miRNA ενσωματώνονται λειτουργικά σε πολλαπλά κρίσιμα μονοπάτια πολλαπλασιασμού κυττάρων και η απορρύθμιση αυτών των miRNA είναι υπεύθυνη για την αποφυγή καταστολής ανάπτυξης και τη διατήρηση της πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης στα καρκινικά κύτταρα. Μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που ονομάζονται πρωτεΐνες E2F διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού με τρόπο που εξαρτάται από τον κυτταρικό κύκλο. Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι τα miRNAs έχουν ρόλο στον έλεγχο της έκφρασης του E2F. Το μέλος E2F, E2F1, επάγει τη μεταγραφή γονιδίου στόχου κατά τη μετάβαση από G1 σε S, και ορίζεται ως ογκοκατασταλτικό επειδή τα ποντίκια με έλλειψη E2F1 ανέπτυξαν μεγάλη ποικιλία καρκίνων (Peng et al., 2016). Οι O'Donnell et al. έδειξαν ότι το **miR-17-92** αναστέλλει τη μετάφραση του E2F1 αφού ενεργοποιηθεί από το c-Myc. Το σύμπλοκο miR-17-92 μπορεί να λειτουργεί ως φρένο σε αυτόν τον πιθανό βρόχο θετικής ανατροφοδότησης για να αποτρέψει την περαιτέρω αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης E2F1 ως απόκριση στην ενεργοποίηση του c-Myc, επειδή ο c-Myc διεγείρει επίσης άμεσα την έκφραση του E2F1 (O'Donnell et al., 2005- Coller et al., 2007).

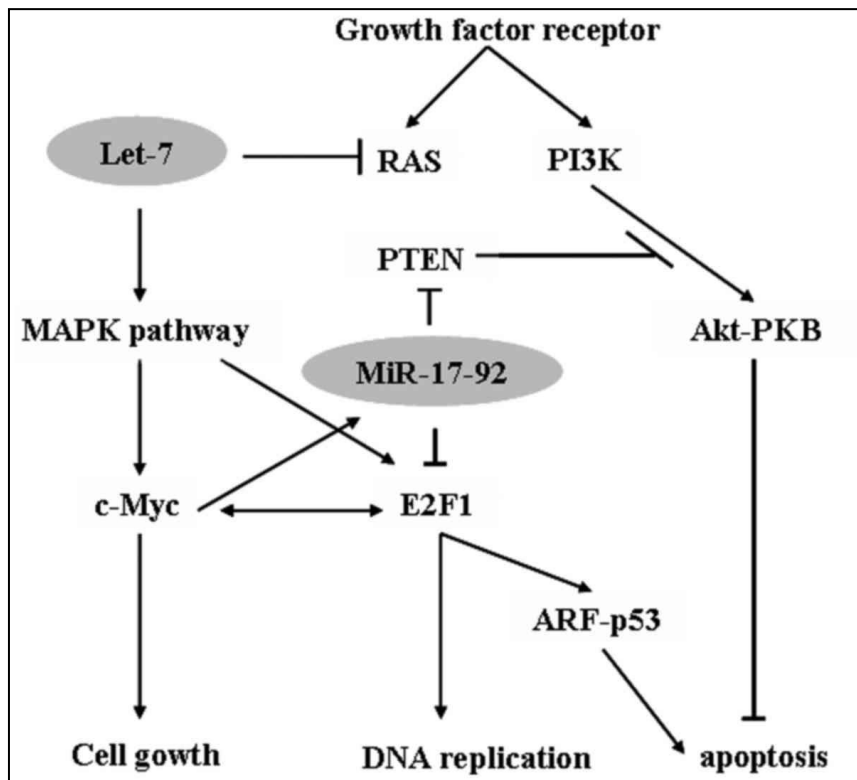
Το **miR- 17–92** βρέθηκε επίσης ότι ρυθμίζει τη μετάφραση E2F2 και E2F3, και οι παράγοντες μεταγραφής E2F μπορούν με τη σειρά τους να προκαλέσουν την έκφραση του συμπλέγματος miR-17–92 (Peng et al., 2016) Επομένως, το σύστημα ανάδρασης μεταξύ του συμπλέγματος miR-17–92 και του E2F παρέχει έναν μηχανισμό για τη διατήρηση της κανονικής εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου υπό κανονικές συνθήκες. Ωστόσο, η υπερέκφραση του miR-17-92, η οποία είναι διαδεδομένη σε πολλούς όγκους, διακόπτει τον βρόχο ανατροφοδότησης που ενθαρρύνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Διαφορετικές κυκλίνες, κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες (Cdk) και οι αναστολείς τους απαιτούνται για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και ρυθμίζονται σε μεγάλο βαθμό από miRNAs. Φάνηκε πως βλαστοκύτταρα με ανεπάρκεια Dicer εμφάνισαν αυξημένη έκφραση του Dacapo, μέλους της οικογένειας αναστολέων Cdk p21/p27, υπονοώντας ότι αυτή η πρωτεΐνη ρυθμίζεται αρνητικά από τα miRNAs για την προώθηση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου. Στα κύτταρα γλοιοβλαστώματος, ο miR-221/222 βρέθηκε να στοχεύει ειδικά τον αναστολέα Cdk p27Kip1, γεγονός που επαληθεύτηκε αργότερα σε πρόσθετες καρκινικές κυτταρικές σειρές και πρωτογενή δείγματα όγκων. Η έκτοπη έκφραση του miR-221/222 επιτάχυνε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ η καταστολή τους προκάλεσε διακοπή του κυτταρικού κύκλου G1 σε καρκινικά κύτταρα (Peng et al.,2016). Περαιτέρω ενδείξεις ότι ο έλεγχος των miR-221/222 της p27Kip1 είναι μια νόμιμη ογκογόνος οδός προέρχονται από την ανακάλυψη ότι η έκφραση των miR-221/222 είναι ανοδικά αυξημένη σε μια σειρά ανθρώπινων καρκίνων.

Ομοίως με τον τρόπο με τον οποίο miRNAs όπως το miR-663, η οικογένεια miR-302 και το miR-24 ρυθμίζουν τα p27Kip1, p21CIP1 και p16INK4a. Το miR-663 βρέθηκε να ρυθμίζεται προς τα πάνω στο ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα και να δρα ως ογκογονίδιο για την προώθηση του κυττάρου G1 S μετάβαση in vitro και in vivo στοχεύοντας απευθείας το p21CIP1. Επομένως, ο άξονας miR-663/p21CIP1 αποσαφηνίζει τον μοριακό μηχανισμό του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του ρινοφαρυγγικού καρκινώματος (Lal et al.,2008)

Εκτός από το ότι επηρεάζουν την έκφραση των αναστολέων Cdk, τα miRNA είναι επίσης ρυθμιστές για την έκφραση της Cdk και της κυκλίνης. Παραδείγματος χάριν, το miRNA-545 προκαλεί τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου σε καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα αναστέλλοντας την παραγωγή της κυκλίνης D1 και του CDK4.79 Τα miRNAs παίζουν ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ρυθμίζοντας σε μεγάλο βαθμό πολυάριθμες σηματοδοτικές οδούς εκτός από τη στόχευση συγκεκριμένων συστατικών του κυτταρικού κύκλου. Για παράδειγμα, το **miR-486**, που έχει μειωθεί σημαντικά στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, βρέθηκε ότι επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση μέσω των οδών σηματοδότησης του υποδοχέα ανάπτυξης ινσουλίνης (IGF) και του PI3K στοχεύοντας τα IGF1, IGF1R και p85α (Peng et al.,2013).

Στην **Εικόνα 5** παρουσιάζεται η αλληλεπίδραση των miRNAs με γονίδια στόχους και η δράση τους ως ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά.



Εικόνα 5 miRNAs ως ογκογονίδια ή ογκοκατασταλτικά γονίδια (Tan et al.,2018).

Το let-7 καταστέλλει τη μετάφραση του γονιδίου Ras GTPase. Η καθοδική ρύθμιση του let-7 προάγει τον κυτταρικό κύκλο μέσω της οδού Ras-MAPK. Το miR-17-92 μπορεί να εμποδίσει την απόπτωση που προκαλείται από ογκογονίδιο.

Αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο

Η αποφυγή της απόπτωσης είναι ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό της εξέλιξης του όγκου, το οποίο πιστεύεται ότι ρυθμίζεται από τα miRNAs (Lima et al.,2011;Li et al.,2012) Τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν πολλές διαφορετικές μεθόδους για να αποφύγουν ή να αποφύγουν την απόπτωση. Η πιο συχνή από αυτές είναι η απώλεια της ικανότητας του p53 να εμποδίζει την ανάπτυξη του όγκου. Η ανοδική ρύθμιση των αντι-αποπτωτικών ρυθμιστών, η καταστολή των προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών και η παρεμπόδιση της οδού θανάτου που παράγεται από εξωγενείς συνδέσμους αποτελούν εναλλακτικές μεθόδους για την αποτροπή της απόπτωσης. Τα MiRNAs συχνά καταστέλλουν ή ενεργοποιούν τα στοιχεία που εμπλέκονται στην αντι-απόπτωση. Υπάρχουν πολυάριθμα miRNAs που έχουν συνδεθεί με τις λειτουργίες του p53 και ορισμένα από αυτά τα miRNAs έχουν την ικανότητα να ελέγχουν τη δραστηριότητα και τα επίπεδα του p53 με τρόπο ανατροφοδοτούμενο. Για παράδειγμα, οι Pichiorri et al.

ανακάλυψαν ότι τρία miRNAs (miR-192, miR-194 και miR-215) που ενεργοποιούνται μεταγραφικά από το p53 να συνδέονται άμεσα με το mRNA της Mdm2 και να καταστέλλουν την παραγωγή της Mdm2 στο πολλαπλό μυέλωμα, εμποδίζοντας την αποδόμηση του p53. Αυτά τα miRNAs είναι θετικοί ρυθμιστές του p53 και η υπερέκφρασή τους είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη του πολλαπλού μυελώματος (Pichiorri et al., 2010).

Μεταξύ των miR-122 και του p53, λαμβάνει χώρα μια ακόμη αρνητική ρύθμιση ανατροφοδότησης. Το miR-122 προάγει τη δραστηριότητα της p53 μέσω της στόχευσης της κυκλίνης G184 και αυξάνει την ευαισθησία των κυττάρων στο φάρμακο δοξορουβικίνη, θέτοντας μια βάση για την ανάπτυξη συνδυασμένης θεραπείας με βάση το χημειο- και το miRNA για το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα. Η απορρύθμιση άλλων miRNA που ρυθμίζονται από το p53 προσδίδει επίσης καρκινικά κύτταρα ανθεκτικά στην απόπτωση. Για παράδειγμα, το σύμπλεγμα **miR-17-92** είναι ένας νέος στόχος για μεταγραφική καταστολή που προκαλείται από το p53 υπό υποξία. Η υπορρύθμισή του ευαισθητοποιεί τα κύτταρα σε απόπτωση που προκαλείται από υποξία, ενώ η υπερέκφρασή του αναστέλλει την απόπτωση. Ως αποτέλεσμα, τα καρκινικά κύτταρα με αυξημένη έκφραση του miR-17-92 είναι σε θέση να αντισταθούν στην απόπτωση που προκαλεί η υποξία (Yan et al., 2009; Peng et al., 2016). Όλα τα προαναφερθέντα ευρήματα έδειξαν ότι, υπό κανονικές συνθήκες, το p53 και τα miRNAs που ελέγχει αποτελούν ένα δίκτυο για την περίπλοκη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου.

Ωστόσο, είναι πιθανό ότι τα καρκινικά κύτταρα με ανεβασμένη p53 ή με κατεβασμένα miRNAs της μπορούν να αντέξουν τον κυτταρικό θάνατο. Ορισμένα miRNAs, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό θάνατο, έχουν τη δυνατότητα να στοχεύουν τόσο τα προ- όσο και τα αντι-αποπτωτικά παράγωγα (Bax, Bim και Puma) και τους ρυθμιστές της απόπτωσης (Bcl-2 και Bcl-xL). Στη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία, η έκφραση των miR-15a και miR-16-1 ρυθμίζεται σημαντικά προς τα κάτω και η έκφρασή τους συνδέεται αντιστρόφως ανάλογα με την έκφραση του Bcl-2. Περαιτέρω έρευνα αποκάλυψε ότι αυτά τα δύο miRNA επάγουν την απόπτωση και καταστέλλουν την έκφραση του Bcl-2. Άλλα miRNAs, όπως τα miR-204,87, miR-148a88 και miR-365, έλεγχαν επίσης το Bcl-2. Στοχεύοντας ειδικά το προαποπτωτικό γονίδιο PUMA σε ανθρώπινα κύτταρα γλοιώματος, τα miR-221/222 αποτρέπουν τον κυτταρικό θάνατο. Ωστόσο, η απενεργοποίηση των miR-221/222 έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση του PUMA και την

απόπτωση των κυττάρων, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι miR-221/222 μπορεί να αποτελέσουν πιθανό θεραπευτικό στόχο για την παρέμβαση στο γλοιοβλάστωμα (Zhang et al., 2010).

Ελέγχοντας εξωτερικά στοιχεία της αποπτωτικής οδού, όπως ο ligand Fas/FasL, τα miRNAs εμπλέκονται επίσης στην αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο. Το **miR-21**, που συχνά ρυθμίζεται προς τα πάνω σε μια ποικιλία καρκίνων, ασκεί μια αντι-αποπτωτική λειτουργία σε όγκους του πνεύμονα που εξαρτώνται από k-Ras αναστέλλοντας την έκφραση του Araf-1, ενός σημαντικού συστατικού της ενδογενούς μιτοχονδριακής αποπτωτικής οδού και μειώνοντας τα επίπεδα πρωτεΐνης του Fas πρόσδεμα, βασικός εκκινητής της εξωγενούς αποπτωτικής οδού (Wang et al., 2013).

Εκτός από τη ρύθμιση της έκφρασης συνδέτη, τα απορυθμισμένα miRNA αντιστέκονται επίσης στον κυτταρικό θάνατο μέσω της ρύθμισης της έκφρασης των υποδοχέων θανάτου. Για παράδειγμα, οι Razumilava et al. ανακάλυψαν ότι ο miR-25, ο οποίος υπερεκφράζεται σε κακοήθη κύτταρα χολαγγειοκαρκινώματος, είναι ικανός να αποτρέπει τον θάνατο των κυττάρων όταν εφαρμόζεται ένας συνδέτης που προκαλεί απόπτωση σχετιζόμενη με τον TNF, στοχεύοντας τον υποδοχέα θανάτου-4 (DR4).

Διέγερση της εισβολής και της μετάστασης

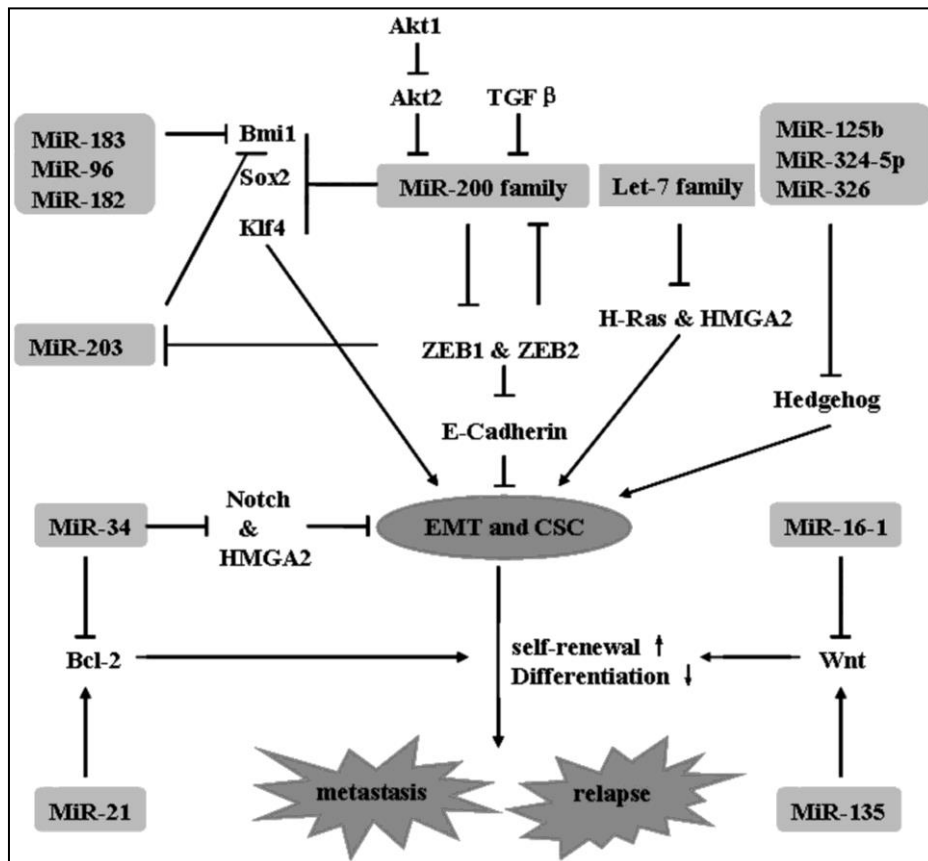
Μια πολύπλοκη, δυναμική και περίπλοκη βιολογική διαδικασία είναι η μετάσταση. Η απώλεια της κυτταρικής προσκόλλησης που προκαλείται από την αναστολή της E-καντερίνης και η ενεργοποίηση γονιδίων που σχετίζονται με την κινητικότητα και την εισβολή είναι χαρακτηριστικά της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT), η οποία θεωρείται σημαντική και πρώιμη φάση της μεταστατικής οδού. Η ενεργοποίηση της διαδικασίας EMT αυξάνει τους ρυθμούς μετανάστευσης και διήθησης στα καρκινικά κύτταρα, ενώ η ενεργοποίηση της αντίστροφης μετάβασης από μεσεγχυματικό σε επιθήλιο απαιτείται για την ανάπτυξη της μετάστασης (MET). Η έκφραση της E-cadherin από το γονίδιο Cadherin 1 είναι απαραίτητη για τη διατήρηση ενός τύπου επιθηλιακών κυττάρων (Liu et al., 2014). Παράγοντες μεταγραφής EMT που χρησιμεύουν ως καταστολείς της E-cadherin - όπως οι (SNAI)1/SNAI2, βασικές πρωτεΐνες έλικας-βρόχου-έλικας συμπεριλαμβανομένων των E47, E2-2, (TWIST)1/TWIST2 και ZEB1 /ZEB2, ενεργοποιούν τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιώντας το EMT (Garg et al., 2013).

Ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας (TGF) είναι ένα από τα κανάλια σηματοδότησης που υποτίθεται ότι ελέγχει τη διαδικασία EMT. Αποδείχθηκε ότι τα miRNAs που ρυθμίζονται από τον TGF εμπλέκονται στη σηματοδότηση TGF για την προώθηση της μετάστασης και την επαγωγή της EMT στον προχωρημένο καρκίνο. Ένα miRNA που εμπλέκεται σε αυτό το μονοπάτι ρύθμισης είναι το miR-155. Υπερεκφράζεται σε έναν αριθμό καρκίνων και η σηματοδότηση TGF-/SMAD4 ενεργοποιεί τη μεταγραφή του. Ένας βασικός ρυθμιστής της κυτταρικής πλαστικότητας και της δημιουργίας και διατήρησης των στενών συνδέσεων, η RhoA GTPάση, αποδείχθηκε ότι είναι ο στόχος των μηχανιστικών πειραμάτων που έδειξαν πώς το miR-155 προωθεί την EMT. Η εξουδετέρωση του miR-155 καταστέλλει την επαγόμενη από τον TGF-β EMT και τη διάλυση σφιχτού συνδέσμου, καθώς και τη μετανάστευση και την εισβολή των κυττάρων (Peng et al., 2016)

Η οικογένεια **miR-200**, τα **miR-27** και **miR-205** αναστέλλουν τα ZEB1 και ZEB2 (Tellez et al., 2011; Young et al., 2013). Η έκφραση του MiR-200 και τα επίπεδα της E. καδερίνης συνδέονται θετικά στον καρκίνο του μαστού. Η αποκατάσταση της έκφρασης του miR-200 είναι αρκετή για να σταματήσει η μετάβαση (από μεσεγχυματικό σε επιθηλιακό) σε κύτταρα που προέρχονται από νεφρούς. Η έκφραση των μελών της οικογένειας MiR-30 συσχετίζεται αντίστροφα με τον μεσεγχυματικό φαινότυπο σε παγκρεατικά επιθηλιακά κύτταρα (Zhang et al., 2012). Σε κυτταρικές σειρές καρκίνου των ωοθηκών που μοιάζουν με μεσεγχυματικά, η υπερέκφραση του miR-429 αντιστρέφει την EMT (Chen et al., 2011).

Η ρύθμιση των βλαστικών κυττάρων του καρκίνου του μαστού υποτίθεται ότι επηρεάζεται από την οικογένεια let-7, την οικογένεια miR-200 και την οικογένεια miR-30. Στα βλαστικά κύτταρα του καρκίνου του μαστού, παρατηρείται υπορρύθμιση της οικογένειας let-7. Ελέγχοντας τα CSCs του μαστού, τα μέλη της οικογένειας let-7 συνδέονται με την ανάπτυξη όγκων και τη μετάσταση του καρκίνου του μαστού σε όγκους που ρυθμίζονται προς τα πάνω. Η απώλεια της αυτοανανέωσης (αποσιώπηση του RAS) προκαλείται από το Let-7. Τα CSC του μαστού, τα οποία περνούν από επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) ως απόκριση στη σηματοδότηση του μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα, έχουν δραματικά αυξημένα επίπεδα της οικογένειας miR-200, η οποία περιλαμβάνει τους miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429, μαζί με τους miR-145 και miR-146. Επιπλέον, τα μέλη της οικογένειας miR-200 έχουν στόχους τα

γονίδια των βλαστικών κυττάρων SOX2, Krüppel-like factor 4, BMI-1, Suz12, ZEB1 και ZEB2. Ο ανταγωνισμός του miR-30 με αντιφλεγμονώδη ολιγονουκλεοτίδια αυξάνει την αυτοανανέωση, την αναγέννηση του όγκου και τη μετάσταση σε διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα του μαστού, ενώ η χαμηλή έκφραση του miR-30 καταστέλλει την αυτοανανέωση των βλαστικών κυττάρων του καρκίνου του μαστού (Tan et al., 2017) [Εικόνα 6].



Εικόνα 6 miRNAs και πιθανοί ρυθμιστικοί μηχανισμοί τους στον καρκίνο (Tan et al., 2018)

Αυτά τα miRNA ρυθμίζουν γονίδια στόχους που εμπλέκονται στις διαδικασίες των καρκινικών κυττάρων. Η μη φυσιολογική έκφραση αυτών των υποθετικών miRNAs στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα υποδηλώνει ότι τα γονίδια που ρυθμίζονται προς τα κάτω προκαλούν αύξηση της αυτοανανέωσης και μείωση των επιπέδων ενδοκυτταρικής απόπτωσης. Αυτό προάγει την εξάπλωση του καρκίνου.

Αγγειογένεση

Η αγγειογένεση είναι μια εξαιρετικά συντονισμένη διαδικασία για την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων από προϋπάρχοντα για την ικανοποίηση των αναγκών για τροφή και οξυγόνο στην ανάπτυξη και μετάσταση του όγκου. Καθώς οι ιστοί του όγκου

έχουν σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση οξυγόνου από τους περιβάλλοντες φυσιολογικούς ιστούς, η υποξία έχει κρίσιμο ρόλο στο μικροπεριβάλλον του όγκου, επιτρέποντας την ανάπτυξη και διατήρηση καρκινικών κυττάρων. Ο επαγωγίσιμος από την υποξία παράγοντας (HIF) είναι ένας κρίσιμος μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει την έκφραση πολυάριθμων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των miRNAs, σε απόκριση στην υποξία. Ο πρωτογενής αγγειογενετικός παράγοντας γνωστός ως αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) λέει στα ενδοθηλιακά κύτταρα να δημιουργήσουν νέα αιμοφόρα αγγεία όταν συνδέεται με τους υποδοχείς του. Κατά συνέπεια, τα miRNA που στοχεύουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια του HIF ή του VEGF θα έχουν πιθανότατα μεγάλο αντίκτυπο στην αγγειογένεση.

Σύμφωνα με τους Camps et al. (2008), το miR-210 είναι το miRNA που αυξάνεται σταθερά και σημαντικά κατά τη διάρκεια της υποξίας. Δύο ανεξάρτητες μελέτες έδειξαν ότι η υπερέκφραση του miR-210 σε φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπινης ομφαλικής φλέβας διεγείρει το σχηματισμό τριχοειδών δομών και εξαρτώμενη από τον VEGF κυτταρική μετανάστευση. Αντίθετα, ο αποκλεισμός του miR-210 ανταγωνίζεται αυτές τις διεργασίες (Lou et al., 2012). Επιπλέον, το miR-210 προάγει την αγγειογένεση όχι μόνο στοχεύοντας τον υποδοχέα συνδέτη της κινάσης τυροσίνης ephrin-A3, ο οποίος είναι ένας αντι-αγγειογενής παράγοντας, αλλά και ενισχύοντας την έκφραση του VEGF και VEGF receptor-2 (VEGFR2) (Liu et al., 2012).

Ο MiR-424, ο οποίος στοχεύει την κουλλίνη 2, μια πρωτεΐνη-σκάλισμα για τη λιγάση της ομπικουιτίνης, ενεργοποιείται από την υποξία στα ενδοθηλιακά κύτταρα για να ενθαρρύνει την αγγειογένεση τόσο in vitro όσο και in vivo. Σύμφωνα με τους Ghosh et al. (2010) και Liu et al. (2011), η διαδικασία αυτή σταθεροποιεί τον HIF1 και του επιτρέπει να διεγείρει μεταγραφικά την έκφραση του VEGF. Το MiR-21 είναι ένα ακόμη miRNA που διεγείρει την αγγειογένεση. Στοχεύει το PTEN για να ενεργοποιήσει τα σηματοδοτικά μονοπάτια Akt/ERK κατάντη, τα οποία αυξάνουν την παραγωγή του VEGF και του HIF1. Ο VEGF και/ή ο HIF1 είναι οι στόχοι των miR-20b και miR-519c, τα οποία, αντίθετα, ελέγχουν αρνητικά την αγγειογένεση. Το **miR-107** αναστέλλει την έκφραση του HIF1β, με αποτέλεσμα η καθοδική ρύθμιση του miR-107 να προάγει την αγγειογένεση του όγκου υπό υποξικές συνθήκες (Peng et al., 2016).

Έρευνες έχουν δείξει ότι τα εξωκυττάρια miRNA από καρκινικά κύτταρα θα μπορούσαν να ενισχύσουν τη ρύθμιση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Ένα από τα στοιχεία παρασχέθηκε από τους Umezū et al. οι οποίοι παρατήρησαν ότι το miR-135b, το οποίο υπερεκφράζεται σε εξωσώματα από ανθεκτικά στην υποξία κύτταρα πολλαπλού μυελώματος, καταστέλλει τον ανασταλτικό παράγοντα του HIF1 (FIH-1) στα ενδοθηλιακά κύτταρα, προάγοντας έτσι τον σχηματισμό ενδοθηλιακού σωλήνα μέσω της οδού σηματοδότησης HIF-FIH. Προκειμένου να περιοριστεί η αγγειογένεση του πολλαπλού μυελώματος, ο εξωσωμικός miR-135b μπορεί να αποτελέσει στόχο (Umezū et al., 2014).

Τα miRNA είναι παντού παρόντα και εκτιμάται ότι ρυθμίζουν πάνω από το 50% του ανθρώπινου γονιδιώματος (Spengler et al.,2014). Τα αποτελέσματα των προηγούμενων μελετών έδειξαν ότι η αλλαγή της έκφρασης συγκεκριμένων miRNA που σχετίζονται με τον καρκίνο μπορεί να αλλάξει την έκφραση πιθανών ογκογόνων ή ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών (Tao et al.,2018), υποδηλώνοντας ότι τα miRNA είναι θεραπευτικοί στόχοι και εργαλεία για τη θεραπεία του καρκίνου. Στον **Πίνακα 1** συνοψίζονται κάποια από τα βασικότερα miRNAs που αποτελούν θεραπευτικούς στόχους σε διάφορους τύπους καρκίνου (Tan et al.,2017)

Πίνακας 1 Βασικά miRNAs στον καρκίνο

Καρκίνος	MicroRNA	Απορρύθμιση	Στόχοι	Μοριακός μηχανισμός
Καρκίνος Μαστού	let-7	Μειωμένη ρύθμιση	E2F2, c-Myc, KRAS	Μειώνοντας τα επίπεδα των c-Myc, E2F2, αναστέλλει το κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την έκφραση KRAS και ενεργοποίησης
	miR-27a	Ανοδική	FOXO1	αναστέλλει την διέλευση του

				κύκλου και κυτταρικό θά
	miR-31	Μειωμένη ρύθμιση	RhoA	Αναστ τοπική εξαγγείωση μετάσταση
	miR-96	Ανοδική	FOXO1	αναστ διέλευση του κύκλου και κυτταρικό θά
	miR-98	Μειωμένη ρύθμιση	E2F2, c- Myc	Μειών επίπεδα των E2F2 και c- M
	miR-182	Ανοδική	FOXO1, FOXO3	αναστ διέλευση του κύκλου και κυτταρικό διεγείρει μετανάστευσ μεταστατικό
	miR-205	Μειωμένη ρύθμιση	HER3	Αναστ ενεργοποίηση και αυξά ανταπόκριση αναστολείς τυροσίνης
	miR-9-3	Μειωμένη ρύθμιση	σελ53	Παίξει αποπτωτική σχετίζεται με
	miR-375	Ανοδική	SHOX2	Επάγε

Γαστρικός Καρκίνος	miR-25	Ανοδική		Κατασ μέλη της οικο /Kip των ο κυκλινοεξαρτ κινασών μ αμετάφρατης 3'
	miR-106b	Ανοδική		Κατασ μέλη της οικο /Kip τωνκυκλινοεξ κινασών, στην επαγ προαποπτωτι ρυθμιστή σε κύτταρα
	miR-93, miR-221	Ανοδική	p21, p27, p57	Κατασ μέλη της οικο /Kip κυκλινοεξαρτ κινασών
	miR-512	Μειωμένη ρύθμιση	Mcl-1	Προκο απόπτωση καρκινικών κυ
	miR-10b	Ανοδική	RhoC	Ρυθμί εκφράσεις π RhoC και του ενεργοποιητή πλασμινογόνο ουροκινάσης HOXD10

Γλοίωμα	miR-221	Μειωμένη ρύθμιση	PTEN/AKT	Μεσο- εκφράσεις γο σχετίζονται μ ρύθμισης σηματοδότση Akt
	miR-324-5	Μειωμένη ρύθμιση	GLI1	αναστ τονπολλαπλα
Ηπατοκυτταρικό Καρκίνωμα- Ηπάτωμα	miR-195	Μειωμένη ρύθμιση	κυκλίνη D1, E2F3	Κατασ σηματισμό και εμπο μετάβαση G1
	miR-16	Μειωμένη ρύθμιση	Bcl-2	Ρυθμί απόπτωση
	miR-18a	Ανοδική	ERα , ESR1	Κατασ μετάφραση δεσμεύοντας του στην αμ περιοχή 3'
	miR-26a	Μειωμένη ρύθμιση	κυκλίνη D2, κυκλίνη E2	Αναστ πολλαπλασια καρκινικών προκαλεί ειδική για τον
	miR-101	Μειωμένη ρύθμιση	Mcl-1	Προάγ απόπτωση καταστέλλει ογκογένεση
	miR-145	Μειωμένη ρύθμιση	EGFR, IGF-1R	Αναστ ανάπτυξη κυττάρων

				μεταλλαγμέν του υποδο επιδερμικού παράγοντα
Καρκίνος Προστάτη	miR-331	Μειωμένη ρύθμιση	HER2/neu	Αποκλ σηματοδοτικ μονοπάτια PI υποδοχείς α που είναι κρί ανάπτυξη και του καρκίνου
	miR-200, miR-200b	Μειωμένη ρύθμιση	ZEB1, ZEB2	αναστ μετάβαση απ ανθεκτικά γεμισιταβίνη κύτταρα. Το ρυθμίζει την προκαλείται αυξητικό πα που προέρχ αιμοπετάλια.

5.2 Βασικά microRNA στον καρκίνο του πνεύμονα

Είναι γνωστό ότι τα microRNAs εμπλέκονται στους φλεγμονώδεις μηχανισμούς στους πνεύμονες, στην επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) και, κατά συνέπεια, στην ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα και στην απόκριση θεραπείας. Οι πιθανές εφαρμογές των microRNAs στη διάγνωση και την πρόγνωση του καρκίνου και τη χρήση τους ως θεραπευτικοί στόχοι έχουν οδηγήσει σε αυξημένο ενδιαφέρον σε αυτόν τον ερευνητικό τομέα (Wang et al.,2014). Οι επιδράσεις των microRNA στη σηματοδότηση κυτοκινών (ή κυτταροκινών) βασίζονται σε παράγοντες μεταγραφής, κυτοκίνες και ρυθμιστές της σηματοδότησης κυτοκινών. Οι κυτοκίνες είναι μια ομάδα πεπτιδίων που

χρησιμοποιούνται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού ώστε να επικοινωνούν μεταξύ τους και με το περιβάλλον τους. Για τη διαφοροποίηση πολλών ανοσοποιητικών κυττάρων, η σηματοδότηση των κυτταροκινών είναι απαραίτητη. Οι μελέτες δείχνουν ότι παίζουν κύριο ρόλο στον έλεγχο της ανοσολογικής αντίδρασης, της φλεγμονής, της αιμοποίησης, της επούλωσης και ρυθμίζουν τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων στο σώμα. Έτσι, ο ρόλος των microRNA στη διαφοροποίηση των ανοσοκυττάρων βασίζεται στη ρύθμιση της έκφρασης των κυτοκινών και στη ρύθμιση των συστατικών σηματοδοσίας τους καθοδικά. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα microRNA, συμπεριλαμβανομένου του **miR-21**, έχουν σημαντικό ρόλο στην εξισορρόπηση των αποκρίσεων βοηθητικών T λεμφοκυττάρων Th1 και Th2 στα αντιγόνα (O'Connell et al.,2012). Σύμφωνα με τους Wang et al. (2014), τα miR-494, let-7, miR-155, miR-135b, miR-21, miR-125b, miR-196 και miR-210 είναι τα microRNAs που έχουν δεχθεί τις περισσότερες έρευνες μέχρι σήμερα.

Τα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα περιέχουν το γονίδιο miR-494, το οποίο θα μπορούσε να ενισχύσει την αγγειογένεση του όγκου. Μέσω της υπερέκφρασης του miR-494 που προκαλείται από τον HIF-1a σε υποξικό περιβάλλον, αυτός ο αγγειογενετικός μηχανισμός προάγει την ανάπτυξη του όγκου (Mao et al., 2015). Από την άλλη πλευρά, το miR-494 μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στον καρκίνο πνεύμονα. Έχει φανεί ότι η έκφραση του miR-494 στα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα τύπου A549 οδηγεί στην καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και στην επαγωγή της γήρανσης. Αποδείχθηκε επίσης ότι η πρωτεΐνη IGF2BP1 θα μπορούσε να είναι στόχος του miR-494. Φαίνεται πως η IGF2BP1 παίζει ρόλο στην ανάπτυξη και ρύθμιση της καρκινογένεσης δεσμεύοντας τα mRNA που κωδικοποιούν τον παράγοντα IGF2 (Insulin-like αυξητικός παράγοντας 2) και το c-Myc (Ohdaira et al.,2012).

Στην κυτταρική σειρά του καρκίνου του πνεύμονα A549, το **miR-155** ρυθμίζει την κυτταρική απόπτωση και την αλλοίωση του DNA μέσω μιας οδού που διαμεσολαβείται από τον παράγοντα Araf-1 (Zang et al.,2012). Επιπλέον, ο miR-153 καταστέλλει την AKT για να παράγει αντικαρκινική δράση στον καρκίνο του πνεύμονα και αναστέλλει τη μετανάστευση και την εισβολή του ανθρώπινου NSCLC στοχεύοντας την ADAM19 (Yuan et al., 2015; Shan et al., 2015).

Το Let-7 είναι ένα διαφορετικό microRNA με αντίκτυπο στην ογκογένεση που εμπλέκεται σε μονοπάτια για την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Αυτό

το microRNA χρησιμεύει ως κρίσιμος ρυθμιστής πολλών γονιδίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και υπερεκφράζεται καθώς εξελίσσεται ο κυτταρικός κύκλος. Είναι επίσης γνωστό ότι το χαμηλό ποσοστό επιβίωσης στον καρκίνο του πνεύμονα συνδέεται με τη χαμηλότερη έκφραση μορίων της οικογένειας Let-7. Επιπλέον, το Let-7 ελέγχει άμεσα έναν μεγάλο αριθμό πρωτορρυθμιστικών γονιδίων που εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, συμπεριλαμβανομένων των RAS, CDC25A, CDK6 και κυκλίνης D (Wang et al.,2012. Έτσι, το Let-7 ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μειώνοντας τη μετάβαση από G1 σε S (Castro et al.,2017). Στον ακόλουθο Πίνακα παρουσιάζονται στοιχειώδη miRNAs που εμπλέκονται στον καρκίνο του πνεύμονα (Castro et al.,2017) [Πίνακας 2].

Πίνακας 2 miRNAs στον καρκίνο του πνεύμονα

miRNAs	Γονίδια στόχοι	Βιολογικός μηχανισμών
miR-494	IGF2BP1	Πρωθεί την αγγειογένεση και μειώνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό
Let-7	RAS, CDC25A, CDK6, κυκλίνη D, LIN28, MYC, HMGA2, HOXA9, TGFBR1, BCL-XL, MAP4K3	Καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και ρυθμίζει τον κυτταρικό κύκλο
miR-155	APAF-1	Πρωθεί το μεταβολισμό της γλυκόζης, ρυθμίζει την κυτταρική απόπτωση και την απόκριση βλάβης του DNA

miR-153	ADAM19, AKT	Αναστέλλει τη μετανάστευση και την εισβολή του ανθρώπινου μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση και προάγει την απόπτωση των καλλιεργημένων καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα
miR-101	COX-2, Lin28B, EZH2	Αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη φλεγμονή και τη δυσρύθμιση του κυτταρικού κύκλου
miR-135b	IL-1R1	Μεσολαβεί τη φλεγμονώδη απόκριση
miR-200	ZEB, E-cadherin, vimentin	Πρωθεί το μηχανισμό EMT
miR-218	Slug/ZEB2	Αναστέλλει την κυτταρική μετανάστευση, την εισβολή και την EMT
miR-487b	SUZ12, BMI1, WNT5A, MYC, KRAS	Καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό και την εισβολή των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα

5.3 Κυκλοφορούντα miRNAs στον καρκίνο του πνεύμονα

Τα miRNA απελευθερώνονται από τα κύτταρα στον εξωκυτταρικό χώρο και αυτά τα ελεύθερα miRNAs μεταφέρονται και εμφανίζουν λειτουργίες (Kosaka et al.,2010; Gayosso-Gómez et al.,2021). Τα κυκλοφορούντα αυτά miRNAs μπορούν να απελευθερωθούν και να προσληφθούν από τα κύτταρα μέσω κυστιδιακής διακίνησης και μέσω μεταφορέων πρωτεϊνών και είναι σε θέση να έχουν δράση ως ρυθμιστές έκφρασης γονιδίων υπό φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες, όπως ο καρκίνος (Ortiz-Quintero et al.,2016; Ortiz-Quintero et al.,2020). Οι γνωστοί μηχανισμοί για την απελευθέρωση miRNA περιλαμβάνουν (1) απελευθέρωση εντός εξωκυτταρικών κυστιδίων (EVs) κυρίως εξωσωμάτων, (2) απελευθέρωση miRNA που σχετίζεται με λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL), (3) απελευθέρωση miRNA μέσω Argonaute 2 (AGO2). και (4)

απελευθέρωση miRNAs μέσω της πρωτεΐνης που δεσμεύει το RNA νουκλεοφωσμίνης (NPM1) (Thomou et al.,2017; Gayosso-Gómez et al.,2021).

Τα EVs αφορούν σωματίδια που απελευθερώνονται φυσικά από το κύτταρο, τα οποία οριοθετούνται από διπλή λιπιδική στιβάδα και δεν μπορούν να αναπαραχθούν (Thery et al.,2018). Τα εξωσώματα είναι ένας τύπος μικρών EVs, διαμέτρου 40–150 nm, που σχηματίζονται από την εσωτερική εκβλάστηση των ενδοσωμάτων για την παραγωγή πολυκυστιδιακών σωμάτων (MVBs). miRNA και άλλα RNA (mRNA και άλλα μη κωδικοποιητικά RNA), DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια μεταφέρονται στα μέσω των εξωσωμάτων. Αυτά τα MVB συγχωνεύονται με την πλασματική μεμβράνη και στη συνέχεια απελευθερώνονται ως εξωσώματα στον εξωκυττάριο χώρο (Hessvik et al.,2018). Οι τετρασπανίνες, οι πρωτεογλυκάνες και οι λεκτίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα εξωσώματα για να συνδεθούν με την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων στον εξωκυττάριο χώρο (Rana et al., 2012- Mulcahy et al., 2014). Κατά συνέπεια, τα εξωσώματα προσλαμβάνονται από τα κύτταρα μέσω ενδοκυττάρωσης, μικροπινοκυττάρωσης, φαγοκυττάρωσης ή λιπιδικών ενώσεων (Tian et al., 2014). Η HDL έχει φανεί πως μεταφέρει miRNA στο ανθρώπινο πλάσμα από υγιή άτομα και ασθενείς με αθηροσκλήρωση. Τα σύμπλοκα HDL-miR-223 χορηγούνται επίσης σε ενδοθηλιακά κύτταρα καταστέλλοντας την έκφραση του μορίου ICAM-1 (Tabet, et al.,2014). Όπως έχει ήδη διαπιστωθεί, ο πυρήνας του RISC είναι ο Argonaute 2 (AGO2). Στο ανθρώπινο πλάσμα και στον ορό, ανακαλύφθηκε ότι συνδέεται με το miRNA και ότι προσφέρει άμυνα έναντι της δραστηριότητας της RNάσης (Turchinovich et al., 2011). Σύμφωνα με μια μελέτη, η ανθρώπινη κυτταρική σειρά ινοβλαστών τύπου HepG2 απελευθερώνει miRNAs χωρίς εξωσώματα συνδεδεμένα με την πρωτεΐνη πρόσδεσης RNA NPM1 μετά από στέρηση ορού σε μέσο καλλιέργειας (Wang et al., 2010; Gayosso-Gómez et al.,2021). Συνολικά, τα δεδομένα αυτά φανερώνουν ότι τα miRNA που μεταφέρονται μέσω εξωσωμάτων και HDL μεταφέρονται στα κύτταρα με λειτουργικό τρόπο, όπου στοχεύουν τα mRNA και ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων (Gayosso-Gómez et al.,2021).

Μέχρι το 2008 ανακαλύφθηκαν εξωκυττάρια miRNAs στο πλάσμα υγιών δοτών, ενώ λίγο αργότερα επιβεβαιώθηκε η παρουσία των μορίων αυτών στο πλάσμα και τον ορό υγιών ατόμων. Σε αυτά τα ελεύθερα ή κυκλοφορούντα miRNAs βρέθηκε ανθεκτικότητα όσον αφορά πέψεις της RNάσης, σε αρκετούς κύκλους κατάψυξης και

απόψυξης και σε ακραίο pH. Από αυτές τις αρχικές μελέτες, τα επίπεδα των κυκλοφορούντων miRNAs στο πλάσμα και στον ορό υγιών ατόμων βρέθηκαν να είναι σταθερά, ενώ τα επίπεδα σε ασθενείς με καρκίνο (συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του πνεύμονα) φάνηκε πως παρουσιάζουν μεταβολές (Gayosso-Gómez et al.,2021). Σε αυτά τα miRNAs βασίζεται η πιθανή εφαρμογή τους ως μη επεμβατικοί βιοδείκτες για διάγνωση και πρόγνωση (Ortiz-Quintero et al.,2020).

Τα κυκλοφορούντα miRNAs στα υγιή άτομα βρίσκονται σε πλήθος σωματικών υγρών όπως δάκρυα, ούρα, αμνιακό υγρό, μητρικό γάλα, βρογχικό υγρό, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, περιτοναϊκό υγρό, υπεζωκοτικό υγρό, σπερματικό υγρό, σάλιο και γαστρικά υγρά (Ortiz-Quintero et al.,2016). Τα κυκλοφορούντα miRNA δείχνουν ένα χαρακτηριστικό μοτίβο έκφρασης σε κάθε σωματικό υγρό, το οποίο μπορεί να υποδηλώνει ότι τα miRNA παρουσιάζουν μια συγκεκριμένη βιολογική λειτουργία που σχετίζεται με τους περιβάλλοντες ιστούς υπό κανονικές φυσιολογικές συνθήκες. Υπό την παρουσία παθολογικών καταστάσεων, τα μεταβαλλόμενα επίπεδα των miRNAs στα σωματικά υγρά έχουν συσχετιστεί με τη διάγνωση πολλών τύπων καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων της ουροδόχου κύστης, του νεφρού, του στομάχου, του παγκρέατος, του εγκεφάλου και του πνεύμονα (Wang et al.,2014; Kim et al.,2018; Korokova et al.,2019; Piao et al.,2019; Cochetti et al.,2020).

Τα κυκλοφορούντα miRNAs περιλαμβάνουν πλήθος χαρακτηριστικών με βάση τα οποία καθίστανται ιδανικά ως βιοδείκτες για κλινικές εφαρμογές. Μπορούν να απομονωθούν με σχετικά μη παρεμβατικές τεχνικές και είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια σε βιολογικά δείγματα. Επιπλέον, μπορούν να ποσοτικοποιηθούν με τη χρήση εξαιρετικά ευαίσθητων και με μεγάλη ακρίβεια μεθόδων μέτρησης (όπως π.χ. με χρήση qPCR) με τα επίπεδα έκφρασής τους να παρουσιάζουν διαφορές λόγω ύπαρξης παθολογίας (Gayosso-Gómez et al.,2021).

Ένας βέλτιστος διαγνωστικός βιοδείκτης για τον καρκίνο θα πρέπει να συνδέεται με την ύπαρξη κακοήθειας ή καρκινικών κυττάρων. Αντίστοιχα, ένας προγνωστικός βιοδείκτης πρέπει να συσχετίζεται με την υποτροπή ή την εξέλιξη του καρκίνου ή την πιθανότητα ενός κλινικού συμβάντος, ενώ ένας βιοδείκτης απόκρισης, με τη βιολογική απόκριση μετά τη θεραπεία. Στον καρκίνο του πνεύμονα, όπου η διάγνωση απαιτεί δείγματα πνευμονικού ιστού, αποτελεί πλεονέκτημα η χρήση βιοδείκτη ο οποίος μπορεί να ληφθεί με ευκολία σε πλήθος περιπτώσεων χρησιμοποιώντας μη επεμβατικές

μεθόδους για την παρακολούθηση της εξέλιξης ή την ανταπόκριση της θεραπείας. Έτσι, τα κυκλοφορούντα miRNAs έχουν μελετηθεί εκτενώς σε διεθνείς ερευνητικές εργασίες με στόχο τη διερεύνηση της πιθανής κλινικής εφαρμογής τους ως βιοδείκτες του καρκίνου του πνεύμονα.

Γενικότερα, η προκλινική διερευνητική φάση για την ανακάλυψη διαγνωστικών βιοδεικτών συνίσταται στον εντοπισμό των κυκλοφορούντων miRNA των οποίων τα επίπεδα έκφρασης, κυρίως στον ορό και το πλάσμα, μεταβάλλονται σε καρκινοπαθείς σε σύγκριση με υγιή άτομα. Η δεύτερη φάση αποτελείται από μια συστηματική αξιολόγηση της ικανότητας του υποψήφιου βιοδείκτη να διακρίνει άτομα με καρκίνο από άτομα χωρίς καρκίνο, με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα και σε μια μεγαλύτερη και ανεξάρτητη ομάδα μελέτης (Gayosso-Gómez et al., 2021). Υπάρχουν πολυάριθμα εργαλεία και πλατφόρμες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εύρεση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των miRNA που κυκλοφορούν στα σωματικά υγρά. Οι πιο δημοφιλείς τεχνικές είναι η qPCR, οι μικροσυστοιχίες και η αλληλουχία επόμενης γενιάς (NGS). Κάθε μέθοδος απαιτεί την αφαίρεση RNA από το σωματικό υγρό και την επακόλουθη σύνθεση cDNA με βάση την αντίστροφη μεταγραφή (RT) (Gayosso-Gómez et al., 2021).

Αυτές οι τεχνολογίες έχουν διαφορές στην ευαισθησία, την ειδικότητα, το κόστος και την επεξεργασία (Pritchard et al., 2012). Σε σύγκριση με τις τρέχουσες τεχνικές qPCR, η NGS και οι μικροσυστοιχίες έχουν γενικά χαμηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Η μέθοδος qPCR παρέχει μάλλον εύκολη και οικονομικά αποδοτική επεξεργασία του δείγματος. Ωστόσο, χρησιμοποιώντας μια ποσοτική και ημιποσοτική τεχνική, πολλά miRNA -ακόμη και εκατοντάδες miRNA- μπορούν να προσδιοριστούν ταυτόχρονα με τη χρήση συστημάτων NGS και μικροσυστοιχιών. Ως αποτέλεσμα, χρησιμεύουν ως κριτήρια επιλογής για ευρεία διαλογή. Μία από τις κύριες αιτίες των αντιφατικών αποτελεσμάτων σχετικά με τα κυκλικά miRNAs ως βιοδείκτες καρκίνου που αναφέρθηκαν από πολυάριθμες δημοσιευμένες μελέτες μπορεί να είναι η χρήση διαφορετικών μεθόδων και πλατφορμών. Με βάση τα ανωτέρω συνιστάται η εφαρμογή μιας τυποποιημένης προσέγγισης. Επιπλέον, η qPCR θα πρέπει να χρησιμοποιείται για την επικύρωση των ευρημάτων ώστε να επιβεβαιώνεται η ποιότητα και η ακρίβεια των δεδομένων, εάν χρησιμοποιούνται προσεγγίσεις ημι-ακολουθίας ή υβριδισμού για την ανακάλυψη miRNA (Gayosso-Gómez et al., 2021).

Τα κυκλικά miRNA παρουσιάζουν μοναδικές προκλήσεις για την επεξεργασία και τον ποσοτικό προσδιορισμό λόγω των προ-αναλυτικών μεταβλητών τους, οι οποίες περιλαμβάνουν τη χρήση μιας αποτελεσματικής μεθόδου εκχύλισης RNA, μιας αποτελεσματικής μεθόδου για τη σύνθεση cDNA, την επαλήθευση της ποιότητας του δείγματος (ποσοστό αιμόλυσης), την επαλήθευση της ποιότητας της εκχύλισης RNA με τη χρήση μεθόδων spike-in και τη χρήση κατάλληλων δειγμάτων ελέγχου (Gayosso-Gómez et al., 2021).

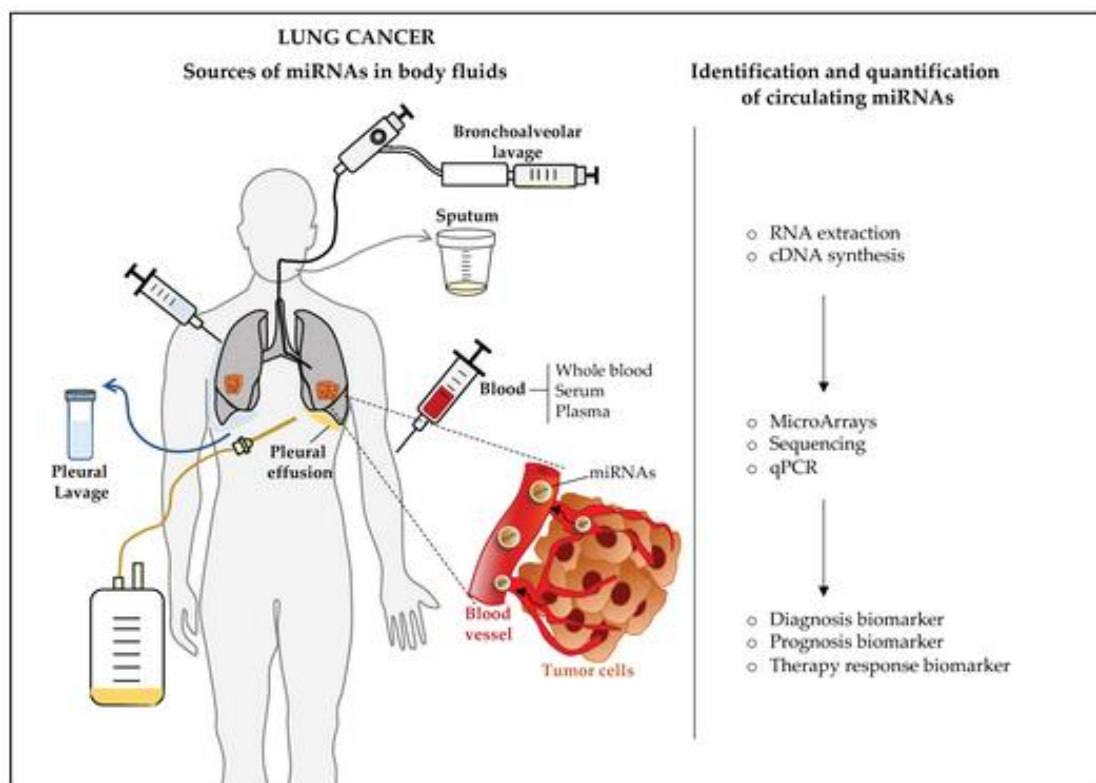
Το γενετικό και επιδημιολογικό υπόβαθρο διαφορετικών ανθρώπων μπορεί να διαφέρει, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε ποικίλα αποτελέσματα κατά την αναζήτηση νέων βιοδεικτών. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να επαληθεύονται ανεξάρτητα από μεγάλες ομάδες επικύρωσης. Σύμφωνα με τους Cheng κ.ά. (2012), Fouad κ.ά. (2017), Duruisseaux κ.ά. (2018), οι περιβαλλοντικοί, γενετικοί και επιγενετικοί παράγοντες κινδύνου παίζουν ρόλο στην πολυπαραμετρική νόσο του καρκίνου. Όσον αφορά την ειδικότητα και την ευαισθησία για τη διάγνωση, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ένας συνδυασμός δύο ή περισσότερων miRNAs υπερτερεί έναντι ενός μεμονωμένου miRNA (Jin et al., 2018, Min et al., 2019). Προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία και η ειδικότητα της διαγνωστικής ανίχνευσης σε σύγκριση με τη χρησιμοποίηση ενός μεμονωμένου υποψήφιου miRNA, διάφορες έρευνες έχουν εξετάσει ομάδες miRNA (δύο ή περισσότερα miRNAs).

Κεφάλαιο 6. Ρόλος Micro-RNAs ως πιθανοί βιοδείκτες για τη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα

6.1 Κυκλοφορούντα miRNAs ως διαγνωστικοί βιοδείκτες του καρκίνου του πνεύμονα

Πιθανά κυκλοφορούντα miRNA με δράση ως βιοδείκτες του καρκίνου του πνεύμονα έχουν αναφερθεί στον ορό, το πλάσμα, το αίμα, το βρογχοκυψελιδικό υγρό, το υπεζωκοτικό υγρό και τα πτύελα. Ωστόσο, τα δείγματα που έχουν ερευνηθεί περισσότερο μέχρι σήμερα είναι το πλάσμα και ο ορός. Υποθετικά, τα κυκλοφορούντα miRNAs (κυρίως

εντός των εξωσωμάτων) απελευθερώνονται από τα κύτταρα όγκου του πνεύμονα στην κυκλοφορία του αίματος και σε άλλα σωματικά υγρά, όπου μπορούν να εξαχθούν, να ποσοτικοποιηθούν και ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν ως μη επεμβατικοί βιοδείκτες της διαδικασίας καρκινογένεσης ή της παρουσίας καρκίνου [Εικόνα 7].



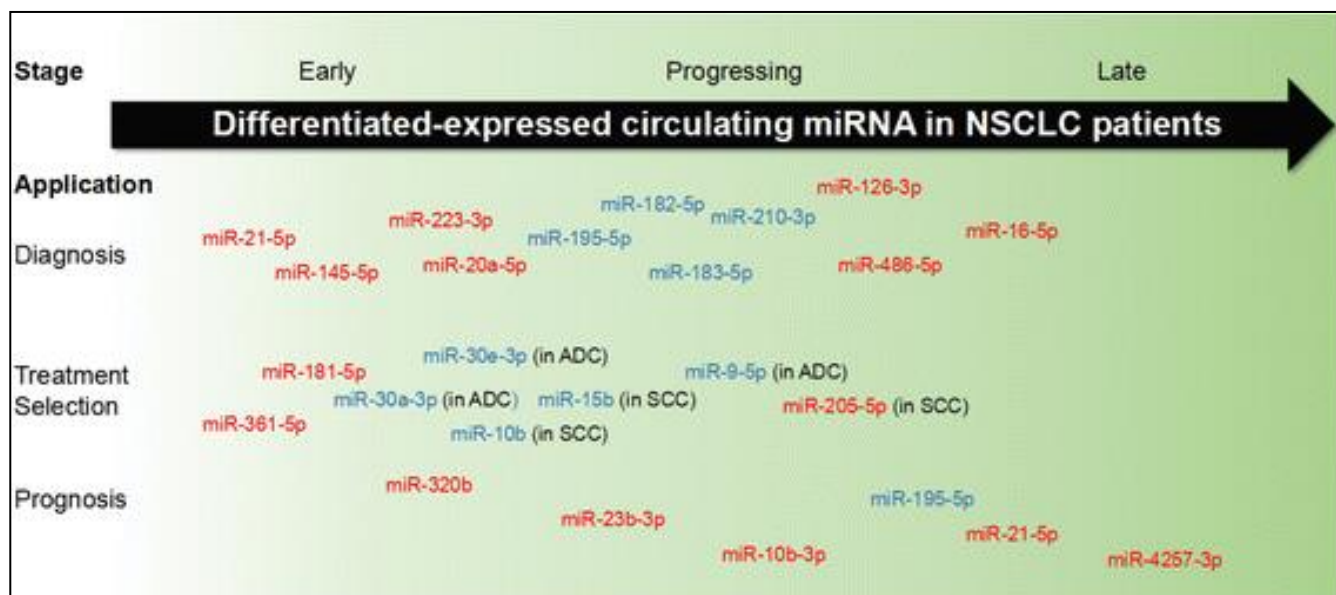
Εικόνα 7 miRNAs σε σωματικά υγρά και χρήση τους ως βιοδείκτες στον καρκίνο του πνεύμονα (Gayosso-Gomez et al.,2021)

Από την άλλη πλευρά, η προέλευση των miRNAs στην κυκλοφορία του αίματος θα μπορούσε να αποδοθεί σε αιμοπετάλια ή άλλα άφθονα αιμοποιητικά κύτταρα στο αίμα, γεγονός που δείχνει ότι το προφίλ miRNA στην κυκλοφορία μπορεί επίσης να είναι αποτέλεσμα της φυσιολογικής απόκρισης στην παρουσία καρκίνου. Μελέτες (Jin κ.ά., 2017- Wei κ.ά., 2017) έχουν εξετάσει την πιθανή χρήση των miRNA που προέρχονται από τα καρκινικά κύτταρα στον κυκλοφόρο ως βιοδείκτες καρκίνου. Εναλλακτικά, τα κυκλοφορούντα miRNA με αλλοιωμένα επίπεδα σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα έχουν διερευνηθεί περαιτέρω για πιθανές λειτουργίες που σχετίζονται με τον καρκίνο (Reis et al.,2020)

Η διαφορετική έκφραση των κυκλοφορούντων miRNAs έχει φανερώσει πολλά υποσχόμενες δυνατότητες για προσυμπτωματικό έλεγχο καρκίνου χωρίς πρόσθετο

τραυματισμό για τους ασθενείς. Διαφορετικά επίπεδα miRNA μπορούν να παρατηρηθούν νωρίς στην πορεία ανάπτυξης ενός καρκίνου, καθώς αυτός εξελίσσεται και αφού έχει εξαπλωθεί. Αυτά τα μικροσκοπικά μόρια RNA μπορούν έτσι να χρησιμεύσουν ως πρακτικοί θεραπευτικοί δείκτες για τη διαφοροποίηση του όγκου, την επιλογή της θεραπευτικής προσέγγισης και τα αποτελέσματα. Σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC), για παράδειγμα, μια μεγάλη ομάδα miRNAs έχει αναγνωριστεί ότι εκφράζονται διαφορετικά σε διαφορετικά στάδια της νόσου και συμβάλλουν στη διάγνωση, τον προσδιορισμό της θεραπείας και την πρόγνωση [Εικόνα 8] (Wang et al.,2018)

Στην παρούσα ενότητα, συνοψίζονται οι πιο πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες που αναφέρουν τα κυκλοφορούντα miRNA ως βιοδείκτες για τη διάγνωση, την απόκριση στη θεραπεία και την πρόγνωση του καρκίνου του πνεύμονα.



Εικόνα 8 Πιθανές κλινικές εφαρμογές των κυκλοφορούντων miRNA ως βιοδείκτες όγκου για το NSCLC. (Wang et al.,2018)

Διάφορα κυκλοφορούντα miRNA έχουν λειτουργήσει σε διάφορες πτυχές του κλινικού ελέγχου. Σε ασθενή με NSCLC, για παράδειγμα, ορισμένα διαφοροποιημένα miRNAs διευκόλυναν τη διάγνωση και την πρόγνωση του καρκίνου, ενώ άλλα συνέβαλαν στην επιλογή στρατηγικής θεραπείας διακρίνοντας τους υποτύπους του όγκου, παρακολουθώντας την εξέλιξη του όγκου ή προβλέποντας την αντοχή στο φάρμακο. Τα επίπεδα έκφρασης αυτών των miRNAs χωρίς κύτταρα θα μπορούσαν να διαφοροποιηθούν σημαντικά στο πρώιμο στάδιο, κατά την εξέλιξη του όγκου ή μέχρι το τελευταίο στάδιο. Η μπλε απόχρωση υποδήλωνε μειωμένη έκφραση miRNA, ενώ το κόκκινο χρώμα υποδήλωνε υψηλότερη έκφραση miRNA στο περιφερικό αίμα ασθενών με NSCLC.

6.1.1 Αίμα, ορός και πλάσμα

Με μια μεγάλη κοόρτη 3066 ατόμων που χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες μελέτης, συμπεριλαμβανομένων ασθενών με α) καρκίνο του πνεύμονα (n = 606), β) μη καρκινική πνευμονοπάθεια (n = 593), γ) άλλες ασθένειες που δεν επηρεάζουν τους πνεύμονες (n = 883) και δ) μη προσβεβλημένα άτομα δείγματος ελέγχου (n = 964), οι Fehlmann et al. δημοσίευσαν μια αναδρομική πολυκεντρική μελέτη το 2020. Οι συγγραφείς ερεύνησαν τη διαγνωστική αξία διαφόρων πλασίων των miRNAs σε δείγματα ολικού αίματος χρησιμοποιώντας μικροσυστοιχίες miRNA για να αναγνωρίσουν τα υποψήφια miRNA (Fehlmann et al., 2020).

Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν 14 miRNA που διέκριναν τους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα από όλα τα άλλα άτομα στη μελέτη, τα οποία ήταν τα **miR-1285-3p, miR-205-5p, miR-1260a, miR-1260b, miR-3152-3p, miR-378b, miR-1202, miR-139-5p, miR-16-2-3p, miR-18a-3p, miR-23b-3p, miR-3907, miR-551b-3p, and miR-93-3p**. 14 miRNAs (**miR-1285-3p, miR-205-5p, miR-17-3p, miR-1202, let-7g-3p, miR-193a-5p, miR-21-3p, miR-3610, miR-4282, miR-4286, miR-452-3p, miR-516a-3p, miR-572, and miR-625-5p**) μπόρεσαν να διακρίνουν ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα από ασθενείς με πνευμονικές παθήσεις χωρίς όγκο, οι οποίες περιελάμβαναν κυρίως χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), ενώ ακόμα 9 miRNAs διέκριναν ασθενείς πρώιμου σταδίου με καρκίνο του πνεύμονα από άτομα χωρίς καρκίνο του πνεύμονα (**miR-1285-3p, miR-205-5p, miR-1260a, miR-1260b, miR-3152-3p, miR-378b, miR-17-3p, miR-564, and miR-374b-5p**). Οι ασθενείς της ομάδας με ασθένειες που δεν επηρεάζουν τους πνεύμονες είχαν σκλήρυνση κατά πλάκας, νόσο του Πάρκινσον, καρκίνο του μαστού, ενδομητρίωση ή διάφορες καρδιακές παθήσεις. υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση στην κοιλιά. ή

παρουσίαζαν σήψη. Η μεγάλη κοόρτη και η συμπερίληψη συγκριτικών ερευνητικών ομάδων με μη καρκινικές πνευμονοπάθειες και άλλα είδη ασθενειών που δεν επηρεάζουν τους πνεύμονες είναι δύο πλεονεκτήματα αυτής της μελέτης. Οι Gayosso-Gomez κ.ά. (2021) σημείωσαν ότι η εν λόγω μελέτη δεν χρησιμοποίησε ποσοτική τεχνική, όπως η qPCR, για να επιβεβαιώσει τα αποτελέσματα που προέκυψαν με τη χρήση πλατφόρμας μικροσυστοιχιών.

Η χρήση ολικού αίματος ως δείγμα μπορεί να είναι επίσης ένα μειονέκτημα επειδή η πηγή των miRNA περιλαμβάνει τα ενδογενή miRNA που προέρχονται από τη ρήξη των κυττάρων του αίματος (ερυθροκύτταρα, αιμοπετάλια και λευκοκύτταρα), εκτός από τα miRNAs που κυκλοφορούν χωρίς κύτταρα. Αυτά τα διάφορα κύτταρα εκφράζουν μοναδικά σύνολα miRNAs, τα οποία μπορεί να συνδέονται ή όχι με την ύπαρξη καρκίνου, εισάγοντας παράγοντες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τα επίπεδα miRNA που βρέθηκαν στο δείγμα. Ωστόσο, η χρήση πλήρους αίματος εξαλείφει μία εργαστηριακή διαδικασία που απαιτείται για τον διαχωρισμό ορού ή πλάσματος και μπορεί να απλοποιήσει την ανάλυση των βιοδεικτών miRNA στην κλινική εργαστηριακή πρακτική (Gayosso-Gomez et al., 2021).

Σε μια μεγάλη ομάδα 744 περιπτώσεων μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (στάδια I και II) και 944 δειγμάτων ελέγχου, οι Ying et al. βρήκαν 5 miRNAs σε δείγματα ούρων για τη διάγνωση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα σε πρώιμο στάδιο το 2020. Οι συγγραφείς μέτρησαν τα miRNAs χρησιμοποιώντας qPCR. Εξέτασαν 540 miRNAs σε δείγματα ούρων από μια ερευνητική ομάδα που περιλάμβανε 216 μάρτυρες (άνδρες Κινέζους υγιείς καπνιστές) και 180 ασθενείς με NSCLC. Πέντε miRNAs (let-7a-5p, miR-1-3p, miR-1291, miR-214-3p και miR-375) επιλέχθηκαν και εξετάστηκαν σε δύο ανεξάρτητες ομάδες επαλήθευσης που αποτελούνταν από άνδρες, γυναίκες, μη καπνιστές και 242 Κινέζους και 190 Καυκάσιους ασθενείς με NSCLC, αντίστοιχα, και 101 Κινέζους και 117 Καυκάσιους ασθενείς με NSCLC. Τα εν λόγω miRNAs εξετάστηκαν επίσης σε τρεις άλλες ομάδες, οι οποίες περιλάμβαναν περιπτώσεις σταδίου II και σταδίου IV και περιελάμβαναν 120 ασθενείς έναντι 117 Κινέζων μαρτύρων, 67 ασθενείς έναντι 273 Κινέζων μαρτύρων και 34 ασθενείς έναντι 31 Κινέζων και Σιγκαπουριανών μαρτύρων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα 5 αυτά miRNA ήταν σε θέση να διαφοροποιήσουν τις περιπτώσεις NSCLC από τους μη καρκινικούς τύπους ελέγχου για όλα τα στάδια, με υψηλή ευαισθησία (81,3% για όλα τα στάδια καρκίνου και 82,9% για τα στάδια I και II, 83,0% για NSCLC σταδίου I) και υψηλή ειδικότητα (90,7%), γεγονός που

απέδωσε πιθανή διαγνωστική αξία για ασθενείς σταδίου I και II με NSCLC σε σύγκριση με αντίστοιχους μάρτυρες ανεξάρτητα από φύλο και κατάσταση καπνίσματος (Ying et al., 2020).

Ταυτόχρονα, οι Asakura et al. ανέφεραν 2 miRNA στον ορό για τη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα (**miR-1268b και miR-6075**), η οποία ήταν ανεξάρτητη από τον ιστολογικό τύπο και το στάδιο. Σε αυτή τη μελέτη, το σύνολο διερεύνησης περιελάμβανε 208 δείγματα καρκίνου του πνεύμονα και 208 μη καρκινικά δείγματα ορού και το σύνολο επικύρωσης αποτελούνταν από 1358 δείγματα καρκίνου του πνεύμονα και 1970 μη καρκινικά δείγματα ορού. Χρησιμοποιώντας μια πλατφόρμα μικροσυστοιχιών, οι επιστήμονες περιέγραψαν την έκφραση 2588 miRNAs σε δείγματα ούρων. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι ένα μεμονωμένο miRNA (**miR-17-3p**, AUC¹, 0,935, ευαισθησία, 93,3%, ειδικότητα, 88,5%) ήταν αποτελεσματικό στη διάκριση των ασθενών με καρκίνο, αλλά ένας συνδυασμός δύο miRNAs (**miR-1268b και miR-6075**) βελτίωσε την AUC σε σχέση με τη χρήση μόνο του ενός miRNA. Οι συγγραφείς ανέφεραν ότι ο διαγνωστικός δείκτης παρουσίασε υψηλή απόδοση για όλα τα παθολογικά στάδια (IA, 96,1%· IB, 93,7%· IIA, 97,3%· IIB, 96,7%· IIIA, 90,2%· IIIB, 83,3%· IV, 100%) και ιστολογικούς τύπους (αδενοκαρκίνωμα, 95,1%, ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα, 94,2%, μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα, 90,9%). Επιπλέον, αποδείχθηκε σε 180 πνεύμονες από ασθενείς με καρκίνο ότι οι διαγνωστικοί δείκτες των miR-17-3p, miR-1268b και miR-6075 μαζί, καθώς και η ομάδα των δύο miRNAs (miR-1268b και miR-6075), μειώθηκαν δραματικά μετά από χειρουργική επέμβαση. Η υπογραφή των δύο miRNA για τη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα δημοσιεύθηκε σε αυτή τη μελέτη, η οποία είναι η μεγαλύτερη μελέτη όσον αφορά τα δείγματα καρκίνου του πνεύμονα (Asakura et al., 2020).

Το 2018, οι Lu et al. αναφέρθηκαν σε μια αναδρομική πολυκεντρική μελέτη με στόχο τον εντοπισμό miRNA του πλάσματος για τη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα ή LC και για τη διάκριση του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (SCLC) από τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) σε σύνολοκοορτής 676 LC και 456 υγιών ατόμων υψηλού κινδύνου. Χρησιμοποίησαν πλάσμα από 73 ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (52 NSCLC, 21 SCLC), καθώς και 33 υγιή άτομα υψηλού κινδύνου, για να εξετάσουν 723 microRNA. Στη συνέχεια, τα αποτελέσματα επικυρώθηκαν περαιτέρω με

¹ AUC = AREA UNDER THE CURVE, περιοχή κάτω της καμπύλης, στατιστικό μέσο

qPCR σε δύο ανεξάρτητες ομάδες επικύρωσης 345 ασθενών με ΛΚ (278 NSCLC, 67 SCLC), 220 υγιή άτομα υψηλού κινδύνου και 258 ασθενών με ΛΚ (209 NSCLC, 49 SCLC), αντίστοιχα. Τρία microRNAs (miR-17, miR-190b και miR-375) διαχώρισαν τους ασθενείς με SCLC από τους ασθενείς με NSCLC, ενώ συνολικά έξι microRNAs (miR-17, miR-190b, miR-19a, miR-19b, miR-26b και miR-375) διέκριναν τους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα από τα υγιή άτομα. Τα πλεονεκτήματα αυτής της μελέτης σύμφωνα με τους Gayoso-Gomez et al., 2021 είναι η μεγάλη κοόρτη, με δείγματα που συλλέγονται από πέντε ιατρικά κέντρα, και η χρήση μιας ομάδας miRNA αντί ενός μεμονωμένου miRNA ως δυνητικού διαγνωστικού βιοδείκτη (Lu et al., 2018).

Σε μια μεσαία κοόρτη το 2020, οι Reiss et al. μελέτησαν τη διαγνωστική χρησιμότητα τριών ομάδων miRNAs που αποτελούνται από διάφορους συνδυασμούς πολλαπλών miRNAs στο πλάσμα για την έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου του πνεύμονα. Εξετάστηκαν συνολικά 139 δείγματα, συμπεριλαμβανομένων 40 περιπτώσεων αδenoκαρκινώματος, 38 περιπτώσεων πλακώδους καρκίνου του πνεύμονα (SCC) και 61 περιπτώσεων ατόμων χωρίς νόσο. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε προακολουθία αλληλουχίας RNA για την αξιολόγηση 800 miRNAs και χρησιμοποιήθηκε qPCR για επικύρωση. Οι συγγραφείς εντόπισαν τελικά α) μια ομάδα οκτώ miRNAs που αποτελούνται από τα miR-16-5p, miR-92a, miR-451a, miR-106b-5p, miR-155-5p, miR-217, miR-1285-3p και miR-1285-5p, (β) μια ομάδα πέντε miRNA που αποτελείται από τα miR-16-5p, miR-148b-3p, miR-378e, miR-484 και miR-664a-3p- και γ) και μια ομάδα τριών miRNA που αποτελείται από τα miR-16-5p, miR-92a και miR-451a. Για να προσδιοριστούν τα βιολογικά μονοπάτια που ελέγχουν αυτά τα miRNA, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση των τριών miRNA miR-16-5p, miR-92a και miR-451a. Σύμφωνα με τους Reis et al. (2020), τα τρία miRNAs έχουν συνδεθεί με μια σειρά από μονοπάτια που σχετίζονται με την ογκογένεση, συμπεριλαμβανομένων των Ras, MAPK και mTOR.

Σε μια περιορισμένη ομάδα, οι Pan et al. ανέφεραν επίσης τη χρήση δύο miRNA για τη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα. Χρησιμοποιώντας qPCR, εξέτασαν τα επίπεδα δύο miRNAs (miR-33a-5p και miR-28-3p) που είχαν προηγουμένως βρεθεί σε ιστούς με καρκίνο του πνεύμονα σε δείγματα ολικού αίματος από 90 ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και 90 υγιείς μάρτυρες. Το συνδυασμένο διαγνωστικό μοντέλο είχε υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα 0,9511 (ευαισθησία: 96,67%- ειδικότητα: 83,33%) για τον

συνδυασμό των δύο κυκλικών miRNAs. Η διαγνωστική χρησιμότητα των miR-33a-5p και miR-128-3p επιβεβαιώθηκε περαιτέρω από τους συγγραφείς σε 41 ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα αρχικού σταδίου (στάδιο I-I TNM) και 41 υγιείς μάρτυρες. AUC, 0,9554-ευαισθησία, 90,24%- ειδικότητα, 92,68%) ήταν μεγαλύτερη για τη συνδυαστική μεταγραφή δύο miRNA από ό,τι για τα συνδυασμένα miRNAs (Pan et al., 2018).

Έχουν δημοσιευτεί πολυάριθμες έρευνες που εξετάζουν τα εξωσώματα και άλλα EVs που μεταφέρουν κυκλικά miRNAs ως πιθανούς δείκτες καρκίνου του πνεύμονα στον ορό και το πλάσμα. Είναι πρώτα απαραίτητο να διαχωριστούν τα εξωσώματα από τα υγρά δείγματα για την ανάλυση αυτών των εξωσωματικών miRNAs. Αυτό γίνεται κυρίως μέσω τεχνικών υπερφυγοκέντρωσης, οι οποίες απαιτούν εξειδικευμένο εξοπλισμό υπερφυγοκέντρωσης και αρκετές ώρες επεξεργασίας. Επιπλέον, η απομόνωση των εξωσωμάτων από τον ορό και το πλάσμα απαιτεί μεγάλους όγκους αυτών των δειγμάτων σε σύγκριση με τον όγκο που χρησιμοποιείται συνήθως για τα κανονικά κυκλοφορούντα miRNA. Αυτές οι απαιτήσεις ενδέχεται να αποτελούν μειονέκτημα για μελλοντική κλινική χρήση ως βιοδείκτες σε μια διαγνωστική δοκιμή(Ortiz-Quintero et al.,2020).

Θεωρητικά, τα miRNA που συνδέονται με τον καρκίνο είναι πιο πιθανό να αποτελέσουν καλούς βιοδείκτες για την ανίχνευση του καρκίνου. Επιπλέον, μοντέλα in vitro και in vivo μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την περαιτέρω ανάλυση του ρόλου των αναγνωρισμένων miRNAs που βρίσκονται στα εξωσώματα. Τα εξωσωμικά miRNAs είναι ένας πιθανός διαγνωστικός βιοδείκτης για τον καρκίνο του πνεύμονα, σύμφωνα με μια μελέτη του 2017 από τους Jin et al. Χρησιμοποίησαν δείγματα πλάσματος για να διαχωρίσουν το αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα από το ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα (SCC) στα αρχικά στάδια και να ανιχνεύσουν εξωσωμικά miRNAs που προέρχονται από τον όγκο. Τα εξωσώματα έχουν προηγουμένως καθαριστεί χρησιμοποιώντας μαγνητικά σφαιρίδια με αντι-επιθηλιακό μόριο προσκόλλησης κυττάρων (EpcAM) ως δείκτη συγγένειας για εξωσώματα που προέρχονται από όγκους και υπερχολερυθρά. Χρησιμοποιώντας μια προσέγγιση αλληλούχισης RNA, 11 miRNA από εξωσώματα σκιαγραφήθηκαν στο πλάσμα 26 ασθενών με NSCLC σταδίου I (16 AD και 10 SCC) και 12 δειγμάτων υγιούς ελέγχου. Χρησιμοποιώντας qPCR, τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν σε μια ομάδα 20 ασθενών με NSCLC σταδίου I (10 AD και 10 SCC) και 30 υγιείς μάρτυρες. Για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα μεταξύ ασθενών με AD και SCC, συγκεντρώθηκε μια τελική ομάδα 42 ασθενών με NSCLC (31 AD και 11 SCC). Τα ευρήματα έδειξαν ότι μια

υπογραφή δύο miRNA (miR-181-5p και miR-361-5p) διαχώριζε το αδενοκαρκίνωμα από το NSCLC, ενώ τα επίπεδα τεσσάρων miRNA (miR-181b-5p, miR-361b-5p, miR-10b-5p και miR-320b) προσδιόριζαν τα άτομα με NSCLC από εκείνα χωρίς NSCLC. Επιπλέον, τα miR-320b και miR-10b-5p διαχώρισαν τους ασθενείς με SCC από εκείνους με NSCLC. Οι συγγραφείς προσδιόρισαν ορισμένους προγνωστικούς στόχους για τα εξωσωματικά miRNA που ανακαλύφθηκαν, όπως ο αυξητικός παράγοντας 1 (IGF1R), ο IGF2, η ενεργοποιημένη από μιτογόνο σήμα πρωτεϊνική κινάση 8 (MAPK8) και η κινάση σερίνης/θρεονίνης-πρωτεΐνης 3 (AKT3) (Jin et al.,2017).

Ένα άλλο παράδειγμα είναι οι Zhan et al. το 2020, οι οποίοι ανέλυσαν εξωσωματικά miRNAs που απομονώθηκαν από τον ορό 330 ασθενών με NSCLC και 312 υγιών ελέγχων χρησιμοποιώντας τεχνολογία μικροσυστοιχίας και qPCR. Ωστόσο, το προφίλ miRNA πραγματοποιήθηκε σε δείγματα μόνο από δύο ασθενείς με NSCLC και έναν υγιή μάρτυρα, ο οποίος δεν θεωρείται αντιπροσωπευτικό μέγεθος δείγματος. Έξι από τα είκοσι δύο miRNA που βρέθηκαν να εκφράζονται διαφορετικά σε ασθενείς με NSCLC σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες δοκιμάστηκαν περαιτέρω με qPCR και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα **miR-5684** και **miR-125b-5p** είχαν μειωμένη ρύθμιση σε ασθενείς με NSCLC. Η διαγνωστική απόδοση απέδωσε AUC 0,793, ευαισθησία 82,7% και ειδικότητα 62,1% (Zhang et al.,2020)

Οι Zhang et al, επίσης το 2020, αξιολόγησαν τη διαγνωστική αξία των εξωσωματικών miRNAs στον ορό ασθενών με NSCLC πρώιμου σταδίου σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες με τεχνολογία μικροσυστοιχίας και qPCR. Οι συγγραφείς πραγματοποίησαν προφίλ miRNA χρησιμοποιώντας ένα σύνολο υγιών μαρτύρων (αποτελούμενο από πέντε δείγματα ορού) και δύο ομάδες ασθενών με NSCLC (που αποτελούνταν από πέντε μη μεταστατικούς ασθενείς με NSCLC και πέντε μεταστατικούς ασθενείς με NSCLC). Αξιολόγησαν περαιτέρω 28 υποψήφια miRNA σε 48 ασθενείς με NSCLC και 48 υγιείς μάρτυρες με qPCR. Τα αποτελέσματα επικυρώθηκαν σε δείγματα ορού από δύο επιπλέον ανεξάρτητες κοόρτες που αποτελούνταν από 72 ασθενείς με NSCLC και 72 υγιείς μάρτυρες, και 156 ασθενείς με NSCLC και 162 υγιείς μάρτυρες, αντίστοιχα. Διαπίστωσαν ότι τα **miR-20b-5p** και **miR-3187-5p** ήταν μειωμένα σε έκφραση σε ασθενείς με NSCLC και ο συνδυασμός των δύο miRNAs απέδωσε AUC 0,848. Επιπλέον, η απόδοση της διάγνωσης βελτιώθηκε με τη χρήση καρκινοεμβρυονικού αντιγόνου (CEA) σε συνδυασμό με **miR-20b-5p** και **miR-3187-5p** (AUC, 0,905), ενώ ο συνδυασμός **miR-20b-5p**,

miR-3187-5p, για τη διάγνωση του NSCLC πρώιμου σταδίου (στάδια 0 και I) έδειξε AUC 0,930 (Zhang et al.,2020)

6.1.2 Άλλα σωματικά υγρά

Η **Εικόνα 9**, ανακτημένη από την ανασκόπηση των Gayosso-Gomez et al., (2021), συνοψίζει τα κυκλοφορούντα miRNAs που αναφέρονται από πρόσφατες δημοσιεύσεις ως πιθανοί διαγνωστικοί βιοδείκτες του καρκίνου του πνεύμονα σε άλλα σωματικά υγρά. Το βρογχοκυψελιδικό υγρό ή BAL είναι μια πηγή miRNAs για τη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα, αν και υπάρχουν λίγες πρόσφατες σχετικές δημοσιευμένες μελέτες διαθέσιμες.

miRNA Signature	Sample Type	Type of Biomarker	Cohort Size	Method of Quantification and Normalization	References
miRNA-126 and let-7a	Bronchoalveolar lavage (BAL)	Diagnostic (early-stage AD)	AD (n = 13) and nontumor pathology controls (n = 15)	qPCR; endogenous control miR-30a-5p	Kim et al., 2018
miR-1285, miR-1303, miR-29a-5p, and miR-650	Bronchial lavage (BL)	Diagnostic (LC)	LC (n = 30) and noncancer controls (n = 30)	qPCR; exogenous control cel-miR 39	Rehbein et al., 2015
miR-198 (combined with carcinoembryonic antigen (CEA) and cytokeratin 19 fragment (CYFRA 21-1))	Pleural effusion (PE)	Diagnostic (AD with malignant pleural effusion (MPE) vs. patients with benign pleural effusion (BPE))	MPE (n = 52) and BPE patients (n = 55)	Microarray and qPCR; endogenous miR-192 and snRNA U6	Han et al., 2013
miR-21(miRNA from EVs)	Pleural lavage	Diagnostic, association with positive cytology and pleural invasion (AD)	AD (n = 41)	Digital PCR	Watabe et al., 2020
EVs-miRNAs miR-1-3p, miR-144-5p, and miR-150-5p	Pleural lavage	Diagnostic (NSCLC vs. BPE patients)	AD and SCC (n = 21) and BPE patients (n = 25)	PCR array; not specified	Roman-Canal et al., 2019
miR-31 and miR-210 *	Sputum *	Diagnostic, to improve the specificity of computed tomography (CT) (LC vs. cancer-free smokers)	LC (n = 130) and cancer-free smokers (n = 141)	qPCR; snRNA U6	Shen et al., 2014

Εικόνα 9 κυκλοφορούντα miRNAs ως πιθανοί διαγνωστικοί βιοδείκτες του καρκίνου του πνεύμονα σε άλλα σωματικά υγρά (Gayosso-Gomez et al.,2021)

Οι Kim et al. το 2018, διερεύνησαν τη διαγνωστική αξία έξι εξωσωματικών miRNAs (**miR-7, miR-21, miR-126, let-7a, miR-17 και miR-19**) που απομονώθηκαν από υγρό BAL για τη διάγνωση του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα σε πρώιμο στάδιο. Η μελέτη αξιολόγησε τα έξι miRNA σε δείγματα BAL από 13 ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα (στάδιο I ή II) και 15 ασθενείς ως δείγμα ελέγχου με απουσία όγκου που αποτελείται από διάμεση πνευμονοπάθεια (n = 4), χρόνια ηωσινοφιλική πνευμονία (n = 3), σαρκοείδωση (n = 2), κρυπτογενή οργανωτική πνευμονία (n = 2), πνευμονίτιδα υπερευαισθησίας (n = 2), ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση (n = 1) και οξεία ηωσινοφιλική πνευμονία (n = 1). Τα

αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα εξωσωματικού **miRNA-126** και **let-7a** ήταν σημαντικά υψηλότερα στο υγρό BAL ασθενών με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα σε σχέση με τα άτομα ελέγχου (Kim et al., 2018).

Ένα άλλο παράδειγμα είναι οι Rehbein et al., το 2015, οι οποίοι ανέλυσαν τα κυκλοφορούντα miRNA σε βρογχικό έκπλυμα (BL) σε μια ομάδα διερεύνησης 10 ασθενών με προχωρημένο καρκίνο του πνεύμονα και 10 ατόμων χωρίς καρκίνο, με συστοιχία PCR και επικύρωσαν τα αποτελέσματα σε μια ανεξάρτητη ομάδα επικύρωσης 30 ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα και 30 άτομα δείγματος ελέγχου με qPCR. Η διάγνωση για τους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα ήταν καρκίνος των πλακωδών κυττάρων (SCLC) ή αδενοκαρκίνωμα προχωρημένου σταδίου (III-IV), ενώ η διάγνωση για την ομάδα ελέγχου ήταν καλοήθης πνευμονοπάθεια. Τέσσερα microRNA - miR-1285, miR-1303, miR-29a-5p και miR-650 - εντοπίστηκαν από τους συγγραφείς ως σημαντικά αυξημένα στους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Rehbein et al., 2015).

Οι Han et al. χρησιμοποίησαν το 2013 μια τεχνική μικροσυστοιχιών για να εξετάσουν miRNAs σε δείγματα υγρού υπεζωκοτικής συλλογής από μια ομάδα 10 ασθενών με κακοήγη υπεζωκοτική συλλογή (MPE) που διαγνώστηκε με αδενοκαρκίνωμα και 10 ασθενών με καλοήγη υπεζωκοτική συλλογή (BPE). Χρησιμοποιώντας qPCR, τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν σε μια ομάδα 42 ασθενών με MPE και 45 ασθενών με BPE. Τα επίπεδα του καρκινοεμβρυϊκού αντιγόνου (CEA) και του CYFRA 21-1 αξιολογήθηκαν επίσης στις πλευριτικές συλλογές. Τα ευρήματα έδειξαν ότι η διαγνωστική απόδοση του miR-198 ήταν ανώτερη από το CYFRA 21-1 και συγκρίσιμη με το CEA, με υψηλότερη ειδικότητα και ευαισθησία. Οι τρεις δείκτες χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό και τα αποτελέσματα ήταν καλύτερα, με AUC 0,926, ευαισθησία 89,2% και ειδικότητα 85,0% (Han et al., 2013).

Πιο πρόσφατα, εξετάστηκε η διαγνωστική χρήση των κυκλικών miRNAs στο πλευριτικό υγρό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Με την έγχυση ενός φυτοχημικού ορού στον υπεζωκοτικό χώρο και την αναρρόφησή του κατά τη διάρκεια της θωρακοσκόπησης, η μέθοδος ανίχνευσης του κυτταρικού υγρού του υπεζωκοτικού υγρού (PLC) μπορεί να ανιχνεύσει την προκλινική εξάπλωση καρκινικών κυττάρων στην υπεζωκοτική κοιλότητα. Το 2020, οι Watabe et al. χρησιμοποίησαν ψηφιακή PCR για να εξετάσουν την κλινικοπαθολογική σημασία των εξωκυτταρικών κυστιδίων (EVs) που

απομονώθηκαν από το πλευριτικό υγρό (πλευριτικό υγρό) 41 ασθενών με αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα για τα επίπεδα έκφρασης ενός μόνο miRNA (miR-21). Ακόμη και σε περιπτώσεις όπου η κυτταρολογική εξέταση ήταν αρνητική, ανακάλυψαν ότι τα επίπεδα EV miR-21 στο πλευριτικό υγρό έκπλυσης συνδέονταν με την πλευριτική διείσδυση σε πρωτοπαθείς θέσεις και τη θετική κυτταρολογική εξέταση (Watabe et al., 2020).

Το 2019, οι Roman-Canal και συν. χρησιμοποίησαν την τεχνική ομαδοποίησης PCR για να εξετάσουν τη διαγνωστική χρησιμότητα των EV miRNAs που απομονώθηκαν από το πλευριτικό υγρό 21 ασθενών με αδενοκαρκίνωμα και πλακώδες καρκίνωμα και 25 ασθενών ελέγχου με καλοήθεις υπεζωκοτικές συλλογές. Σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου, τρία miRNAs (miR-1-3p, miR-144-5p και miR-150-5p) παρήγαγαν τον υψηλότερο βαθμό ακρίβειας για την ανίχνευση του καρκίνου του πνεύμονα (Roman-Canal et al., 2019).

Μια άλλη πηγή miRNAs σε σωματικά υγρά για τη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα είναι τα πτύελα. Ωστόσο, τα κυτταρικά υπολείμματα που διαχωρίζονται με φυγοκέντρηση από τα πτύελα είναι εκεί όπου στην πραγματικότητα βρίσκονται τα miRNAs. Ως εκ τούτου, θεωρούνται ενδογενή σε αντίθεση με τα cyclin ή cf-miRNAs. Για να αυξήσουν την ειδικότητα της υπολογιστικής τομογραφίας (CT), οι Shen et al. εξέτασαν τα miRNAs ως πιθανούς βιοδείκτες στα πτύελα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα το 2014. Η έρευνα αυτή χρησιμοποίησε qPCR και επικεντρώθηκε σε 12 miRNAs που είχαν προηγουμένως βρεθεί σε ιστούς όγκων του πνεύμονα. Τριάντα έξι ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (13 SCLC και 53 NSCLC) και 68 μη καπνιστές (39 με ΧΑΠ, δεκαέξι με πνευμονία, επτά με σαρκοείδωση και τέσσερις με φλεγμονώδες κοκκίωμα) αποτέλεσαν την ομάδα μελέτης. Η ερευνητική ομάδα αποτελούνταν από 73 καπνιστές χωρίς καρκίνο (40 με ΧΑΠ, 18 με πνευμονία, 8 με σαρκοείδωση και 7 με φλεγμονώδες κοκκίωμα) και 64 ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (6 SCLC και 58 NSCLC). Ο συνδυασμός δύο miRNAs (miR-31 και miR-2110) επέδειξε υψηλότερη ανταπόκριση (AUC, 0,83) παρά το γεγονός ότι υπήρχαν 10 miRNAs που εκφράζονταν διαφορετικά μεταξύ των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα και των ασθενών ελέγχου. Ενώ η αξονική τομογραφία είχε 93,9% ευαισθησία και 83,8% ειδικότητα για τη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα, η χρήση των δύο miRNAs (miR-31 και miR-210) σε συνδυασμό παρήγαγε αποτελέσματα με ευαισθησία και ειδικότητα 65,2% και 89,7%, αντίστοιχα. Η ανάλυση των miRNAs δύο πλαισίων και της CT

μαζί κατέδειξε μεγαλύτερη ειδικότητα (91,2%) από ό,τι η CT μόνη της. Ως εκ τούτου, οι συγγραφείς πρότειναν ότι αυτός ο βιοδείκτης δύο-miRNA πτυέλων μπορεί να βελτιώσει την απόδοση της CT για τη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα (Shen et al.,2014).

6.2 Κυκλοφορούντα miRNAs ως προγνωστικοί βιοδείκτες του καρκίνου του πνεύμονα

Ένας προγνωστικός βιοδείκτης χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της πιθανότητας ενός κλινικού συμβάντος, της ανάπτυξης καρκίνου ή και των δύο. Τα κυκλικά miRNAs έχουν εξεταστεί ως πιθανοί προγνωστικοί βιοδείκτες στο περιφερικό αίμα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Οι Khandelwal et al. χρησιμοποίησαν ποσοτική PCR (qPCR) το 2020 για να εξετάσουν τα επίπεδα του κυκλικού miR-590-5p στο πλάσμα 80 ασθενών με NSCLC και 80 υγιών ατόμων ελέγχου ως δόλωμα ελέγχου. Αυτό το miRNA επιλέχθηκε με βάση δημοσιευμένα στοιχεία καθώς τα επίπεδά του είναι απορρυθμισμένα σε αρκετούς άλλους καρκίνους και έχει φανεί συσχέτισή του με ογκογόνες και ογκοκατασταλτικές ιδιότητες. Τα αποτελέσματα τους έδειξαν ότι τα επίπεδα miRNA-590-5p ήταν μειωμένα στο πλάσμα των ασθενών με NSCLC σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου. Επιπλέον, οι ασθενείς με χαμηλά επίπεδα miRNA-590-5p είχαν σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά διάμεσης επιβίωσης σε σύγκριση με ασθενείς που εξέφραζαν υψηλά επίπεδα miR-590-5p, γεγονός που υποδηλώνει ότι το miR-590 Το -5p είναι ένας πιθανός προγνωστικός δείκτης για την εξέλιξη του NSCLC (Khandelwal et al.,2020)

Το 2018, οι Xu et al. ανέλυσαν την προγνωστική αξία 13 προ-αγγειογενετικών miRNAs για την συνολική επιβίωση στο πλάσμα 196 ασθενών με NSCLC χρησιμοποιώντας qPCR. Η διάμεση περίοδος παρακολούθησης ήταν 56,7 μήνες. Φάνηκε ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των **miR-18a, miR-20a, miR-92a, miR-126, miR- 210 και miR-19a** συσχετίστηκαν με χειρότερη επιβίωση, φανερώνοντας πως τα συγκεκριμένα miRNAs θα μπορούσαν να εφαρμοστούν ως προγνωστικοί βιοδείκτες (Xu et al.,2018).

Οι Zhao et al. διερεύνησαν τη σχέση μεταξύ των εκφράσεων miR-34a/b/c στο πλάσμα και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών και της πρόγνωσης των ασθενών με NSCLC το 2017. Λόγω της μεταβαλλόμενης έκφρασής του σε διάφορες κακοήθειες, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του πνεύμονα, και της σύνδεσής του με την πρόγνωση των ασθενών με SCLC, επέλεξαν αποκλειστικά τον miR-34. Η κοόρτη

περιελάμβανε 196 ασθενείς με NSCLC και χρησιμοποιήθηκε qPCR για τον προσδιορισμό των επιπέδων του miR-34a/b/c στο πλάσμα. Σύμφωνα με τα ευρήματα (Zhao et al., 2017), τα υψηλότερα επίπεδα του miR-34a συνδέονταν με μεγαλύτερη επιβίωση σε σχέση με τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης.

Η προγνωστική σημασία των κυκλικών microRNAs που συνδέονται με τη συνολική επιβίωση μετά από θεραπεία με nivolumab στον ορό ασθενών με NSCLC μελετήθηκε από τους Halvorsena και συν. το 2018. Σε αντίθεση με προηγούμενες έρευνες, οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν ευρύ προφίλ miRNA μέσω NGS με αίμα από 20 ασθενείς με NSCLC πριν λάβουν nivolumab (θεραπεία αντισωμάτων κατά της υπομονάδας PD-1) και στη συνέχεια επικύρωσαν τα αποτελέσματα σε μια ομάδα 31 ασθενών χρησιμοποιώντας qPCR. Σύμφωνα με τους Halvorsen et al. (2018), μια συλλογή επτά miRNAs (miR-215-5p, miR-411-3p, miR-493-5p, miR-494-3p, miR-495-3p, miR-548j-5p και miR-93-3p) συνδέθηκαν σημαντικά με την επιβίωση άνω των έξι μηνών.

Τα κυκλικά miRNAs που αναγνωρίστηκαν από πρόσφατες δημοσιεύσεις ως πιθανοί βιοδείκτες πρόγνωσης του καρκίνου του πνεύμονα συνοψίζονται στην Εικόνα 10.

miRNA Signature	Sample Type	Type of Biomarker	Cohort Size	Method of Quantification and Normalization	Reference
miR-590-5p	Plasma	Prognosis (NSCLC) Low levels: lower median survival rates	NSCLC (n = 80) and healthy controls (n = 80)	qPCR; Cel-miR-39	Khandelwal et al., 2020
Signature #1: miR-18a, miR-20a, miR-92a, miR-126, miR-210, and miR-19a; Signature 2: miR-18a, miR-20a, miR-92a, miR-210, and miR-126	Plasma	Prognosis (NSCLC) Signature #1: high levels, worse DFS Signature #2: high levels, shorter OS	NSCLC (n = 196)	qPCR; snRNA U6	Xu et al., 2018
miR-34a and miR-34c	Plasma	Prognosis (NSCLC) High levels miR-34a: prolonged DFS High levels miR-34c: longer OS	NSCLC (n = 196)	qPCR; snRNA U6	Zhao et al., 2017
miR-215-5p, miR-411-3p, miR-493-5p, miR-494-3p, miR-495-3p, miR-548j-5p, and miR-93-3p	Serum	Prognosis (NSCLC after nivolumab treatment) Signature associated with OS >6 months	NSCLC (n = 51)	Sequencing and qPCR; TMM normalization and endogenous miR-93-5p and miR-222-3p	Halvorsen et al., 2018

Εικόνα 10 κυκλοφορούντα miRNAs ως πιθανοί προγνωστικοί βιοδείκτες στον καρκίνο του πνεύμονα (Gayosso-Gomez et al., 2021)

6.3 Κυκλοφορούντα miRNAs ως θεραπευτικοί βιοδείκτες του καρκίνου του πνεύμονα

Τα κυκλοφορούντα miRNA είναι επίσης πιθανοί βιοδείκτες της θεραπευτικής απόκρισης στον καρκίνο του πνεύμονα. Έχει λάβει χώρα πληθώρα μελετών, κάποιες από τις οποίες παρατίθενται ακολούθως.

Πριν από τη λήψη θεραπείας με αντίσωμα PD/PD-L1 για προχωρημένο NSCLC, οι Shukuya et al. το 2020 εξέτασαν τη δυνητική χρησιμότητα των ελεύθερων miRNAs και των miRNAs εντός των EVs στο πλάσμα των ασθενών ως βιοδεικτών. Οι ασθενείς που εμφάνισαν μερική ανταπόκριση ή σταθερότητα που διήρκησε περισσότερο από 6 μήνες ταξινομήθηκαν ως ανταποκρινόμενοι και οι ασθενείς που εμφάνισαν προοδευτική νόσο ταξινομήθηκαν ως μη ανταποκρινόμενοι. 32 και 7 κυκλοφορούντα miRNA στο πλάσμα και τα EVs, αντίστοιχα, αναγνωρίστηκαν ως διαφορετικά εκφρασμένα μεταξύ ανταποκρινόμενων και μη αποκρινόμενων χρησιμοποιώντας NGS. Δέκα κυκλοφορούντα miRNA επιλέχθηκαν για επικύρωση qPCR και εννέα από αυτά φάνηκε να εκφράζονται διαφορετικά μεταξύ των αποκρινόμενων και των μη αποκρινόμενων. Μόνο τρία από τα πέντε miRNAs (miR-199a-3p, miR-200c-3p, miR-21-5p, miR-28-5p και miR-30e-3p) που επιλέχθηκαν για περαιτέρω επιβεβαίωση (miR-200c-3p, miR-21-5p και miR-28-5p) διέφεραν σημαντικά μεταξύ ανταποκρινόμενων και μη ανταποκρινόμενων.

Το 2020, οι Peng et al. διερεύνησαν την πιθανή χρήση εξωσωματικών miRNAs από το πλάσμα ασθενών με προχωρημένο EGFR/ALK αρνητικό NSCLC που έλαβαν αναστολείς PD-1/PD-L1 ως βιοδείκτες για την ταυτοποίηση ασθενών με θετική ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία. Τέσσερις ασθενείς με αυξανόμενη νόσο θεωρήθηκαν ως μη ανταποκρινόμενοι, ενώ πέντε ασθενείς με μερική ανταπόκριση στη θεραπεία συμπεριλήφθηκαν ως ανταποκρινόμενοι. Επτά δείγματα πλάσματος υγιών συμμετεχόντων χρησιμοποιήθηκαν ως υποκατάστατα. Οι εννέα ασθενείς υποβλήθηκαν σε θεραπεία με διαφορετικά φάρμακα ανοσοθεραπείας που στοχεύουν το PD-1/PD-L1 και συλλέχθηκαν δείγματα πλάσματος πριν από τη θεραπεία και μετά, εάν οι ασθενείς πέτυχαν μερική ανταπόκριση. Ένα χιλιοστόλιτρο πλάσματος χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των εξωσωμάτων με υπερφυγοκέντρηση και τα miRNA που προέρχονται από εξώσωμα σχεδιάστηκαν χρησιμοποιώντας αλληλουχία μικρών RNA επόμενης γενιάς. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ασθενείς με εξέλιξη νόσου είχαν υψηλότερα επίπεδα **hsa-**

miR-320d, hsa-miR-320c και hsa-miR-320b σε σύγκριση με ασθενείς με ανταπόκριση, γεγονός που μπορεί να υποδεικνύει συσχέτιση με μια δυσμενή ανταπόκριση στη θεραπεία αντι-PD-1. Επιπρόσθετα, οι συγγραφείς ανέφεραν ότι το **miR-125b-5p** ήταν μειωμένο στα δείγματα μετά τη θεραπεία σε σύγκριση με τα δείγματα πριν από τη θεραπεία, προτείνοντας ότι μπορεί να είναι ένας πιθανός δείκτης για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας anti-PD-1. Υπέθεσαν επίσης ότι ο miR-125b-5p μπορεί να μειώσει τα T κύτταρα (Peng et al., 2020).

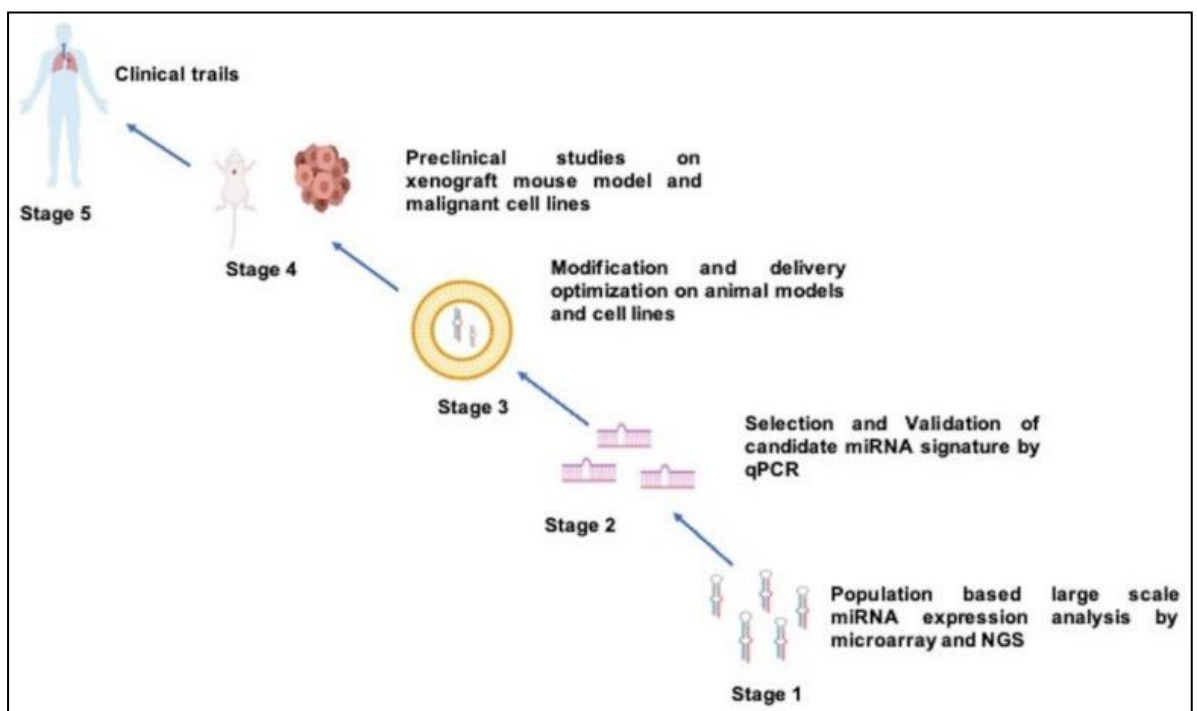
Οι Fan et al. ανέλυσαν τα miRNA του ορού ως πιθανούς βιοδείκτες για να προβλέψουν την ανταπόκριση στη θεραπεία αντι-PD1 σε ασθενείς με προχωρημένο στάδιο NSCLC. Στη δοκιμή συμμετείχαν ογδόντα ασθενείς με NSCLC σταδίου IV. Όσοι είχαν μερική ή πλήρη ανταπόκριση στη θεραπεία θεωρήθηκαν ανταποκρινόμενοι. Τα αποτελέσματα επικυρώθηκαν με τη χρήση της μεθόδου ομαδοποίησης προφίλ miRNA PCR και της qPCR. Σύμφωνα με τα ευρήματα, οι μη ανταποκρινόμενοι είχαν σημαντικά μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης των miRNAs miR-93, miR-138-5p, miR-200, miR-27a, miR-424, miR-34a, miR-28, miR-106b, miR-193a-3p και miR-181a από ό,τι οι ανταποκρινόμενοι (Fan et al., 2020).

6.4 Θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα με miRNAs

Τα miRNAs αναγνωρίζεται ευρέως ότι διαδραματίζουν μια λειτουργία στον καρκίνο και πολυάριθμες μελέτες έχουν διαπιστώσει ότι διαδραματίζουν επίσης ρόλο στη θεραπεία του καρκίνου και στη χημειοαντίσταση. Ωστόσο, το siRNA, το οποίο είναι παρόμοιο με το miRNA, υποβλήθηκε στην πρώτη του δοκιμή σε ανθρώπους το 2004 και το πρώτο φάρμακο siRNA έλαβε έγκριση το 2018 (Ozcan et al., 2015). Η άμεση εισαγωγή miRNAs (τεχνική αποκατάστασης) ή η χρήση θεραπευτικών φαρμάκων για τον έλεγχο της έκφρασης miRNA μπορούν και οι δύο να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία κυττάρων που έχουν απορρυθμισμένα miRNAs. Στην τεχνική αποκατάστασης η λειτουργία της μειωμένης έκφρασης του oncostatic miRNA αντικαθίσταται και αποκαθίσταται με τη χρήση τεχνητών δομών dsRNA (μιμητές miRNA).

Ένα συνθετικό ολιγονουκλεοτίδιο που μιμείται το **miR-34a** ενσωματωμένο σε λιποσωμικά νανοσωματίδια ήταν η πρώτη θεραπεία βασισμένη σε miRNA που

χρησιμοποιήθηκε για τον καρκίνο (Bouchie et al.,2013), π.χ, ένας συνδυασμός miRNA mimics **Let-7** και **miR-34** που χορηγήθηκε σε μοντέλο ποντικού NSCLC Kras-Trp53 (Kras mutation-p53 deletion) έδειξε πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα, τα οποία βελτιώθηκαν περαιτέρω όταν συμπληρώθηκαν με αναστολέα EGFR (erlotinib) (Wiggins et al.,2010; Stahlhut et al.,2015). Με τις προοπτικές της γενετικής μηχανικής και της νανοτεχνολογίας, έχουν αναπτυχθεί νέες, αποτελεσματικές στρατηγικές για την παροχή miRNA mimics, π.χ μια μελέτη που διεξήχθη από τους Talekar et al. (2016) παρατήρησε ότι η παροχή άγριου τύπου p53 μαζί με το mimic **miR-125b** με διπλά νανοσωματίδια με βάση το υαλουρονικό οξύ (HA) στοχευμένα σε CD44/EGFR προώθησαν σημαντική επαναπόλωση των μακροφάγων και διέγειραν απόπτωση σε KP (μετάλλαξη KRAS-διαγραφή p53 (Talekar et al.,2015). Μια άλλη μελέτη χρησιμοποίησε σύμπλοκο λιποσώματος/CL-pVAX-miR-143 (CL-pVAX-miR-143) για την παροχή mimics **miR-143**, τα οποία ανέστειλαν τη μετάσταση όγκου σε ένα μοντέλο ποντικού NSCLC (Jiang et al.,2019). Πρόσφατα, miRNA mimics έχουν αναγνωριστεί από εξωκυτταρικά κυστίδια που προέρχονται από τον άνθρωπο, όπως τα εξωσώματα, όχι σε μοντέλα ποντικών αλλά σε τρισδιάστατα μικρορευστοποιημένα μοντέλα καρκίνου του πνεύμονα. Για παράδειγμα, ένα miR-497 mimic μελετήθηκε σε ένα τρισδιάστατο μοντέλο καρκίνου του πνεύμονα (Jeong et al.,2020) [Εικόνα 11]



Εικόνα 11 Τα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης στο σχεδιασμό φαρμάκων που βασίζονται σε miRNA για τον καρκίνο του πνεύμονα (Wani et al.,2022)

Η εφαρμογή βιοιατρικής που βασίζεται σε νουκλεϊκά οξέα, όπως τα ολιγονουκλεοτίδια και τα μορια προσέλκυσης miRNA (ή miRNA σφουγγάρια), χρησιμοποιεί microRNA σφουγγάρια ως στόχους άμεσα ή έμμεσα για να είναι δυνατές θεραπευτικές αποκρίσεις στον καρκίνο του πνεύμονα. Οι "σφαίρες miRNA" είναι LncRNAs που βρίσκονται στο εσωτερικό των κυττάρων, τα οποία έχουν πολλές θέσεις πρόσδεσης για ένα συγκεκριμένο miRNA. Σύμφωνα με τους Watashi et al. (2010), λειτουργούν παγιδεύοντας το miRNA και εμποδίζοντάς το να προσκολληθεί στους ενδογενείς στόχους του. Για παράδειγμα, το μακρύ μη κωδικοποιητικό RNA TUG1 (taurine upregulated gene 1) προάγει τη χημειοευαισθησία της χημειοθεραπείας αναστέλλοντας τη λειτουργία του **miR-211** και παρεμποδίζοντας το PTEN από την αναστολή (Guo et al.,2019)

Μερικά άλλα παραδείγματα είναι η χρήση antagomiRs, συνθετικών ανταγωνιστών των miRNAs που δρουν ως παράγοντες αποσιώπησης των miRNAs. Έχουν σχεδιαστεί για να εμποδίζουν την ειδική λειτουργία των miRNA και τροποποιούνται σε συγκεκριμένα σημεία (γέφυρα O2-C4) ή επισημαίνονται με συγκεκριμένες λειτουργικές ομάδες (2-μεθοξυαιθυλο) (Esau et al.,2006). Αυτές οι τροποποιήσεις τα καθιστούν ανθεκτικά στη νουκλεάση και βελτιώνουν τη θερμοσταθερότητα και την εξειδίκευση του στόχου. Σύμφωνα με την έρευνα των Fu-Gang Dua κ.ά., το AMO (antisense morpholino) αύξησε δραματικά την ευαισθησία της πακλιταξέλης εξουδετερώνοντας το miR-421 τόσο σε in vivo όσο και σε in vitro πειραματικές ρυθμίσεις.

Ειδικές χημικές ενώσεις που στοχεύουν στη σύνθεση miRNA ή εμποδίζουν την αλληλεπίδραση miRNA-στόχου μπορούν επίσης να καταστείλουν το miRNA. Μικρές ανασταλτικές ενώσεις με πιθανά αντικαρκινικά χαρακτηριστικά μπορούν να στοχεύουν και να διευκολύνουν την αλληλεπίδραση του miRNA με το σύμπλοκο RISC. Μια άλλη έρευνα των Xigan He et al. ανακάλυψε ότι η Docetaxel, ένα ημισυνθετικό αντίστοιχο της πακλιταξέλης, προάγει τον πολλαπλασιασμό σε κυτταρικές σειρές NSCLC μέσω της ανορθωτικής ρύθμισης του miR-7. Οι He et al. (2015) αναφέρουν ότι η θεμελιώδης διαδικασία είναι άγνωστη.

Οι μικρές ενώσεις στοχεύουν επίσης ειδικά στη δευτερογενή δομή του microRNA. Αποτρέπουν τη διάσπαση της Drosha ή του Dicer αλληλεπιδρώντας άμεσα με πρόδρομες ουσίες miRNA. Ανακαλύφθηκε ότι οι αμινογλυκοσίδες και οι δευτερογενείς δομές του RNA αλληλεπιδρούν άμεσα. Πρόσφατα ευρήματα σχετικά με την κουργουμίνη βρήκαν ότι έχει αντικαρκινικές ιδιότητες του πνεύμονα μέσω της προς τα κάτω ρύθμισης του **miR-21** και

της ανοδικής ρύθμισης των ογκοκατασταλτικών miR-192-5p και miR-215 (Lelli et al.,2017). Μια άλλη παρόμοια μελέτη διαπίστωσε ότι η λήψη κουρκουμίνη, φυτοχημικής ουσίας, καταστέλλει τη μετάσταση του NSCLC διεγείροντας την έκφραση του miR-206 και αποθαρρύνοντας την οδό σηματοδότησης mTOR (Wang et al.,2020).

6.5 Νέες εξελίξεις στη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα με χρήση miRNA

Το διαγνωστικό και προγνωστικό δυναμικό της έκφρασης των miRNA στον καρκίνο του πνεύμονα επηρεάζεται έντονα από έναν αριθμό αναλυτικών και προγνωστικών παραγόντων. Ορισμένοι από αυτούς είναι εγγενείς στα miRNAs, όπως η εισαγωγή ή η διαγραφή νουκλεοτιδίων, SNPs, ισομερών και GCs των miRNAs, οι οποίοι έχουν αντίκτυπο στην ανάκτηση miRNA, αλλάζουν την αλληλουχία των miRNA και στη συνέχεια έχουν σημαντικό αντίκτυπο στο προφίλ των miRNAs. Η τεχνική απομόνωσης, οι συνθήκες αποθήκευσης και το είδος της τεχνικής προφίλ παίζουν ρόλο. Τα ελεύθερα miRNAs (cf-miRNAs), τα οποία έχουν μη ομόλογη προέλευση, είναι αυτά που κρύβουν την ποσότητα και τη συγκέντρωση των miRNAs που παράγονται από καρκινικά κύτταρα σε βιοαντιδραστήρες. Επιπλέον, τα σπλαχνικά όργανα, συμπεριλαμβανομένων του ήπατος, των νεφρών και των πνευμόνων που έχουν υψηλότερη υδροστατική πίεση του αίματος, θα μπορούσαν να αποτελέσουν πηγή απελευθέρωσης (Condrat et al., 2020- Wani et al.,2021).

Ένα άλλο εμπόδιο είναι η ετερογένεια της έκφρασης των miRNA. Για παράδειγμα, τόσο η φλεγμονή, που είναι γνωστό χαρακτηριστικό του καρκίνου, όσο και η υποξία είναι συχνές καταστάσεις στο μικροπεριβάλλον του όγκου, διαταράσσοντας σημαντικά την έκφραση του miRNA και δημιουργώντας μια ομιχλώδη εικόνα υποψήφιων miRNA που δεν ρυθμίζονται εντός του όγκου (KomarTili et al.,2013; Rupaimoole et al.,2014).

Σημαντικά ζητήματα- εμπόδια που σχετίζονται με θεραπευτικά miRNAs αφορούν τη συγκεκριμένη διαθεσιμότητα και την κακή βιοδιαθεσιμότητα στο σημείο στόχο. Λόγω της πολυανιονικής φύσης τους, η μεταφορά μέσω της λιπιδικής διπλοστιβάδαςέχει δυσκολίες. Επίσης, τα αγγειακά τοιχώματα, όπως οι στενές συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων, εμποδίζουν σημαντικά την παρααγγειακή μεταφορά. Η πολυανιονική τους φύση και η σύζευξή τους με φορείς υψηλού μοριακού βάρους, όπως αντισώματα, για

παροχή ειδικής στόχου σημαίνει ότι δεν μπορούν να διασχίσουν λιπιδικές διπλές στοιβάδες αυθόρμητα και παραμένουν παγιδευμένοι σε λυσοσωμικά διαμερίσματα ή οπισθοχωρούν πίσω στην πλασματική μεμβράνη . Ως αποτέλεσμα, μόνο ένα περιορισμένο τμήμα παραμένει βιοδιαθέσιμο για τα miRISC ώστε να αλληλεπιδράσουν με τους κυτταροπλασματικούς mRNA στόχους τους. Η λεγόμενη "ενδοσωμική διαφυγή" του πλεονεκτικού φορτίου (συζευγμένο miRNA ή πακέτο), το οποίο υποστηρίζει τη διαδικασία RNAi, είναι απαραίτητη. Τα συζευγμένα siRNA και ASO έχουν παραδοθεί αποτελεσματικά με τη χρήση διαφόρων ενδοσωματικών παραγόντων. Επί του παρόντος παράγονται μικρά συντηρητικά πεπτίδια που μπορούν να διαρρήξουν την ενδοσωμική μεμβράνη και να διευκολύνουν την απελευθέρωση του πλεονεκτικού φορτίου (Varkouhi et al., 2010). Προκειμένου να διευκολυνθεί η "ενδοσωμική διαφυγή" των συζευγμάτων siRNA ή ASO, χρησιμοποιούνται επίσης ενδοσωμικά πολυμερή. Η ενδοσωμική μεμβράνη διαχωρίζεται και γίνεται ασταθής όταν το υδρόφιλο πολυμερές μετατρέπεται σε υδρόφοβο πολυμερές σε όξινο περιβάλλον (Wani et al., 2022).

Εκτός από την κακή βιοδιαθεσιμότητα, τα θεραπευτικά miRNA συνδέονται με υψηλή πιθανότητα επιδράσεων εκτός στόχου, οι οποίες μπορεί να θέσουν σε κίνδυνο την εξειδίκευση του στόχου και το θεραπευτικό αποτέλεσμα και μερικές φορές να προκαλέσουν κυτταρικό θάνατο. Το συχνό αποτέλεσμα εκτός στόχου του θεραπευτικού miRNA είναι μια τάση να συμπεριφέρεται ως miRNA του siRNA, καθώς η αλληλουχία των σπόρων ανέχεται πολλές αναντιστοιχίες και μειώνει την αφθονία αρκετών μη-στόχων mRNA, ενώ εξακολουθεί να διατηρεί το αποτέλεσμα επί του στόχου. Ένα άλλο αποτέλεσμα εκτός στόχου είναι η ανταγωνιστική συμπεριφορά του θεραπευτικού siRNA με τα ενδογενή miRNA για την εφαρμογή RNAi. Αυτό διαταράσσει τη φυσική ισορροπία μεταξύ RISC και ενδογενών miRNAs και μπορεί να οδηγήσει σε απρόβλεπτα αποτελέσματα εκτός στόχου (Wani et al.,2022).

Συζήτηση-Συμπεράσματα

Τα κυκλοδεσμευτικά miRNAs έχουν επιδείξει σημαντική ικανότητα να αποδίδουν καλά σε κλινικές ρυθμίσεις ως μη επεμβατικοί δείκτες καρκίνου. Μπορεί να είναι πολύτιμες σε διάφορες πτυχές, συμπεριλαμβανομένου του προσυμπτωματικού ελέγχου καρκίνου στο πρώιμο στάδιο, της ταξινόμησης υποτύπων και της πρόβλεψης ευαισθησίας στα φάρμακα για την επιλογή θεραπευτικής στρατηγικής και του ελέγχου της χημειοθεραπείας ή της ραδιοαντίστασης των όγκων για την πρόγνωση των αποτελεσμάτων και των υποτροπών. Τα χαρακτηριστικά των κυκλοφορούντων miRNAs στο αίμα και σε άλλα σωματικά υγρά, καθώς και ο ρόλος τους σε μηχανισμούς που σχετίζονται με τον καρκίνο τονίζουν τις μεγάλες δυνατότητές τους ως μη επεμβατικοί βιοδείκτες του καρκίνου του πνεύμονα. Ωστόσο, παρά τις πολυάριθμες δημοσιεύσεις και πρωτοβουλίες που αποσκοπούν στην κλινική εφαρμογή, ο στόχος αυτός φαίνεται να απέχει πολύ από το να επιτευχθεί. Για αυτό ευθύνονται το μικροσκοπικό μέγεθος των καλλιεργείων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση, η χρήση αντισυμβατικών τεχνικών για τον ποσοτικό προσδιορισμό των miRNAs που κυκλώνουν, καθώς και η χαμηλή συγκέντρωση των miRNAs στα σωματικά υγρά.

Σήμερα είναι διαθέσιμες καλύτερες ρυθμίσεις και τεχνικές για τη μελέτη των miRNA που ανακυκλώνονται ως αποτέλεσμα των πρόσφατων εξελίξεων στον τομέα της έρευνας των miRNA, συμπεριλαμβανομένης της τεχνικής και τεχνολογικής τεχνογνωσίας. Η κατανόηση της γονιδιακής έκφρασης έχει μεταβληθεί από τα miRNAs, τα οποία έχουν επίσης ανοίξει το δρόμο για τη δημιουργία ολοκαίνουργιων διαγνωστικών διαδικασιών και θεραπειών για τον καρκίνο. Απαιτούνται μελέτες μεγαλύτερης κλίμακας για την περαιτέρω αύξηση της ευαισθησίας, της ειδικότητας και της δυνατότητας εφαρμογής των υποτιθέμενων βιοδεικτών miRNA ποδηλασίας στο μέλλον, προκειμένου να μεταφραστούν αυτά τα δεδομένα σε θεραπευτική χρήση. Μακροπρόθεσμα, είναι σημαντικό να εντοπιστούν πρόσθετοι πιθανοί στόχοι του miRNA και να αναπτυχθούν ασφαλείς και συγκεκριμένες μέθοδοι (συγκεκριμένα τυπικά πρωτόκολλα) για την παροχή θεραπειών που βασίζονται σε miRNA, προκειμένου να γίνει η διαμόρφωση των miRNA κρίσιμη τεχνική για τη θεραπεία και τη διαχείριση του καρκίνου. Θα πρέπει επίσης να έχουμε κατά νου ότι ο καρκίνος του πνεύμονα είναι μια πολυπαραγοντική και εξαιρετικά ετερογενής νόσος, και κατά συνέπεια, είναι πιθανό να απαιτούνται πολλαπλές και συνδυασμένες στρατηγικές για την επίτευξη αποτελεσματικών μεθόδων διάγνωσης και παρακολούθησης που μπορούν να ενσωματωθούν στην κλινική πράξη. Ως εκ τούτου, η χρήση ενός συνδυασμού miRNAs και άλλων τεχνικών διαλογής του καρκίνου του πνεύμονα, όπως η αξονική τομογραφία, είναι πιθανό να οδηγήσει στο μέλλον στην κλινική εφαρμογή των miRNAs ως μη επεμβατικών βιοδεικτών.

Βιβλιογραφικές Αναφορές

1. Aisner, S. C., Finkelstein, D. M., Ettinger, D. S., Abeloff, M. D., Ruckdeschel, J. C., & Eggleston, J. C. (1990). The clinical significance of variant-morphology small-cell carcinoma of the lung. *Journal of clinical oncology*, *8*(3), 402-408.
2. Alberg, A. J., & Samet, J. M. (2003). Epidemiology of lung cancer. *Chest*, *123*(1), 21S-49S.
3. Alló, M., Buggiano, V., Fededa, J. P., Petrillo, E., Schor, I., De La Mata, M., ... & Kornblihtt, A. R. (2009). Control of alternative splicing through siRNA-mediated transcriptional gene silencing. *Nature structural & molecular biology*, *16*(7), 717-724.
4. Ameyar-Zazoua, M., Rachez, C., Souidi, M., Robin, P., Fritsch, L., Young, R., ... & Harel-Bellan, A. (2012). Argonaute proteins couple chromatin silencing to alternative splicing. *Nature structural & molecular biology*, *19*(10), 998-1004.
5. Anand, S. (2013). A brief primer on microRNAs and their roles in angiogenesis. *Vascular cell*, *5*, 1-7.
6. Asakura, K., Kadota, T., Matsuzaki, J., Yoshida, Y., Yamamoto, Y., Nakagawa, K., ... & Ochiya, T. (2020). A miRNA-based diagnostic model predicts resectable lung cancer in humans with high accuracy. *Communications biology*, *3*(1), 134
7. Austin, T. B. M. (2013). First microRNA mimic enters clinic. *Nature biotechnology*, *31*(7), 577.
8. Barta, J. A., Powell, C. A., & Wisnivesky, J. P. (2019). Global epidemiology of lung cancer. *Annals of global health*, *85*(1).
9. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*, *116*(2), 281-297.
10. Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., & Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4: NOT deadenylase and DCP1: DCP2 decapping complexes. *Genes & development*, *20*(14), 1885-1898.
11. Benhamed, M., Herbig, U., Ye, T., Dejean, A., & Bischof, O. (2012). Senescence is an endogenous trigger for microRNA-directed transcriptional gene silencing in human cells. *Nature cell biology*, *14*(3), 266-275.

12. Boudreau, R. L., Jiang, P., Gilmore, B. L., Spengler, R. M., Tirabassi, R., Nelson, J. A., ... & Davidson, B. L. (2014). Transcriptome-wide discovery of microRNA binding sites in human brain. *Neuron*, *81*(2), 294-305.
13. Braun, J. E., Truffault, V., Boland, A., Huntzinger, E., Chang, C. T., Haas, G., ... & Izaurralde, E. (2012). A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nature structural & molecular biology*, *19*(12), 1324-1331.
14. Brümmer, A., & Hausser, J. (2014). MicroRNA binding sites in the coding region of mRNAs: extending the repertoire of post-transcriptional gene regulation. *Bioessays*, *36*(6), 617-626.
15. Burns, D. M. (2000). Primary prevention, smoking, and smoking cessation: implications for future trends in lung cancer prevention. *Cancer*, *89*(S11), 2506-2509.
16. Cagle, P. T., Allen, T. C., & Olsen, R. J. (2013). Lung cancer biomarkers: present status and future developments. *Archives of Pathology and Laboratory medicine*, *137*(9), 1191-1198.
17. Camps, C., Buffa, F. M., Colella, S., Moore, J., Sotiriou, C., Sheldon, H., ... & Ragoussis, J. (2008). hsa-miR-210 is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clinical cancer research*, *14*(5), 1340-1348.
18. Cancer Genome Atlas Research Network. (2012). Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*, *489*(7417), 519.
19. Cancer Genome Atlas Research Network. (2014). Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*, *511*(7511), 543.
20. Cardinali, B., Cappella, M., Provenzano, C., Garcia-Manteiga, J. M., Lazarevic, D., Cittaro, D., ... & Falcone, G. (2016). MicroRNA-222 regulates muscle alternative splicing through Rbm24 during differentiation of skeletal muscle cells. *Cell death & disease*, *7*(2), e2086-e2086.
21. Castro, D., Moreira, M., Gouveia, A. M., Pozza, D. H., & De Mello, R. A. (2017). MicroRNAs in lung cancer. *Oncotarget*, *8*(46), 81679.
22. Catalanotto, C., Cogoni, C., & Zardo, G. (2016). MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions. *International journal of molecular sciences*, *17*(10), 1712.

23. Chen, J., Wang, L., Matyunina, L. V., Hill, C. G., & McDonald, J. F. (2011). Overexpression of miR-429 induces mesenchymal-to-epithelial transition (MET) in metastatic ovarian cancer cells. *Gynecologic oncology*, *121*(1), 200-205.
24. Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., ... & Zhang, C. Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell research*, *18*(10), 997-1006.
25. Cheng, L., Alexander, R. E., MacLennan, G. T., Cummings, O. W., Montironi, R., Lopez-Beltran, A., ... & Zhang, S. (2012). Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. *Modern Pathology*, *25*(3), 347-369.
26. Cochetti, G., Cari, L., Nocentini, G., Maulà, V., Suvieri, C., Cagnani, R., ... & Mearini, E. (2020). Detection of urinary miRNAs for diagnosis of clear cell renal cell carcinoma. *Scientific Reports*, *10*(1), 1-13.
27. Coller, H. A., Forman, J. J., & Legesse-Miller, A. (2007). "Myc'ed messages": myc induces transcription of E2F1 while inhibiting its translation via a microRNA polycistron. *PLoS genetics*, *3*(8), e146.
28. Condrat, C. E., Thompson, D. C., Barbu, M. G., Bugnar, O. L., Boboc, A., Cretoiu, D., ... & Voinea, S. C. (2020). miRNAs as biomarkers in disease: latest findings regarding their role in diagnosis and prognosis. *Cells*, *9*(2), 276.
29. Crabtree, J. S., Singleton, C. S., & Miele, L. (2016). Notch signaling in neuroendocrine tumors. *Frontiers in oncology*, *6*, 94.
30. Cui, L., Zhang, X., Ye, G., Zheng, T., Song, H., Deng, H., ... & Guo, J. (2013). Gastric juice MicroRNAs as potential biomarkers for the screening of gastric cancer. *Cancer*, *119*(9), 1618-1626.
31. Darby, S., Hill, D., Auvinen, A., Barros-Dios, J. M., Baysson, H., Bochicchio, F., ... & Doll, R. (2005). Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *Bmj*, *330*(7485), 223.
32. Ding, X. M. (2014). MicroRNAs: regulators of cancer metastasis and epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Chinese journal of cancer*, *33*(3), 140.
33. Duruisseaux, M., & Esteller, M. (2018, August). Lung cancer epigenetics: from knowledge to applications. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 51, pp. 116-128). Academic Press.

34. Eichhorn, S. W., Guo, H., McGeary, S. E., Rodriguez-Mias, R. A., Shin, C., Baek, D., ... & Bartel, D. P. (2014). mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Molecular cell*, *56*(1), 104-115.
35. Esau, C., Davis, S., Murray, S. F., Yu, X. X., Pandey, S. K., Pear, M., ... & Monia, B. P. (2006). miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell metabolism*, *3*(2), 87-98.
36. Fan, J., Yin, Z., Xu, J., Wu, F., Huang, Q., Yang, L., ... & Yang, G. (2020). Circulating microRNAs predict the response to anti-PD-1 therapy in non-small cell lung cancer. *Genomics*, *112*(2), 2063-2071.
37. Fasanaro, P., Greco, S., Lorenzi, M., Pescatori, M., Brioschi, M., Kulshreshtha, R., ... & Martelli, F. (2009). An integrated approach for experimental target identification of hypoxia-induced miR-210. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(50), 35134-35143.
38. Fehlmann, T., Kahraman, M., Ludwig, N., Backes, C., Galata, V., Keller, V., ... & Keller, A. (2020). Evaluating the use of circulating microRNA profiles for lung cancer detection in symptomatic patients. *JAMA oncology*, *6*(5), 714-723.
39. Fernandez-Cuesta, L., Plenker, D., Osada, H., Sun, R., Menon, R., Leenders, F., ... & Thomas, R. K. (2014). CD74–NRG1 Fusions in Lung Adenocarcinoma. *Cancer discovery*, *4*(4), 415-422.
40. Fernández-Hernando, C., Ramírez, C. M., Goedeke, L., & Suárez, Y. (2013). MicroRNAs in metabolic disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *33*(2), 178-185.
41. Filosso, P. L., Ruffini, E., Asioli, S., Giobbe, R., Macri, L., Bruna, M. C., ... & Oliaro, A. (2011). Adenosquamous lung carcinomas: a histologic subtype with poor prognosis. *Lung Cancer*, *74*(1), 25-29.
42. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *nature*, *391*(6669), 806-811.
43. Fouad, Y. A., & Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. *American journal of cancer research*, *7*(5), 1016.
44. Fukao, A., Mishima, Y., Takizawa, N., Oka, S., Imataka, H., Pelletier, J., ... & Fujiwara, T. (2014). MicroRNAs trigger dissociation of eIF4A1 and eIF4AII from target mRNAs in humans. *Molecular cell*, *56*(1), 79-89.

45. García-López, J., Brieño-Enríquez, M. A., & Del Mazo, J. (2013). MicroRNA biogenesis and variability. *Biomolecular concepts*, 4(4), 367-380.
46. Garg, M. (2013). Epithelial-mesenchymal transition-activating transcription factors-multifunctional regulators in cancer. *World journal of stem cells*, 5(4), 188.
47. Garzon, R., Calin, G. A., & Croce, C. M. (2009). MicroRNAs in cancer. *Annual review of medicine*, 60, 167-179.
48. Gayosso-Gómez, L. V., & Ortiz-Quintero, B. (2021). Circulating MicroRNAs in blood and other body fluids as biomarkers for diagnosis, prognosis, and therapy response in lung cancer. *Diagnostics*, 11(3), 421.
49. Gayosso-Gómez, L. V., & Ortiz-Quintero, B. (2021). Circulating MicroRNAs in blood and other body fluids as biomarkers for diagnosis, prognosis, and therapy response in lung cancer. *Diagnostics*, 11(3), 421.
50. George, J., Lim, J. S., Jang, S. J., Cun, Y., Ozretić, L., Kong, G., ... & Thomas, R. K. (2015). Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*, 524(7563), 47-53.
51. Ghosh, G., Subramanian, I. V., Adhikari, N., Zhang, X., Joshi, H. P., Basi, D., ... & Ramakrishnan, S. (2010). Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF- α isoforms and promotes angiogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 120(11), 4141-4154.
52. Goldstraw, P., Chansky, K., Crowley, J., Rami-Porta, R., Asamura, H., Eberhardt, W. E., ... & Yokoi, K. (2016). The IASLC lung cancer staging project: proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM classification for lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(1), 39-51.
53. Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., ... & Mello, C. C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 106(1), 23-34.
54. Grosche, B., Kreuzer, M., Kreisheimer, M., Schnelzer, M., & Tschense, A. (2006). Lung cancer risk among German male uranium miners: a cohort study, 1946–1998. *British journal of cancer*, 95(9), 1280-1287.
55. Guo, S., Zhang, L., Zhang, Y., Wu, Z., He, D., Li, X., & Wang, Z. (2019). Long non-coding RNA TUG1 enhances chemosensitivity in non-small cell lung cancer by impairing microRNA-221-dependent PTEN inhibition. *Aging (Albany NY)*, 11(18), 7553.

56. Halvorsen, A. R., Sandhu, V., Sprauten, M., Flote, V. G., Kure, E. H., Brustugun, O. T., & Helland, Å. (2018). Circulating microRNAs associated with prolonged overall survival in lung cancer patients treated with nivolumab. *Acta Oncologica*, *57*(9), 1225-1231.
57. Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015 Jun 29;*87*:3-14. doi: 10.1016/j.addr.2015.05.001. Epub 2015 May 12. PMID: 25979468; PMCID: PMC4504744.
58. Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., & Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, *404*(6775), 293-296.
59. Han, H. S., Yun, J., Lim, S. N., Han, J. H., Lee, K. H., Kim, S. T., ... & Lee, O. J. (2013). Downregulation of cell-free miR-198 as a diagnostic biomarker for lung adenocarcinoma-associated malignant pleural effusion. *International journal of cancer*, *133*(3), 645-652.
60. Hansen, T. B., Wiklund, E. D., Bramsen, J. B., Villadsen, S. B., Statham, A. L., Clark, S. J., & Kjems, J. (2011). miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA. *The EMBO journal*, *30*(21), 4414-4422.
61. He, X., Li, C., Wu, X., & Yang, G. (2015). Docetaxel inhibits the proliferation of non-small-cell lung cancer cells via upregulation of microRNA-7 expression. *International journal of clinical and experimental pathology*, *8*(8), 9072.
62. Henke, J. I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schüttler, C. G., Fehr, C., ... & Niepmann, M. (2008). microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *The EMBO journal*, *27*(24), 3300-3310.
63. Hessvik, N. P., & Llorente, A. (2018). Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*, 193-208.
64. Horvitz, H. R., & Sulston, J. E. (1980). Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, *96*(2), 435-454.
65. Huang, V., Place, R. F., Portnoy, V., Wang, J., Qi, Z., Jia, Z., ... & Li, L. C. (2012). Upregulation of Cyclin B1 by miRNA and its implications in cancer. *Nucleic acids research*, *40*(4), 1695-1707.
66. Huang, V., Place, R. F., Portnoy, V., Wang, J., Qi, Z., Jia, Z., ... & Li, L. C. (2012). Upregulation of Cyclin B1 by miRNA and its implications in cancer. *Nucleic acids research*, *40*(4), 1695-1707.

67. Inamura K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Front Oncol.* 2017 Aug 28;7:193.
68. Inamura, K. (2017). Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Frontiers in oncology*, 7, 193.
69. Inamura, K., Ninomiya, H., Ishikawa, Y., & Matsubara, O. (2010). Is the epidermal growth factor receptor status in lung cancers reflected in clinicopathologic features?. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 134(1), 66-72.
70. Inamura, K., Takeuchi, K., Togashi, Y., Hatano, S., Ninomiya, H., Motoi, N., ... & Ishikawa, Y. (2009). EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset. *Modern Pathology*, 22(4), 508-515.
71. Jeffries, C. D., Fried, H. M., & Perkins, D. O. (2011). Nuclear and cytoplasmic localization of neural stem cell microRNAs. *Rna*, 17(4), 675-686.
72. Jeong, K., Yu, Y. J., You, J. Y., Rhee, W. J., & Kim, J. A. (2020). Exosome-mediated microRNA-497 delivery for anti-cancer therapy in a microfluidic 3D lung cancer model. *Lab on a Chip*, 20(3), 548-557.
73. Jiang, Q., Yuan, Y., Gong, Y., Luo, X., Su, X., Hu, X., & Zhu, W. (2019). Therapeutic delivery of microRNA-143 by cationic lipoplexes for non-small cell lung cancer treatment in vivo. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 145, 2951-2967.
74. Jin, X., Chen, Y., Chen, H., Fei, S., Chen, D., Cai, X., ... & Xie, C. (2017). Evaluation of Tumor-Derived Exosomal miRNA as Potential Diagnostic Biomarkers for Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer Using Next-Generation Sequencing. *Clinical cancer research*, 23(17), 5311-5319.
75. Jin, X., Chen, Y., Chen, H., Fei, S., Chen, D., Cai, X., ... & Xie, C. (2017). Evaluation of Tumor-Derived Exosomal miRNA as Potential Diagnostic Biomarkers for Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer Using Next-Generation Sequencing. *Clinical cancer research*, 23(17), 5311-5319.
76. Jo, M. H., Shin, S., Jung, S. R., Kim, E., Song, J. J., & Hohng, S. (2015). Human Argonaute 2 has diverse reaction pathways on target RNAs. *Molecular cell*, 59(1), 117-124.
77. Kanodra, N. M., Silvestri, G. A., & Tanner, N. T. (2015). Screening and early detection efforts in lung cancer. *Cancer*, 121(9), 1347-1356.

78. Kim, J. E., Eom, J. S., Kim, W. Y., Jo, E. J., Mok, J., Lee, K., ... & Kim, M. H. (2018). Diagnostic value of microRNAs derived from exosomes in bronchoalveolar lavage fluid of early-stage lung adenocarcinoma: A pilot study. *Thoracic cancer*, *9*(8), 911-915
79. Kim, J. E., Eom, J. S., Kim, W. Y., Jo, E. J., Mok, J., Lee, K., ... & Kim, M. H. (2018). Diagnostic value of microRNAs derived from exosomes in bronchoalveolar lavage fluid of early-stage lung adenocarcinoma: A pilot study. *Thoracic cancer*, *9*(8), 911-915.
80. Kocher, F., Hilbe, W., Seeber, A., Pircher, A., Schmid, T., Greil, R., ... & Fiegl, M. (2015). Longitudinal analysis of 2293 NSCLC patients: a comprehensive study from the TYROL registry. *Lung Cancer*, *87*(2), 193-200.
81. Kohno, T., Ichikawa, H., Totoki, Y., Yasuda, K., Hiramoto, M., Nammo, T., ... & Shibata, T. (2012). KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nature medicine*, *18*(3), 375-377.
82. Kopkova, A., Sana, J., Machackova, T., Vecera, M., Radova, L., Trachtova, K., ... & Fadrus, P. (2019). Cerebrospinal fluid MicroRNA signatures as diagnostic biomarkers in brain tumors. *Cancers*, *11*(10), 1546.
83. Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., & Ochiya, T. (2010). Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells*♦. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(23), 17442-17452.
84. Lababede O, Meziane MA. The Eighth Edition of TNM Staging of Lung Cancer: Reference Chart and Diagrams. *Oncologist*. 2018 Jul;*23*(7):844-848. doi: 10.1634/theoncologist.2017-0659. Epub 2018 Apr 12.
85. Lal, A., Kim, H. H., Abdelmohsen, K., Kuwano, Y., Pullmann Jr, R., Srikantan, S., ... & Gorospe, M. (2008). p16INK4a translation suppressed by miR-24. *PLoS one*, *3*(3), e1864.
86. Leal, J. A., Feliciano, A., & LLeonart, M. E. (2013). Stem cell MicroRNAs in senescence and immortalization: novel players in cancer therapy. *Medicinal Research Reviews*, *33*(1), 112-138.
87. Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *cell*, *75*(5), 843-854.
88. Lelli, D., Sahebkar, A., Johnston, T. P., & Pedone, C. (2017). Curcumin use in pulmonary diseases: State of the art and future perspectives. *Pharmacological research*, *115*, 133-148.

89. Lemcke, H., & David, R. (2018). Potential mechanisms of microRNA mobility. *Traffic*, 19(12), 910-917.
90. Li, C., Hashimi, S. M., Good, D. A., Cao, S., Duan, W., Plummer, P. N., ... & Wei, M. Q. (2012). Apoptosis and micro RNA aberrations in cancer. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 39(8), 739-746.
91. Li, L. C. (2017). Small RNA-guided transcriptional gene activation (RNAa) in mammalian cells. *RNA Activation*, 1-20.
92. Lima, R. T., Busacca, S., Almeida, G. M., Gaudino, G., Fennell, D. A., & Vasconcelos, M. H. (2011). MicroRNA regulation of core apoptosis pathways in cancer. *European journal of cancer*, 47(2), 163-174.
93. Lindeman, N. I., Cagle, P. T., Aisner, D. L., Arcila, M. E., Beasley, M. B., Bernicker, E. H., ... & Yatabe, Y. (2018). Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Journal of Thoracic Oncology*, 13(3), 323-358.
94. Liu, F., Lou, Y. L., Wu, J., Ruan, Q. F., Xie, A., Guo, F., ... & Wang, Y. (2012). Upregulation of microRNA-210 regulates renal angiogenesis mediated by activation of VEGF signaling pathway under ischemia/perfusion injury in vivo and in vitro. *Kidney and Blood Pressure Research*, 35(3), 182-191.
95. Liu, J., Hu, J., Hicks, J. A., Prakash, T. P., & Corey, D. R. (2015). Modulation of splicing by single-stranded silencing RNAs. *nucleic acid therapeutics*, 25(3), 113-120.
96. Liu, L. Z., Li, C., Chen, Q., Jing, Y., Carpenter, R., Jiang, Y., ... & Jiang, B. H. (2011). MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1 α expression. *PLoS one*, 6(4), e19139.
97. Liu, Y. Y., Han, J. Y., Lin, S. C., Liu, Z. Y., & Jiang, W. T. (2014). Effect of CDH1 gene methylation on transforming growth factor β -induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cell line A549. *Genetics and Molecular Research*, 13(4), 8568-8576.
98. Lorigan, P., Radford, J., Howell, A., & Thatcher, N. (2005). Lung cancer after treatment for Hodgkin's lymphoma: a systematic review. *The lancet oncology*, 6(10), 773-779.

99. Lou, Y. L., Guo, F., Liu, F., Gao, F. L., Zhang, P. Q., Niu, X., ... & Deng, Z. F. (2012). miR-210 activates notch signaling pathway in angiogenesis induced by cerebral ischemia. *Molecular and cellular biochemistry*, 370, 45-51.
100. Lu, S., Kong, H., Hou, Y., Ge, D., Huang, W., Ou, J., ... & Bai, C. (2018). Two plasma microRNA panels for diagnosis and subtype discrimination of lung cancer. *Lung Cancer*, 123, 44-51.
101. Machlin, E. S., Sarnow, P., & Sagan, S. M. (2011). Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(8), 3193-3198.
102. Majid, S., Dar, A. A., Saini, S., Yamamura, S., Hirata, H., Tanaka, Y., ... & Dahiya, R. (2010). MicroRNA-205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer*, 116(24), 5637-5649.
103. Mao, G., Liu, Y., Fang, X. I., Liu, Y., Fang, L., Lin, L., ... & Wang, N. (2015). Tumor-derived microRNA-494 promotes angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Angiogenesis*, 18, 373-382.
104. Mazzone, P. J., Silvestri, G. A., Patel, S., Kanne, J. P., Kinsinger, L. S., Wiener, R. S., ... & Detterbeck, F. C. (2018). Screening for lung cancer: CHEST guideline and expert panel report. *Chest*, 153(4), 954-985.
105. Miao, L., Yao, H., Li, C., Pu, M., Yao, X., Yang, H., ... & Wang, Y. (2016). A dual inhibition: microRNA-552 suppresses both transcription and translation of cytochrome P450 2E1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(4), 650-662.
106. Miller, K. D., Siegel, R. L., Lin, C. C., Mariotto, A. B., Kramer, J. L., Rowland, J. H., ... & Jemal, A. (2016). Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*, 66(4), 271-289.
107. Min, L., Zhu, S., Chen, L., Liu, X., Wei, R., Zhao, L., ... & Zhang, S. (2019). Evaluation of circulating small extracellular vesicles derived miRNAs as biomarkers of early colon cancer: a comparison with plasma total miRNAs. *Journal of extracellular vesicles*, 8(1), 1643670.
108. Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., ... & Tewari, M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(30), 10513-10518.

109. Mullangi, S., & Lekkala, M. R. (2021). Adenocarcinoma. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
110. Nakaoku, T., Tsuta, K., Ichikawa, H., Shiraishi, K., Sakamoto, H., Enari, M., ... & Kohno, T. (2014). Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung Adenocarcinoma. *Clinical cancer research*, *20*(12), 3087-3093.
111. Nishi, K., Nishi, A., Nagasawa, T., & Ui-Tei, K. (2013). Human TNRC6A is an Argonaute-navigator protein for microRNA-mediated gene silencing in the nucleus. *Rna*, *19*(1), 17-35.
112. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in endocrinology*, *9*, 402.
113. O'Connell, R. M., Rao, D. S., & Baltimore, D. (2012). microRNA regulation of inflammatory responses. *Annual review of immunology*, *30*, 295-312.
114. O'Donnell, K. A., Wentzel, E. A., Zeller, K. I., Dang, C. V., & Mendell, J. T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *nature*, *435*(7043), 839-843.
115. Ohdaira, H., Sekiguchi, M., Miyata, K., & Yoshida, K. (2012). MicroRNA-494 suppresses cell proliferation and induces senescence in A549 lung cancer cells. *Cell proliferation*, *45*(1), 32-38.
116. Ørom, U. A., Nielsen, F. C., & Lund, A. H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Molecular cell*, *30*(4), 460-471.
117. Ortiz-Quintero, B. (2016). Cell-free microRNAs in blood and other body fluids, as cancer biomarkers. *Cell proliferation*, *49*(3), 281-303.
118. Ortiz-Quintero, B. (2020). Extracellular MicroRNAs as intercellular mediators and noninvasive biomarkers of cancer. *Cancers*, *12*(11), 3455.
119. Ozcan, G., Ozpolat, B., Coleman, R. L., Sood, A. K., & Lopez-Berestein, G. (2015). Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics. *Advanced drug delivery reviews*, *87*, 108-119.
120. Pan, J., Zhou, C., Zhao, X., He, J., Tian, H., Shen, W., ... & Gong, Z. (2018). A two-miRNA signature (miR-33a-5p and miR-128-3p) in whole blood as potential biomarker for early diagnosis of lung cancer. *Scientific reports*, *8*(1), 16699.

121. Park, S. M., Gaur, A. B., Lengyel, E., & Peter, M. E. (2008). The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes & development*, *22*(7), 894-907.
122. Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., ... & Ruvkun, G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, *408*(6808), 86-89
123. Peifer, M., Fernández-Cuesta, L., Sos, M. L., George, J., Seidel, D., Kasper, L. H., ... & Thomas, R. K. (2012). Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nature genetics*, *44*(10), 1104-1110.
124. Peng, X. X., Yu, R., Wu, X., Wu, S. Y., Pi, C., Chen, Z. H., ... & Zhou, Q. (2020). Correlation of plasma exosomal microRNAs with the efficacy of immunotherapy in EGFR/ALK wild-type advanced non-small cell lung cancer. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, *8*(1).
125. Peng, Y., & Croce, C. M. (2016). The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, *1*, 15004. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>
126. Peng, Y., Dai, Y., Hitchcock, C., Yang, X., Kassis, E. S., Liu, L., ... & Croce, C. M. (2013). Insulin growth factor signaling is regulated by microRNA-486, an underexpressed microRNA in lung cancer. *Proceedings of the national academy of sciences*, *110*(37), 15043-15048.
127. Piao, X. M., Jeong, P., Kim, Y. H., Byun, Y. J., Xu, Y., Kang, H. W., ... & Kim, W. J. (2019). Urinary cell-free microRNA biomarker could discriminate bladder cancer from benign hematuria. *International Journal of Cancer*, *144*(2), 380-388.
128. Pichiorri, F., Suh, S. S., Rocci, A., De Luca, L., Taccioli, C., Santhanam, R., ... & Croce, C. M. (2010). RETRACTED: Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 Impairs the p53/MDM2 Autoregulatory Loop in Multiple Myeloma Development. *Cancer cell*, *18*(4), 367-381.
129. Plank, M., Maltby, S., Mattes, J., & Foster, P. S. (2013). Targeting translational control as a novel way to treat inflammatory disease: the emerging role of microRNAs. *Clinical & Experimental Allergy*, *43*(9), 981-999.
130. Pritchard, C. C., Cheng, H. H., & Tewari, M. (2012). MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nature Reviews Genetics*, *13*(5), 358-369.

131. Rajdev, K., Siddiqui, A. H., Ibrahim, U., Patibandla, P., Khan, T., & El-Sayegh, D. (2018). An unusually aggressive large cell carcinoma of the lung: undiagnosed until autopsy. *Cureus, 10*
132. Ramchandran, R., & Chaluvally-Raghavan, P. (2017). miRNA-mediated RNA activation in mammalian cells. In *RNA activation* (pp. 81-89). Springer, Singapore.
133. Rana, S., Yue, S., Stadel, D., & Zöller, M. (2012). Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *The international journal of biochemistry & cell biology, 44*(9), 1574-1584.
134. Raza, U., Zhang, J. D., & Şahin, Ö. (2014). MicroRNAs: master regulators of drug resistance, stemness, and metastasis. *Journal of molecular medicine, 92*, 321-336.
135. Razumilava, N., Bronk, S. F., Smoot, R. L., Fingas, C. D., Werneburg, N. W., Roberts, L. R., & Mott, J. L. (2012). miR-25 targets TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) death receptor-4 and promotes apoptosis resistance in cholangiocarcinoma. *Hepatology, 55*(2), 465-475.
136. Rehbein, G., Schmidt, B., & Fleischhacker, M. (2015). Extracellular microRNAs in bronchoalveolar lavage samples from patients with lung diseases as predictors for lung cancer. *Clinica Chimica Acta, 450*, 78-82.
137. Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., ... & Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *nature, 403*(6772), 901-906.
138. Reis, P. P., Drigo, S. A., Carvalho, R. F., Lopez Lapa, R. M., Felix, T. F., Patel, D., ... & Tsao, M. S. (2020). Circulating miR-16-5p, miR-92a-3p, and miR-451a in plasma from lung cancer patients: potential application in early detection and a regulatory role in tumorigenesis pathways. *Cancers, 12*(8), 2071.
139. Roberts, T. C. (2014). The microRNA biology of the mammalian nucleus. *Molecular Therapy-Nucleic Acids, 3*, e188.
140. Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., & Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research, 14*(10a), 1902-1910.
141. Roman-Canal, B., Moiola, C. P., Gatus, S., Bonnin, S., Ruiz-Miró, M., González, E., ... & Colas, E. (2019). EV-associated miRNAs from pleural lavage as potential diagnostic biomarkers in lung cancer. *Scientific reports, 9*(1), 1-9.

142. Rudin, C. M., Brambilla, E., Faivre-Finn, C., & Sage, J. (2021). Small-cell lung cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1), 1-20.
143. Rupaimoole, R., Wu, S. Y., Pradeep, S., Ivan, C., Pecot, C. V., Gharpure, K. M., ... & Sood, A. K. (2014). Hypoxia-mediated downregulation of miRNA biogenesis promotes tumour progression. *Nature communications*, 5(1), 5202.
144. Sabbula, B. R., & Anjum, F. (2022). Squamous Cell Lung Cancer. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
145. Schraivogel, D., & Meister, G. (2014). Import routes and nuclear functions of Argonaute and other small RNA-silencing proteins. *Trends in biochemical sciences*, 39(9), 420-431.
146. Schraivogel, D., Schindler, S. G., Danner, J., Kremmer, E., Pfaff, J., Hannus, S., ... & Meister, G. (2015). Importin- β facilitates nuclear import of human GW proteins and balances cytoplasmic gene silencing protein levels. *Nucleic acids research*, 43(15), 7447-7461.
147. Shan, N., Shen, L., Wang, J., He, D., & Duan, C. (2015). MiR-153 inhibits migration and invasion of human non-small-cell lung cancer by targeting ADAM19. *Biochemical and biophysical research communications*, 456(1), 385-391.
148. Shen, J., Liao, J., Guarnera, M. A., Fang, H., Cai, L., Stass, S. A., & Jiang, F. (2014). Analysis of MicroRNAs in sputum to improve computed tomography for lung cancer diagnosis. *Journal of Thoracic Oncology*, 9(1), 33-40.
149. Shigematsu, H., Lin, L., Takahashi, T., Nomura, M., Suzuki, M., Wistuba, I. I., ... & Gazdar, A. F. (2005). Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(5), 339-346.
150. Shim, H. S., Zheng, Z., Liebers, M., Cha, Y. J., Ho, Q. H., Onozato, M., ... & Iafrate, A. J. (2015). Unique genetic and survival characteristics of invasive mucinous adenocarcinoma of the lung. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(8), 1156-1162.
151. Shukuya, T., Ghai, V., Amann, J. M., Okimoto, T., Shilo, K., Kim, T. K., ... & Carbone, D. P. (2020). Circulating MicroRNAs and extracellular vesicle-containing micrnas as response biomarkers of anti-programmed cell death protein 1 or programmed death-ligand 1 therapy in NSCLC. *Journal of Thoracic Oncology*, 15(11), 1773-1781.

152. Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2017). Cancer Statistics, 2017 CA Cancer J Clin 2017; 67: 7-30. *External Resources Pubmed/Medline (NLM) Crossref (DOI)*.
153. Spengler, R. M., Oakley, C. K., & Davidson, B. L. (2014). Functional microRNAs and target sites are created by lineage-specific transposition. *Human molecular genetics*, 23(7), 1783-1793.
154. Spengler, R. M., Zhang, X., Cheng, C., McLendon, J. M., Skeie, J. M., Johnson, F. L., ... & Boudreau, R. L. (2016). Elucidation of transcriptome-wide microRNA binding sites in human cardiac tissues by Ago2 HITS-CLIP. *Nucleic acids research*, 44(15), 7120-7131.
155. Stahlhut, C., & Slack, F. J. (2015). Combinatorial action of microRNAs let-7 and miR-34 effectively synergizes with erlotinib to suppress non-small cell lung cancer cell proliferation. *Cell cycle*, 14(13), 2171-2180.
156. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.
157. Tabet, F., Vickers, K. C., Cuesta Torres, L. F., Wiese, C. B., Shoucri, B. M., Lambert, G., ... & Rye, K. A. (2014). HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells. *Nature communications*, 5(1), 3292.
158. Takeuchi, K., Soda, M., Togashi, Y., Suzuki, R., Sakata, S., Hatano, S., ... & Ishikawa, Y. (2012). RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nature medicine*, 18(3), 378-381.
159. Talekar, M., Trivedi, M., Shah, P., Ouyang, Q., Oka, A., Gandham, S., & Amiji, M. M. (2016). Combination wt-p53 and MicroRNA-125b transfection in a genetically engineered lung cancer model using dual CD44/EGFR-targeting nanoparticles. *Molecular Therapy*, 24(4), 759-769.
160. Tan, W., Liu, B., Qu, S., Liang, G., Luo, W., & Gong, C. (2018). MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy. *Oncology letters*, 15(3), 2735-2742.
161. Tan, Y., Zhang, B., Wu, T., Skogerbø, G., Zhu, X., Guo, X., ... & Chen, R. (2009). Transcriptional inhibition of Hoxd4 expression by miRNA-10a in human breast cancer cells. *BMC molecular biology*, 10(1), 1-9.
162. Tang, R., Li, L., Zhu, D., Hou, D., Cao, T., Gu, H., ... & Zen, K. (2012). Mouse miRNA-709 directly regulates miRNA-15a/16-1 biogenesis at the posttranscriptional level in the nucleus: evidence for a microRNA hierarchy system. *Cell research*, 22(3), 504-515.

163. Tao, G., & Martin, J. F. (2013). MicroRNAs get to the heart of development. *Elife*, 2, e01710.
164. Tellez, C. S., Juri, D. E., Do, K., Bernauer, A. M., Thomas, C. L., Damiani, L. A., ... & Belinsky, S. A. (2011). EMT and Stem Cell–Like Properties Associated with miR-205 and miR-200 Epigenetic Silencing Are Early Manifestations during Carcinogen-Induced Transformation of Human Lung Epithelial Cells. Carcinogens Induce Epigenetic Silencing of miRNAs. *Cancer research*, 71(8), 3087-3097.
165. Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., ... & Jovanovic-Talisman, T. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of extracellular vesicles*, 7(1), 1535750.
166. Thomou, T., Mori, M. A., Dreyfuss, J. M., Konishi, M., Sakaguchi, M., Wolfrum, C., ... & Kahn, C. R. (2017). Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature*, 542(7642), 450-455.
167. Tian, T., Zhu, Y. L., Zhou, Y. Y., Liang, G. F., Wang, Y. Y., Hu, F. H., & Xiao, Z. D. (2014). Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *Journal of Biological Chemistry*, 289(32), 22258-22267.
168. Tili, E., Michaille, J. J., & Croce, C. M. (2013). Micro RNA s play a central role in molecular dysfunctions linking inflammation with cancer. *Immunological reviews*, 253(1), 167-184.
169. Travis, W. D., Brambilla, E., Burke, A. P., Marx, A., & Nicholson, A. G. (2015). Introduction to the 2015 World Health Organization classification of tumors of the lung, pleura, thymus, and heart. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(9), 1240-1242.
170. Tsai, N. P., Lin, Y. L., & Wei, L. N. (2009). MicroRNA mir-346 targets the 5'-untranslated region of receptor-interacting protein 140 (RIP140) mRNA and up-regulates its protein expression. *Biochemical Journal*, 424(3), 411-418.
171. Tsuta, K., Kohno, T., Yoshida, A., Shimada, Y., Asamura, H., Furuta, K., & Kushima, R. (2014). RET-rearranged non-small-cell lung carcinoma: a clinicopathological and molecular analysis. *British journal of cancer*, 110(6), 1571-1578.
172. Turchinovich, A., Weiz, L., Langhein, A., & Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic acids research*, 39(16), 7223-7233.

173. Turunen, T. A., Roberts, T. C., Laitinen, P., Väänänen, M. A., Korhonen, P., Malm, T., ... & Turunen, M. P. (2019). Changes in nuclear and cytoplasmic microRNA distribution in response to hypoxic stress. *Scientific reports*, *9*(1), 1-12.
174. Umezu, T., Tadokoro, H., Azuma, K., Yoshizawa, S., Ohyashiki, K., & Ohyashiki, J. H. (2014). Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *124*(25), 3748-3757.
175. Vaishnavi, A., Capelletti, M., Le, A. T., Kako, S., Butaney, M., Ercan, D., ... & Doebele, R. C. (2013). Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nature medicine*, *19*(11), 1469-1472.
176. Valinezhad Orang, A., Safaralizadeh, R., & Kazemzadeh-Bavili, M. (2014). Mechanisms of miRNA-mediated gene regulation from common downregulation to mRNA-specific upregulation. *International journal of genomics*, 2014.
177. Varkouhi, A. K., Scholte, M., Storm, G., & Haisma, H. J. (2011). Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *Journal of Controlled Release*, *151*(3), 220-228.
178. Vasudevan, S., & Steitz, J. A. (2007). AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*, *128*(6), 1105-1118.
179. Visone R, Croce CM. MiRNAs and cancer. *Am J Pathol*. 2009 Apr;174(4):1131-8. doi: 10.2353/ajpath.2009.080794. Epub 2009 Mar 5. PMID: 19264914; PMCID: PMC2671346.
180. Wagner, G. R. (1997). Asbestosis and silicosis. *The Lancet*, *349*(9061), 1311-1315.
181. Wang, H., Peng, R., Wang, J., Qin, Z., & Xue, L. (2018). Circulating microRNAs as potential cancer biomarkers: the advantage and disadvantage. *Clinical epigenetics*, *10*(1), 1-10.
182. Wang, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D., & Galas, D. J. (2010). Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic acids research*, *38*(20), 7248-7259.
183. Wang, L., Zhang, L. F., Wu, J., Xu, S. J., Xu, Y. Y., Li, D., ... & Liu, M. F. (2014). IL-1 β -Mediated Repression of microRNA-101 Is Crucial for Inflammation-Promoted Lung Tumorigenesis miR101 Links Inflammation to Lung Cancer. *Cancer research*, *74*(17), 4720-4730.

184. Wang, N., Feng, T., Liu, X., & Liu, Q. (2020). Curcumin inhibits migration and invasion of non-small cell lung cancer cells through up-regulation of miR-206 and suppression of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Acta pharmaceutica*, 70(3), 399-409.
185. Wang, P., Zhuang, L., Zhang, J., Fan, J., Luo, J., Chen, H., ... & Meng, Z. (2013). The serum miR-21 level serves as a predictor for the chemosensitivity of advanced pancreatic cancer, and miR-21 expression confers chemoresistance by targeting FasL. *Molecular oncology*, 7(3), 334-345.
186. Wang, X., Cao, L. E. I., Wang, Y., Wang, X., Liu, N., & You, Y. (2012). Regulation of let-7 and its target oncogenes. *Oncology letters*, 3(5), 955-960.
187. Wani JA, Majid S, Imtiyaz Z, Rehman MU, Alsaffar RM, Shah NN, Alshehri S, Ghoneim MM, Imam SS. MiRNAs in Lung Cancer: Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Potential. *Diagnostics (Basel)*. 2022 Jul 1;12(7):1610. doi: 10.3390/diagnostics12071610. PMID: 35885514; PMCID: PMC9322918.
188. Wani, J. A., Majid, S., Khan, A., Arafah, A., Ahmad, A., Jan, B. L., ... & Rehman, M. U. (2021). Clinico-pathological importance of miR-146a in lung cancer. *Diagnostics*, 11(2), 274.
189. Watabe, S., Kikuchi, Y., Morita, S., Komura, D., Numakura, S., Kumagai-Togashi, A., ... & Uozaki, H. (2020). Clinicopathological significance of microRNA-21 in extracellular vesicles of pleural lavage fluid of lung adenocarcinoma and its functions inducing the mesothelial to mesenchymal transition. *Cancer Medicine*, 9(8), 2879-2890.
190. Watashi, K., Yeung, M. L., Starost, M. F., Hosmane, R. S., & Jeang, K. T. (2010). Identification of small molecules that suppress microRNA function and reverse tumorigenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 24707-24716.
191. Wei, F., Ma, C., Zhou, T., Dong, X., Luo, Q., Geng, L., ... & Liu, Y. (2017). Exosomes derived from gemcitabine-resistant cells transfer malignant phenotypic traits via delivery of miRNA-222-3p. *Molecular cancer*, 16, 1-14.
192. Wei, Y., Li, L., Wang, D., Zhang, C. Y., & Zen, K. (2014). Importin 8 regulates the transport of mature microRNAs into the cell nucleus. *Journal of Biological Chemistry*, 289(15), 10270-10275.
193. Wiggins, J. F., Ruffino, L., Kelnar, K., Omotola, M., Patrawala, L., Brown, D., & Bader, A. G. (2010). Development of a Lung Cancer Therapeutic Based on the Tumor Suppressor

MicroRNA-34 Activity of a Synthetic Tumor Suppressor microRNA. *Cancer research*, 70(14), 5923-5930.

194. Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5), 855-862.

195. Xiao, M., Li, J., Li, W., Wang, Y., Wu, F., Xi, Y., ... & Yu, W. (2017). MicroRNAs activate gene transcription epigenetically as an enhancer trigger. *RNA biology*, 14(10), 1326-1334.

196. Xu, X., Zhu, S., Tao, Z., & Ye, S. (2018). High circulating miR-18a, miR-20a, and miR-92a expression correlates with poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer medicine*, 7(1), 21-31.

197. Yan, H. L., Xue, G., Mei, Q., Wang, Y. Z., Ding, F. X., Liu, M. F., ... & Sun, S. H. (2009). Repression of the miR-17-92 cluster by p53 has an important function in hypoxia-induced apoptosis. *The EMBO journal*, 28(18), 2719-2732.

198. Ying, L., Du, L., Zou, R., Shi, L., Zhang, N., Jin, J., ... & Su, D. (2020). Development of a serum miRNA panel for detection of early stage non-small cell lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(40), 25036-25042.

199. Young, J. A., Ting, K. K., Li, J., Moller, T., Dunn, L., Lu, Y., ... & Gamble, J. R. (2013). Regulation of vascular leak and recovery from ischemic injury by general and VE-cadherin-restricted miRNA antagonists of miR-27. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 122(16), 2911-2919.

200. Yuan, Y., Du, W., Wang, Y., Xu, C., Wang, J., Zhang, Y., ... & Pan, Z. (2015). Suppression of AKT expression by mi R-153 produced anti-tumor activity in lung cancer. *International journal of cancer*, 136(6), 1333-1340.

201. Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., & Bartel, D. P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *cell*, 101(1), 25-33.

202. Zang, Y. S., Zhong, Y. F., Fang, Z., Li, B., & An, J. (2012). MiR-155 inhibits the sensitivity of lung cancer cells to cisplatin via negative regulation of Apaf-1 expression. *Cancer gene therapy*, 19(11), 773-778.

203. Zardo, G., Ciolfi, A., Vian, L., Starnes, L. M., Billi, M., Racanicchi, S., ... & Nervi, C. (2012). Polycombs and microRNA-223 regulate human granulopoiesis by transcriptional

control of target gene expression. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 119(17), 4034-4046.

204. Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental biology*, 302(1), 1-12.

205. Zhang, J., Zhang, H., Liu, J., Tu, X., Zang, Y., Zhu, J., ... & Zhang, J. (2012). miR-30 inhibits TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocyte by targeting Snail1. *Biochemical and biophysical research communications*, 417(3), 1100-1105.

206. Zhang, Y., Fan, M., Zhang, X., Huang, F., Wu, K., Zhang, J., ... & Zhang. (2014). Cellular microRNAs up-regulate transcription via interaction with promoter TATA-box motifs. *Rna*, 20(12), 1878-1889.

207. Zhang, Z. J., Song, X. G., Xie, L., Wang, K. Y., Tang, Y. Y., Yu, M., ... & Song, X. R. (2020). Circulating serum exosomal miR-20b-5p and miR-3187-5p as efficient diagnostic biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer. *Experimental Biology and Medicine*, 245(16), 1428-1436.

208. Zhang, Z., Tang, Y., Song, X., Xie, L., Zhao, S., & Song, X. (2020). Tumor-derived exosomal miRNAs as diagnostic biomarkers in non-small cell lung cancer. *Frontiers in Oncology*, 10, 560025.

209. Zhao, K., Cheng, J., Chen, B., Liu, Q., Xu, D., & Zhang, Y. (2017). Circulating microRNA-34 family low expression correlates with poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic disease*, 9(10), 3735.

Πηγές Εικόνων

- Εικόνα 1** Inoue A, Nukiwa T (2005) Gene Mutations in Lung Cancer: Promising Predictive Factors for the Success of Molecular Therapy. *PLoS Med* 2(1): e13.
- Εικόνα 2** Ν. Μπαλταγιάννης, Δ. Αναγνωστόπουλος. Το νέο Διεθνές Σύστημα Σταδιοποίησης TNM του καρκίνου του πνεύμονος (8η έκδοση). *Επιστημονικά Χρονικά* 2018; 23(1): 35-50
- Εικόνα 3** Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015 Jun 29;87:3-14. doi: 10.1016/j.addr.2015.05.001.
- Εικόνα 4** Sadakierska-Chudy A. MicroRNAs: Diverse Mechanisms of Action and Their Potential Applications as Cancer Epi-Therapeutics. *Biomolecules.* 2020 Sep 7;10(9):1285. doi: 10.3390/biom10091285.
- Εικόνα 5** Tan, W., Liu, B., Qu, S., Liang, G., Luo, W., & Gong, C. (2018). MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy. *Oncology letters, 15(3), 2735–2742.* <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7638>
- Εικόνα 6** Tan, W., Liu, B., Qu, S., Liang, G., Luo, W., & Gong, C. (2018). MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy. *Oncology letters, 15(3), 2735–2742.* <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7638>
- Εικόνα 7** Gayosso-Gómez, L. V., & Ortiz-Quintero, B. (2021). Circulating MicroRNAs in blood and other body fluids as biomarkers for diagnosis, prognosis, and therapy response in lung cancer. *Diagnostics, 11(3), 421.*
- Εικόνα 8** Wang, H., Peng, R., Wang, J., Qin, Z., & Xue, L. (2018). Circulating microRNAs as potential cancer biomarkers: the advantage and disadvantage. *Clinical epigenetics, 10(1), 1-10.*
- Εικόνα 9** Gayosso-Gómez, L. V., & Ortiz-Quintero, B. (2021). Circulating MicroRNAs in blood and other body fluids as biomarkers for diagnosis, prognosis, and therapy response in lung cancer. *Diagnostics, 11(3), 421.*
- Εικόνα 10** Gayosso-Gómez, L. V., & Ortiz-Quintero, B. (2021). Circulating MicroRNAs in blood and other body fluids as biomarkers for diagnosis, prognosis, and therapy response in lung cancer. *Diagnostics, 11(3), 421.*
- Εικόνα 11** Wani JA, Majid S, Imtiyaz Z, Rehman MU, Alsaffar RM, Shah NN, Alshehri S, Ghoneim MM, Imam SS. MiRNAs in Lung Cancer: Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Potential. *Diagnostics (Basel).* 2022 Jul 1;12(7):1610. doi: 10.3390/diagnostics12071610. PMID: 35885514; PMCID: PMC9322918.