



ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Σκοπός:** Η μελέτη για πρώτη φορά, σε επίπεδο RNA της έκφρασης των μορίων PD-1 και PD-L1 στα ΜΚΠΑ, η διερεύνηση της συσχέτισής τους με την ύπαρξη σωματικών μεταλλάξεων στο γονίδιο *KRAS* και η ανάλυση της προγνωστικής τους αξίας για τους ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα (ΜΜΚΠ).

**Μέθοδοι:** Συμπεριελήφθησαν συνολικά 128 ασθενείς με ΜΜΚΠ οι οποίοι έλαβαν θεραπεία πρώτης γραμμής στην Παθολογική Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Απομονώθηκαν ΜΚΠΑ και έγινε ομογενοποίηση και απομόνωση ολικού RNA. Έπειτα αναπτύχθηκε μέθοδος ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο για τη μελέτη των γονιδίων ενδιαφέροντος. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το *PGK1* και υπολογίστηκαν οι μονάδες σχετικής έκφρασης  $2^{-\Delta CT}$  των γονιδίων στόχων και ακολούθησε στατιστική ανάλυση.

**Αποτελέσματα:** Η έκφραση των μορίων PD-1 ( $P=0.027$ ) και PD-L1 ( $P=0.022$ ) στα ΜΚΠΑ των ασθενών συσχετίζεται θετικά με την ηλικία. Βρέθηκε αυξημένη έκφραση του PD-L1 σε ΜΚΠΑ από γυναίκες ασθενείς ( $P=0.014$ ) και πρώην καπνιστές ( $P=0.022$ ). Δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική σχέση μεταξύ της έκφρασης των μορίων στόχων PD-1 και PD-L1 στα ΜΚΠΑ, με την παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο *KRAS* στα δείγματα καρκινικού ιστού των ασθενών. Σύμφωνα με την ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier, βρέθηκε ότι οι ασθενείς με θετική έκφραση του PD-L1 στα ΜΚΠΑ έχουν στατιστικώς σημαντικά αυξημένο διάστημα ολικής επιβίωσης (OS) σε σχέση με τους ασθενείς με αρνητική έκφραση του PD-L1 στα ΜΚΠΑ ( $P=0.009$ ).

**Συμπεράσματα:** Η έκφραση του PD-L1 στα ΜΚΠΑ θα μπορούσε να αποτελέσει έναν μη επεμβατικά προσδιορισμό βιοδείκτη ευμενούς πρόγνωσης για τους ασθενείς με ΜΜΚΠ.

## CONTACT

Κλείτα Μιχαηλίδου, MSc, PhD  
Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια  
Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης,  
**Email:** k.michailidou@uoc.gr  
**Phone:** 2810394567

# ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ PD-1 ΚΑΙ PD-L1 ΣΕ ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΟΥ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ: ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ *KRAS* ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΚΒΑΣΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ.

Βαγιάτης Βασίλειος<sup>1</sup>, Σβολιαντόπουλος Κωνσταντίνος<sup>2</sup>, Σαριδάκης Γεώργιος<sup>1</sup>, Κουτουλάκη Χαρά<sup>1</sup>, Κυριακίδου Αθηνά<sup>2</sup>, Παπαδάκη Α. Μαρία<sup>1</sup>, Μαυρουδής Δημήτριος<sup>1,2</sup>, Αγγελάκη Σοφία<sup>1,2</sup>, Μιχαηλίδου Κλείτα<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, <sup>2</sup>Παθολογική-Ογκολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ηρακλείου

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο **μη-μικροκυτταρικός καρκίνος πνεύμονα** (ΜΜΚΠ), ο κύριος υπότυπος καρκίνου του πνεύμονα, αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως. Την τελευταία δεκαετία, έχει αναγνωρισθεί ο **σημαντικός ρόλος που κατέχει το ανοσοποιητικό σύστημα στον έλεγχο της ανάπτυξης του όγκου**. Τα κύτταρα του ανθρωπίνου οργανισμού βρίσκονται υπό διαρκή ανοσιακή επιτήρηση προκειμένου να αποτραπεί ο νεοπλασματικός μετασχηματισμός τους, ωστόσο μέσω διαφόρων μηχανισμών, είναι δυνατόν να διαφύγουν από την ανοσοεπιτήρηση με συνέπεια τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους και τελικά την ανάπτυξη του όγκου. Ένα από τα πιο καλά μελετημένα μονοπάτια **ανοσολογικής διαφυγής των καρκινικών κυττάρων** αποτελεί το μονοπάτι PD-L1/PD-1. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι οι σωματικές μεταλλάξεις στο ογκογονίδιο ***KRAS***, που αποτελούν και τις πιο συχνές μεταλλάξεις στους ασθενείς με ΜΜΚΠ, σχετίζονται άμεσα με διαταραχές στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος, επηρεάζοντας την ενεργοποίηση μονοπατιών που διαμορφώνουν ένα ανοσολογικά ενεργό μικροπεριβάλλον του όγκου (TME). Επίσης, υπάρχουν δεδομένα που αποδεικνύουν την που τη συσχέτιση μεταξύ της ύπαρξης μεταλλάξεων *KRAS* και υψηλότερης έκφρασης PD-L1.

Οι όγκοι προκαλούν εκτεταμένη διαταραχή του ανοσοποιητικού συστήματος και στην περιφέρεια. Προς αυτή τη κατεύθυνση, τα μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος (ΜΚΠΑ), τα οποία εμπεριέχουν όλους τους πληθυσμούς των κυκλοφορούντων ανοσοκυττάρων, μπορούν εύκολα να απομονωθούν από το περιφερικό αίμα και να αναλυθούν για τον προσδιορισμό της έκφρασης μορίων-σημείων ελέγχου της ανοσολογικής απάντησης, όπως το PD-1 και το συνδότη του PD-L1, σε πραγματικό χρόνο

## ΣΚΟΠΟΣ

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη για **πρώτη φορά**, σε επίπεδο **RNA** της **έκφρασης των μορίων PD-1 και PD-L1 στα ΜΚΠΑ**, η διερεύνηση της **συσχέτισής** τους με την ύπαρξη ή όχι **σωματικών μεταλλάξεων στο γονίδιο *KRAS*** και η ανάλυση της **προγνωστικής τους αξίας** για τους ασθενείς με ΜΜΚΠ

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

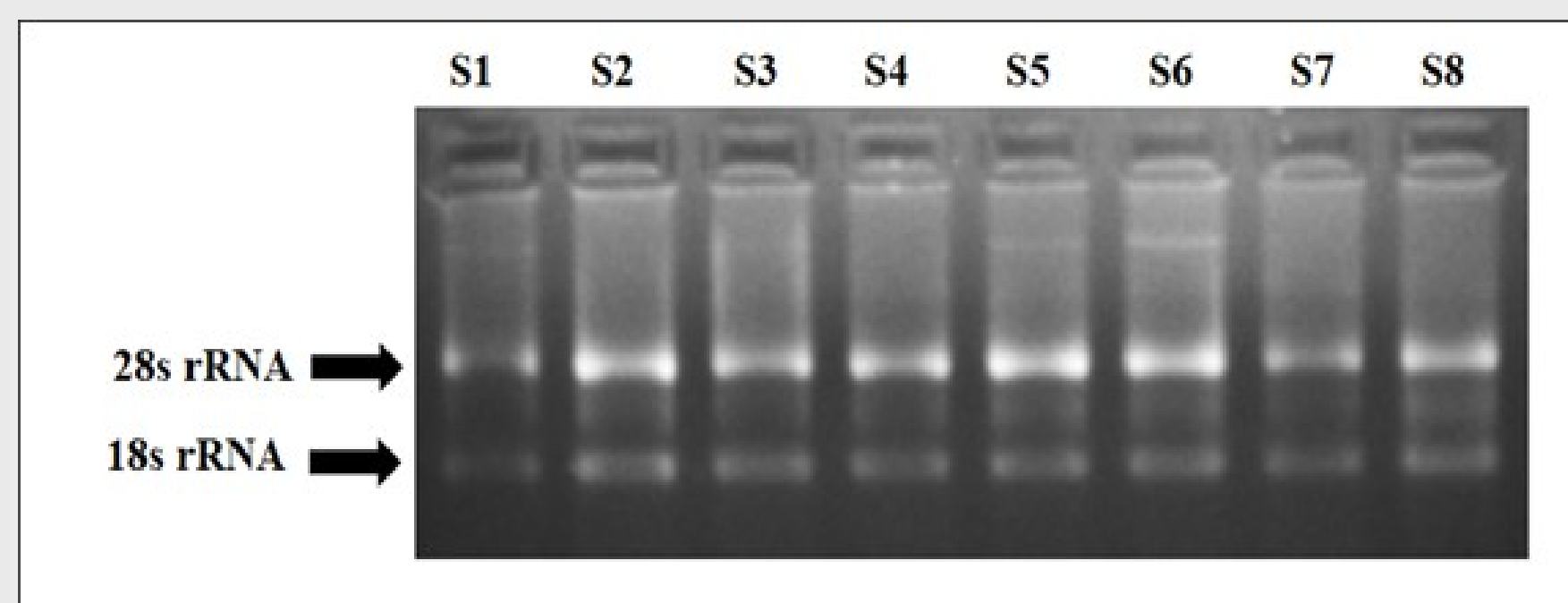
**Συλλογή βιολογικών δειγμάτων:** Δείγματα ολικού αίματος συλλέχθηκαν από 128 ασθενείς με ΜΜΚΠ πριν την έναρξη πρώτης γραμμής θεραπείας στην Παθολογική Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠαΓΝΗ). Αμέσως μετά τη συλλογή έγινε απομόνωση ΜΚΠΑ, με φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση φικόλης, και αποθήκευση στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία.

**Απομόνωση ολικού RNA και ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχός του:** Η απομόνωση ολικού RNA από το ίζημα των ΜΚΠΑ, έγινε με την χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol. Το απομονωθέν RNA ακολούθως ελέγχθηκε ποσοτικά με φωτομέτρηση στα 260nm και ποιοτικά με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης (1.5%/v/v).

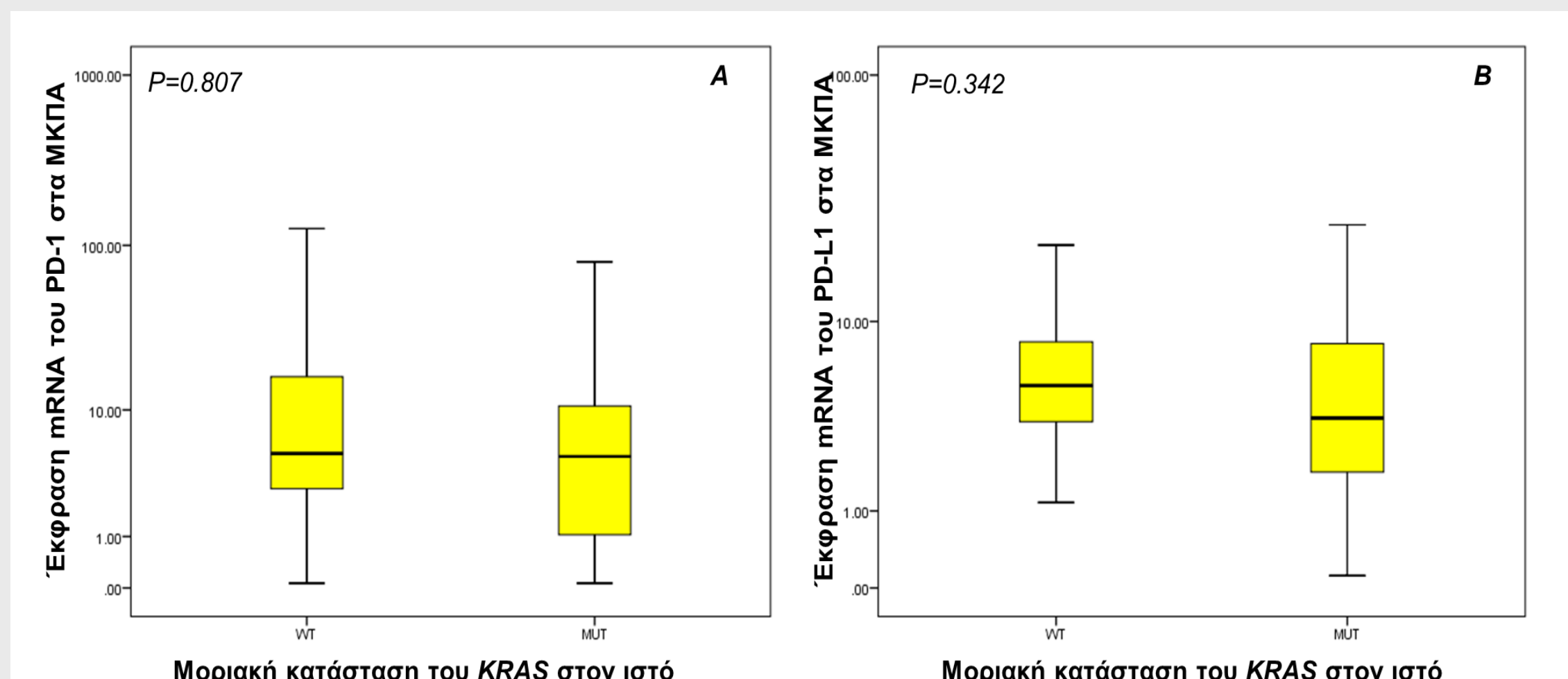
**Σύνθεση cDNA με αντίστροφη μεταγραφή και ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων στόχων, PD-1 και PD-L1, με ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο:** Ακολούθησε σύνθεση συμπληρωματικού cDNA σύνθεση cDNA με τυχαία εξαμερή εκκινητών. Η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των γονιδίων στόχων πραγματοποιήθηκε με ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο με την τεχνολογία Taq-Man και κατάλληλα σηματομενούς ιχνηθέτες (probes). Το γονίδιο αναφοράς *PGK* χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων μας και τον υπολογισμό των μονάδων σχετικής ποσοτικοποίησης (relative quantification units).

**Ανάλυση αποτελεσμάτων:** Με κατάλληλη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων αξιολογήθηκε η προβλεπτική και προγνωστική αξία της έκφρασης των PD-1 και PD-L1 και της συσχέτισης με την ύπαρξη *KRAS* μεταλλάξεων.

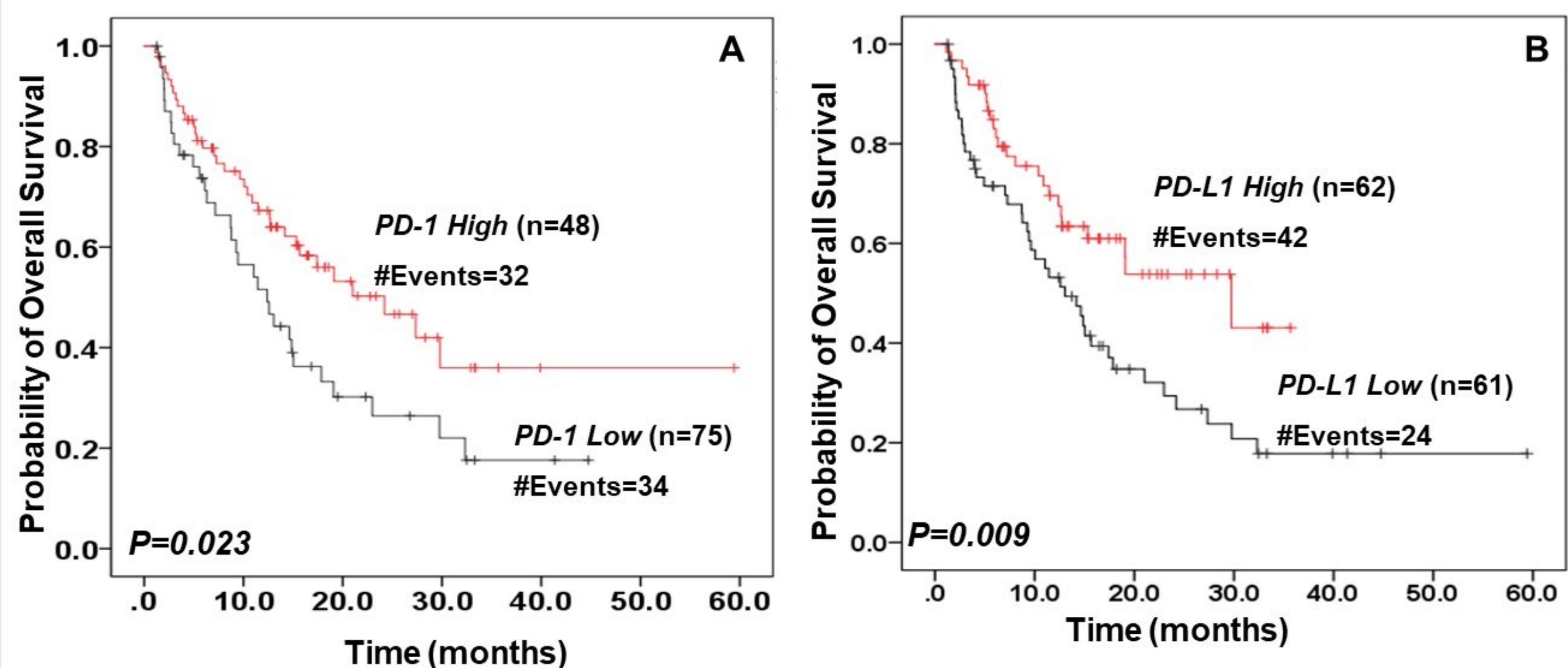
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



**Εικόνα 1.** Έλεγχος ποιότητας απομονωθέντος ολικού RNA από τα ΜΚΠΑ, με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης. Η παρουσία των δύο ζωνών του 28s και 18s rRNA και η απουσία προϊόντων αποικοδόμησης αποτελεί ένδειξη της καλής ποιότητας του ολικού RNA.



**Εικόνα 2.** Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές σχέσεις μεταξύ της ύπαρξης μεταλλάξεων στο γονίδιο *KRAS* στα δείγματα ιστού των ασθενών όπως προσδιορίστηκαν με αλληλούχιση με την έκφραση του PD-1 ( $P=0.807$ ) και του PD-L1 ( $P=0.342$ ) στα ΜΚΠΑ. Το *P* value υπολογίστηκε με το τεστ McNemar.



**Εικόνα 3.** Με τη βοήθεια του αλγορίθμου Xtile, υπολογίστηκε το βέλτιστο σημείο λήψης απόφασης (cutoff) ως το 41<sup>ο</sup> εκατοστημόριο (3.91 μονάδες ποσοτικοποίησης) για το PD-1 και το 50<sup>ο</sup> εκατοστημόριο (4.49 μονάδες ποσοτικοποίησης) για το PD-L1. Ακολούθως τα ΜΚΠΑ από τους ασθενείς με ΜΜΚΠ κατηγοριοποιήθηκαν σε ομάδες υψηλής και χαμηλής έκφρασης με βάση τα όρια αυτά. Από την ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier προκύπτει ότι οι ασθενείς με ΜΚΠΑ που χαρακτηρίζονται από υψηλή έκφραση του PD-1 (Μέρος Α;  $P=0.023$ ) ή υψηλή έκφραση του PD-L1 (Μέρος Β,  $P=0.009$ ) παρουσιάζουν μεγαλύτερο διάστημα ολικής επιβίωσης σε σύγκριση με τους ασθενείς που έχουν ΜΚΠΑ με χαμηλή έκφραση των δύο μορίων. Επομένως, τόσο το PD-1 όσο και το PD-L1, στη περιφέρεια, μπορούν να θεωρηθούν ως βιοδείκτες ευμενούς πρόγνωσης που μπορούν να προσδιοριστούν μη επεμβατικά.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- ✓ Δεν βρέθηκε στατιστικώς σημαντική σχέση μεταξύ της έκφρασης των μορίων στόχων PD-1 και PD-L1 στα ΜΚΠΑ, με την παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο *KRAS* στα δείγματα καρκινικού ιστού των ασθενών
- ✓ Σύμφωνα με την ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan-Meier, βρέθηκε ότι οι ασθενείς με θετική έκφραση του PD-1 ( $P=0.023$ ) και του PD-L1 ( $P=0.009$ ) στα ΜΚΠΑ έχουν στατιστικώς σημαντικά αυξημένο διάστημα ολικής επιβίωσης (OS) σε σχέση με τους ασθενείς με αρνητική έκφραση του PD-1 και του PD-L1 στα ΜΚΠΑ.
- ✓ Η ανάλυση της έκφρασης των μορίων PD-1 και PD-L1 στα ΜΚΠΑ των ασθενών με ΜΜΚΠ, έδειξε ότι αποτελούν βιοδείκτες ευμενούς πρόγνωσης για τους ασθενείς με ΜΜΚΠ, των οποίων η έκφραση μπορεί να αναλυθεί μη επεμβατικά, στα μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος.

## Βιβλιογραφία

- Cooper, W.A., et al., PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma. Lung Cancer, 2015. 89(2): p. 181-8.
- Tuminello, S., et al., PD-L1 as a prognostic biomarker in surgically resectable non-small cell lung cancer: a meta-analysis. Transl Lung Cancer Res, 2020. 9(4): p. 1343-1360.
- Lahiri, A., et al., Lung cancer immunotherapy: progress, pitfalls, and promises. Mol Cancer, 2023. 22(1): p. 40.
- Kim, H.R., et al., PD-L1 expression on immune cells, but not on tumor cells, is a favorable prognostic factor for head and neck cancer patients. Sci Rep, 2016. 6: p. 36956.
- Kwon, S.C., et al., The Expression of Programmed Death-Ligand 1 on Immune Cells Is Related to a Better Prognosis in Biliary Tract Cancer. Gut Liver, 2023. 17(6): p. 933-941.
- Dart, S.J., et al., Changes in expression of PD-L1 on peripheral T cells in patients with melanoma and lung cancer treated with PD-1 inhibitors. Sci Rep, 2021. 11(1): p. 15312.
- Tang, F. and P. Zheng, Tumor cells versus host immune cells: whose PD-L1 contributes to PD-1/PD-L1 blockade mediated cancer immunotherapy? Cell Biosci, 2018. 8: p. 34.
- Matikas, A., et al., Prognostic Implications of PD-L1 Expression in Breast Cancer: Systematic Review and Meta-analysis of Immunohistochemistry and Pooled Analysis of Transcriptomic Data. Clin Cancer Res, 2019. 25(18): p. 5717-5726.

## Ευχαριστίες

Μέρος της παρούσας εργασίας χρηματοδοτήθηκε από την Εταιρεία Ογκολόγων - Παθολόγων Ελλάδας (Ε.Ο.Π.Ε.)