



ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΥΚΛΟΦΟΡΟΥΝΤΩΝ microRNAs ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΜΗ-ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΠΝΕΥΜΟΝΑ (ΜΜΚΠ) ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΥΝ ΠΛΑΤΙΝΟΥΧΟ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Μοναστηριώτη Α.¹, Παπαδάκη Χ.¹, Ρούνης Κ.², Καλαπανίδα Δ.², Παπακώστα Β.¹, Γεωργιάδου Μ.², Βαρδάκης Ν.², Μαυρουδής Δ.^{1,2}, Αγγελάκη Σ.^{1,2}

¹ Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα
² Παθολογική-Ογκολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου, Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Τα microRNAs (miRNAs) ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση και την αλληλεπίδραση μεταξύ καρκινικών κυττάρων και ανοσοκυττάρων. Τα κυκλοφορούντα miRNAs πιθανόν αντανακλούν τη συστηματική απόκριση κατά του όγκου, παρέχοντας ταυτόχρονα τη δυνατότητα επαναλαμβανόμενης παρακολούθησης. Τα miR-26a, miR-30d, miR-98, miR-195, let-7c και miR-202 συμμετέχουν στην διαφοροποίηση των μακροφάγων.

Μέθοδοι: Η έκφραση των let-7c, miR-26a, miR-30d, miR-98, miR-195 και miR-202, αναλύθηκε με RT-qPCR στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ (N=125) που συλλέχθηκε πριν την έναρξη της θεραπείας. Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο ομάδες, υψηλής και χαμηλής έκφρασης, ανάλογα με τη διάμεση τιμή έκφρασης κάθε miRNA.

Σκοπός: Η μελέτη της έκφρασης των miRNAs στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ που έλαβαν χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με βάση πλατινούχα σύμπλοκα και η συσχέτισή τους με την έκβαση των ασθενών.

Αποτελέσματα: Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 65 έτη (εύρος: 37-88), 86,4% ήταν άνδρες, 68% είχαν μη-πλακώδη ΜΜΚΠ, 26,4% των ασθενών εμφάνισαν PR, 39,2% SD και 34,4% PD. Η υψηλή έκφραση miR-202 σχετίστηκε με πρόοδο νόσου (HR: 2.335, p=0.040) και επιπλέον αναγνωρίστηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής (HR: 1.564, p=0.021) και μικρότερη συνολική επιβίωση (HR: 1.558, p=0.024) στο σύνολο των ασθενών. Επίσης, η υψηλή έκφραση του miR-202 είχε ανεξάρτητη προγνωστική αξία ως παράγοντας μειωμένης συνολικής επιβίωσης (HR: 1.989, p=0.008) στους ασθενείς με μη-πλακώδες υπότυπο. Τέλος, οι ασθενείς με πλακώδη ΜΜΚΠ και υψηλή έκφραση του miR-26a είχαν μικρότερη συνολική επιβίωση, σε σύγκριση με αυτούς με χαμηλή έκφραση (10,07 vs. 13,53 μήνες, p=0.033).

Συμπεράσματα: Η παρούσα μελέτη δείχνει για πρώτη φορά ότι η έκφραση του miR-202 στο πλάσμα αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη σε ασθενείς με ΜΜΚΠ που λαμβάνουν χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα. Ταυτόχρονα, υποστηρίζεται η υπόθεση ότι κυκλοφορούντα miRNAs που συμμετέχουν στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης αποτελούν υποσχόμενους βιοδείκτες.

ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ

Μοναστηριώτη Αλεξία
Εργ. Μεταφραστικής Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή,
Πανεπιστήμιο Κρήτης
Email: monasal91@gmail.com

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Παρά την πρόοδο που έχει επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια στον τομέα της ιατρικής ακριβείας, η χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα παραμένει ο ακρογωνιαίος λίθος θεραπευτικής αντιμετώπισης ενός μεγάλου μέρους ασθενών με προχωρημένο ή μεταστατικό ΜΜΚΠ, οι οποίοι δεν παρουσιάζουν στοχευμένες γενετικές αλλοιώσεις, ενώ παράλληλα έχουν αποδοθεί και ανοσοδιαμορφωτικές επιδράσεις στα πλατινούχα σύμπλοκα. Έχει βρεθεί ότι τα microRNAs (miRNAs) ρυθμίζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και του ανοσολογικού συστήματος του ξενιστή, καθώς και ότι συμμετέχουν στη ρύθμιση παραγωγής, του κυτταρικού επαναπρογραμματισμού και της διαφοροποίησης των μακροφάγων.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου των κυκλοφορούντων let-7c, miR-26a, miR-30d, miR-98, miR-195 και miR-202 στο πλάσμα, τα οποία έχουν βρεθεί ότι συμμετέχουν στην διαφοροποίηση των μακροφάγων, σε σχέση με:

- ❖ Την έκβαση των ασθενών με ΜΜΚΠ που λαμβάνουν χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα, ως θεραπεία 1^{ης} γραμμής και
- ❖ Τα κλινικά χαρακτηριστικά τους.

Πίνακας 1: Κλινικοπαθολογικά Χαρακτηριστικά Ασθενών							
Ιστολογικός Υπότυπος	Όλοι		Πλακώδες		Μη-Πλακώδες		P value
Χαρακτηριστικά	N	%	N	%	N	%	
Αριθμός Ασθενών	125		40	32.0	85	68.0	
Φύλο							
Άρρεν	108	86.4	40	100.0	68	63.0	0.008*
Θήλυ	17	13.6	0	0.0	17	37.0	
Ηλικία (έτη)							
Μέσος Όρος (εύρος)	65 (37-88)		66.5 (46-88)		63.2 (37-82)		0.339*
ECOG PS							
0	31	24.8	11	27.5	20	23.5	0.354*
1	77	61.6	22	55.0	55	64.7	
2	13	10.4	7	17.5	6	7.1	
3	4	3.2	0	0.0	4	4.7	
Σταδιοποίηση							
II	1	0.8	1	2.5	0	0.0	0.004*
III	4	3.2	4	10	0	0.0	
IV	120	96	35	87.5	85	100.0	
Ιστολογικός Υπότυπος							
Αδενοκαρκίνωμα	77	61.6					ns*
Καρκίνωμα Πλακωδών κυττάρων	40	32.0					
Άλλο	8	6.4					
Αριθμός Μεταστατικών Εστιών							
0	15	12	6	15.0	9	10.6	0.073*
1	50	40	21	52.5	29	34.12	
2	33	26.4	9	22.5	24	28.23	
≥3	27	21.6	4	10.0	23	27.05	
Χημειοθεραπευτικό Σχήμα							
CDDP/TXT	46	36.8	19	47.5	27	31.76	<0.001*
CDDP/GEM	33	26.4	20	50.0	13	15.3	
CDDP/PEM	44	35.2	1	2.5	43	50.59	
PLATINUM-BASED	2	1.6			2	2.35	
Απόκριση στη Θεραπεία							
PR	33	26.4	13	32.5	20	23.53	0.715*
SD	49	39.2	14	35.0	35	41.17	
PD	43	34.4	13	32.5	30	35.3	
ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; CDDP, cisplatin; TXT, taxotere; GEM, gemcitabine; PEM, pemetrexed; PR, partial response; SD, stable disease; PD, progressive disease; *Pearson's chi-squared test, Response to treatment was assessed according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST 1.1 criteria)							

ΜΕΘΟΔΟΙ

Πλάσμα συλλέχθηκε από ασθενείς με προχωρημένο ή μεταστατικό ΜΜΚΠ (N=125), πριν την έναρξη της χημειοθεραπείας (Πίνακας 1). Τα επίπεδα έκφρασης των κυκλοφορούντων miRNAs στο πλάσμα εκτιμήθηκαν με RT-qPCR με την μέθοδο 2- $\Delta\Delta C_t$.

- Για τη σχετική ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο αναφοράς U6 snRNA.
- Τα επίπεδα μεταβολών έκφρασης των miRNAs υπό διερεύνηση σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές έκφρασης στην ομάδα ελέγχου υπολογίστηκε με τη μέθοδο 2- $\Delta\Delta C_t$.
- Οι ασθενείς χαρακτηρίστηκαν ως υψηλής ή χαμηλής έκφρασης ανάλογα με τη διάμεση τιμή έκφρασης του εκάστοτε miRNA.
- Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το υπολογιστικό πρόγραμμα SPSS.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- Η υψηλή έκφραση του miR-202 συσχετίστηκε με πρόοδο νόσου (HR: 2.335; p=0.040, Πίνακας 2).
- Η υψηλή έκφραση του miR-202 συσχετίστηκε με μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής (PFS, p=0.041, Εικόνα 1A) και με μικρότερη συνολική επιβίωση (OS, p=0.022, Εικόνα 1B).
- Η υψηλή έκφραση του miR-202 αναγνωρίστηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μικρότερο διάστημα ελεύθερο υποτροπής (PFS, HR: 1.564, p=0.021, Πίνακας 3) και μικρότερη συνολική επιβίωση (OS, HR: 1.558, p=0.024, Πίνακας 3) στο σύνολο των ασθενών.
- Στους ασθενείς με μη-πλακώδες ιστολογικό υπότυπο, η υψηλή έκφραση του miR-202 συσχετίστηκε με μικρότερη συνολική επιβίωση (OS, p=0.012, Εικόνα 2) και αναγνωρίστηκε ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για μικρότερη συνολική επιβίωση (OS, HR: 1.989; p=0.008, Πίνακας 4).
- Στους ασθενείς με πλακώδες ιστολογικό υπότυπο, η υψηλή έκφραση του miR-26a συσχετίστηκε με μικρότερη συνολική επιβίωση (OS, 10.07 vs. 13.53 μήνες, p=0.033, Εικόνα 3).

Πίνακας 2. Πιθανότητα πρόοδου νόσου ως απόκριση στη χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα (Binary Logistic regression analysis, N=125).

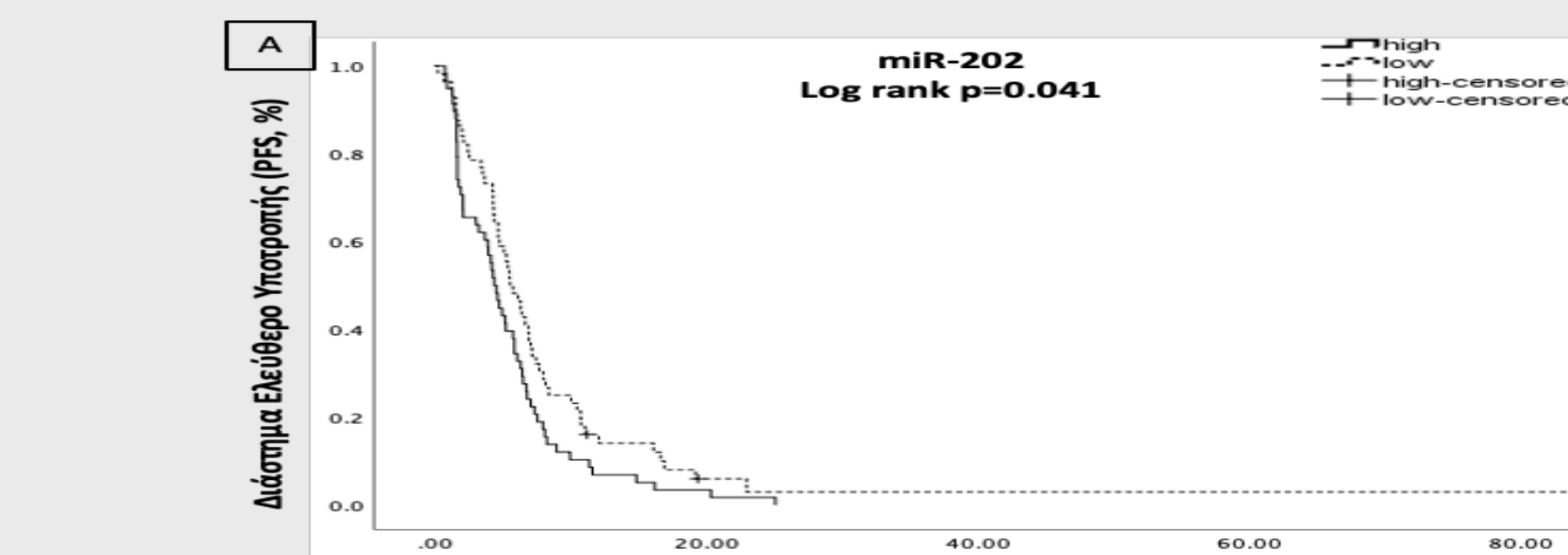
Πρόοδος νόσου ως απόκριση στη χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα	
HR (95% CI)	p value
2.335 (1.038-5.254)	0.040

Πίνακας 3. Διάστημα Ελεύθερο Υποτροπής (PFS) και Συνολική Επιβίωση (OS) σε ασθενείς με ΜΜΚΠ (Multivariate Cox Regression analysis, N=125).

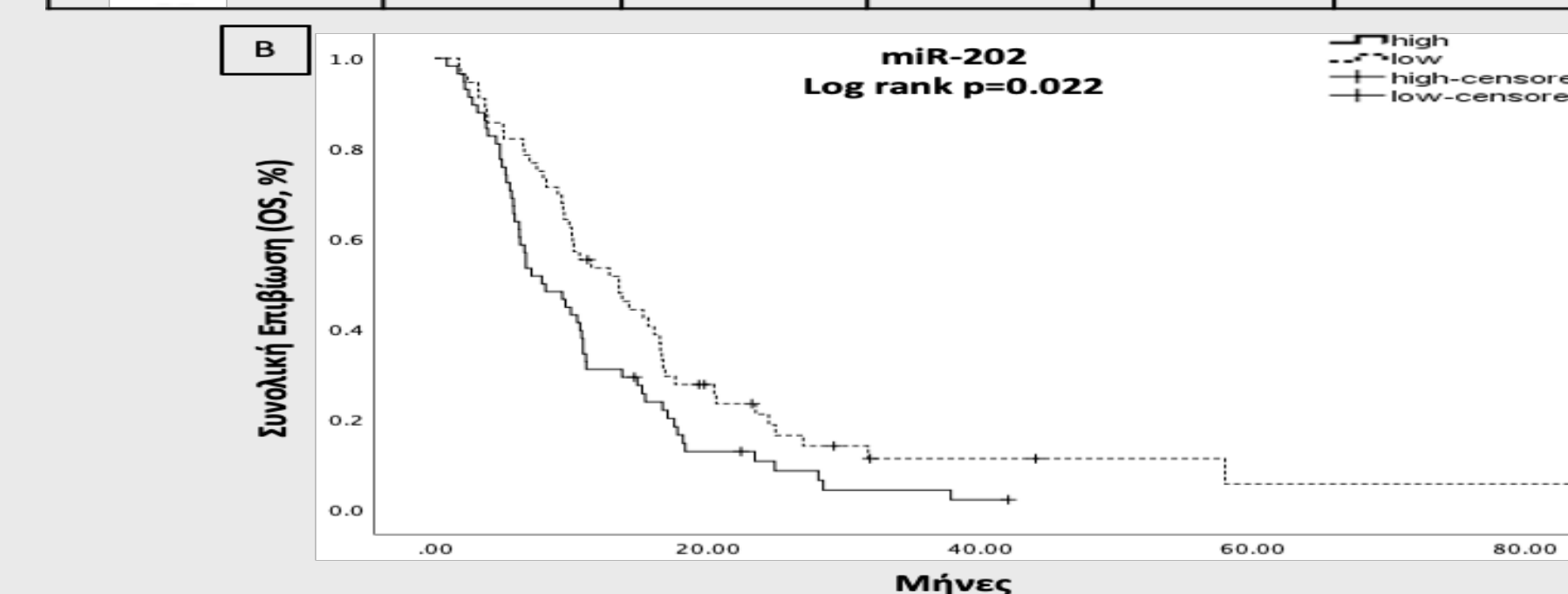
Διάστημα Ελεύθερο Υποτροπής PFS		Συνολική Επιβίωση OS	
HR (95% CI)	p value	HR (95% CI)	p value
1.564 (1.068-2.289)	0.021	1.558 (1.060-2.291)	0.024

Πίνακας 4. Συνολική Επιβίωση (OS) σε ασθενείς με μη-πλακώδες ΜΜΚΠ (Multivariate Cox Regression analysis, N=85).

Συνολική Επιβίωση OS	
HR (95% CI)	p value
1.989 (1.196-3.309)	0.008

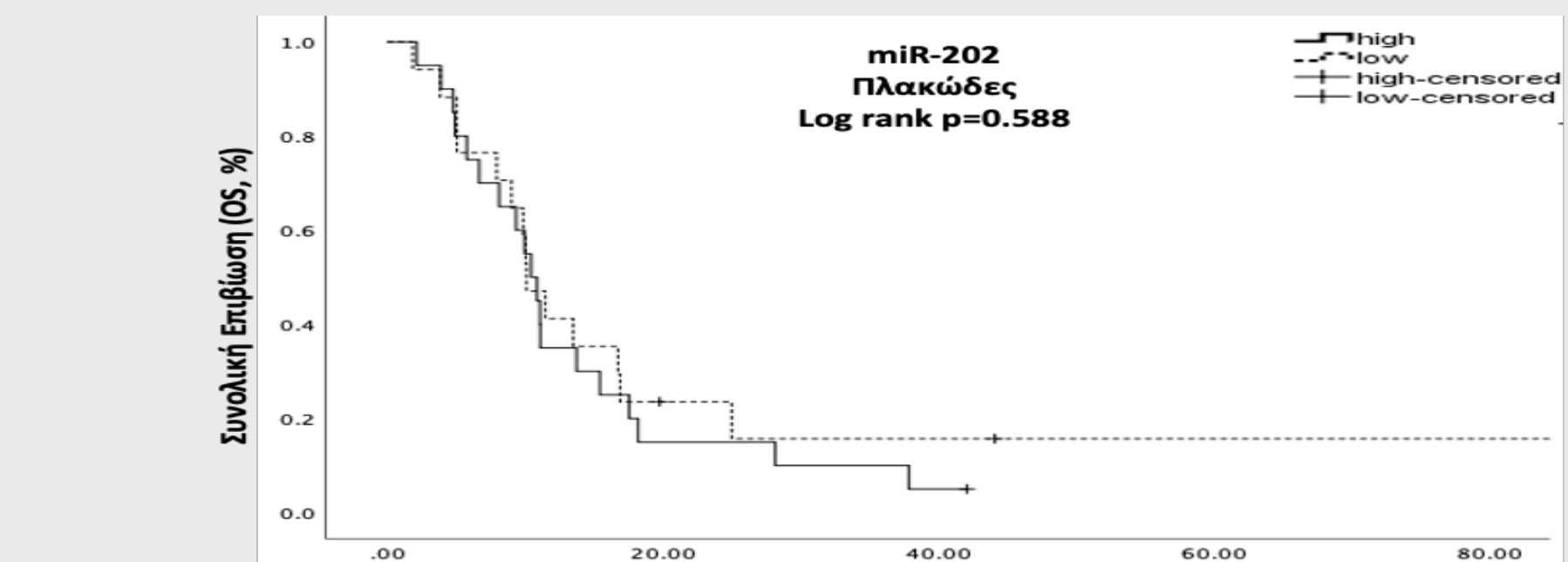


High	58	2	0	0	0
Low	56	2	1	1	1

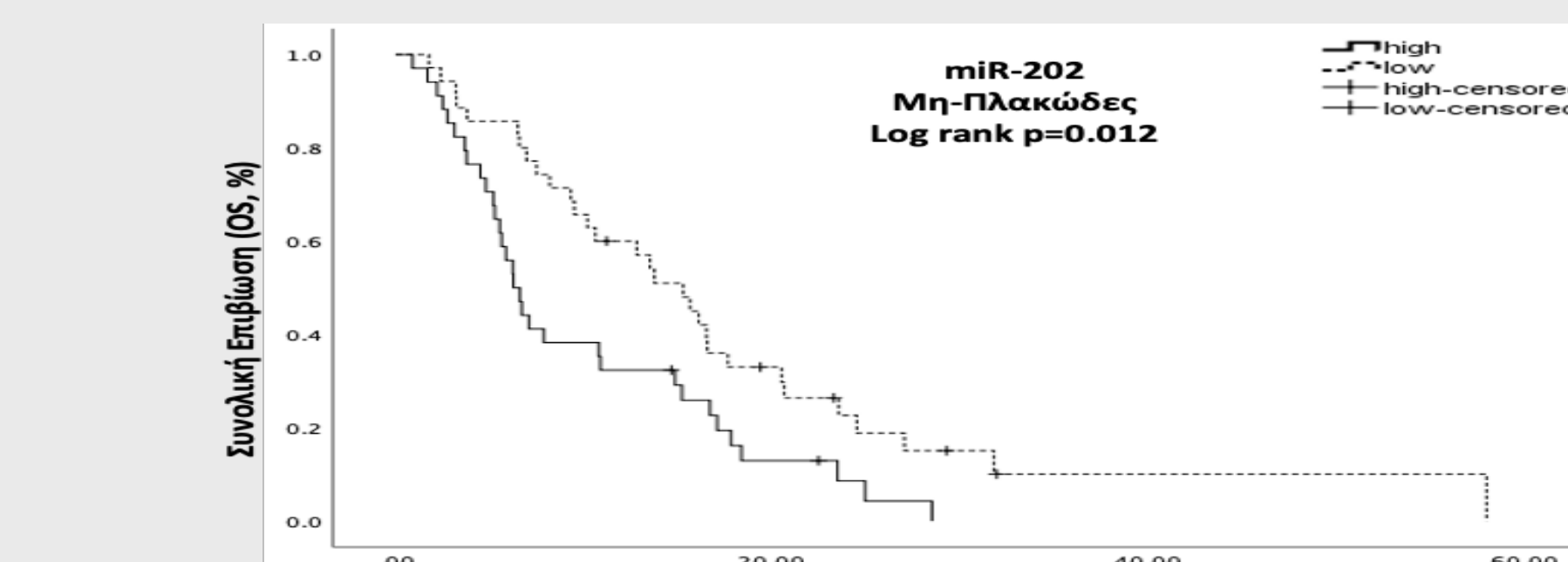


High	58	7	1	0	0
Low	56	13	3	1	1

Εικόνα 1. Διάστημα Ελεύθερο Υποτροπής PFS (Α) και Συνολική Επιβίωση OS (Β) με βάση τα επίπεδα έκφρασης του miR-202 στο πλάσμα ασθενών με ΜΜΚΠ (Kaplan-Meier analysis, N=125).

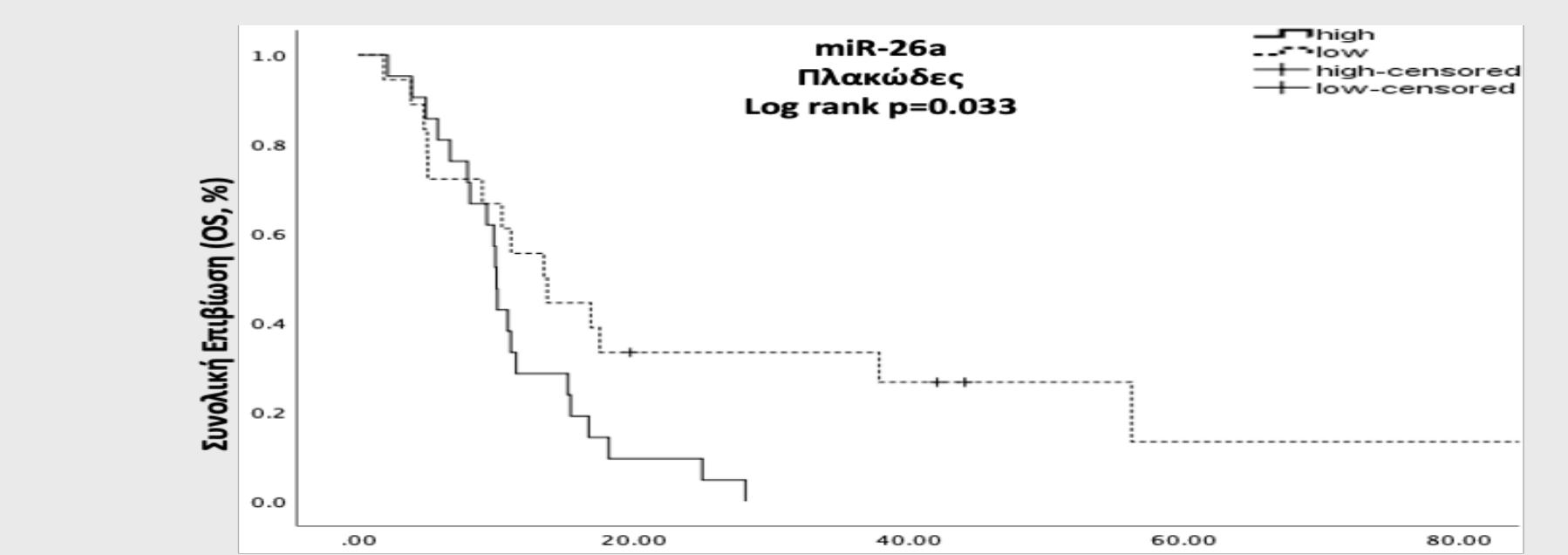


High	20	3	1	0	0
Low	17	3	2	1	1

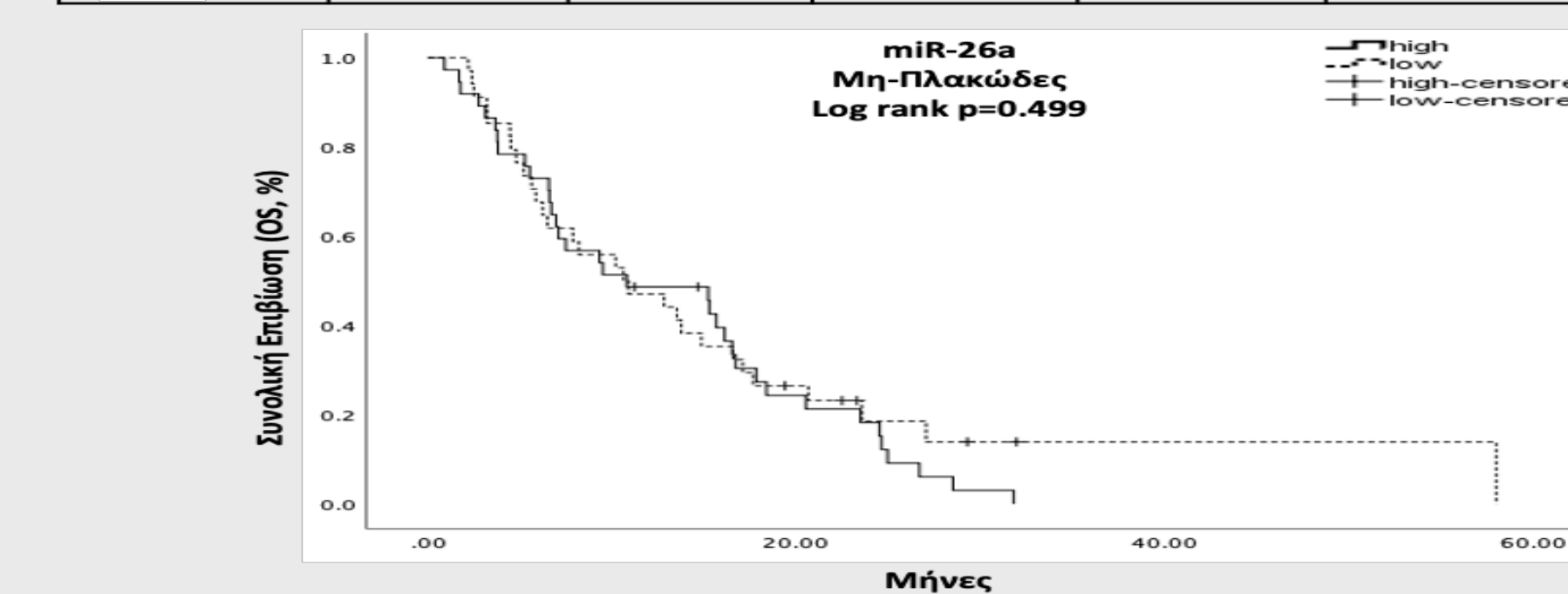


High	34	4	0	0
Low	35	10	1	0

Εικόνα 2. Συνολική Επιβίωση OS με βάση τα επίπεδα έκφρασης του miR-202 στο πλάσμα ασθενών με Πλακώδες (N=40) και Μη-Πλακώδες (N=85) ΜΜΚΠ (Kaplan-Meier analysis).



High	21	2	0	0	0
Low	18	5	4	1	1



High	37	8	0	0
Low	34	8	1	0

Εικόνα 3. Επιβίωση OS (Β) με βάση τα επίπεδα έκφρασης του miR-202 στο πλάσμα ασθενών με Πλακώδες (N=40) και Μη-Πλακώδες (N=85) ΜΜΚΠ (Kaplan-Meier analysis).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι αναλύσεις σε επίπεδο ιστού αδυνατούν να συλλάβουν τη δυναμική σχέση μεταξύ όγκου-ξενιστή, εν αντιθέσει με τους κυκλοφορούντες βιοδείκτες, οι οποίοι μπορούν να αντικατοπτρίζουν τη συστηματική απόκριση του όγκου, παρέχοντας ταυτόχρονα τη δυνατότητα για επαναλαμβανόμενη δειγματοληψία και παρακολούθησης.

- Η παρούσα μελέτη:**
- Είναι η πρώτη που δείχνει ότι miRNAs, που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των μακροφάγων, έχουν ανεξάρτητο προγνωστικό ρόλο σε ασθενείς με προχωρημένο ή μεταστατικό ΜΜΚΠ.
 - Προτείνει ότι τα επίπεδα έκφρασης του miR-202 στο πλάσμα έχουν προγνωστικό ρόλο σε ασθενείς με ΜΜΚΠ ανάλογα με τον ιστολογικό τους τύπο.
 - Προτείνει ότι τα miRNAs που μελετήθηκαν, πιθανώς αντιπροσωπεύουν πολλά υποσχόμενους κυκλοφορούντες βιοδείκτες και ο ρόλος αυτός χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Remark, R. et. al, The non-small cell lung cancer immune contexture. A major determinant of tumor characteristics and patient outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 2015
Joosse, S.A. et. al, Circulating cell-free cancer-testis MAGe-A RNA, BORIS RNA, let-7b and miR-202 in the blood of patients with breast cancer and benign breast diseases. *Br J Cancer* 2014
Song, Q. et. al, MiR-26a-5p potentiates metastasis of human lung cancer cells by regulating ITGbeta8- JAK2/STAT3 axis. *Biochem Biophys Res Commun* 2018
Zhao, Z. et. al, miR-202 functions as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer by targeting STAT3. *Mol Med Rep* 2017