



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

*«Μελέτη της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή σε πρωτοπαθείς όγκους και σε συνοδές μεταστάσεις στο ΚΝΣ σε ασθενείς με νεοπλασίες.»*

**ΠΑΠΑΔΑΚΗ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ**  
ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ - ΟΓΚΟΛΟΓΟΣ

Δ Ι Δ Α Κ Τ Ο Ρ Ι Κ Η Δ Ι Α Τ Ρ Ι Β Η

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022**





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

*«Μελέτη της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή σε πρωτοπαθείς όγκους και σε συνοδές μεταστάσεις στο ΚΝΣ σε ασθενείς με νεοπλασίες.»*

**ΠΑΠΑΔΑΚΗ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ  
ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ - ΟΓΚΟΛΟΓΟΣ**

**Δ Ι Δ Α Κ Τ Ο Ρ Ι Κ Η Δ Ι Α Τ Ρ Ι Β Η**

**Ι Ω Α Ν Ν Ι Ν Α 2 0 2 2**

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

**Ημερομηνία αίτησης της κ. Παπαδάκη Αλεξάνδρας:** 09-03-2017

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** Γ.Σ. αριθμ. 798<sup>α</sup>/06-06-2017

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων:

Πενθερουδάκης Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ογκολογίας

Μέλη:

Μπατιστάτου Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Γούσια Άννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 28-07-2017

«Μελέτη της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή σε πρωτοπαθείς όγκους και σε συνοδές μεταστάσεις στο ΚΝΣ σε ασθενείς με νεοπλασίες»

**Ανασυγκρότηση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** Γ.Σ. αριθμ. 1001<sup>α</sup>/29-03-2022

Επιβλέπων:

Μάουρι Ντάβιντε, Επίκουρος Καθηγητής Ογκολογίας

Μέλη:

Μπατιστάτου Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Γούσια Άννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 1009<sup>α</sup>/08-06-2022**

1. Μάουρι Ντάβιντε, Επίκουρος Καθηγητής Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Μπατιστάτου Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Γούσια Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Βούλγαρης Σπυρίδων, Καθηγητής Νευροχειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Μήτσης Μιχαήλ, Καθηγητής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Τσέκερης Περικλής, Καθηγητής Ακτινοθεραπείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Αλεξίου Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Νευροχειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

**Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 27-06-2022**

Ιωάννινα 4-11-2022

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Σπυρίδων Κοντισιώτης

Καθηγητής Νευρολογίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική εκπονήθηκε την περίοδο 2017-2022 στο τμήμα Ιατρικής, της σχολής των Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Συγκεκριμένα, η διατριβή εκπονήθηκε στο Παθολογοανατομικό και Ογκολογικό τμήμα του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, με τη συνεργασία και τη βοήθεια επιστημόνων και από τα δύο τμήματα, τους οποίους επιθυμώ να ευχαριστήσω τον καθένα ξεχωριστά.

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Ογκολογίας κ. Γεώργιο Πενθερουδάκη, ο οποίος υπήρξε ο αρχικός επιβλέπων της παρούσας διατριβής. Η εμπιστοσύνη που μου έδειξε, η καθοδήγησή του στα πρώτα βήματα, οι επιστημονικές συμβουλές του υπήρξαν για εμένα ισχυρά εχέγγυα για να προχωρήσω στην έρευνα και να ολοκληρώσω την διατριβή αυτή.

Εν συνεχεία ευχαριστώ τον τωρινό διευθυντή της Ογκολογικής κλινικής, επίκουρο καθηγητή ογκολογίας κ. Davide Mauri, για τη βοήθειά του και την άριστη συνεργασία που έχουμε τόσο στο εκπαιδευτικό, όσο και στο κλινικό κομμάτι.

Κυρίως όμως θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Παθολογοανατομίας κα. Άννα Γούσια, ο ρόλος της οποίας ήταν καθοριστικός για την εκπόνηση της παρούσας διατριβής. Το αμέριστο ενδιαφέρον της, ο πολύτιμος χρόνος που διέθεσε για να στηρίξει την έρευνα αυτή και πάνω από όλα ο ενθαρρυντικός και υποστηρικτικός της λόγος ήταν τα βασικά στοιχεία που μου έδιναν κίνητρο να συνεχίσω παρά τις όποιες δυσκολίες. Χωρίς την επιστημονική της κατάρτιση στο παθολογοανατομικό κομμάτι της διατριβής μου δε θα ήταν εφικτό να εξαχθούν χρήσιμα αποτελέσματα από την έρευνα.

Ακόμη, ευχαριστώ την κα Αντωνία Χαρχαντή, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας, Ιστολογίας και Εμβρυολογίας και την κα Αλεξάνδρα Παπούδου-Μπάη, Επίκουρη καθηγήτρια Παθολογοανατομίας για τη βοήθειά τους.

Επίσης, ευχαριστώ την κα Μαρίνα Τσιτσέ για τη βοήθειά της στην ανεύρεση των ιατρικών φακέλων και τους συναδέλφους μου ειδικούς ογκολόγους και ειδικευόμενους ιατρούς της Ογκολογικής κλινικής.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου, τον σύζυγό μου Νίκο και τα παιδιά μου Λυδία και Φαίδρα για την απεριόριστη στήριξή τους.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ .....</b>	<b>1</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>8</b>
<b>2. ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ .....</b>	<b>9</b>
2.1 Ορισμός της ανοσολογίας.....	9
2.2 Γενικά στοιχεία του ανοσοποιητικού συστήματος και ο ρόλος του. ....	9
2.3 Ο ρόλος των διηθητικών ανοσοποιητικών κυττάρων στον καρκίνο. ....	11
2.3.1 Τα κυριότερα κύτταρα της φυσικής ανοσίας ή έμφυτης ή μη ειδικής (Innate) είναι :.....	12
2.3.2 Τα κύτταρα της επίκτητης ή προσαρμοστικής ή ειδικής ανοσίας (acquired or specific or adaptive immunity) είναι:.....	17
2.4. Immune Checkpoints.....	23
<b>3. ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΕΣ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ .....</b>	<b>26</b>
3.1 Επιδημιολογία.....	26
3.2 Διάγνωση, Παθολογοανατομία, Μοριακή βιολογία.....	28
3.2.1 Διάγνωση.....	28
3.2.2 Μέθοδοι διάγνωσης .....	28
3.2.3 Παθολογοανατομία, υγρή βιοψία και μοριακή βιολογία. ....	29
3.3 ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΩΤΟΠΑΘΗ ΒΛΑΒΗ ΣΕ ΜΕΤΑΣΤΙΚΗ ΝΟΣΟ. ....	31
3.4 Μηχανισμοί μετάστασης από συγκεκριμένους πρωτοπαθείς όγκους .....	39
3.5 Θεραπευτική προσέγγιση εγκεφαλικών μεταστάσεων.....	43
<b>4.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....</b>	<b>53</b>
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>56</b>
<b>5. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ .....</b>	<b>58</b>
<b>6.ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ .....</b>	<b>60</b>
<b>7.ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ .....</b>	<b>61</b>
7.1 Υλικό .....	61
7.1.1 Συλλογή ιστικών δειγμάτων .....	61
7.1.2 Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά.....	61
7.2 Μέθοδοι.....	64
7.2.1 Ανοσοϊστοχημεία.....	64
7.2.2 Εκτίμηση των TILS στις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις .....	66
7.2.3 Εκτίμηση του PD-L1 στις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις.....	83



7.2.4 Εκτίμηση του PD-1 στις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις .....	91
<b>8.ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....</b>	<b>95</b>
<b>9.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>96</b>
<b>10.ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ .....</b>	<b>107</b>
<b>11.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>111</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....</b>	<b>113</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>115</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ .....</b>	<b>117</b>

## ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1.Τα ποσοστά των ασθενών με εγκεφαλικές μεταστάσεις .....	27
Πίνακας 2.Μοριακές υπογραφές συγκεκριμένων κακοήθων νεοπλασμάτων. ....	30
Πίνακας 3.Χαρακτηριστικά του συνόλου των ασθενών και των όγκων τους. ....	63
Πίνακας 4.Πρωτογενή αντισώματα, η πηγή, ο κλώνος και η αραίωση τους. ....	64
Πίνακας 5.Hazard ratios and 95% confidence intervals estimated by univariate Cox regression models with respect to OS1 and OS2 .....	103
Πίνακας 6.Hazard ratios and 95% confidence intervals estimated by univariate Cox regression models for clinicopathological parameters with respect to OS1 and OS2. ....	106

## ΕΙΚΟΝΕΣ

<b>Εικόνα 1.</b> Η ισορροπία μεταξύ των ανοσοκυττάρων που προάγουν την ανοσολογική ανοσολογική και των ανοσοκυττάρων καταστολείς αυτής κατά την διάρκεια εξέλιξης του καρκίνου.....	11
Εικόνα 2. Τα TILS στον καρκίνο .....	19
Εικόνα 3. Ο διπλός ρόλος των T cells στα αρχικά στάδια του καρκίνου και στο στάδιο της μετάστασης. ....	20
Εικόνα 4. Immune checkpoints στο μικροπεριβάλλον του όγκου.....	24
Εικόνα 5. Στάδια ανάπτυξης εγκεφαλικής μετάστασης. ....	31
Εικόνα 6.Αλληλεπίδραση ανοσοκυττάρων και κυττάρων του όγκου.....	33
Εικόνα 7.Το μικροπεριβάλλον του Κ.Ν.Σ των εγκεφαλικών μεταστάσεων.....	37
Εικόνα 8.Προτεινόμενος θεραπευτικός αλγόριθμος ασθενών με εγκεφαλικές μεταστάσεις.(A) In general. (B) For SCLC patients. (C) For melanoma patients.....	52
Εικόνα 9.Εικόνα 9.CD8 x200, low stromal, low intraepithelial. ....	68
Εικόνα 10. CD8 x200, low stromal, low intraepithelial. ....	68
Εικόνα 11.CD8 x600, high stromal, low intraepithelial. ....	69
Εικόνα 12.CD8 x200, high stromal, low intraepithelial. ....	70
Εικόνα 13. CD8 x400, high stromal, high intraepithelial. ....	70
Εικόνα 14.CD8 x400-1, high stromal, high intraepithelial. ....	71
Εικόνα 15.CD8 x400, low stromal, high intraepithelial. ....	71
Εικόνα 16. CD8 x400, low stromal, high intraepithelial. ....	72
Εικόνα 17.CD8 x400, primary tumor urothelial. ....	72
Εικόνα 18. CD8 x200, primary tumor urothelial. ....	73
Εικόνα 19. CD8 x200 primary tumor lung.....	73
Εικόνα 20. CD8 x100 primary tumor lung.....	74

Εικόνα 21. CD3 x400, high stromal, low intraepithelial .....	74
Εικόνα 22. CD3 x200, high stromal, low intraepithelial .....	75
Εικόνα 23. CD3 x400, high stromal, high intraepithelial. ....	76
Εικόνα 24. CD3 x400, high stromal, high intraepithelial. ....	76
Εικόνα 25. CD3 x400,high stromal, high intraepithelial. ....	77
Εικόνα 26.CD3 x200,high stromal, high intraepithelial. ....	77
Εικόνα 27.CD3 x200, primary tumor urothelial. ....	78
Εικόνα 28. CD3 x200, primary tumor lung.....	78
Εικόνα 29. FOXP3 x400-2.....	79
Εικόνα 30. FOXP3 x400.....	79
Εικόνα 31 FOXP3 x400-2.....	80
Εικόνα 32.. FOXP3 x200.....	80
Εικόνα 33.. FOXP3 x200.....	81
Εικόνα 34. FOXP3 x400.....	81
Εικόνα 35. FOXP3 x400, primary tumor urothelial .....	82
Εικόνα 36. FOXP3 x200, primary tumor lung.....	82
Εικόνα 37.Η θετική χρώση του PD-L1 στα immune cells(IC) .....	84
Εικόνα 38. Σε κάποιες περιπτώσεις, παρατηρήθηκε επίσης ολομεμβρανική χρώση των IC, ειδικά σε κύτταρα που είναι μορφολογικά συνεπή με μακροφάγα και /ή δενδριτικά κύτταρα. ....	84
Εικόνα 39.Η χρώση των IC συχνά εμφανίστηκε με τη μορφή συσσωμάτων είτε στα ενδοογκικά ή στα στρωματικά IC, είτε και στα δύο.....	85
Εικόνα 40.Η χρώση των IC παρατηρήθηκε επίσης με μορφή εστιακών ή διάχυτων ενδοογκικών διάσπαρτων μονοκυττάρων ή μικρών συσσωμάτων διασκορπισμένων μεταξύ των νεοπλασματικών κυττάρων (TC). ....	85
Εικόνα 41. PDL1 x100. ....	86
Εικόνα 42.PDL1 x200. ....	86
Εικόνα 43.PDL1 x400. ....	87
Εικόνα 44. PDL1 x400, immune cells.....	87
Εικόνα 45. PDL1 x200, immune cells.....	88
Εικόνα 46. PDL1x400,primary , urothelial. ....	88
Εικόνα 47. PDL1x200,primary tumor, urothelial.....	89
Εικόνα 48. PDL1x200,primary tumor, lung.....	89
Εικόνα 49. PDL1x100,primary tumor, lung.....	90
Εικόνα 50.PD1x200. ....	91
Εικόνα 51. PD1-x400. ....	92
Εικόνα 52. PD1x400.....	92
Εικόνα 53. PD1x400,primary tumor, urothelial. ....	93
Εικόνα 54. PD1x200,primary tumor, urothelial. ....	93
Εικόνα 55. PD1x200,primary tumor, lung. ....	94
Εικόνα 56..4PD1x100, primary tumor, lung .....	94

## ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

Διάγραμμα 1.Ιστόγραμμα συχνοτήτων για CD3, CD8, FOXP3.....	97
Διάγραμμα 2.Συζευγμένα δεδομένα από τον πρωτοπαθή όγκο και τη μετάσταση για CD3, CD8 and FOXP3. Paired plots of CD3, CD8 and FOXP3 values in primary and metastatic samples. ....	98
Διάγραμμα 3.Η καμπύλη Kaplan-Meier σε σχέση με (Α) OS1 και (Β) OS2 για το σύνολο των ασθενών με διαθέσιμα δεδομένα παρακολούθησης .....	99

Διάγραμμα 4.Οι καμπύλες Kaplan-Meier όπως διαμορφώθηκαν από τη συσχέτιση της έκφρασης sFOXP3 με την συνολική επιβίωση (Α) OS1 και (Β) OS2. ....	100
Διάγραμμα 5.Η καμπύλη Kaplan-Meier βασισμένη στη συσχέτιση της έκφρασης των ολικών FOXP3 με την OS2. Kaplan-Meier curve based on total FOXP3 expression with respect to OS2. ....	101



## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι εγκεφαλικές μεταστάσεις αποτελούν την πιο συχνή κακοήθεια εγκεφάλου στους ενήλικες. Οι ασθενείς με κακοήθεια διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης απομακρυσμένων μεταστάσεων, συμπεριλαμβανομένων των εγκεφαλικών, κατά την πορεία της νόσου τους. Η επίπτωση εγκεφαλικών μεταστάσεων σε ασθενείς με καρκίνο ποικίλλει ανάλογα με την εντόπιση της πρωτοπαθούς εστίας, με κυρίαρχο τον καρκίνο πνεύμονος και το μελάνωμα, αλλά βαίνει αυξανόμενη κατά τις τελευταίες δεκαετίες. Για πολλά χρόνια, ο εγκέφαλος θεωρούνταν μη ανοσογόνο όργανο και κατ' επέκταση, οι εγκεφαλικές μεταστάσεις στο Κ.Ν.Σ ότι στερούνταν ανοσολογικής απόκρισης. Τα τελευταία χρόνια, η θεωρία αυτή τείνει να αναθεωρηθεί. Ωστόσο, οι γνώσεις μας είναι περιορισμένες, διότι η ανοσολογική απάντηση στο εγκεφαλικό παρέγχυμα δεν έχει μελετηθεί αρκετά.

Ο θεμελιώδης ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η διατήρηση της ιστικής ομοιόστασης, με τη συνεχή ανοσοεπιτήρηση και την προαγωγή της φλεγμονώδους αντίδρασης από τον ξενιστή έναντι του όγκου. Φυσιολογικά, με την έναρξη της ανοσολογικής απόκρισης σηματοδοτείται η έναρξη αναχαίτησής της από τον ίδιο τον οργανισμό για την αποφυγή αυτοάνοσων συμβαμάτων. Η ισορροπία μεταξύ ανοσοαπόκρισης και ανοσοκαταστολής αποτελεί τον μηχανισμό ανοσοελέγχου. Στην πολύπλοκη αυτή διαδικασία καθοριστικό ρόλο παίζουν τα διηθούντα ανοσοκύτταρα (Tumor infiltrating Lymphocytes-TILs). Παρά το γεγονός ότι τα TILs εμφανίζουν αντινεοπλασματική δράση και προάγουν την ανοσοαπόκριση κατά των κυττάρων-στόχων, τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να εκμεταλλεύονται τις ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες συγκεκριμένων φαινοτύπων των TILs καθώς και των ανοσοσημείων ελέγχου (Programmed cell death-ligand 1, PD-L1, Programmed cell death receptor 1, PD-1), με αποτέλεσμα τη διαφυγή τους από την ανοσοεπιτήρηση, την επιβίωση τους και την εξέλιξη της καρκινογένεσης.

Παρά την κακή πρόγνωση που προσδίδουν οι εγκεφαλικές μεταστάσεις, η εφαρμογή νέων στοχευτικών ανοσοθεραπευτικών προσεγγίσεων έχει αυξήσει την επιβίωση των ασθενών και έχει αναδείξει τη σημασία της ανοσολογικής απάντησης για την κατανόηση, αλλά και τον περαιτέρω σχεδιασμό του θεραπευτικού πλάνου. Η παρουσία ανοσολογικής διήθησης λεμφοκυττάρων και η έκφραση PD-L1 στον όγκο έχει συσχετιστεί με μεγαλύτερη ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία, αποκτώντας προβλεπτικό ρόλο. Είναι γενικά αποδεκτό ότι υψηλά μεταλλαξιγόνοι όγκοι, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από έντονη παρουσία TILs εμφανίζουν υψηλές ανταποκρίσεις στην ανοσοθεραπεία.

Η ύπαρξη ανοσολογικής απάντησης αποκτά ολοένα και περισσότερο χαρακτήρα βιοδείκτη και η ύπαρξη της στις εγκεφαλικές μεταστάσεις αποτελεί αντικείμενο μελέτης για την κατανόηση του ρόλου του ανοσοποιητικού συστήματος στο Κ.Ν.Σ και το αντίκτυπο που μπορεί να έχει στην εξέλιξη της νόσου, στην πρόγνωση και στην ενδεχόμενη ανταπόκριση σε νεότερες στοχευτικές θεραπευτικές επιλογές.

## 2. ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

### 2.1 Ορισμός της ανοσολογίας.

Ανοσολογία είναι ο κλάδος της βιοϊατρικής επιστήμης που ασχολείται με την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού(ξενιστή) στην αντιγονική πρόκληση, την αναγνώριση του «δικού» του από το «ξένο». Η ανοσολογία αναλύει τη φυσιολογία του ανοσοποιητικού συστήματος τόσο στους υγιείς, όσο και στους νοσούντες οργανισμούς. Ασχολείται με όλες τις βιολογικές (in vivo), ορολογικές (in vitro), φυσικές και χημικές παραμέτρους των ανοσιακών φαινομένων. Μελετά επίσης τις δυσλειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος στις ανοσολογικές διαταραχές (όπως τα αυτοάνοσα νοσήματα, οι υπερευαισθησίες, η ανοσοανεπάρκεια κ.α). Η ανοσολογία είναι χρήσιμη σε αρκετούς τομείς της ιατρικής ιδιαίτερα όμως στην ογκολογία, στην οποία διαδραματίζει πρωταρχικό ρόλο τα τελευταία χρόνια με καινοτόμες θεραπείες όπως η ανοσοθεραπεία.

### 2.2 Γενικά στοιχεία του ανοσοποιητικού συστήματος και ο ρόλος του.

Το σύνολο των κυττάρων, μορίων και οργάνων που συνεργάζονται προκειμένου να επιτευχθεί η προστασία του οργανισμού κατά των βλαπτικών παραγόντων ονομάζεται ανοσοποιητικό σύστημα (ανοσολογικό ή ανοσιακό) και η συνδυασμένη αντίδρασή τους, την οποία προκαλεί η επαφή με ξένους οργανισμούς ή εξαλλαγμένα κύτταρα, συνιστά την ανοσολογική απάντηση.

Η ανοσολογική απάντηση στον καρκίνο αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία στην οποία συμμετέχουν ένα δίκτυο κυττάρων της ειδικής (adaptive) και της μη ειδικής ανοσίας (innate immunity), τα οποία αποτελούν τα ανοσοποιητικά κύτταρα διείσδυσης του όγκου -Tumor infiltrating immune cells (T Λεμφοκύτταρα, B Λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, Ουδετερόφιλα, Ηωσινόφιλα, μαστοκύτταρα, Natural killer cells, κ.α).Τα Tumor infiltrating lymphocytes-TILS (T lymphocytes και B lymphocytes) συγκαταλέγονται στα ανοσοκύτταρα ειδικής ανοσίας(adaptive immune cells) και μεταναστεύουν στο σημείο που λαμβάνει χώρα η ανοσολογική απόκριση συμβάλλοντας έτσι στη δημιουργία του μικροπεριβάλλοντος του όγκου.

Ο θεμελιώδης ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η διατήρηση της ιστικής ομοιόστασης με την συνεχή ανοσοεπιτήρηση, προάγοντας φλεγμονώδεις αντιδράσεις από τον ξενιστή έναντι του όγκου που περιλαμβάνουν τη συντονισμένη ενεργοποίηση των adaptive και των innate immune cells. (1). Επίσης το ανοσοποιητικό σύστημα συμβάλλει στην διατήρηση της ισορροπία μεταξύ της ανοσολογικής απάντησης (immune response) με την ανοσοκαταστολή (immune suppression), το λεγόμενο immune control. Η έναρξη μιας ανοσιακής απάντησης εγείρει την έναρξη της διαδικασίας αναχαίτισής της αποσκοπώντας στην προστασία του οργανισμού από αυτοάνοσα συμβάματα. Στην περίπτωση του καρκίνου όμως η αναχαίτηση της ανοσιακής απάντησης έχει σαν αποτέλεσμα την προαγωγή της καρκινογένεσης.

Η καρκινογένεση διαταράσσει την εύρυθμη λειτουργία των φυσιολογικών ιστών πυροδοτώντας την ανοσολογική απόκριση με στόχο την εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων



στους πρωτοπαθείς όγκους. Εάν η διαδικασία της εξάλειψης είναι ανεπαρκής, τα νεοπλασματικά κύτταρα μπορούν να διαφύγουν της ανοσοπαρακολούθησης. Η διαδικασία αυτή εξηγείται από την θεωρία της ανοσοεπεξεργασίας του καρκίνου (immunoeediting cancer theory) και συνίσταται σε τρεις φάσεις: την εξάλειψη, την ισορροπία και τη διαφυγή.(2) Παρόλο που οι ασθενείς διαγιγνώσκονται συχνότερα στη φάση διαφυγής, αυτή η σχέση μεταξύ του όγκου και της ανοσίας του ξενιστή συνεχίζει να εξελίσσεται και μερικές φορές μαζί της και το μέγεθος της αντικαρκινικής ανοσοαπόκρισης. Ακόμη και σε προχωρημένα στάδια της νόσου, οι παράμετροι του ανοσοποιητικού έχουν πλέον αναγνωριστεί ότι επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα την επιβίωση των ασθενών.(3)

Τα ανοσοποιητικά κύτταρα βρίσκονται σε συνεχή αλληλεπίδραση και αλληλεξάρτηση, τόσο μεταξύ τους όσο και με τους περιβάλλοντες ιστούς. Η αλληλεπίδραση και αλληλεξάρτηση γίνεται είτε με άμεση κυτταρική επικοινωνία (cell-to-cell contact) ή μέσω διαλυτών παραγόντων που παράγουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος ή οι περιβάλλοντες ιστοί, όπως τα καρκινικά κύτταρα δημιουργώντας ένα ιδιαίτερο μικροπεριβάλλον (tumor microenvironment)(4).

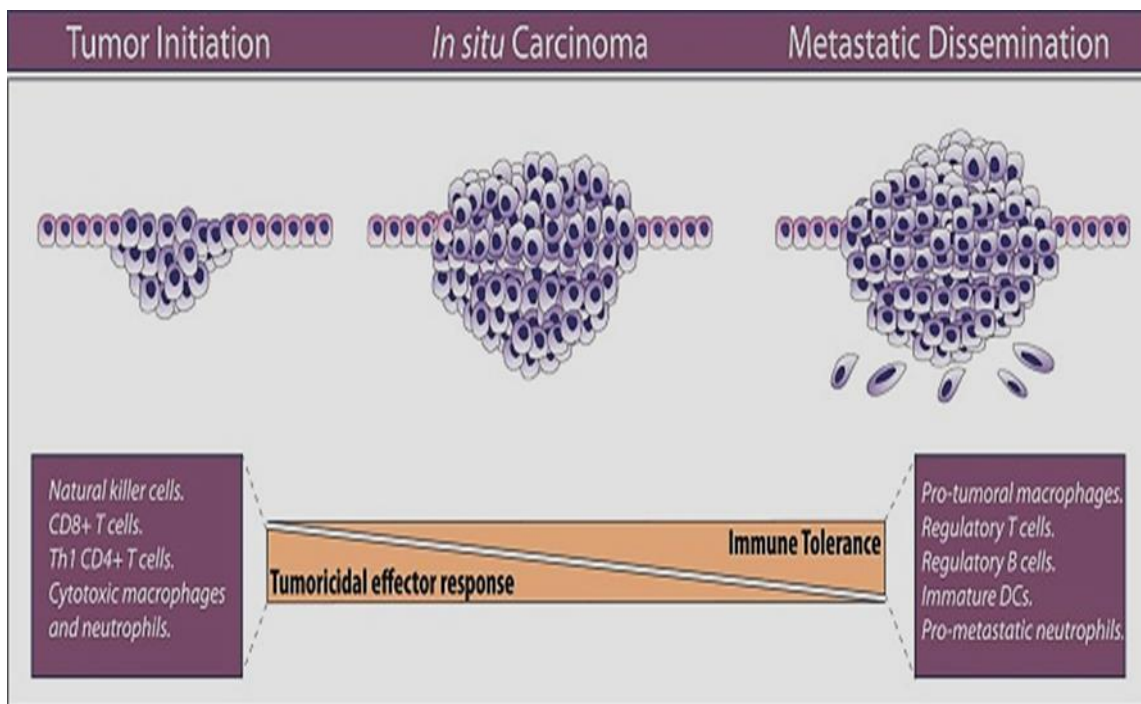
Οι πρωτοπαθείς και μεταστατικοί όγκοι είναι πολύπλοκα οικοσυστήματα που αποτελούνται από νεοπλασματικά κύτταρα, extracellular matrix (ECM) και μη νεοπλασματικά κύτταρα, τα οποία περιλαμβάνουν υποστηρικτικά μεσεγχυματικά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και διηθητικά φλεγμονώδη ανοσοκύτταρα(TILs). Η αλληλεπίδραση μεταξύ καρκινικών κυττάρων και βοηθητικών κυττάρων τροφοδοτεί και διαμορφώνει την ανάπτυξη του όγκου. Κατά τον σχηματισμό του όγκου, η αρχιτεκτονική των ιστών εξελίσσεται σε ένα εξαιρετικά εξειδικευμένο μικροπεριβάλλον που χαρακτηρίζεται από αλλοιωμένο ECM και χρόνια φλεγμονή(5).

Τα μόρια και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος φτάνουν κυρίως στους ιστούς με την αιματική κυκλοφορία και εισχωρούν σε αυτούς από το τοίχωμα των τριχοειδικών αγγείων. Στη συνέχεια τα λεμφοκύτταρα μαζί με τα αντισώματα και άλλα στοιχεία εισέρχονται στο λεμφικό σύστημα. Τα λεμφικά αγγεία συλλέγουν τα λεμφοκύτταρα και τα υπόλοιπα κυτταρικά ή άλλα στοιχεία από το μεσοκυττάριο υγρό και το περιεχόμενο μεταφέρεται στις φλέβες επιστρέφοντας έτσι στην αιματική κυκλοφορία. Τα λεμφοκύτταρα βρίσκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις στους λεμφαδένες και στους τόπους παραγωγής και εξέλιξης τους που είναι ο μυελός των οστών, ο θύμος αδένας και ο σπλήνας. Το ανοσοποιητικό σύστημα βρίσκεται σε συνεχή φθορά και ανανέωση με την αναγνώριση, τη μνήμη και την ειδικότητα να είναι τα κύρια χαρακτηριστικά του.

### 2.3 Ο ρόλος των διηθητικών ανοσοποιητικών κυττάρων στον καρκίνο.

Η παρουσία ανοσοποιητικών κυττάρων σε κακοήγη νεόπλασματα φανερώνει την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή με σκοπό την καταστολή της καρκινογένεσης, εγείροντας το ερώτημα: « πως τελικά τα καρκινικά κύτταρα διαφεύγουν της ανοσοεπιτήρησης του ανοσοποιητικού συστήματος και ποιοι μηχανισμοί συμμετέχουν στην καταστολή του;» Η κάθε κατηγορία των φλεγμονωδών κυττάρων (Tumor infiltrating immune cells) έχει διαφορετικό μηχανισμό δράσης προάγοντας ή καταστέλλοντας την καρκινογένεση.

Δεδομένου ότι τα φλεγμονώδη κύτταρα παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά σε κακοήθεις όγκους στον άνθρωπο, έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες για την καλύτερη κατανόηση του πολύπλοκου ρόλου των φλεγμονωδών κυττάρων στα καρκινώματα. Είναι γενικά αποδεκτό ότι μια ανώμαλη μη ειδική και ειδική ανοσολογική απόκριση συμβάλλει στην ογκογένεση επιλέγοντας επιθετικούς κλώνους, προκαλώντας ανοσοκαταστολή και προάγοντας την καρκινογένεση (**Εικόνα 1**: Palucka & Coussens 2016).



**Εικόνα 1.** Η ισορροπία μεταξύ των ανοσοκυττάρων που προάγουν την ανοσολογική ανοσολογική και των ανοσοκυττάρων καταστολείς αυτής κατά την διάρκεια εξέλιξης του καρκίνου.

**Η ισορροπία μεταξύ των ανοσοκυττάρων που προάγουν την ανοσολογική απόκριση και των ανοσοκυττάρων καταστολείς αυτής, κατά τη διάρκεια εξέλιξης του καρκίνου.** Στα αρχικά στάδια του όγκου τα τελεστικά κύτταρα του ανοσοποιητικού εξαλείφουν τα ανοσογόνα καρκινικά κύτταρα. Κατά την εξέλιξη του όγκου, επιλεγμένα καρκινικά τα οποία επιβιώνουν, υιοθετούν διαφορετικές στρατηγικές περιφερικής ανοσολογικής ανοχής, στρατολογώντας ανοσοκατασταλτικά κύτταρα του ανοσοποιητικού, αναχαιτίζοντας τη δράση των κυτταροτοξικών κυττάρων.

Οι υποκατηγορίες των διηθητικών λεμφοκυττάρων των όγκων(TILs) χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένα μόρια κυτταρικής επιφανείας του συμπλέγματος διαφοροποίησης(Cluster of Differentiation-CD) τα οποία είναι πρωτεϊνικά μόρια διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, υπεύθυνα για την ενεργοποίηση τους.

2.3.1 Τα κυριότερα κύτταρα της φυσικής ανοσίας ή έμφυτης ή μη ειδικής (Innate) είναι :

- τα μακροφάγα
- τα δενδριτικά κύτταρα (DCs)
- τα κοκκιόκυτταρα(ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα)
- τα μαστοκύτταρα
- κύτταρα φυσικοί φονείς(Natural Killer cells)

#### ΜΑΚΡΟΦΑΓΑ (MACROPHAGES)

Τα μακροφάγα είναι έμφυτα ανοσοκύτταρα που διαφοροποιούνται από τα κυκλοφορούντα κλασικά μονοκύτταρα μετά την εξαγγείωση στους ιστούς. Κατά τη διαφοροποίηση, τα μακροφάγα είναι εξοπλισμένα για να ανιχνεύουν και να ανταποκρίνονται σε λοιμώξεις και τραυματισμούς ιστών, παίζοντας βασικό ρόλο στην ομοίωση και την επιδιόρθωση των ιστών(6). Ο ρόλος τους στη διαδικασία της χρόνιας φλεγμονής που σχετίζεται με τον καρκίνο είναι βασικός και η παρουσία τους έχει περιγράψει σε κάθε βήμα της εξέλιξης του καρκίνου, από την εμφάνιση του πρωτοπαθούς όγκου, της εξέλιξης του σε μεταστατικό έως την αντίσταση στη θεραπεία(7)(8).

Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα διακρίνονται σε προφλεγμονώδη (τύπος M1 που καθοδηγείται από LPS και IFN $\gamma$ ) και σε αντιφλεγμονώδη(τύπος M2 καθοδηγούμενος από IL-4 ή IL-13).(9) Κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης παρατηρείται μια υπεροχή του τύπου M1, ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στον περιορισμό των ανοσογόνων καρκινικών κυττάρων. Καθώς εξελίσσεται ο όγκος, στο μικροπεριβάλλον του όγκου παρατηρείται μια υπεροχή του τύπου M2, στον οποίο συγκαταλέγονται και τα TAMs(tumor associated macrophages) που προάγουν την καρκινογένεση με διάφορους μηχανισμούς.(10). Τα TAMs προάγουν την εξέλιξη του όγκου διεγείροντας την αγγειογένεση, αυξάνοντας τόσο τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων όσο και της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης, μειώνοντας την αποτελεσματικότητα της αντικαρκινικής θεραπείας. Επίσης, αναδιαμορφώνουν το ECM, προωθούν τη μετάσταση, προκαλώντας τελικά την ανοσοκαταστολή των φλεγμονωδών ανοσοκυττάρων.(11)(12)(10). Μια άλλη υποκατηγορία των μακροφάγων είναι τα λεγόμενα MAMs(metastasis-associated macrophages) τα οποία ενισχύουν την καρκινογένεση μέσω της αύξησης του πολλαπλασιασμού των νεοπλασματικών κυττάρων και της αύξησης της αγγειογένεσης, ενώ η δράση τους φαίνεται να περιορίζεται με την χορήγηση αντιαγγειογενετικής θεραπείας(13). Σε προκλινικά πειραματικά μοντέλα σε ασθενείς με

καρκίνο φαίνεται ότι τα υψηλά επίπεδα TAMs συσχετίζονται με κακή πρόγνωση και μειωμένη συνολική επιβίωση(7).

#### ΔΕΝΔΡΙΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (DENDRITIC CELLS)

Τα δενδριτικά κύτταρα(DCs) αποτελούν τον βασικό τύπο αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (APC) της φυσικής ανοσίας και αντιπροσωπεύουν τον βασικό συνδετικό κρίκο της έμφυτης(innate) με την επίκτητη(adaptive) ανοσολογική απόκριση.

Ο ρόλος των DCs είναι εξαιρετικά σημαντικός, γιατί ανιχνεύουν τα αντιγόνα και τα παρουσιάζουν στα T λεμφοκύτταρα μέσω του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC), ενεργοποιώντας την ανοσολογική απάντηση. Εκφράζουν διακριτούς δείκτες που διαφέρουν και εμφανίζουν διαφορετική ανοσολογική δραστηριότητα. Έχουν περιγραφεί υποκατηγορίες των DCs π.χ μυελοειδή και πλασματοκυτταροειδή.

Με εξαίρεση το εγκεφαλικό παρέγχυμα, τα DC βρίσκονται σε κάθε ιστό σε όλο το σώμα(14). Κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης, τα DCs επιδρούν στα T κύτταρα μνήμης ανάλογα με το φλεγμονώδες πλαίσιο και τα συνδιεγερτικά σήματα έχοντας σαν αποτέλεσμα η παρουσίαση του αντιγόνου να οδηγήσει είτε σε ανοχή αντιγόνου ή εκκίνηση και πυροδότηση μιας απόκρισης effector T cells. Τα DCs που διεισδύουν στον όγκο έχουν περιγραφή σε πολλούς τύπους καρκίνου και επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό το μικροπεριβάλλον του(15), αν και η δραστηριότητα τους, η οποία είναι απαραίτητη για τον ρόλο των T cells, δεν έχει πλήρως κατανοηθεί.

Τα δενδριτικά κύτταρα συχνά χωρίζονται σε 2 κύρια υποσύνολα: μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα (mDCs, CD11c+) και πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα (pDCs, CD11c-)(16). Τα mDCs υπάρχουν σε μη λεμφικούς ιστούς και κανονικά προάγουν μια απόκριση Th1 T-κυττάρων μέσω της έκφρασης της IL-12. Αντίθετα, τα pDCs υπάρχουν σε δευτερογενή λεμφοειδή όργανα και παράγουν κλασικά IFN-α ως απόκριση σε ιογενείς λοιμώξεις(17). Τα DCs μπορούν περαιτέρω να ταξινομηθούν ως ώριμα ή ανώριμα, με τα ανώριμα DC να παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση συνδιεγερτικού μορίου και κυτοκίνης, οδηγώντας σε έναν πιο ανοσοκατασταλτικό φαινότυπο(16).

Ένα μοντέλο ινοσαρκώματος ποντικού που δεν έχει CD8a<sup>+</sup> DCs δείχνει εξασθενημένη αντικαρκινική δράση από τα CD4<sup>+</sup> και CD8<sup>+</sup> T κύτταρα(18). Από μελέτες φάνηκε ότι η αντικαρκινική δράση της χημειοθεραπείας έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση ATP και μετάδοση σημάτων από τα νεκρωμένα κύτταρα που προκαλούν την επιστράτευση των δενδριτικών κυττάρων και την διαφοροποίηση του σε CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>hi</sup> DCs ενεργοποιώντας με την σειρά τους τα effector T cells(17). Συνεπώς, η έκφραση ειδικών υποδοχέων (formyl peptide receptor 1) στα DCs εγείρει περαιτέρω την διαφοροποίηση, την ωρίμανσή τους καθώς και την ικανότητα τους να προσδένονται με τα αντιγόνα και να τα παρουσιάζουν στα T cells στον καρκίνο του μαστού και του παχέος εντέρου(19). Τα τελευταία χρόνια διεξάγονται μελέτες στις οποίες ελέγχεται η αντινεοπλασματική δράση εμβολίων με DCs τα οποία φέρουν καρκινικά αντιγόνα κυρίως στο μελάνωμα και στον

προστάτη(20)(21)(22). Πιο πρόσφατα, μια μελέτη φάσης II σε 39 ασθενείς με μελάνωμα έδειξε ότι ο συνδυασμός ενός ενδοδερμικού εμβολίου DC σε συνδυασμό με CTLA-4 immune checkpoints inhibitor οδήγησε σε οκτώ πλήρεις και επτά μερικές θεραπευτικές ανταποκρίσεις (23).

Συμπερασματικά, ο ρόλος των DC είναι καθοριστικός τόσο στην εκκίνηση όσο και στην πορεία εξέλιξης της προσαρμοστικής ανοσολογικής απόκρισης κατά του όγκου. Η καλύτερη κατανόηση τέτοιων μηχανισμών θα ρίξει φως στο πώς η επίθεση των T-κυττάρων κατά του όγκου αποτυγχάνει να καταστείλει και να περιορίσει την ανάπτυξη του. Σύμφωνα με τα δεδομένα που έχουμε, η μαζική παράλληλη μονοκυτταρική ανάλυση στο πρώιμο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα (στάδιο I) έχει αναδείξει μια επιλεκτική εξάντληση των CD141<sup>+</sup> DCs (σε σύγκριση με το φυσιολογικό πνευμονικό παρέγχυμα) που συσχετίζεται με μειωμένη δραστηριότητα NK και T-κυττάρων, η οποία προάγει την εξέλιξη της νόσου(24). Πρόσφατα, έχει αποδειχθεί ότι σε μελάνωμα, καρκίνο μαστού και παχέος εντέρου σε μοντέλα ποντικού, τα καρκινικά κύτταρα επηρεάζουν την επιστράτευση των DC στο TME με έκκριση προσταγλανδίνης E2, η οποία καταστέλλει τα NK τα οποία συνδέονται με τον όγκο και οδηγεί σε περαιτέρω εξασθένηση της επιστράτευσης των DC που εξαρτάται από τα κύτταρα NK(25)

#### ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ(NEUTROPHILS)

Τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα αποτελούν τον μεγαλύτερο πληθυσμό των λευκών αιμοσφαιρίων και διαδραματίζουν πρωταρχικό ρόλο στην διαδικασία της φλεγμονής. Μαζί με τα βασεόφιλα και τα ηωσινόφιλα αποτελούν την ευρύτερη κατηγορία των κοκκιοκυττάρων. Τα ουδετερόφιλα παράγονται στον μυελό των οστών και βρίσκονται φυσιολογικά στο περιφερικό αίμα. Στα πρώτα στάδια της φλεγμονής, κυρίως ως αποτέλεσμα βακτηριακών μολύνσεων, περιβαλλοντικών παραγόντων και καρκινογένεσης, τα ουδετερόφιλα είναι η πρώτη απάντηση του οργανισμού και μεταναστεύουν προς το σημείο της φλεγμονής. Η καταπολέμηση του ξένου βλαπτικού οργανισμού από τον ξενιστή γίνεται με πολλούς μηχανισμούς των ουδετερόφιλων όπως η φαγοκυττάρωση, ο χημειοτακτισμός, η αντιμικροβιακή λειτουργία, η αποκοκκίωση καθώς και η εναπόθεση εξωκυττάρων παγίδων ουδετεροφίλων-neutrophil extracellular traps(NETs)(26) Σε ασθενείς με κακοήθεια, υψηλά επίπεδα ουδετερόφιλων που σχετίζονται με όγκους (TANs), υψηλά επίπεδα ουδετεροφίλων και υψηλές αναλογίες ουδετερόφιλων/λεμφοκυττάρων έχουν συσχετιστεί με δυσμενή πρόγνωση σε διαφορετικές τύπους καρκίνων(27). Όμοια με τους δύο φαινότυπους των μακροφάγων, έχει ανακαλυφθεί ότι και τα TANs διακρίνονται σε δύο κατηγορίες πόλωσης την N1 και N2, οι οποίες διαδραματίζουν διαφορετική δράση στην ανοσολογική απόκριση(28). Ωστόσο, ο ρόλος τους ακόμη δεν είναι πλήρως κατανοητός και αποτελεί αντικείμενο έρευνας.

Στον καρκίνο του παχέος εντέρου στον άνθρωπο, υψηλά επίπεδα CD66b<sup>+</sup> TANs έχουν συσχετιστεί με καλύτερη πρόγνωση ενισχύοντας την ογκοκτόνο ικανότητα των CD8<sup>+</sup> T κυττάρων(29). Τα ουδετερόφιλα επάγουν επίσης την αντικαρκινική δράση της

ακτινοθεραπείας, όπως μελετήθηκε σε μοντέλα συγγενούς ξενομοσχεύματος καρκίνου μαστού, όπου φάνηκε ότι μεταναστεύουν ταχέως στο σημείο του όγκου και η ταυτόχρονη χορήγηση G-CSF ενίσχυσε την αποτελεσματικότητα της θεραπείας(30).

Από την άλλη μεριά μια σειρά ερευνών αποκαλύπτει ότι τα TANs προκαλούν μια παρατεταμένη φλεγμονώδη διαδικασία, η οποία σχετίζεται με την καρκινογένεση και την εξέλιξη του όγκου. Στον καρκίνο του στομάχου, το 2017 ο Wang και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι τα TANs επάγουν άμεση ανοσοκαταστολή στα T κύτταρα μέσω της έκφρασης PD-L1 που προκαλείται από τα tumor-derived granulocyte macrophage-CSF (GM-CSF)(31). Ένας πληθυσμός κυττάρων φαινοτυπικά και μορφολογικά παρόμοιος με τα ουδετερόφιλα, που ονομάζονται πολυμορφοπυρηνικά, προερχόμενα από μυελοειδή, κατασταλτικά κύτταρα-polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells (PMN-MDSCs), έχει εντοπιστεί σε ασθενείς με καρκίνο και σε προκλινικά μοντέλα(32). Η παρουσία των PMN-MDSC σε κακοήγη νεοπλάσματα έχει συσχετιστεί με την πρόκληση χρόνιας φλεγμονής και ανοχή στα αντιγόνα από τα T cells(32).

Το 2004, ο Brinkmann και οι συνεργάτες του παρατήρησαν, ότι η ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων προκαλεί την απελευθέρωση δομών DNA με τη μορφή ιστών. Τα NETs αποτελούν ένα δίκτυο από ίνες χρωματίνης και πρωτεάσες που παγιδεύουν και εξοντώνουν τα ανοσογόνα καρκινικά κύτταρα, τα βακτήρια, εξωκυττάρια. Παρόλα αυτά έχει αποδειχθεί τα τελευταία χρόνια σε ασθενείς με καρκίνο, ότι η παρουσία των NETs στο TME έχει συνδεθεί με την πρόοδο του καρκίνου(33).

Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα ουδετερόφιλα εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια κι ανάλογα με το φαινοτυπικό τους προφίλ διαδραματίζουν ένα ξεχωριστό ρόλο σε όλα τα στάδια της εξέλιξης του καρκίνου.

#### ΜΑΣΤΟΚΥΤΤΑΡΑ(MASTOCYTES) ΚΑΙ ΒΑΣΕΟΦΙΛΑ(BASOPHILS)

Τα μαστοκύτταρα είναι κύτταρα της έμφυτης ανοσίας και ανήκουν στην οικογένεια των λευκοκυττάρων. Τα μαστοκύτταρα παράγονται στο μυελό των οστών από τη διαφοροποίηση των προγονικών πολυδύναμων αιμοποιητικών κυττάρων, αλλά η διαφοροποίησή τους ολοκληρώνεται στους ιστούς. Δεν ανευρίσκονται στο περιφερικό αίμα, όπως τα υπόλοιπα λευκά αιμοσφαίρια, αλλά στους διάφορους ιστούς όπως το δέρμα, το γαστρεντερικό, τους πνεύμονες, κ.α.

Τα μαστοκύτταρα συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση, προστατεύοντας τον οργανισμό από ξένους οργανισμούς. Η αναγνώριση επιβλαβών για τον οργανισμό μικροβίων ή άλλων οργανισμών από τα μαστοκύτταρα, έχει ως συνέπεια την ενεργοποίησή τους, απελευθερώνοντας αγγειοδραστικά μόρια τοπικά στους ιστούς. Η δράση τους σχετίζεται κυρίως με αλλεργικές αντιδράσεις. Ένας από τους κύριους μεσολαβητές που απελευθερώνουν, κατά τη διάρκεια της αλλεργικής αντίδρασης, είναι η ισταμίνη. Παράγουν επίσης διάφορες κυτοκίνες και πρωτεολυτικά ένζυμα. Ο ρόλος τους στην ανοσολογική απόκριση στην εξέλιξη της καρκινογένεσης δεν φαίνεται να είναι γνωστός.

Τα βασεόφιλα κοκκιοκύτταρα είναι τα μικρότερα σε μέγεθος κύτταρα της λευκής σειράς και λόγω της ομοιότητας τους μορφολογικά με τα μαστοκύτταρα θεωρούνταν αρχικά υποκατηγορία τους. Τα βασεόφιλα σε αντίθεση με τα μαστοκύτταρα ανευρίσκονται στο περιφερικό αίμα και η διαφοροποίησή τους ολοκληρώνεται στο μυελό των οστών. Στο κυτταρόπλασμά τους διακρίνονται άφθονα κοκκία που περιέχουν μεγάλες ποσότητες ηπαρίνης και ισταμίνης. Η φαγοκυτταρική τους ικανότητα είναι περιορισμένη, αλλά η συμμετοχή τους σε αλλεργικές αντιδράσεις είναι έντονη. Ο ρόλος τους στην ανολογική απάντηση στον καρκίνο είναι άγνωστος, όπως και των μαστοκυττάρων.

#### ΚΥΤΤΑΡΑ ΦΥΣΙΚΟΙ ΦΟΝΕΙΣ(NATURAL KILLER CELLS)

Τα κύτταρα NK ανήκουν στην έμφυτη ανοσία(innate) του ανοσοποιητικού συστήματος και συμμετέχουν στην άμυνα του ξενιστή σε κύτταρα στόχους, όπως μολυσμένα κύτταρα ή καρκινικά κύτταρα. Τα NK κύτταρα παρουσιάζουν ισχυρή κυτταρολυτική ικανότητα, η οποία επιτυγχάνεται κυρίως με την απελευθέρωση κυτταροτοξικής περφορίνης και γρανζύμης, ενεργοποιώντας με την σειρά τους τον παράγοντα νέκρωσης όγκου(TNFα) και τα μονοπάτια απόπτωσης στα κύτταρα του όγκου TRAIL και FASL. Τα νεοπλασματικά κύτταρα δεν εκφράζουν στην επιφάνεια τους μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης I(MHC class I) σε αντίθεση με τα υγιή και λόγω αυτού γίνονται αντιληπτά από τα κύτταρα NK κατά τη διαδικασία της ανοσοεπιτήρησης, με αποτέλεσμα τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατό τους. Συνεπώς, τα κύτταρα NK καταστέλλουν με αυτόν τον τρόπο την καρκινογένεση, έχοντας ισχυρή αντικαρκινική δράση. Η παρουσία διήθησης NK κυττάρων στον ορθοκολικό και γαστρικό καρκίνο συσχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση(34)(35). Έχει περιγραφεί μια ποικιλία ανασταλτικών και διεγερτικών υποδοχέων στην κυτταρική τους επιφάνεια που καθορίζουν ανάλογα τη δραστηριότητα τους. Έχει φανεί ότι η παρουσία ανώμαλου κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η παρουσία βλαβών DNA και η ενεργοποίηση της οδού RAS σε μοντέλα καρκίνου σε ποντίκια αυξάνουν στα νεοπλασματικά κύτταρα τους υποδοχείς εκείνους που προσδέονται με τον διεγερτικό υποδοχέα NKG2D στα NK κύτταρα καταστέλλοντας την ανάπτυξη του όγκου(36). Η έλλειψη του υποδοχέα NKG2D σε ποντίκια συσχετίστηκε με μεγαλύτερη πιθανότητα καρκινογένεσης, επιβεβαιώνοντας τον σημαντικό ρόλο του υποδοχέα NKG2D στην ανοσολογική απόκριση στον καρκίνο(37). Η επιστράτευση των NK κυττάρων επιτυγχάνεται με την παραγόμενη από τον όγκο IL15(38). Ο υποδοχέας κυτταροτοξικότητας NKp46 και ο ανασταλτικός υποδοχέας Ly49 στα κύτταρα NK αναστέλλουν τη μεταστατική ανάπτυξη στον καρκίνο του πνεύμονα, στο μελάνωμα και στο ινοσάρκωμα(39). Ο ρόλος των NK κυττάρων, βάση αυτών των δεδομένων είναι σημαντικός στον έλεγχο εξέλιξης του καρκίνου.

2.3.2 Τα κύτταρα της επίκτητης ή προσαρμοστικής ή ειδικής ανοσίας (acquired or specific or adaptive immunity) είναι:

- Β λεμφοκύτταρα(B Cells)
- Τ λεμφοκύτταρα(T Cells)

### B CELLS

Τα Β cells προέρχονται από την ενεργοποίηση συγκεκριμένων βλαστικών κυττάρων, τα πολυδύναμα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα, στον μυελό των οστών. Ακολούθως ωριμάζουν και διαφοροποιούνται σε πλασματοκύτταρα, τα οποία παράγουν αντισώματα και Β κύτταρα μνήμης, τα οποία προκαλούν χημική ανοσία έναντι των παθογόνων(40). Παρόλο που η παρουσία των Β κυττάρων στο μικροπεριβάλλον του όγκου είναι αποδεδειγμένη σε διάφορους τύπους καρκίνων(συμπεριλαμβανομένου του μελανώματος, του μαστού, των ωοθηκών, του προστάτου κ.α) ωστόσο ο ρόλος τους στην εξέλιξη της καρκινογένεσης δεν είναι τόσο διευκρινισμένος, όπως αυτός των Τ cells. Σύμφωνα με τα επιστημονικά δεδομένα τα Β cells προάγουν την εξέλιξη του όγκου, διότι ενισχύουν τη χρόνια φλεγμονή και αυξάνουν την αγγειογένεση. Ο Coussens και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι η έλλειψη ώριμων Β cells, σε ποντίκια με κακοήθεια, αναχαιτίζει την εξέλιξη του όγκου(41). Τα Β cells μέσω του μηχανισμού έκκρισης IL-10 και TGFβ προκαλεί ανοσοκαταστολή(42)(43). Επίσης, ένας άλλος μηχανισμός μέσω του οποίου προάγουν την καρκινική δραστηριότητα είναι η έκκριση IL-35 όπως αυτό περιγράφηκε σε νεοπλάσματα παγκρέατος με kras σε ποντίκια(44). Η εναπόθεση ανοσοσφαιρινών στο μικροπεριβάλλον του όγκου έχει συσχετιστεί με ενίσχυση της αγγειογένεσης και της χρόνιας φλεγμονώδους αντίδρασης, ενεργοποιώντας τα μυελοειδή κύτταρα. Τα Β κύτταρα που λειτουργούν ως καταστολείς της ανοσολογικής απάντησης ονομάζονται ρυθμιστικά Β cells, ο ρόλος τους όμως παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστος.

### T CELLS

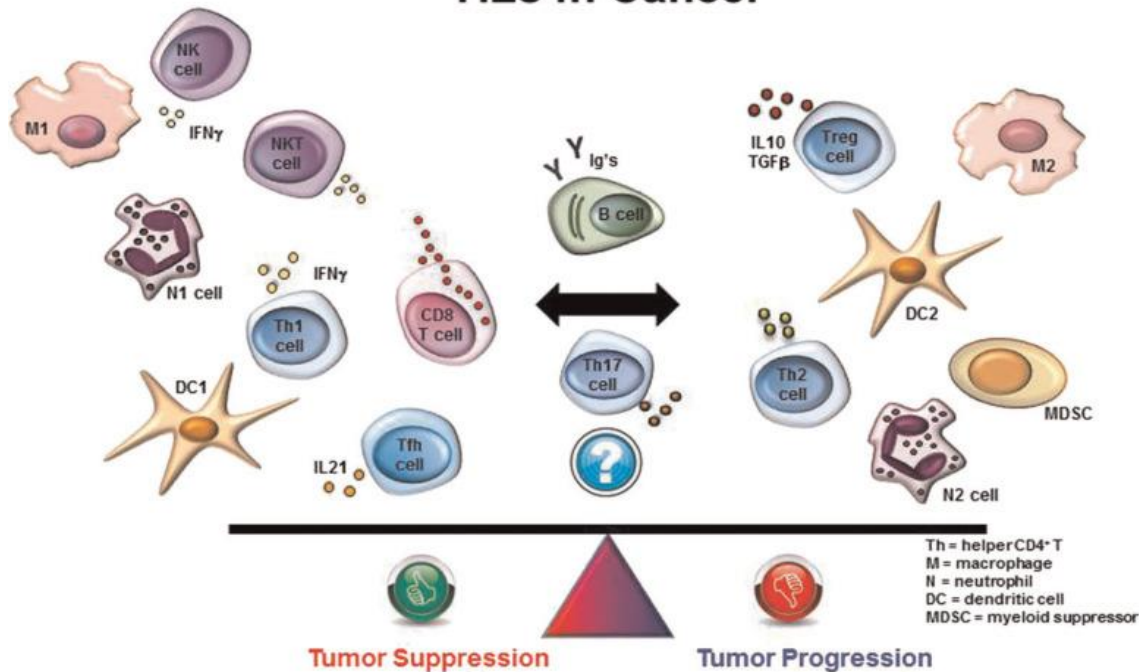
Τα Τ lymphocytes(T cells) αντιπροσωπεύουν μαζί με τα Β cells τα Tumor infiltrating lymphocytes(TILs) και αποτελούν ανοσοκύτταρα ειδικής ανοσίας(adaptive immune cells). Ο ρόλος τους στην ανοσολογική απάντηση είναι καθοριστικός, χαρακτηρίζει την έκταση και το είδος της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή προς τα καρκινικά κύτταρα, αποκτώντας προγνωστική και προβλεπτική σημασία σε πολλά κακοήθη νεοπλάσματα(45). Η αξιολόγηση των (TILs) έχει σημαντική αξία στα πλαίσια αναζήτησης βέλτιστων βιοδεικτών για την επιλογή ασθενών με την υψηλότερη πιθανότητα ανταπόκρισης στην ανοσοθεραπεία. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αξιολόγηση των TILs έχει προταθεί ως βιοδείκτης, ο οποίος θα συμπεριλαμβάνεται στην ιστοπαθολογική αναφορά(46)(47). Οι ιστοπαθολογικές αναφορές κακοηθών νεοπλασμάτων δείχνουν ότι τα TILs που σχετίζονται με τον όγκο εκτείνονται πέρα από το διηθητικό όριο του όγκου και επίσης κυριαρχούν στον υποξικό πυρήνα του(48)(49). Η υψηλή έκφραση διηθητικών λεμφοκυττάρων TILs στο μελάνωμα έχει συσχετιστεί με ευνοϊκή πρόγνωση(50), στο μαστό(51), στον πνεύμονα(52), στον μεταστατικό κολοορθικό καρκίνο(53), στον γαστρικό καρκίνο(8) και σε άλλους τύπους καρκίνου. Ανάλογα με το



ανοσολογικό πλαίσιο, τα infiltrating immune cells μπορούν να αναχαιτίζουν την εξέλιξη των νεοπλασματικών κυττάρων αλλά μπορούν επίσης να δημιουργούν ένα μικροπεριβάλλον ανοσοκαταστολής στο οποίο τα νεοπλασματικά κύτταρα μπορούν να διαφεύγουν(54). Συνεπώς τα T cells όπως και τα υπόλοιπα ανοσοκύτταρα αποκτούν διαφορετικούς φαινότυπους σύμφωνα με τους οποίους εμφανίζουν φλεγμονώδη ή αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα και κατ' επέκταση είναι προαγωγείς ή καταστολείς της καρκινογένεσης(55). Στα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης παράγονται ανοσογόνα αντιγόνα τα οποία προβάλλονται από τα APC στα T cells, με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή τους και την μετανάστευσή τους στο TME. Ακολούθως, τα T cells διαφοροποιούνται σε CD8+ κυτταροτοξικά T cells που αποτελούν τα πιο σημαντικά αντικαρκινικά κύτταρα και μέσω της εξωκυττάρωσης κόκκων που περιέχουν περφορίνη και γρανζύμη ασκούν αντινεοπλασματική δράση εξουδετερώνοντας τα ανοσογόνα καρκινικά κύτταρα. Παράλληλα, η αντικαρκινική δράση των CD4<sup>+</sup> T cells, με τη μεσολάβηση του T helper 1 (Th-1) μέσω της έκκρισης υψηλών ποσοτήτων προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως IL-2, TNF-α και IFN-γ - προάγει όχι μόνο την εκκίνηση και την ενεργοποίηση των T-κυττάρων και την κυτταροτοξικότητα των CD8+ T cells καθώς επίσης την αντινεοπλασματική δραστηριότητα των μακροφάγων και των NK κυττάρων και ενισχύει την προβολή της ανοσογονικότητας του όγκου. Και τα δύο, τα ενεργοποιημένα κυτταροτοξικά T cell(CD8+ naïve T cells) και τα ενεργοποιημένα T helper cells(CD4+ naïve T cells) εκφράζουν συγκεκριμένα μόρια κυτταρικής επιφανείας του συμπλέγματος διαφοροποίησης(cluster of differentiation) CD3+, πρωτεϊνικά μόρια υπεύθυνα για την ενεργοποίησή τους. Η διήθηση από CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells και η παρουσία κυτοκινών Th-1 σε όγκους συσχετίζεται με ευνοϊκή πρόγνωση όσον αφορά το διάστημα ελεύθερο νόσου και τη συνολική επιβίωση σε πολλά κακοήθη νεοπλάσματα(45).

Παρά το γεγονός ότι τα T cells εμφανίζουν αντινεοπλασματική δράση και μεσολαβούν στην ανοσολογική απόκριση κατά των κυττάρων-στόχων, τα καρκινικά κύτταρα κατά την εξέλιξη της νόσου έχουν την ικανότητα να εκμεταλλεύονται τις ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες συγκεκριμένων φαινοτύπων των T cells, προκαλώντας ανοσοκαταστολή με αποτέλεσμα την επιβίωσή τους και την εξέλιξη της καρκινογένεσης. Τα CD8+ κυτταροτοξικά T cells, T-helper 1(Th-1) cells τα οποία παράγουν ιντερφερόνη-γ και τα NK cells εμφανίζουν μία έντονη αντικαρκινική ανοσολογική απόκριση σε συνεργασία με τα μακροφάγα M1 και τα δενδριτικά κύτταρα με φαινότυπο DC1. Αντίθετα τα T helper 2(Th-2), τα M2 μακροφάγα, τα DC2 δενδριτικά κύτταρα, τα μυελοειδή ανοσοκατασταλτικά κύτταρα MDSCs, τα FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells(Treg) εμφανίζουν ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες με την παραγωγή IL-10 και TGFβ, ενισχύοντας τα καρκινικά κύτταρα. Η ισορροπία αυτή μεταξύ των διαφορετικών φαινοτύπων των ανοσοκυττάρων σε υγιή κύτταρα αποσκοπεί στην ιστική ομοιόσταση(56)(**Εικόνα 2**).

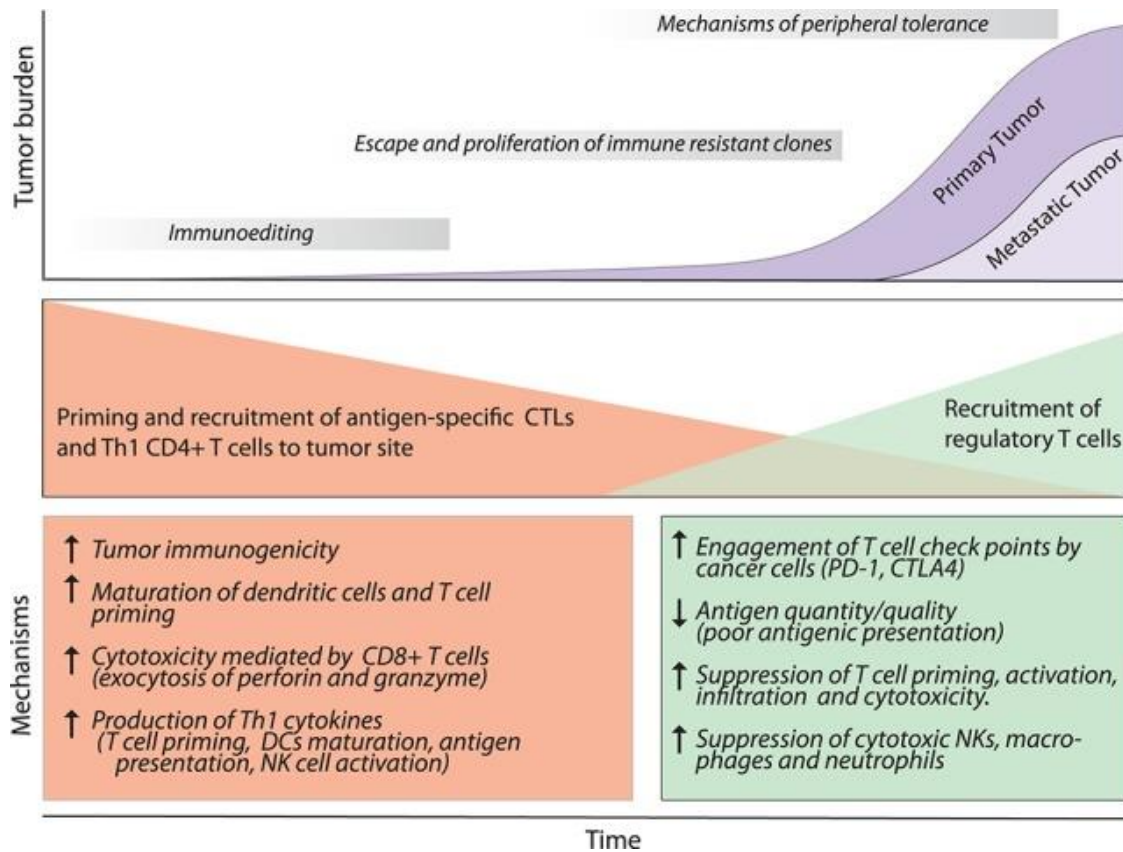
## TILs in Cancer



Εικόνα 2. Τα TILS στον καρκίνο

Τα κυτταρικά συστατικά της ανοσοαπόκρισης του ξενιστή στους όγκους μπορούν να ελέγξουν την ανάπτυξη του όγκου ή να συμβάλλουν σε ένα ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον που προάγει την εξέλιξη του. Στα διαφορετικά αυτά υποσύνολα ανοσοκυττάρων συμπεριλαμβάνονται τα *tumor associated macrophages*, με άλλοτε αντιογκογόνο δράση (M1) και άλλοτε προογκογόνο δράση (M2), αντίστοιχα τα *T-helper cells* (Th1) και (Th2), τα *cytotoxic T cells*, τα *T regulatory cells* (Treg), τα *dendritic cells* (DC1) και (DC2), και τα *myeloid derived suppressor cells* όπως φαίνονται στην εικόνα.

Είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι η αποτελεσματικότητα της αντινεοπλασματικής ανοσολογικής απάντησης των T cells εξαρτάται τόσο από την ικανότητα του αντιγόνου του όγκου να επάγει μια ανοσοαπόκριση (ανοσογονικότητα) όσο και από την παρουσία ή απουσία ανασταλτικού σήματος για αναχαίτιση της ανοσολογικής απάντησης (57). Συνεπώς, όγκοι που εμφανίζουν υψηλή ανοσογονικότητα αποτελούν πιο εύκολους στόχους για το ανοσοποιητικό σύστημα και εξουδετερώνονται σε πιο πρώιμα στάδια (58). Αντίθετα, οι λιγότερο ανοσογονικοί όγκοι διαφεύγουν της ανοσοεπιτήρησης και επιβιώνουν κι εξελίσσονται, μία διαδικασία γνωστή ως ανοσολογική επεξεργασία καρκίνου (*immunoeediting*) (59). Στη συνέχεια τα νεοπλασματικά επιζώντα κύτταρα υιοθετούν έναν άνοσο-ανθεκτικό φαινότυπο. Παράλληλα, κατά την ανάπτυξη του όγκου, τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσουν μηχανισμούς περιφερικής ανοχής και καταφέρνουν να περιορίσουν την τοπική κυτταροτοξική δράση των T κυττάρων καθώς και άλλων κυττάρων, όπως TAMs, NK κύτταρα και TANS (59) (εικόνα 3)



Εικόνα 3. Ο διπλός ρόλος των T cells στα αρχικά στάδια του καρκίνου και στο στάδιο της μετάστασης.

Στα πρώιμα στάδια της ογκογένεσης, η απόκριση των T cells κατά των αντιγόνων προερχόμενα από τον όγκο ελέγχει με κυτταροτοξική δράση την εξέλιξη του όγκου μέσω έκκρισης Th-1 κυτοκινών (IFN- $\gamma$ , IL-2 και IL-12), στρατολόγησης NK cells. Ως συνέπεια της σταθερής πίεσης που ασκείται από το ανοσοποιητικό σύστημα στα κύτταρα του όγκου, εκλεκτικοί κλώνοι του όγκου καταφέρνουν και διαφεύγουν της ανοσολογικής αναγνώρισης. Αυτά τα κύτταρα εισέρχονται σε μια φάση ανάπτυξης, που δεν εμποδίζεται από το ανοσοποιητικό σύστημα, στρατολογώντας τα ρυθμιστικά κύτταρα CD4+T cells (Tregs), τα οποία προκαλούν καταστολή της ανοσοαπόκρισης.

Τα ανθεκτικά καρκινικά κύτταρα στην προσπάθειά τους να αναχαιτίσουν την ανοσολογική απόκριση χρησιμοποιούν μηχανισμούς όπως τα σημεία ελέγχου-immune check points (PD-L1, PD-1, CTLA-4, LAG3) και επιστρατεύουν T cells όπως τα CD4+Th2 και τα CD4+T regulatory cells (Treg), τα οποία περιορίζουν τη αντικαρκινική δράση των κυτταροτοξικών CD8+ T cells. Τα Treg εκφράζουν τον μεταγραφικό παράγοντα FOXP3. Τα FOXP3+Treg προέρχονται από παύνη CD4+ T cells και η διαφοροποίησή τους προκαλείται είτε από την έκθεση σε ένα αντιγόνο ή από την παραγωγή συγκεκριμένων κυτοκινών στους περιφερικούς ιστούς, τα λεγόμενα peripheral Tregs (pTregs), ή διαφοροποιούνται in vitro τα λεγόμενα induced Tregs (iTregs). Τα pTregs αποτελούνται από άλλα υποσύνολα FoxP3<sup>-</sup>: ρυθμιστικά κύτταρα τύπου 1 T (Tr1) και κύτταρα T helper 3 (Th3), τα οποία εμπλέκονται επίσης στην ανοσολογική ανοχή. Τα Tregs διακρίνονται επίσης σε δύο κατηγορίες τα ενεργοποιημένα Tregs (CD4+CD45RA-

CD25+FOXP3+) και στα μη ενεργοποιημένα Tregs(CD4+CD45RA+CD25-FOXP3+), τα οποία εμφανίζουν περιορισμένη ανοσοκατασταλτική ικανότητα(60). Ο ρόλος τους είναι να καταστέλλουν τη δράση των ανοσοκυττάρων που επάγουν την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή προς τα κύτταρα του όγκου(61). Η προκαλούμενη ανοσοκατάστολη από τα Treg επιτυγχάνεται από τη δέσμευση της IL-2 και την παραγωγή ανοσοκατασταλτικών μορίων όπως IL-10, TGF-β, προσταγλανδίνης E2, αδενosίνης και η γαλακτίνης-1(62). Επιπλέον, τα Treg εκφράζουν τα ίδια immunecheck points(CTLA-4), οι οποίοι ενισχύουν περαιτέρω την ανοσοκατασταλτική τους δράση. Στο TME τα νεοπλασματικά κύτταρα και ανοσοκύτταρα σχετίζονται με τον όγκο όπως τα TAMs και τα κατασταλτικά ανοσοκύτταρα MDSCs απελευθερώνουν χημειοκίνες όπως CCL17, CCL22, CCL5, CCL6 ή CCL28, οι οποίες προσελκύουν τα ενεργοποιημένα Tregs που εκφράζουν υποδοχείς χημειοκινών όπως CCR4,CCR5,CCR10 και CXCR3(63)(64)(65). Τα καρκινικά κύτταρα προκαλούν περαιτέρω τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των Tregs μέσω της διαφοροποίησης των DC σε ανώριμα που παράγουν TGF-β. Συμπερασματικά, η συσσώρευση του FoxP3+ Tregs εντός του TME είναι αποτέλεσμα της επιστράτευσης tTregs ή rTregs μέσω χημειοταξίας, ενίσχυσης του πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης και επιβίωσης τους μέσω παραγόντων από τα καρκινικά κύτταρα, όπως TGF-β και η IL-10, ή πιθανώς μέσω της ενεργοποίησης του προγενέστερου CD4+FoxP3-T σε CD4+FoxP3+Tregs. Βάση πολλών μελετών η παρουσία των Treg σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση σε πολλά κακοήγη νεοπλάσματα, όπως στον καρκίνο μαστού(66). Ωστόσο, υπάρχουν δυσκολίες στην εκτίμηση των Tregs με συνέπεια ορισμένα αντικρουόμενα αποτελέσματα όσον αφορά την προγνωστική σημασία των Tregs σε ορισμένους τύπους καρκίνου, γι' αυτό δεν προχώρησε η ιδέα της στόχευσης τους, ως στοχεύουσα θεραπευτική αντιμετώπιση στον καρκίνο.

Στη μετάσταση, τα κυτταροτοξικά CD8+ T cells διαδραματίζουν επίσης αντινεοπλασματική δράση και η παρουσία τους συσχετίστηκε με μειωμένη επίπτωση σε μεταστάσεις, π.χ οστικές μεταστάσεις(67). Επίσης, οι προοπτικές αναλύσεις ασθενών με καρκίνο πνεύμονα και μαστού έδειξαν αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων και των T κυττάρων στο περιφερικό αίμα(68)(69). Είναι ενδιαφέρον ότι η ανοσοθεραπεία με αναστολείς σημείων ελέγχου-immune checkpoints inhibitor(ICI) είναι σημαντικά αποτελεσματική στη θεραπεία εγκεφαλικών μεταστατικών όγκων από μελάνωμα και καρκίνο του πνεύμονα, ειδικά όταν λαμβάνεται υπόψη η έλλειψη ειδικής ανοσολογικής απάντησης στο κεντρικό νευρικό σύστημα(KNS)(70)(71)(72). Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η αποτελεσματικότητα της ανοσοθεραπείας με ICI σε εγκεφαλικές μεταστάσεις από μελάνωμα είναι σημαντική κι εξαρτάται από το φορτίο της εξωκράνιας νόσου και την περιφερική ενεργοποίηση των CD8<sup>+</sup> T κυττάρων (73). Από την άλλη πλευρά, ένα υψηλό επίπεδο κυκλοφορούντων Tregs έχει συσχετιστεί με υψηλότερο κίνδυνο μετάστασης σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονος(74), με κολοορθικό καρκίνωμα(75) και σε ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα(76).

### ΓΑΜΑ ΔΕΛΤΑ – GAMMA DELTA T CELLS(ΓΔ TC)

Τα γδΤ cells αποτελούν μη συμβατά TC και αντιπροσωπεύουν μια μικρή ομάδα των TC στο περιφερικό αίμα. Τα γδΤ cells εκφράζουν ετεροδιμερείς υποδοχείς των TC(TCRs) τα οποία αποτελούνται από γ και δ αλυσίδες, σε αντίθεση με τα πιο κύρια και γνωστά CD4+ T helper και τα CD8+ Cytotoxic TC, τα οποία αποτελούνται από αβ TCRs. Αφορούν ανοσοκύτταρα ειδικής ανοσίας (adaptive immune cells). Ο μηχανισμός δράσης τους στην ανοσολογική απόκριση δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος. Έχουν περιγραφεί κάποιες υποκατηγορίες των γδ TC. Τα γδ TC γενικά ανευρίσκονται σε επιθηλιακούς ιστούς και σε βλεννογόνους αποτελώντας την πρώτη γραμμή άμυνας σε παθογόνους εισβολείς. Στην πλειοψηφία τους τα γδ TC δεν στηρίζονται στην αναγνώριση μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας(MCH) σε αντίθεση με τα αβ TC, των οποίων η δράση τους βασίζεται στην αλληλεπίδραση με μόρια του MCH. Τα γδ TC φαίνεται να ενεργοποιούνται μέσω μεταβολιτών όπως ο φωσφορυλιωμένος πρόδρομος μεταβολίτης eukaryotic isrprenoid precursor(IPP), ο οποίος ανευρίσκεται συχνά στα καρκινικά κύτταρα. Επίσης, το κυτταρικό stress, το οποίο προκαλείται από μια λοίμωξη ή φλεγμονώδη αντίδραση στην καρκινογένεση, έχει ως αποτέλεσμα την επιστράτευση των γδ TC, συμβάλλοντας έτσι στην ανοσοεπιτήρηση. Ένας άλλος τρόπος ενεργοποίησης των γδ TC είναι τα συνδιεγερτικά σήματα, προερχόμενα π.χ από υποδοχείς των NK κυττάρων. Ακολούθως, μετά την επαφή με το αντιγόνο τα γδ TC απελευθερώνουν κυτταροκίνες (IFNα, IFNγ, IL-17), χημειοκίνες και κυτταρικά ένζυμα, μεσολαβώντας στην ανοσολογική απάντηση. Λόγω της ιδιαιτερότητας των γδ TC να δρουν ανεξάρτητα από το MCH, τα καθιστούν παν-πληθυσμού ανοσοκύτταρα, αποκτώντας ένα ξεχωριστό ερευνητικό ενδιαφέρον. Μελέτες στο παρελθόν, οι οποίες στόχευαν τα γδ TC με χρήση φωσφορυλιωμένων μεταβολιτών επέδειξαν ένα καλό προφίλ ασφάλειας, ωστόσο η αποτελεσματικότητά τους δεν επιβεβαιώθηκε.

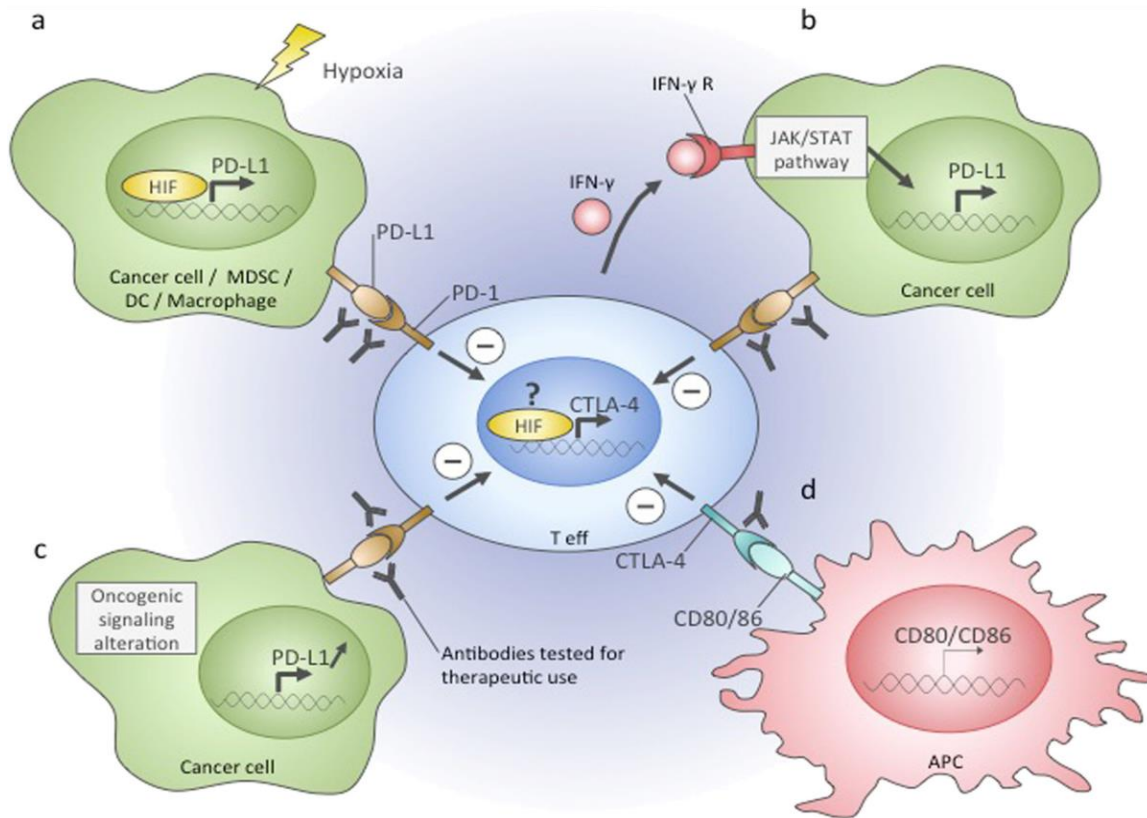
## 2.4. Immune Checkpoints

Τα σημεία ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος – immune checkpoints(IC) είναι ρυθμιστές του ανοσοποιητικού, αποσκοπώντας στην ιστική ομοιόσταση. Ο ρόλος τους είναι ζωτικής σημασίας γιατί προστατεύει τον οργανισμό από αυτοάνοσα συμβάματα και από ανεξέλεγκτη επίθεση του ανοσοποιητικού. Ωστόσο, ο καρκίνος εκμεταλλεύεται την ανοσοκατασταλτική ιδιότητα των IC και καταφέρνει να διαφεύγει της ανοσοεπιτήρησης, με σκοπό την επιβίωση και εξέλιξη του(**Εικόνα 4**).

Τα πιο γνωστά ανοσοσημεία ελέγχου είναι το programmed death-1(PD-1) και το cytotoxic T lymphocyte antigen-4(CTLA-4), τα οποία δρουν ως αναστολείς της δράσης των κυτταροτοξικών CD8+ T cells και των CD4+ T helper 1 cells και έχουν συσχετιστεί με την ανοσολογική διαφυγή στον καρκίνο(77). Η συμμετοχή της σηματοδότησης του CTLA-4 μελετήθηκε αρχικά στο μελάνωμα, το οποίο εμφανίζει μεγάλη ανοσογονικότητα και κατά συνέπεια έντονη ανοσολογική απόκριση(78), στον καρκίνο πνεύμονος(79), στον γαστρικό(80) και στον κολοορθικό καρκίνο(80). Η programmed death-ligand 1(PD-L1) αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που ρυθμίζει προς τα κάτω τις ανοσολογικές αποκρίσεις, μέσω της δέσμευσής της στους δύο προγραμματισμένους υποδοχείς θανάτου – 1(PD-1) και B7.1. Το PD-1 αποτελεί ανασταλτικό υποδοχέα, ο οποίος εκφράζεται στα T Cells, μετά την ενεργοποίησή τους, όπως αυτή προκαλείται σε καταστάσεις χρόνιας διέγερσής τους, σε χρόνιες φλεγμονές και κακοήθειες. Η σύνδεσή του PD-L1 με το PD-1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των T cells, την παραγωγή κυτοκινών και την κυτταροτοξική δραστηριότητα τους, με συνέπεια την λειτουργική αδρανοποίηση ή την εξάντληση των Tcells. Συνεπώς, η δέσμευση του PD1 με τον συνυποδοχέα του, PDL-1 (που εκφράζεται από πολλά ανοσοκύτταρα, μεσεγχυματικά κύτταρα, αγγειακά κύτταρα και νεοπλασματικά κύτταρα), έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της δραστηριότητας των T-κυττάρων, αναστέλλοντας τις αντικαρκινικές τους δραστηριότητες, με συνέπεια την επιβίωση και εξέλιξη των νεοπλασματικών κυττάρων(81). Το B7.1 αποτελεί ένα μόριο που εκφράζεται στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC) προκαλώντας αναστολή της ανοσολογικής απόκρισης, συμπεριλαμβανομένης της αναστολής των ενεργοποιημένων T cells και την παραγωγή κυτοκινών. Η ανώμαλη έκφραση του PD-L1 στα κύτταρα του όγκου έχει προγνωστική και προβλεπτική αξία και η εκτίμηση της θεωρείται αναγκαία στα πλαίσια αναζήτησης βιοδεικτών με σκοπό την βέλτιστη θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών με καρκίνο. Υψηλή έκφραση του PD-L1 έχει συσχετιστεί με χειρότερη πρόγνωση σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονος(82). Η προβλεπτική αξία του PD-L1 έγκειται στο γεγονός ότι όγκοι με υψηλή έκφραση του PD-L1 εμφανίζουν εξαιρετικές ανταποκρίσεις στη θεραπεία με immune checkpoints inhibitors(ICI) anti-PD-L1 και anti-PD-1, ανταποκρίσεις μακροχρόνιες σε σχέση με την κλασσική χημειοθεραπεία.

Τα τελευταία χρόνια, η ανοσοθεραπεία κατέχει σημαντική θέση στην θεραπεία για τον καρκίνο, όπως το anti-PD1 (pembrolizumab και nivolumab), το anti-PD-L1 (avelumab) και το anti-CTLA4 (ipilimumab) με ισχυρή αντινεοπλασματική δράση σε πολλά κακοήθη

νεοπλάσματα(83), κυρίως στο μελάνωμα και στον καρκίνο του πνεύμονος, οι οποίοι φέρουν υψηλό μεταλλαξιγόνο φορτίο και είναι πιο εύκολα αναγνωρίσιμοι από το ανοσοποιητικό σύστημα.



Εικόνα 4. Immune checkpoints στο μικροπεριβάλλον του όγκου

Οι immune checkpoint inhibitors έχουν δείξει ισχυρή αντινεοπλασματική δραστηριότητα και στο μεταστατικό στάδιο διαφόρων τύπων καρκίνου. Ωστόσο, η αγωγή με ICI στους ασθενείς με εγκεφαλικές μεταστάσεις δεν είχε ένδειξη πριν από λίγα χρόνια. Οι εγκεφαλικές μεταστάσεις αποτελούσαν κριτήριο αποκλεισμού σε κλινικές μελέτες με σκέλος την ανοσοθεραπεία. Τα τελευταία χρόνια, η καλύτερη κατανόηση του ανοσοποιητικού τοπίου στο Κ.Ν.Σ καθώς και του μικροπεριβάλλοντος του όγκου στις εγκεφαλικές μεταστάσεις κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο εγκέφαλος αποτελεί ένα ανοσολογικά ενεργό όργανο και δεν είναι ανοσολογικά απομονωμένο(72). Το φλεγμονώδες TME των εγκεφαλικών μεταστάσεων εμφανίζει στην πλειοψηφία των ασθενών έντονη διήθηση από TILs και συχνά υψηλή έκφραση ανοσοκατασταλτικών παραγόντων, όπως PD-1 και PD-L1(84). Νεότερα δεδομένα υποστηρίζουν την ασφάλεια και αποτελεσματικότητα των ICI με σημαντικές

ανταποκρίσεις και σε ασθενείς με εγκεφαλικές μεταστάσεις ή πρωτοπαθείς όγκους εγκεφάλου(85).



### 3. ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΕΣ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

#### 3.1 Επιδημιολογία

Οι εγκεφαλικές μεταστάσεις-brain metastases(BM) αποτελούν την πιο συχνή κακοήθεια εγκεφάλου στους ενήλικες. Υπολογίζεται ότι στις Η.Π.Α το 2,0% όλων των ασθενών οι οποίοι διαγιγνώσκονται με καρκίνο παρουσιάζουν εγκεφαλικές μεταστάσεις κατά τη στιγμή της διάγνωσης, με ετήσια επίπτωση που κυμαίνεται από 21.000 έως 43.000 περιπτώσεις. Οι ασθενείς με μικροκυτταρικό και μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα εμφάνισαν τα υψηλότερα ποσοστά εγκεφαλικών μεταστάσεων κατά τη διάγνωση. Μεταξύ των ασθενών με μεταστατική νόσο, εγκεφαλικές μεταστάσεις εμφάνισαν οι ασθενείς με μελάνωμα (28,2%), αδenoκαρκίνωμα πνεύμονα (26,8%), μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα που δεν προσδιορίζεται NOS (25,6%), μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (23,5%), πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα (15,9%), βρογχιολοκυψελιδικό καρκίνωμα (15,5%), ο καρκίνος του νεφρού (10,8%) και ο καρκίνος μαστού(7,58%)(86). Είναι ενδιαφέρον ότι μεταξύ των ασθενών με μεταστατική νόσο, οι ασθενείς με μεταστατικό μελάνωμα έχουν το υψηλότερο ποσοστό εγκεφαλικών μεταστάσεων, αντανακλώντας την αυξημένη τάση του να δίνει μεταστάσεις στον εγκέφαλο(86)(Πίνακας 1). Το 20 με 30% των ασθενών με καρκίνο θα εμφανίσουν εγκεφαλικές μεταστάσεις κατά τη εξέλιξη της νόσου τους. Η συχνότητα των εγκεφαλικών μεταστάσεων έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια (87). Ένα αίτιο αυτής της αύξησης είναι ο συνδυασμός νεότερων και πιο ακριβέστερης διαγνωστικής αξίας μεθόδων καθώς και των νεότερων πιο αποτελεσματικών θεραπειών, που έχουν ως αποτέλεσμα μεγαλύτερους χρόνους συνολικής επιβίωσης από τη στιγμή της διάγνωσης της πρωτοπαθούς εστίας καρκίνου(88). Σύμφωνα με μια μελέτη 15,517 ασθενών στη Σουηδία, η επίπτωση των εγκεφαλικών μεταστάσεων διπλασιάστηκε μεταξύ 1987 και 2006(89). Οι δύο κύριοι καρκίνοι υπεύθυνοι για αυτή την αυξημένη συχνότητα είναι του μαστού στις γυναίκες και του πνεύμονα και στα δύο φύλα.

Η παρουσία εγκεφαλικών μεταστάσεων χειροτερεύει την πρόγνωση του ασθενούς και του προσδίδει ένα πτωχό προσδόκιμο. Οι ασθενείς με δευτεροπαθείς εστίες εγκεφάλου συχνά αποκλείονται από κλινικές μελέτες, μην έχοντας πρόσβαση με αυτόν τον τρόπο σε νεότερα θεραπευτικά πρωτόκολλα (88). Η διάμεση συνολική επιβίωση σε ασθενείς με εγκεφαλικές μεταστάσεις που δεν έχουν υποβληθεί σε θεραπεία είναι περίπου 5 εβδομάδες. Οι σύγχρονες μέθοδοι θεραπείας μπορούν να επεκτείνουν αυτή την πρόγνωση σε 3-18 μήνες, αλλά οι πολυπαραγοντικές αναλύσεις δείχνουν ότι οι ασθενείς με εγκεφαλικές μεταστάσεις εξακολουθούν να έχουν γενικά χειρότερη πρόγνωση από τους ασθενείς χωρίς BM(88)(90)(91). Οι μεταστάσεις στον εγκέφαλο του καρκίνου του προστάτη και του μαστού έχουν τις καλύτερες μακροπρόθεσμες προγνώσεις, σε σύγκριση με τις μεταστάσεις του καρκίνου του παχέος εντέρου, του μελανώματος και του πνεύμονα που έχουν τη χειρότερη πρόγνωση.

Η ύπαρξη BM δεν επιδεινώνουν μόνο την πρόγνωση αλλά έχουν αρνητικό αντίκτυπο και στην ποιότητα ζωής των ασθενών, διότι προκαλούν συμπτώματα από το ΚΝΣ όπως αταξία,

επιληπτικές κρίσεις, προβλήματα όρασης και ομιλίας, πονοκεφάλους και πτώση επιπέδου επικοινωνίας.

Table 1.

Proportion of patients with brain metastasis at time of initial diagnosis, median survival after brain metastasis diagnosis, incidence of leptomeningeal disease, and metastatic pattern in patients with SCLC, NSCLC, adenocarcinoma of the lung, breast cancer, renal cancer, colorectal cancer, and melanoma [1,133–137].

Type	Incidence of Brain Metastases at Initial Diagnosis (%)	Incidence of Brain Metastases Among Patients with Metastatic Disease (%)	Median Survival after Brain Metastasis Diagnosis (months)	Incidence of Leptomeningeal Disease (%)
Small Cell Lung Cancer	15.83	22.43	6.0	10–25
Non Small Cell Lung Cancer NOS	12.81	22.56	4.0	1–3.8
Breast Cancer	0.41	7.58	10	5
Renal Cancer	1.48	10.84	5	0.03
Colorectal Cancer	0.27	1.36	6	0.058
Melanoma	0.65	28.16	6	22–46

Πίνακας 1. Τα ποσοστά των ασθενών με εγκεφαλικές μεταστάσεις

**Τα ποσοστά των ασθενών με εγκεφαλικές μεταστάσεις:** κατά τη στιγμή της διάγνωσης, η διάμεση επιβίωση, η επίπτωση λεπτομηνιγγικής καρκινωμάτωσης, στο μεταστατικό στάδιο του SCLC, NSCLC, αδenoκαρκινώματος του πνεύμονος, του καρκίνου του μαστού, του νεφροκυτταρικού καρκινώματος, του κολορθηκτικού καρκίνου και του μελανώματος.

Οι νεότερες μέθοδοι αντιμετώπισης των BMs είχαν ως αποτέλεσμα τη σταδιακή αύξηση της επιβίωσης για ασθενείς με BMs. Η ακτινοθεραπεία εφ'ολοκλήρου του εγκεφάλου (WBRT) και η θεραπεία με κορτικοστεροειδή που αναπτύχθηκαν στα μέσα του εικοστού αιώνα αύξησαν τους χρόνους επιβίωσης από 4–6 εβδομάδες σε 4–6 μήνες(92). Ωστόσο, σχετίζεται με γνωστικά ελλείμματα, τα οποία έχουν ως αποτέλεσμα σημαντική έκπτωση στην ποιότητα ζωής των ασθενών. Συνεπώς, οι κατευθυντήριες οδηγίες τείνουν να συστήνουν αντί της χρήσης WBRT, τη χρήση της στερεοτακτικής ακτινοχειρουργικής (SRS) σε ασθενείς με περιορισμένο αριθμό BMs για ολιγο-μεταστατική νόσο, ενώ η WBRT έχει περισσότερο παρηγορητικό ρόλο ως θεραπεία διάσωσης(93). Επιπλέον η εξέλιξη στον τομέα της νευροχειρουργικής επιτρέπει την εξαίρεση περιορισμένου αριθμού εγκεφαλικών μεταστάσεων, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την περαιτέρω αύξηση της συνολικής

επιβίωσης, με μέσους χρόνους επιβίωσης 10-16 μήνες(92). Ο συνδυασμός νευροχειρουργικής ακολουθούμενη από SRS, σε ασθενείς με μεγαλύτερες BMs, φαίνεται από πρόσφατες αναδρομικές μελέτες ότι βελτιώνει σημαντικά την τοπικοπεριοχική νόσο και προσδίδει όφελος στην συνολική επιβίωση μεγαλύτερο σε σχέση με την SRS μόνη της(94)(95). Τέλος, η καλύτερη κατανόηση της ανοσολογικής απόκρισης στο εγκεφαλικό παρέγχυμα και η προθήκη ανοσοθεραπείας με τους ICI σε συνδυασμό με κυτταροτοξική θεραπεία, στην αγωγή των ασθενών με εγκεφαλικές μεταστάσεις, αλλάζοντας τη θεραπευτική προσέγγιση έχουν δείξει, σε ορισμένες περιπτώσεις, θεαματικές ανταποκρίσεις αυξάνοντας δραματικά τους χρόνους επιβίωσης σε ασθενείς με BMs(96)(97). Παρά τη πρόοδο στην θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με BMs, η πρόγνωση για την πλειοψηφία των ασθενών παραμένει πτωχή.

### **3.2 Διάγνωση, Παθολογοανατομία, Μοριακή βιολογία**

#### **3.2.1 Διάγνωση**

Το ατομικό ιστορικό συνήθως περιορίζεται στην εμφάνιση νευρολογικής σημειολογίας εντός λίγων εβδομάδων. Οι BMs συχνότερα προκαλούν κεφαλαλγία, επιληπτικές κρίσεις, κινητικές διαταραχές όπως ημιπάρεση, αισθητηριακές διαταραχές, διαταραχές στην όραση, αλλαγές στην προσωπικότητα, αφασία ή σημεία και συμπτώματα προκαλούμενα από αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση. Ο κίνδυνος επιληπτικών κρίσεων σχετίζεται με την εγγύτητα των BMs στον φλοιό του εγκεφάλου και από την παρουσία αιμορραγίας. Τα εστιακά συμπτώματα και σημεία εξαρτώνται από τη θέση των BMs. Αιμορραγικές BMs από μελάνωμα ή χοριακό καρκίνωμα, ή αποφρακτικός υδροκέφαλος καθώς και BMs με παρεγκεφαλιδική εντόπιση συνήθως προκαλούν ταχεία νευρολογική επιδείνωση. Μια λεπτομερής νευρολογική εξέταση σύμφωνα με τα κριτήρια τα οποία προτείνονται από το Response Assessment in Neuro-oncology(RANO) θα πρέπει να εκτελείται από τη στιγμή της διάγνωσης των BMs αλλά και κατά τη διάρκεια παρακολούθησής τους.

#### **3.2.2 Μέθοδοι διάγνωσης**

Ο εγκέφαλος αποτελεί όργανο στόχο για πολλά κακοήθη νεοπλάσματα και η υποψία εγκεφαλικών μεταστάσεων δεν θα πρέπει να απομακρύνεται ως πιθανό σενάριο. Κατά τη διάγνωση ενός συμπαγούς όγκου, ανάλογα με την επίπτωση που εμφανίζει σε εγκεφαλικές μεταστάσεις, στα πλαίσια σταδιοποίησης της νόσου, κρίνεται απαραίτητος ή όχι ο έλεγχος του εγκεφάλου. Κατά τη διάρκεια επανελέγχων στην περίπτωση γνωστού πρωτοπαθούς όγκου, σε ασυμπτωματικούς ασθενείς, η απεικόνιση του εγκεφάλου θα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται, με σκοπό τον αποκλεισμό εγκεφαλικών μεταστάσεων. Σε ογκολογικούς ασθενείς, οι οποίοι εμφανίζουν νευρολογική σημειολογία, η υποψία εγκεφαλικής νόσου είναι υψηλή και η απεικόνιση του εγκεφάλου θεωρείται επιτακτική ανάγκη, για την έγκαιρη διάγνωση και περαιτέρω θεραπευτική αντιμετώπιση.

Η μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου(MRI) με σκιαγραφικό αποτελεί τη μέθοδο εκλογής στη διάγνωση των BMs. Είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη η διαφορική διάγνωση μεταξύ εγκεφαλικών μεταστάσεων, πρωτοπαθών όγκων του εγκεφάλου(κυρίως κακοήθη γλοιώματα και πρωτοπαθή λεμφώματα του Κ.Ν.Σ) καθώς και μη νεοπλασματικών καταστάσεων(αποστήματα, λοιμώξεις, αγγειακές παθήσεις) ακόμη και σε ασθενείς με γνωστό ιστορικό καρκίνου.

Η MRI diffusion-weighted είναι χρήσιμη στη διαφοροδιάγνωση αλλοιώσεων, οι οποίες εμφανίζουν δακτυλοειδή πρόσληψη σκιαγραφικού και είναι ύποπτες για δευτεροπαθείς εντοπίσεις εγκεφάλου από αλλοιώσεις, οι οποίες δεν προσλαμβάνουν και πιθανόν αφορούν αποστήματα. Σε ασθενείς οι οποίοι για κάποιο λόγο αντεδείκνυται να υποβληθούν σε MRI εγκεφάλου συστήνεται η αξονική τομογραφία εγκεφάλου(CT). Ωστόσο, η αξονική εγκεφάλου εμφανίζει μικρότερη ευαισθησία στην ανίχνευση BMs σε σχέση με την MRI.

Νεότερες απεικονιστικές μέθοδοι του νευρικού συστήματος όπως η MRI perfusion, MRI spectroscopy και το PET-CT με FDG ή με χρήση αμινοξέων μπορούν να ανιχνεύσουν εγκεφαλική νόσο, αλλά δεν παρέχουν επαρκή στοιχεία για διαφοροδιάγνωση μεταξύ δευτεροπαθών εντοπίσεων που προσλαμβάνουν σκιαγραφικό από άλλους κακοήθεις όγκου του εγκεφάλου, γλοιακής ή μη προέλευσης.

Σε περίπτωση που οι BMs αποτελούν το πρώτο εύρημα σε ασθενείς χωρίς γνωστό ιστορικό κακοήθους νεοπλασίας συστήνεται η ενδελεχής φυσική εξέταση(συμπεριλαμβανομένης του δέρματος και των όρχεων), ολόσωμη αξονική τομογραφία, μαστογραφία και υπέρηχος μαστών κι αν δεν ανευρεθεί η πρωτοπαθής εστία ενδείκνυται η εξέταση με FDG-PET CT.

### 3.2.3 Παθολογοανατομία, υγρή βιοψία και μοριακή βιολογία.

Η ιστολογική ταυτοποίηση εγκεφαλικής μετάστασης είναι αναγκαία πριν από οποιαδήποτε θεραπευτική προσέγγιση σε ασθενείς στους οποίους δεν ανευρέθη πρωτοπαθής εστία(καρκίνος αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας-CUP) και δεν υπάρχει βιοψία. Επιπλέον, σε ασθενείς με καλά ελεγχόμενη τη νόσο ή παλαιό ιστορικό κακοήθους εξεργασίας πρέπει να εξετάζεται το ενδεχόμενο βιοψίας των εγκεφαλικών μεταστάσεων, με σκοπό να αποκλειστεί η πιθανότητα ενός δεύτερου πρωτοπαθούς όγκου.

Η ιστοπαθολογική έκθεση πέραν από τη συνήθη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, θα πρέπει να συμπληρώνεται με ανοσοϊστοχημικό έλεγχο σε περιπτώσεις διφορούμενων αποτελεσμάτων. Τα τελευταία χρόνια η περαιτέρω διερεύνηση με μοριακό έλεγχο του ιστού παρέχει πληροφορίες για την πρόγνωση αλλά και το πιθανό όφελος από στοχευμένες θεραπείες (**Πίνακας 2**).

Predictive markers	
Entity	Molecular markers/targets
Breast	HER2, ER/PR, BRCA1/2 ('BRCAness'), PIK3CA, PD-L1
Non-small-cell lung	EGFR, ROS1, NTRK, ALK, RET, MET, KRAS, BRAF, PD-1/PD-L1
Squamous cell	FGFR1
Melanoma	BRAF, KIT, NF1, NRAS, PD-L1
Colorectal	KRAS, BRAF, NRAS, PD-L1, MSI
Upper gastrointestinal	HER2, MET
Urothelial/transitional Cell	PD-L1
Endometrium	MSI
Ovarian (serous)	ER/PR, MSI
Ovarian (mucinous)	MSI

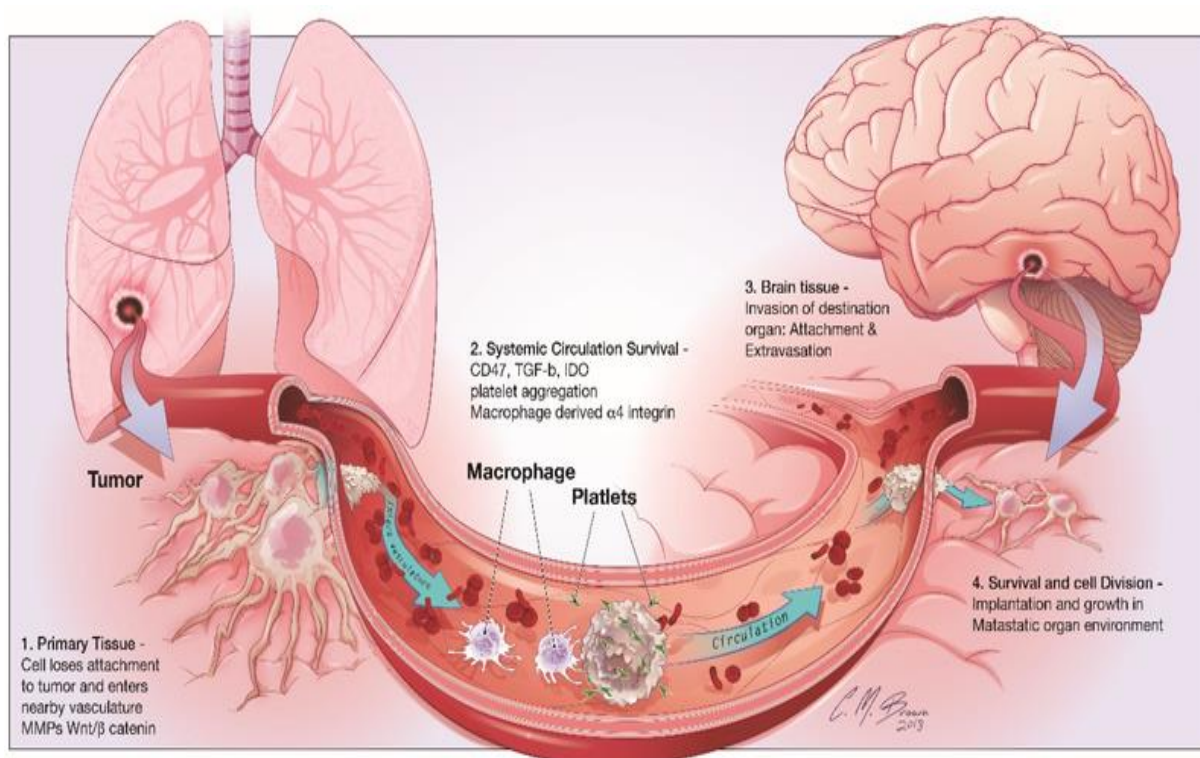
*Πίνακας 2. Μοριακές υπογραφές συγκεκριμένων κακοήθων νεοπλασμάτων.*

Επιπλέον, η υγρή βιοψία αποτελεί ένα από τα πιο καινοτόμα εργαλεία ανίχνευσης κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων. Η υγρή βιοψία είναι μια μη επεμβατική μέθοδο ανάλυσης του καρκινικού DNA, το οποίο απομονώνεται από το πλάσμα ασθενών με καρκίνο. Η υγρή βιοψία αποτελεί μια εναλλακτική μέθοδο στην επεμβατική βιοψία καρκινικού ιστού και στην ιστολογική εκτίμηση αυτού και παρέχει πληροφορίες για το γενετικό προφίλ του όγκου. Παρόλα αυτά, η υγρή βιοψία δεν υποκαθιστά την αξία της κλασσικής βιοψίας, η οποία συνεχίζει να αποτελεί την εξέταση επιλογής για τη διάγνωση του καρκίνου. Με τη βοήθεια της υγρής βιοψίας, ο ογκολόγος μπορεί να συλλέγει χρήσιμες πληροφορίες για την πρόγνωση του ασθενούς, για την απόκριση του στη θεραπεία και για την έγκαιρη πρόβλεψη μιας υποτροπής.

Τέλος εάν η νευρολογική εκτίμηση θέσει την υποψία λεπτομηνιγγικής καρκινωμάτωσης είναι απαραίτητη η οσφυονωτιαία παρακέντηση και η κυτταρολογική εξέταση του Ε.Ν.Υ.

### 3.3 Ανοσοποιητικό σύστημα και εξέλιξη του καρκίνου από την πρωτοπαθή βλάβη σε μεταστατική νόσο.

Ο Stephen Paget ανέπτυξε για πρώτη φορά τη θεωρία των σπόρων και του εδάφους της μετάστασης το 1889. Μελέτησε ένα μη τυχαίο μοτίβο μεταστάσεων κατά την αυτοψία σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού και υπέθεσε ότι αυτό ήταν αποτέλεσμα μεταστατικών κυττάρων, αυτά που ο ίδιος αποκαλούσε «σπόρους», τα οποία είχαν μεγαλύτερη τάση να μεταναστεύουν σε ορισμένα όργανα, το «έδαφος»(98). Η καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών μετάστασης έχει καταστήσει σαφέστερες τις προϋποθέσεις που απαιτούνται για να αποκολληθεί ένα κύτταρο από τον πρωτοπαθή όγκο, να εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος, να επιβιώσει στην κυκλοφορία του αίματος, να εισβάλει στο όργανο στόχο του και στη συνέχεια να επιβιώσει σε αυτό το νέο περιβάλλον(Εικόνα 5). Ένα κοινό χαρακτηριστικό σε καθένα από αυτά τα βήματα είναι η ανάγκη του μεταστατικού κυττάρου να αποφεύγει την αναγνώριση και την καταστροφή από το ανοσοποιητικό σύστημα σε κάθε βήμα της μεταστατικής εξέλιξης. Οι ανοσοκατασταλτικοί μηχανισμοί έχουν ζωτικής σημασίας ρόλο για την επιβίωση του «σπόρου» και το ανοσοποιητικό σύστημα είναι βασικός μοχλός για τη δημιουργία του γόνιμου εδάφους για να κρατήσουν αυτά τα κύτταρα. Είναι σημαντικό να κατανοήσουμε αυτούς τους μηχανισμούς στο πλαίσιο των εγκεφαλικών μεταστάσεων για να σχεδιάσουμε νέες και στοχεύουσες ανοσοθεραπείες για την αντιμετώπισή τους.



Εικόνα 5. Στάδια ανάπτυξης εγκεφαλικής μετάστασης. .

Ο μηχανισμός δημιουργίας εγκεφαλικής μετάστασης περιλαμβάνει τέσσερα κύρια βήματα: 1) αποκόλληση του μεταστατικού κυττάρου από την πρωτοπαθή εστία, 2) επιβίωση στη

συστηματική κυκλοφορία,3)εισβολή στο παρέγχυμα του εγκεφάλου και 4)επιβίωση στο μικροπεριβάλλον του Κ.Ν.Σ.

#### ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟ ΚΥΤΤΑΡΟ «ΣΠΟΡΟΣ»: ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΟΓΚΟΥ

Οι πρωτοπαθείς όγκοι εμφανίζουν την ικανότητα να επηρεάζουν την ανοσολογική απόκριση μέσω των μεταβολιτών και των στρωματικών συστατικών στο μικροπεριβάλλον τους. Ένας μηχανισμός για να γίνει αυτό είναι μέσω της υπερέκφρασης ενός ενζύμου της Ινδολαμίνης 2,3 διοξυγενάσης(IDO) που μεταβολίζει την τρυπτοφάνη σε κυνουρενίνη, εξουδετερώνοντας αποτελεσματικά την τρυπτοφάνη στο μικροπεριβάλλον (99). Η εξάντληση της τρυπτοφάνης ενεργοποιεί μια απόκριση στρες στα Τ-κύτταρα που αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό τους και επάγει έναν ανοσοκατασταλτικό φαινότυπο Treg(100). Επιπλέον, η απελευθέρωση κυνουρενίνης, σε αυτή τη διαδικασία προάγει περαιτέρω τη διαφοροποίηση Treg, καθώς και έναν ανοσοκατασταλτικό φαινότυπο στα ειδικά αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs), δενδριτικά DCs και μακροφάγα MCs, αναγκάζοντάς τα να εκκρίνουν περισσότερες ρυθμιστικές κυτοκίνες όπως IL-10 και TGFβ(100). Τα συστατικά του στρώματος του όγκου καταστέλλουν επίσης μια αποτελεσματική αντινεοπλασματική ανοσοαπόκριση. Το στρώμα του όγκου αποτελείται από ινοβλάστες, εξειδικευμένα μεσεγχυματικά κύτταρα που διακρίνονται στο ιστικό περιβάλλον, αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, περικύτταρα και συστατικά εξωκυττάριας ουσίας- extracellular matrix(ECM). Αυτά τα συστατικά όχι μόνο παρέχουν ένα φυσικό φραγμό για την είσοδο των κυττάρων του ανοσοποιητικού, αλλά επίσης καταστέλλουν ενεργά το ανοσοποιητικό σύστημα παρεμποδίζοντας την παρουσίαση ανοσοαντιγόνου στα Τ-κύτταρα(101). Οι ινοβλάστες διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του όγκου και τις μεταστάσεις, εκκρίνοντας αυξητικούς παράγοντες στον ιστό, οι οποίοι μπορούν να προάγουν την ανάπτυξη του όγκου και μεταλλοπρωτεάσες-matrix metalloproteases(MMPs) που μπορούν να υποβαθμίσουν το ECM και να προάγουν την ανάπτυξη, την εισβολή, την αγγειογένεση και τη μετάσταση(102). Τέλος, τα μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα μπορούν να παράγουν TGF-β και διαλυτούς συνδέτες Τ-κυττάρων δόλωμα που μειώνουν την ανοσολογική απόκριση και εμποδίζουν την επαφή των Τ-κυττάρων με τα καρκινικά κύτταρα(103).

#### ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Οι αντιρυθμιστικοί μηχανισμοί, που συνήθως χρησιμοποιούνται για την επίλυση μιας φλεγμονώδους απόκρισης, εκμεταλλεύονται τα καρκινικά κύτταρα, επιτρέποντας την ανοσολογική διαφυγή και προάγοντας την επιβίωσή τους. Τα MDSC, ανοσοκατασταλτικά κύτταρα από προγονικά ανώριμα μυελοειδή κύτταρα, επάγονται από φλεγμονή και νέκρωση εντός του TME και αναχαιτίζουν με πολλαπλούς τρόπους την αντικαρκινική ανοσοαπόκριση(104). Τα MDSCs εξαντλούν τα αμινοξέα στο TME, λιμοκτονώντας τα Τ-κύτταρα και αναστέλλοντας τις οδούς σηματοδότησης που απαιτούνται για την ενεργοποίησή τους (**Εικόνα 6**)(105). Παράγουν επίσης μονοξείδιο του αζώτου (NO) μέσω της έκφρασης των συνθετασών του μονοξειδίου του αζώτου (NOS2 και NOS3), η οποία αναστέλλει τη σηματοδότηση IL-2 και την ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων(105). Παράγονται





επιδιόρθωση. Τα μακροφάγα που σχετίζονται με όγκους (TAMs) προσλαμβάνουν έναν προ-ογκικό φαινότυπο M2, εκκρίνοντας παράγοντες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη, την αναδιαμόρφωση της εξωκυτταρικής ουσίας, την αγγειογένεση και την ανοσοκαταστολή(106). Πολλαπλοί παράγοντες που προέρχονται από όγκους οδηγούν την πρόσληψη αυτών των μακροφάγων συμπεριλαμβανομένης VEGFA, CCL5, CCL9, CCL18, CCL2, και CSF1(106)(7)(107). Ο ρόλος των TAMs που προάγουν τον όγκο απεικονίζεται από το εύρημα ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις τους στο ENY σε όγκους, σχετίζονται με κακή πρόγνωση σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού(107). Τα TAMs είναι κύτταρα με φτωχή αντιγονοπαρασυσταστική ικανότητα και εκφράζουν HLA-G και HLA-E, ανασταλτικά μόρια MHC-I που αναστέλλουν τη λύση των κυττάρων NK και των T-κυττάρων(7). Συμβάλλουν επίσης στον ανοσοκατασταλτικό TME μέσω της έκφρασης των συν-ανασταλτικών μορίων PD-L1 και PD-L2, IL-10, TGFβ και χημειοκινών (CCL5, CCL20 και CCL22) που δρουν για τη στρατολόγηση Tregs εντός του TME(7)(108)(109). Επιπρόσθετα, εμπλέκονται σε μεγάλο βαθμό στις διαδικασίες μετάστασης μέσω αναδιαμόρφωσης εξωκυττάριας ουσίας ECM (TGF-β, MMP-2, MMP-9, LL37, SR-A, Καθεψίνες) και αγγειογένεσης (VEGF, PDGF)(106)(7).

Τα δενδριτικά κύτταρα συχνά χωρίζονται σε 2 κύρια υποσύνολα: μυελοειδή δενδριτικά κύτταρα (mDCs, CD11c+) και πλασματοκυτταροειδή δενδριτικά κύτταρα (pDCs, CD11c-). Τα mDCs υπάρχουν σε μη λεμφικούς ιστούς και κανονικά προάγουν μια απόκριση Th1 T-κυττάρων μέσω της έκφρασης της IL-12. Αντίθετα, τα pDCs υπάρχουν σε δευτερογενή λεμφοειδή όργανα και παράγουν κλασικά IFN-α ως απόκριση σε ιογενείς λοιμώξεις. Τα DCs μπορούν περαιτέρω να ταξινομηθούν ως ώριμα ή ανώριμα, με τα ανώριμα DC να παρουσιάζουν μειωμένη έκφραση συνδιεγερτικού μορίου και κυτοκίνης, οδηγώντας σε έναν πιο ανοσοκατασταλτικό φαινότυπο. Τα DC στο TME τείνουν να είναι πιο ανώριμα, καθώς το TME αναστέλλει τη διαφοροποίησή τους, αυτό μειώνει την ικανότητά τους να παρουσιάζουν αντιγόνα όγκου στα T-κύτταρα και να παρέχουν την απαραίτητη συνδιέγερση, ενώ καταστέλλουν ενεργά την αντικαρκινική ανοσοαπόκριση μέσω της έκφρασης της IL-10 και του TGFβ και της επακόλουθης προώθησης των Tregs (110) (111). Επιπλέον, τα pDC τα οποία επιστρατεύονται σε όγκους εκφράζουν έναν πιο ανεκτικό φαινότυπο, παράγοντας IDO και ICOSL, ευνοώντας την ενεργοποίηση των Treg και παράγουν κυρίως IFN-α, ενώ είναι φτωχοί παραγωγοί IFN τύπου I στο TME, λόγω της επίδρασης του TGF-β και του TNF-α που εκφράζονται από τα καρκινικά κύτταρα(17). Επίσης καταστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων στο TME μέσω της παραγωγής της γρανζύμης B(17)(112). Συγκεκριμένα, τα pDC είναι σε θέση να προάγουν αντικαρκινικές ανοσοαποκρίσεις εάν διεγείρονται κατάλληλα μέσω της ανοσοθεραπείας, αντιμετωπίζοντας με αυτό τον τρόπο την ανασταλτική φύση του TME, η οποία προκαλεί έναν προ-ογκικό φαινότυπο pDC(17).

Τέλος ο κύριος τύπος κυττάρων που εμπλέκεται στη δημιουργία του ανοσοκατασταλτικού TME είναι το ρυθμιστικό T κύτταρο(T regulatory cell). Τα Tregs υπό φυσιολογικές συνθήκες αποσκοπούν στην ομοιόσταση του ανοσοποιητικού και την επαγωγή ανοχής στα αυτοαντιγόνα, αυτά τα κύτταρα είναι ισχυροί ρυθμιστές του ανοσοποιητικού συστήματος εντός του TME. Επιτυγχάνουν αυτή την ανοσοκαταστολή μέσω ποικίλων

μηχανισμών. Απελευθερώνουν άφθονες ποσότητες ρυθμιστικών κυτοκινών (IL-10, IL-35 και TGFβ) ενώ εκφράζουν πολυάριθμους συν-ανασταλτικούς υποδοχείς (CTLA-4, PD-1, LAG-3, TIM-3, ICOS, TGIT) και καταναλώνουν IL-2 στο TME(112). Αυτό αποτρέπει την ενεργοποίηση των T-κυττάρων Th1 και καταστέλλει την αντικαρκινική ανοσοαπόκριση. Επιπλέον, αυτά τα κύτταρα μπορούν να είναι άμεσα κυτταροτοξικά στα κύτταρα του ανοσοποιητικού μέσω της παραγωγής περφορίνης και γρανζύμης(113).

#### ΕΝΔΟΑΓΓΕΙΑΚΟ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ Η ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΟΥ «ΣΠΟΡΟΥ» ΣΤΟ «ΕΔΑΦΟΣ»

Μόλις τα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα απελευθερωθούν από τον πρωτοπαθή όγκο και εισέλθουν στην κυκλοφορία, αντιμετωπίζουν μια νέα σειρά προκλήσεων στην κυκλοφορία. Η μηχανική καταπόνηση απειλεί συνεχώς τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (CTCs) με τη μορφή καθαρών δυνάμεων λόγω της ροής του αίματος και συμπίεσης κατά την είσοδο σε μικρά τριχοειδή(114). Οι όγκοι το καταπολεμούν αυτό μέσω του σχηματισμού μικροσυσσωμάτων κυττάρων-αιμοπεταλίων και κυττάρων-κυττάρων, καθιστώντας τα ανθεκτικά στη μηχανική καταπόνηση(114). Επιπλέον, μέσω της αναστολής των αποπτωτικών μονοπατιών σηματοδότησης αυτά τα κύτταρα όχι μόνο αντιστέκονται στην απόπτωση που προκαλείται από μηχανικό στρες, αλλά στην απόπτωση ως αποτέλεσμα της απώλειας σηματοδότησης της ιντεγκρίνης(114). Η υπερέκφραση της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης rapnexin-1 αναστέλλει την απόπτωση που προκαλείται από μηχανικό στρες(115), και η ενεργοποίηση οδών υπέρ της επιβίωσης όπως το PI3K/Akt εξουδετερώνει τις αποπτωτικές επιδράσεις της απώλειας σήματος ιντεγκρίνης(116).

Εκτός από την αντίσταση στην απόπτωση που προκαλείται από μια δραστική αλλαγή στο περιβάλλον, τα CTC πρέπει να αποφεύγουν την αναγνώριση των κυττάρων του ανοσοποιητικού. Αυτό είναι πιο δύσκολο από ό,τι στο ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον του πρωτοπαθούς όγκου των κυττάρων, καθώς η κυκλοφορία περιέχει πολυάριθμα περιφερειακά ανοσοκύτταρα προετοιμασμένα για επιτήρηση. Εδώ τα αιμοπετάλια παίζουν επίσης ρόλο, θωρακίζοντας τα CTC από την ανοσολογική αναγνώριση(114). Ο ρόλος των αιμοπεταλίων υπερβαίνει τη φυσική θωράκιση των καρκινικών κυττάρων, ωστόσο, αναστέλλουν επίσης άμεσα τα κύτταρα NK μέσω της έκφρασης του TGF-β, μειώνοντας τη ρύθμιση του NKG2D στα κύτταρα NK(117). Τα ίδια τα CTC μπορούν να αποφύγουν την αναγνώριση από τα κύτταρα NK μέσω της διάσπασης του MICA και του MICB στην επιφάνειά τους, οι συνδέτες NKG2D που χρησιμοποιούνται από τα κύτταρα NK για να αναγνωρίσουν και να σκοτώσουν κύτταρα όγκου(118). Τέλος, τα αιμοπετάλια μπορούν να μεταφέρουν φυσιολογικά μόρια MHC κατηγορίας I στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων, προστατεύοντάς τα από κυτταροτοξικά T-κύτταρα(119). Εκτός από τα αιμοπετάλια, τα μακροφάγα παίζουν ουσιαστικό ρόλο στην προστασία των CTC. Τα αιμοπετάλια και το ινώδες γύρω από τα CTC προσλαμβάνουν μακροφάγα, τα οποία είναι απαραίτητο συστατικό για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων στην κυκλοφορία(120). Ένας προτεινόμενος μηχανισμός μέσω του οποίου τα μακροφάγα ενισχύουν την επιβίωση του CTC είναι μέσω της έκφρασης της α4-ιντεγκρίνης, που αλληλεπιδρά με το VCAM-1 στην επιφάνεια του CTC και παρέχει ένα σήμα επιβίωσης(121). Η αλληλεπίδραση μακροφάγου-CTC δεν είναι μόνο

σημαντική για την ενδοαγγειακή επιβίωση των CTC, αλλά εμπλέκεται σε ολόκληρο τον μεταστατικό καταρράκτη. Τα CTC επάγουν έναν φαινότυπο μακροφάγου που προάγει την ενδοαγγείωση των καρκινικών κυττάρων από τον πρωτοπαθή όγκο(122). Επιπλέον, τα μακροφάγα διευκολύνουν την εξαγγείωση και τον αποικισμό των CTC σε απομακρυσμένες περιοχές(120)(123).

#### «ΕΔΑΦΟΣ» ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΗΣ ΕΣΤΙΑΣ

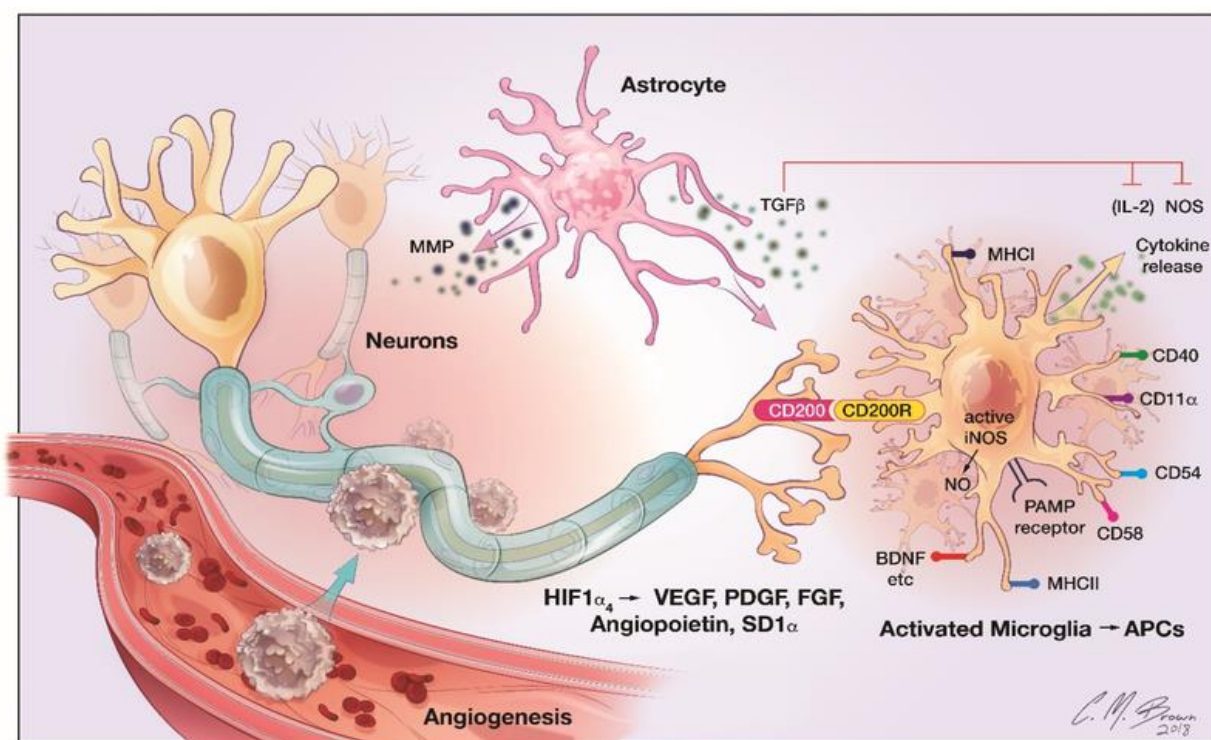
Από τη στιγμή που ένα καρκινικό κύτταρο αποδεσμευτεί από τον πρωτοπαθή όγκο, εισβάλλει στο περιβάλλον στρώμα, διασχίζει τον ενδοθηλιακό φραγμό στη συστηματική κυκλοφορία και κατευθύνεται προς τα αγγεία του εγκεφάλου, σταματά στη μικροαγγείωση στα σημεία αγγειακής διακλάδωσης. Οι φυσικοί περιορισμοί των καρκινικών κυττάρων εντός μικρών αγγείων διευκολύνουν το σχηματισμό σημείων προσκόλλησης μεταξύ του ενδοθηλίου και του κυττάρου(124). Αυτά τα σημεία σύνδεσης σχηματίζονται χρησιμοποιώντας αλληλεπιδράσεις μεταξύ σελεκτινών, ιντεγκρινών, καντερινών, CD44 και ICAMs/VCAM(124)(125). Το ποιοι ακριβώς υποδοχείς και δεσμοί χρησιμοποιούνται είναι πολύ περίπλοκο και εξαρτάται από το αγγειακό υπόστρωμα, τον τύπο του καρκινικού κυττάρου και τις αλληλεπιδράσεις με πολλούς τύπους κυττάρων εντός του μικροπεριβάλλοντος (124).

Μόλις συνδεθεί, το μεταστατικό κύτταρο πρέπει να μεταναστεύσει μέσω της ένωσης ενδοθηλιακών κυττάρων. Η διάσπαση αυτών των συνδέσεων περιλαμβάνει την καταστροφή των μορίων προσκόλλησης συνδέσμων, από πρωτεολυτικά ένζυμα όπως η σεπράση και η καθεψίνη (127)(128). Μετά τη διάσπαση του ενδοθηλιακού φραγμού, τα μεταστατικά κύτταρα συναντούν τη βασική μεμβράνη. Η διάσπαση αυτού του φραγμού είναι παρόμοια με τους μηχανισμούς που χρησιμοποιεί το κύτταρο για να σπάσει από τον πρωτοπαθή όγκο(124). Μετά την εισβολή του BBB πιστεύεται ότι αντί να μετακινηθούν στο παρέγχυμα του εγκεφάλου, αυτά τα κύτταρα αναπτύσσονται κατά μήκος του μικροαγγειακού συστήματος, μια τάση που είναι γνωστή ως «αγγειακή συσσώρευση»(128). Αυτό είναι κρίσιμο για την ίδρυση μικροαποικιών. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιντεγκρινών στα μεταστατικά κύτταρα και στη βασική μεμβράνη των αγγείων παρέχουν τα σημάδια ανάπτυξης και επιβίωσης που απαιτούνται για την ανάπτυξη των νέων μεταστατικών όγκων(128).

#### Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΩΝ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΩΝ

Έχει αμφισβητηθεί εάν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος στον εγκέφαλο συμβάλλουν ή καταπολεμούν τη δημιουργία ΒΜ. Από τη μια πλευρά, περίπου το 99% των μεταστατικών κυττάρων που εισέρχονται στον εγκέφαλο αποτυγχάνουν να αναπτυχθούν και να σχηματίσουν μακρομεταστάσεις, γεγονός που δείχνει ότι υπάρχουν ανταγωνιστικές διεργασίες που αναστέλλουν την εγκατάστασή τους(129). Από την άλλη πλευρά, οι μελέτες έχουν δείξει ότι τα ανοσοκύτταρα του εγκεφάλου μπορούν να συμβάλουν στη δημιουργία ευνοϊκού μικροπεριβάλλοντος, που επιτρέπει τον αποικισμό των νέων ΒΜs (130–135)(**Εικόνα 7**). Τόσο η μικρογλοία, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος του εγκεφάλου όσο και

τα μυελωειδή μονοκύτταρα/μακροφάγα στους περιαγγειακούς χώρους, είναι τόσο διευκολυντές όσο και ανταγωνιστές στο σχηματισμό ΒΜ. Μελέτες έχουν δείξει την ικανότητά τους να καταπολεμούν και να εξουδετερώνουν καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιώντας ΝΟ και από την άλλη πλευρά έχουν δείξει ότι ρυθμιστικοί παράγοντες όπως η νευροτροφίνη ΝΤ-3, ένας ρυθμιστής της ενεργοποίησης των μικρογλοιακών κυττάρων, σχετίζεται με αυξημένο σχηματισμό ΒΜ(136,137). Συνεπώς, τα μικρογλοιακά κύτταρα προστατεύουν τον εγκέφαλο από τον μεταστατικό αποικισμό των νεοπλασματικών κυττάρων, ωστόσο, παρά αυτούς τους αντικαρκινικούς μηχανισμούς, η μικρογλοία έχει αποδειχθεί ότι είναι κινητήριος δύναμη στον σχηματισμό των ΒΜ. Τα μεταστατικά κύτταρα χρησιμοποιούν τις κυτταροπλασματικές διεργασίες της μικρογλοίας για να καθοδηγήσουν την εισβολή τους στον εγκέφαλο(138). Η απεικόνιση έχει αποκαλύψει την παρουσία ενός πυκνού τοιχώματος μικρογλοιακών κυττάρων στη επιφάνεια μεταξύ ΒΜ και του εγκεφαλικού παρεγχύματος(130). Επιπλέον, τα μεταστατικά κύτταρα μπορεί να ρυθμίζουν τη λειτουργία της μικρογλοίας. Τα ενεργοποιημένα μικρογλοιακά κύτταρα παράγουν κανονικά iNOS και TNF-α, επιτρέποντάς τους να λύσουν τα κύτταρα-στόχους(132), αλλά παρουσία ΒΜs η μικρογλοία δείχνει μειωμένη έκφραση αυτών των παραγόντων, υποδηλώνοντας την υιοθέτηση ενός φαινοτύπου πολωμένου μακροφάγου Μ2 που διευκολύνει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και καταστέλλει κυτταροτοξικές λειτουργίες(132).



Εικόνα 7. Το μικροπεριβάλλον του Κ.Ν.Σ των εγκεφαλικών μεταστάσεων.

Κατά την εισβολή στο εγκεφαλικό παρέγχυμα των κυττάρων του όγκου αλληλεπιδρούν κυρίως με τη μικρογλοία και τα αστροκύτταρα για να δημιουργήσουν μια νέα μεταστατική εστία.

Τα αστροκύτταρα παίζουν παρόμοιο ρόλο στη διευκόλυνση του αποικισμού ΒΜ. Οι Xing et al έδειξαν ότι οι εγκεφαλικές μεταστάσεις εκφράζουν υψηλά επίπεδα IL-1β υπό την επίδραση των γύρω αστροκυττάρων, γεγονός που οδηγεί σε αυξημένη σηματοδότηση Notch στα καρκινικά κύτταρα, προάγοντας τη στελέχωσή τους και την ανάπτυξή τους στη μεταστατική εστία(136). Τα στοιχεία έχουν επίσης δείξει τον σχηματισμό κενών συνδέσεων μεταξύ αστροκυττάρων και κυττάρων όγκου που επιτρέπει τη διέλευση του cGAMP, το οποίο ενεργοποιεί την οδό STING στα αστροκύτταρα και προάγει την έκφραση της IFNα και του TNFα για να διευκολύνει περαιτέρω την ανάπτυξη του όγκου(131). Η παραγωγή παραγόντων αποικοδόμησης του ECM όπως η ηπαράνωση και οι μεταλλοπρωτεϊνάσες θεμέλιας ουσίας (MMPs) από τα αστροκύτταρα συμβάλλει επίσης στην διήθηση των ΒΜs προάγοντας τη μετανάστευση αυτών των κυττάρων(133). Συνολικά, αυτά τα κύτταρα που κανονικά προστατεύουν τον εγκέφαλο από ξένους εισβολείς καταλήγουν να διευκολύνουν την είσοδο και τον αποικισμό του εγκεφάλου από μεταστατικά κύτταρα.

Ο πρωτοπαθής όγκος είναι επίσης ικανός να επηρεάσει την ανοσολογική σύνθεση του προμεταστατικού εδάφους, διευκολύνοντας την είσοδο και την επιβίωση των μεταστατικών καρκινικών κυττάρων. Οι Liu et al. έδειξαν σε ένα μοντέλο ποντικού μετάστασης εγκεφάλου καρκίνου του μαστού ότι ένας πρωτοπαθής όγκος του μαστού μπορεί να προκαλέσει την παρουσία CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup> μυελοειδών κυττάρων στον εγκέφαλο, τα οποία με τη σειρά τους εκφράζουν τις φλεγμονώδεις χημειοκίνες S100A8 και S100A9 που είναι σε θέση να προσελκύουν καρκινικά κύτταρα στον εγκέφαλο(139). Όχι μόνο αυτά τα μυελοειδή κύτταρα που προκαλούνται από τον πρωτοπαθή όγκο έχουν την ικανότητα να προσελκύουν καρκινικά κύτταρα στον εγκέφαλο, αλλά μπορούν επίσης να συμβάλλουν στην επιβίωσή τους. Οι αναφορές έχουν δείξει υψηλή έκφραση του CCL9 στο ίδιο CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup>μυελοειδή κύτταρα στους προμεταστατικούς πνεύμονες ποντικών με καρκίνο του μαστού και μελάνωμα. Αυτή η έκφραση CCL9 συνέβαλε στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και στη μετάσταση με τρόπο που εξαρτάται από τον TGF-β(140). Εκτός από τα μυελοειδή κύτταρα, τα μαστοκύτταρα έχει επίσης αποδειχθεί ότι συμβάλλουν στην εγκατάσταση και την επιβίωση των ΒΜ, μέσω της έκφρασης των IL-8, IL-10, VEGF και MMP2(141).

### 3.4 Μηχανισμοί μετάστασης από συγκεκριμένους πρωτοπαθείς όγκους

Τα στάδια του μεταστατικού καταρράκτη είναι πολλά και κοινά για όλους τους τύπους καρκίνου, εντούτοις υπάρχουν μοναδικές ιδιότητες ορισμένων τύπων καρκίνων που τους καθιστούν πιο επιρρεπείς στο σχηματισμό εγκεφαλικής μετάστασης σε σύγκριση με άλλους.

#### ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ

Από τους τρεις υποτύπους καρκίνου του μαστού, οι HER2-θετικοί και τριπλά αρνητικοί υπότυποι (υποδοχέας ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 και υποδοχέας οιστρογόνου/υποδοχέας προγεστερόνης αρνητικοί) είναι οι πιο επιθετικοί και πιθανόν να δώσουν μετάσταση στον εγκέφαλο. Η ύπαρξη τριπλά αρνητικού καρκίνου προμηνύει τη χειρότερη επιβίωση, εν μέρει λόγω της αυξημένης τάσης για μετάσταση εγκεφάλου σε αυτούς τους ασθενείς(142,143). Σχεδόν οι μισοί από τους ασθενείς με προχωρημένο τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού αναπτύσσουν εγκεφαλικές μεταστάσεις. Με βάση τις προκλινικές μελέτες αυτό το φαινόμενο έχει αποδοθεί σε συγκεκριμένες διαταραχές του BBB(blood brain barrier) προκαλούμενες από τον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού, με αποτέλεσμα τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων στο εγκεφαλικό παρέγχυμα(144,145). Έχει υποστηριχθεί ότι κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μετάστασης, τα καρκινικά κύτταρα του μαστού (BCC) υφίστανται μετάβαση από επιθηλιακό σε μεσεγχυματικό στοιχείο για να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος και στη συνέχεια αντιστρέφουν τη διαδικασία με μια μετάβαση από μεσεγχυματικό σε επιθηλιακό στοιχείο, αφού φτάσουν στον εγκεφαλικό ιστό για να σχηματίσουν μεταστάσεις(146). Η διαφυγή της άμυνας του ανοσοποιητικού συστήματος κατά τη διάρκεια της κυκλοφορίας του αίματος πρέπει επίσης να συμβεί προκειμένου τα BCC να φτάσουν στα αγγεία του εγκεφάλου. Οι Racila et al απέδειξαν ότι οι παραλλαγές πολυμορφισμού ενός νουκλεοτιδίου στο C1qA, μια υπομονάδα του συμπλέγματος C1, που αναγνωρίζει ανοσοσυμπλέγματα και ξεκινά την κλασική οδό ενεργοποίησης του συμπληρώματος, συσχετίστηκαν με αυξημένη μετάσταση στον εγκέφαλο, τα οστά και το ήπαρ σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Αν και αυτός ο πολυμορφισμός έχει συγκρίσιμη συχνότητα στον φυσιολογικό πληθυσμό χωρίς καρκίνο του μαστού, οι ασθενείς που είχαν καρκίνο του μαστού με απομακρυσμένες μεταστάσεις ήταν πιο πιθανό να έχουν το SNP από εκείνους με μη μεταστατικό καρκίνο του μαστού, υποδεικνύοντας ότι η ικανότητα αποφυγής οψωνοποίησης μέσω αναστολής της ενεργοποίησης του συμπληρώματος έχει ρόλο στην εξάπλωση σε απομακρυσμένες τοποθεσίες(147).

Μόλις εισέλθουν στο αγγειακό σύστημα, τα BCC ρυθμίζουν προς τα πάνω την έκφραση της επιφανειακής καθεψίνης 5 που διευκολύνει τη διέλευση του BBB μέσω της λύσης του JAM-B, ένα βασικό συστατικό των στενών συνδέσεων. Αυτό το φαινόμενο έχει επίσης παρατηρηθεί σε πρωτοπαθείς όγκους του μαστού που έχουν εξαπλωθεί στον εγκέφαλο(127). Μια άλλη πρωτεΐνη που ρυθμίζεται προς τα πάνω στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού καθώς και στο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα και συνδέεται με κακή πρόγνωση είναι η μεσοθηλίνη. Παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της ανιχνεύσιμης IFN-γάμμα σε απόκριση στη μεσοθηλίνη και της αυξημένης επιβίωσης σε αναλύσεις ολικού αίματος

ασθενών με επιθηλιακούς καρκίνους (πνεύμονα, μαστού, ωοθηκών, μελάνωμα), υποδηλώνοντας ότι η μεσοθηλίνη είναι ένα σημαντικό αντιγόνο που σχετίζεται με τον όγκο στις εγκεφαλικές μεταστάσεις(148).

Τα BCC μπορούν να χειριστούν τη μικρογλοιακή ενεργοποίηση μέσω έκφρασης νευρωνικών πρωτεϊνών. Όταν εκφράζεται στην επιφάνεια των BCC, το NT-3 προάγει τον σχηματισμό μακροσκοπικών βλαβών στον εγκέφαλο. Φαίνεται να παίζει βασικό ρόλο στη μετάβαση σε έναν επιθηλιακό φαινότυπο, επιτρέποντας στα BCC να επιβιώσουν στο παρέγχυμα του εγκεφάλου αφού εισβάλουν στην κοιλιακή βασική μεμβράνη. Επιπλέον, το NT-3 ενθαρρύνει τον πολλαπλασιασμό των BCC στον εγκέφαλο, όπως φαίνεται σε μοντέλα ποντικών στα οποία τους έχει χορηγηθεί ένεση με κυτταρικές σειρές ανθρώπινων όγκων(137). Η ανοσορύθμιση από το NT 3 λαμβάνει χώρα μέσω αναστολής της ενεργοποίησης μικρογλοίας. Τα χαμηλά επίπεδα μικρογλοιακής ενεργοποίησης προάγουν την ανάπτυξη μεταστατικών όγκων ενώ τα υψηλά επίπεδα ενεργοποίησης έχουν ως αποτέλεσμα κυτταροτοξικότητα(137). Η σηματοδότηση CXCR4, η οποία επίσης ενεργοποιεί τη μικρογλοία, έχει βρεθεί ότι διευκολύνει την εισβολή των BCC(149). Η διαφορική ενεργοποίηση των μικρογλοίων μπορεί να προκαλέσει διαφορετικές αποκρίσεις βοηθητικών T κυττάρων. Έρευνες των ανοσοαποκρίσεων που προκαλούνται από Th2 στον καρκίνο του μαστού έχουν αποκαλύψει το ρόλο του στο να επιτρέπει την ανάπτυξη BM. Η θυμική στρωματική λεμφοποιητίνη (TSLP) είναι μια κυτοκίνη που προάγει κυρίως μια προκαλούμενη από Th2 ανοσοαπόκριση(150).

### ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΣ

Οι εγκεφαλικές μεταστάσεις από τον καρκίνο του πνεύμονα χαρακτηρίζονται από πυκνές συσσωρεύσεις ενεργοποιημένης μικρογλοίας που οριοθετούν το όριο μεταξύ του όγκου και του παρακείμενου εγκεφαλικού ιστού. Μελέτες *in vitro*, δείχνουν ότι υπάρχουν δύο αντικρουόμενες λειτουργίες μικρογλοίας – είτε προστατευτικές ή κυτταροτοξικές. Όταν διαφορετικές συγκεντρώσεις μικρογλοίας που ενεργοποιείται από LPS (λιποπολυσακχαρίτης) εφαρμόστηκαν σε μεταστατικά καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα, τα καρκινικά κύτταρα συμπεριφέρθηκαν διαφορετικά. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις, τα καρκινικά κύτταρα είχαν αυξημένη βιωσιμότητα, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, η βιωσιμότητα μειώθηκε (132). Σε αυτό το μοντέλο έχει παρατηρηθεί τόσο η ενεργοποίηση όσο και η απενεργοποίηση της μικρογλοίας. Η αύξηση σε αριθμό καθώς και ο μετασχηματισμός της σε σχήμα αμοιβαδοειδές/ενεργοποιημένο υποδηλώνουν ενεργοποίηση ενώ η έλλειψη έκφρασης επαγωγίσιμης συνθετάσης μονοξειδίου του αζώτου (iNOS) ή TNF-άλφα (παράγοντας νέκρωσης όγκου άλφα) υποδηλώνει αδρανοποίηση της στο μικροπεριβάλλον του όγκου(132). Άλλες μελέτες επιβεβαιώνουν την παρουσία αυξημένων ποσοτήτων συσσωρευμένης μικρογλοίας πέριξ του όγκου σε εγκεφαλικές μεταστάσεις με ΜΜΚΠ σε σύγκριση με εγκεφαλικές μεταστάσεις μελανώματος, ωστόσο υπάρχει σχετικά μικρή έκφραση του iNOS και άλλων ενζύμων που εμπλέκονται στην παραγωγή ελεύθερων ριζών, με αποτέλεσμα πολλά από αυτά τα μικρογλοιακά κύτταρα να είναι είτε ανενεργά είτε να ενισχύουν τον όγκο(151). Οι εγκεφαλικές μεταστάσεις χαρακτηρίζονται συνήθως από μικρού βαθμού διήθησης T-

κυττάρων και Β-κυττάρων και η ανοσολογική απόκριση συνεπώς είναι περιορισμένη(151). Ωστόσο τα τελευταία χρόνια μελέτες αποδεικνύουν ότι η ανοσολογική απόκριση στο εγκεφαλικό παρέγχυμα υφίσταται και η ενίσχυσή της με θεραπεία με ICI οδηγεί σε σημαντικές και μακροχρόνιες ανταποκρίσεις. Οι McGranahan et al διαπίστωσαν ότι τα μεταστατικά πλακώδη καρκινώματα του πνεύμονα είχαν μειωμένη έκφραση πολλών γονιδίων HLA τάξης I καθώς και μειωμένη έκφραση των συστατικών του μορίου MHC κατηγορίας I, με συνέπεια τα μεταστατικά κύτταρα να διαφεύγουν της ανοσοεπιτήρησης μειώνοντας τις πιθανότητες επιτυχούς ανοσολογικής απάντησης από τα ενεργοποιημένα T cells(152). Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι οι BMs από όγκους μη μικροκυτταρικού καρκίνου πνεύμονος, παρά το γεγονός ότι έχουν υψηλότερο μεταλλαξιογόνο φορτίο, χαρακτηρίζονται από λιγότερους κλώνους T-κυττάρων από τους αντίστοιχους πρωτοπαθείς όγκους και η πλειονότητα των κλώνων T-κυττάρων που βρέθηκαν στις BMs διέφεραν από αυτούς του πρωτοπαθείς όγκους(153). Αυτό υποδηλώνει όχι μόνο την αλλαγή στην ανοσογονικότητα των καρκινικών κυττάρων κατά την εξελιγή τους σε μεταστατικά, αλλά υπογραμμίζει επίσης την ικανότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού να αναστέλλει τις ανοσολογικές αποκρίσεις στο ΚΝΣ. Τα μαστοκύτταρα (MCs) έχουν επίσης βρεθεί σε ανθρώπινες BMs (μέσω χρώσης με τρυπτάση) με προέλευση από πνεύμονες, νεφρούς και μαστούς. Τα MCs υποστηρίζουν τη διάδοση των εγκεφαλικών μεταστάσεων μέσω έκκρισης ανοσοκατασταλτικών κυτοκινών IL-8, IL-10, καθώς και VEGF και MMP2 που ρυθμίζουν το μικροπεριβάλλον και συμβάλλουν στο μεταστατικό δυναμικό σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα(154).

### ΜΕΛΑΝΩΜΑ

Οι ασθενείς με τοπικά προχωρημένο μελάνωμα, συμπεριλαμβανομένης της προσβολής των περιφερειακών λεμφαδένων και εκείνοι με άγνωστη πρωτοπαθή εστία μελανώματος, διατρέχουν σημαντικά αυξημένο κίνδυνο προσβολής του ΚΝΣ. Μέχρι και το 15% αυτών των ασθενών θα έχουν BM(155). Ο υποδοχέας CCR4 (υποδοχέας χημειοκίνης 4) εκφράζεται σε κύτταρα μελανώματος και έχει αυξημένη έκφραση στα μεταστατικά μελανώματα σε σύγκριση με το πρωτοπαθές μελάνωμα. Επιπλέον, οι συνδέτες για τον CCR4 (CCL17 και CCL22) εκφράζονται από αστροκύτταρα, μικρογλοία και ενδοθηλιακά κύτταρα του εγκεφάλου υπό συνθήκες στρες και όταν εκτίθενται σε μεταστατικά κύτταρα που προέρχονται από μελάνωμα. Στο μοντέλο ποντικού τους, οι Klein et al ανακάλυψαν επίσης ότι ο συνδέτης CCL17 ρυθμίστηκε σημαντικά προς τα πάνω 10 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό των κυττάρων του μελανώματος, αλλά πριν ανιχνευθούν τυχόν ενδοκρανιακές μικρομεταστάσεις, υποδεικνύοντας ότι το δερματικό μελάνωμα έχει έναν πρόωρο μηχανισμό που προκαλεί ανοδική ρύθμιση του CCL17, ο οποίος δρα ως χημειοελκτικό στο μελάνωμα που εκφράζει τον υποδοχέα CCR4+(156). Ο υποδοχέας CCR4 εκφράζεται επίσης από κύτταρα Th2 και Tregs (157) και δρα ως χημειοελκτικό για τους πληθυσμούς T-κυττάρων. Αυτό επάγει την ανοχή μέσω της αστροκυτταρικής, μικρογλοιακής και ενδοθηλιακής έκφρασης του εγκεφάλου του CCL17 και θα μπορούσε να είναι ένας άλλος μηχανισμός μέσω του οποίου το μεταστατικό μελάνωμα αποφεύγει το ανοσοποιητικό σύστημα. Ένας άλλος πιθανός



μηχανισμός μετάστασης μελανώματος βρέθηκε από τους Kaur et al. Είδαν ότι οι γηρασμένοι ινοβλάστες εκκρίνουν αυξημένες ποσότητες sFRP2, ενός ανταγωνιστή Wnt, που τελικά οδήγησε σε μια εξασθενημένη απόκριση στη βλάβη του DNA στα κύτταρα του μελανώματος, καθιστώντας τα πιο ανθεκτικά στο vemurafenib και οδήγησε τη μετάστασή τους(158).

Το Axitinib, ένας αναστολέας των VEGFR-1, 2, & 3, ο οποίος προκαλεί ανταπόκριση σε περίπου 20% των ασθενών που έλαβαν θεραπεία, βρέθηκε ότι αυξάνει τον αριθμό των διεισδυτικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (CD45+) σε ένα μοντέλο ποντικού με ενδοκρανιακό μελάνωμα. Συγκεκριμένα, ο υποπληθυσμός των κατασταλτικών κυττάρων που προέρχονται από μονοκυτταρικά μυελοειδή (moMDSCs – CD11b+Ly6ChighLy6G-) αυξήθηκε στους ενδοκρανιακούς όγκους. Αυτά τα κύτταρα βρέθηκαν να έχουν μειωμένη ικανότητα ανοσοκαταστολής τόσο στους ενδοκρανιακούς όσο και στους εξωκρανιακούς όγκους (159). Μια άλλη μελέτη διαπίστωσε ότι από τη στιγμή που το μεταστατικό μελάνωμα φτάσει στο ΚΝΣ γίνεται σημαντικά πιο ανεκτικό από ισοδύναμους όγκους στην περιφέρεια, μια επίδραση που προκαλείται από την αύξηση του κυκλοφορούντος TGF-β(160)

#### ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Η μετάσταση στον εγκέφαλο είναι μια σπάνια επιπλοκή του κολοορθικού καρκίνου και επομένως η έρευνα για τη θεραπεία και τους μηχανισμούς που διέπουν την εγκεφαλική μετάσταση είναι μικρή. Οι περισσότεροι ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του παχέος εντέρου αναπτύσσουν εγκεφαλικές μεταστάσεις στο τελικό στάδιο της νόσου και σχετίζεται με κακή συνολική πρόγνωση(161). Ο υποδοχέας χημειοκίνης C-X-C τύπου 4 (CXCR4) και το ένζυμο ινδολεαμίνη 2, 3-διοξυγενάση του πλακούντα (IDO) βρέθηκαν να ρυθμίζονται προς τα πάνω σε ορισμένες εγκεφαλικές μεταστάσεις του ορθοκολικού καρκινώματος (CRC). Το CXCR4 μαζί με τον συνδέτη του CXCL12 εμπλέκεται στη διακίνηση λεμφοκυττάρων μέσω χημειοταξίας και η ανοδική ρύθμισή του στο CRC έχει συσχετιστεί με χειρότερη επιβίωση. Το IDO είναι σημαντικό για την καταστολή της απόκρισης των μητρικών T-κυττάρων κατά του εμβρύου και όταν παρατηρείται στο πρωτοπαθές CRC προμηνύει τον σχηματισμό απομακρυσμένων μεταστάσεων(162). Οι πρόσφατες έρευνες για το BM από το CRC έχουν επικεντρωθεί στην ισχυρή σύνδεση μεταξύ των ογκογονιδίων στην οικογένεια RAS, ενώ λιγότερη έμφαση έχει δοθεί στον ρόλο του ανοσοποιητικού συστήματος σε αυτές(163,164).

### **3.5 Θεραπευτική προσέγγιση εγκεφαλικών μεταστάσεων.**

Οι εγκεφαλικές μεταστάσεις είναι μια συχνή μεταστατική εντόπιση του καρκίνου και ιστορικά προσεγγιζόταν ως ξεχωριστή νοσολογική οντότητα. Η θεραπευτική αντιμετώπιση των BMs αποτελεί ένα μείζον ογκολογικό πρόβλημα στην καθημέρα πράξη, λόγω της συνεχούς αυξανόμενης επίπτωσης τους, αποτέλεσμα του μεγαλύτερου προσδόκιμου που επιτυγχάνεται από τις νεότερες και πιο αποτελεσματικές θεραπείες, τον εκσυγχρόνισμό των απεικονιστικών μεθόδων, του γηράσκοντος πληθυσμού και της εγρήγορσης των θεραπόντων ιατρών. Ο στόχος της θεραπείας σε ασθενείς με BMs είναι η καθυστέρηση της νευρολογικής επιδείνωσης και η παράταση της συνολικής επιβίωσης, διατηρώντας μια καλή ποιότητα ζωής. Μια μειοψηφία ασθενών, κυρίως ασθενείς με ολιγομεταστατική νόσο στον εγκέφαλο καταφέρνουν μακρά επιβίωση ή ακόμη και ίαση.

Στη σύγχρονη ογκολογία, η κατανόηση των βιολογικών και μοριακών θεμελίων των BMs έχει βελτιωθεί σημαντικά, οδηγώντας σε εξελιγμένα προγνωστικά μοντέλα και σε εξατομικευμένα θεραπευτικά πρωτόκολλα, για τον ασθενή και τη νόσο, όπως συστήνονται από τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες της ογκολογικής κοινότητας. Η θεραπευτική φάρετρα, εκτός από την ολοκράνια ακτινοθεραπεία(WBRT) και τη χειρουργική εξαίρεση, περιλαμβάνει τη στερεοτακτική ακτινοχειρουργική(SRS), στοχεύουσες φαρμακευτικές θεραπείες και την ανοσοθεραπεία(ICI), που συχνά εφαρμόζονται διαδοχικά ή σε συνδυασμό. Η πρόοδος της νευροαπεικόνισης παρέχει περαιτέρω ακρίβεια στην εντόπιση της εγκεφαλικής νόσου σε αρχικά στάδια, παρέχει πληροφορίες για την ανταπόκριση στην εκάστοτε θεραπεία και διαφοροποιεί τις παρενέργειες από την πρόοδο νόσου. Η απόφαση της θεραπευτικής αντιμετώπισης ασθενών με BMs θα πρέπει να είναι αποτέλεσμα ογκολογικού συμβουλίου από διεπιστημονική ομάδα, έτσι ώστε να εξετάζεται η εφαρμογή όλων των θεραπευτικών μεθόδων εξασφαλίζοντας εξατομικευμένη προσέγγιση με σκοπό το μεγαλύτερο όφελος στο προσδόκιμο του ασθενή.

#### **ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΕΞΑΙΡΕΣΗ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΩΝ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΩΝ.**

##### Διαγνωστική προσπέλαση

Νευροχειρουργική παρέμβαση με διαγνωστικό σκοπό θεωρείται απαραίτητη σε πολλά κλινικά σενάρια, συμπεριλαμβανομένων των ασθενών με εμφάνιση εγκεφαλικών μεταστάσεων χωρίς παρουσία πρωτοπαθούς όγκου, ασθενών με παλαιό ιστορικό ή ιστορικό περισσότερων της μιας κακοήθειας, ασθενών με γνωστή κακοήθεια, η οποία δεν εμφανίζει συχνά BMs ή ασθενών με κακοήθεια όπως αυτή του μαστού στην οποία είναι χρήσιμο το μοριακό προφίλ της μετάστασης, το οποίο θα καθορίσει και την περαιτέρω θεραπευτική αγωγή. Η διαγνωστική αξία της βιοψίας εγκεφαλικής βλάβης στα πλαίσια διαφοροδιάγνωσης μεταξύ προόδου ή υποτροπής της νόσου και αλλαγών της βλάβης σχετιζόμενες με τη θεραπεία παραμένει περιορισμένη, διότι οι αλλαγές σχετιζόμενες με τη θεραπεία όπως η νέκρωση και η ενεργή νόσος μπορεί να συνυπάρχουν και να μην απομονωθεί η τελευταία στο βιοπτικό υλικό.

##### Θεραπευτική προσπέλαση

Η θεραπευτική αξία της νευροχειρουργικής εξαίρεσης λίγων ή έστω μιας εγκεφαλικής μετάστασης σε ασθενείς με ελεγχόμενη την υπόλοιπη συστηματική νόσο παραμένει αδιαμφισβήτητη. Η χειρουργική επέμβαση αποτελεί μια σημαντική επιλογή σε ασθενείς με εγκεφαλικές μεταστάσεις, που μπορεί να προσφέρει άμεση ανακούφιση από τα συμπτώματα τα οποία προκαλεί η επίδραση του όγκου στον φυσιολογικό ιστό και τα οποία είναι ανθεκτικά στη χορήγηση κορτικοστεροειδών. Η επέμβαση βελτιώνει το προσδόκιμο των ασθενών με ολιγομεταστατική νόσο, καλή λειτουργική κατάσταση και περιορισμένο αριθμό εξωκρανιακών μεταστάσεων. Η έκταση της εξαίρεσης των BMs σχετίζεται με τον τοπικό έλεγχο της νόσου(165)(166). *En block* εξαιρέσεις έχουν σαν αποτέλεσμα λιγότερες υποτροπές και χαμηλότερο κίνδυνο για λεπτομηνιγκική διασπορά από τις τμηματικές εξαιρέσεις(167). Η πιθανότητα μιας ευρείας εκτομής BMs μπορεί να επιτευχθεί στις μέρες μας με τη χρήση διεγχειρητικής νευροπλοήγησης και φλουϊκής χαρτογράφησης καθώς και τη χρήση φθορίζουσας καθοδήγησης (fluorescence-guided surgery FGS) και εστιασμένης υπερηχογραφίας, η οποία μεγιστοποιεί την εξαίρεση του όγκου και ελαχιστοποιεί τη μετεγχειρητική νοσηρότητα(168–170). Μια μετεγχειρητική μαγνητική τομογραφία(MRI) εγκεφάλου θα πρέπει να διενεργείται 48 ώρες μετά τη χειρουργική επέμβαση, για τον καθορισμό της έκτασης της εξαίρεσης. Οι τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες που επέδειξαν όφελος από την προσθήκη ολοκράνιας ακτινοθεραπείας (whole brain radiation therapy-WBRT) μετά τη χειρουργική επέμβαση σε ασθενείς με μεμονωμένη BM, σχεδιάστηκαν και πραγματοποιήθηκαν δεκαετίες πριν, σε μια εποχή που οι χειρουργικές και απεικονιστικές μέθοδοι δεν ήταν εξελιγμένες και δεν υπήρχε πληθώρα φαρμακευτικών επιλογών(171,172). Επεξεργάζοντας αυτά τα στατιστικά δεδομένα, στη σύγχρονη νευροχειρουργική προέκυψε το συμπέρασμα ότι παρόμοιο όφελος επιτυγχάνεται με τη νευροχειρουργική εξαίρεση περισσότερων εγκεφαλικών μεταστάσεων εφόσον μια ολική εκτομή είναι εφικτή.

Υπάρχουν συγκεκριμένες ενδείξεις, που η νευροχειρουργική επέμβαση αποτελεί άμεση θεραπευτική παρέμβαση, σε ασθενείς με πολλαπλές BMs. Μία τέτοια ένδειξη αποτελεί η ύπαρξη μεγάλων εγκεφαλικών βλαβών, διαμέτρου > 3 εκ, οι οποίες ασκούν πιεστικά φαινόμενα και προκαλούν αυξημένη ενδοκρανιακή πίεση σε ζωτικής σημασίας περιοχές του εγκεφάλου. Η εντόπιση δευτεροπαθούς εστίας στον οπίσθιο βόθρο του εγκεφάλου αποτελεί ένδειξη, εξαιτίας του υψηλού κινδύνου αποφρακτικού υδροκέφαλου. Επιπλέον οι BMs με περιοχές νέκρωσης ή κυστικές BMs αποτελούν μία ακόμη ένδειξη, διότι φαίνεται να απαντούν λιγότερο καλά στην στερεοτακτική ακτινοχειρουργική σε σύγκριση με τις συμπαγείς BMs.

Η χειρουργική εκτομή, περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη παρέμβαση, επιτρέπει την ταχεία μείωση των στεροειδών και βελτιώνει το θεραπευτικό αποτέλεσμα στην επακόλουθη φαρμακευτική αγωγή, ιδιαίτερα της ανοσοθεραπείας. Σε ασθενείς με υποτροπιάζουσες BMs, η νευροχειρουργική αντιμετώπιση δεν φαίνεται να έχει ένδειξη, ωστόσο σε ασθενείς για τους οποίους υπάρχουν διαθέσιμες στοχεύουσες αποτελεσματικές θεραπείες, το χειρουργείο μπορεί να αποτελεί ένδειξη.

Η διάμεση θερμική θεραπεία με λέιζερ (LITT) αποτελεί μια καινοτόμα θεραπευτική προσέγγιση, η οποία φαίνεται να είναι επωφελής κυρίως σε ασθενείς με υποτροπιάζοντες όγκους εγκεφάλου καθώς και την μετακτινική νέκρωση με ενθαρρυντικά αποτελέσματα στον τοπικό έλεγχο της νόσου(173), αλλά ο ακριβής καθορισμός του ρόλου της LITT χρήζει περαιτέρω μελέτης(174).

Σε όλες τις ενδείξεις της νευροχειρουργικής αντιμετώπισης των BMs, εκτός από επείγουσες καταστάσεις, θα πρέπει να συνυπολογίζεται ο κίνδυνος και το όφελος ενός χειρουργείου και η απόφαση να λαμβάνεται μετά από ογκολογικό συμβούλιο, στο οποίο να συμμετέχουν οι αντίστοιχες ειδικότητες (παθολόγοι ογκολόγοι, νευροχειρουργοί, ακτινοθεραπευτές, ακτινολόγοι, παθολογοανατόμοι κ.α), αποσκοπώντας στο μεγαλύτερο όφελος για τον ασθενή.

## **ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΙΑ**

### Στερεοτακτική ακτινοχειρουργική-SRS

Η εφ'ολοκλήρου του εγκεφάλου ακτινοθεραπεία(WBRT) αποτέλεσε για πολλές δεκαετίες την βασική θεραπευτική μέθοδο αντιμετώπισης των ασθενών με BMs, τα τελευταία χρόνια η στερεοτακτική ακτινοθεραπεία φαίνεται να την αντικαθιστά ολοένα και περισσότερο, κυρίως λόγω των νοητικών διαταραχών και του νευρογνωστικού ελλείματος που σχετίζονται με την WBRT, σε σύγκριση με την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της SRS. Η SRS προσφέρει όφελος στο προσδόκιμο επιβίωσης των ασθενών με BMs και αποτελεί ένδειξη σε πολλές κλινικές καταστάσεις, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της διεθνούς κοινότητας ακτινοθεραπευτικής ογκολογίας και στερεοτακτικής ακτινοχειρουργικής. Η SRS αποτελεί μια αναίμακτη, ανώδυνη μέθοδο και με λιγότερες επακόλουθες επιπλοκές σε αντίθεση με την νευροχειρουργική επέμβαση. Η SRS ορίζεται ως η χορήγηση υψηλών δόσεων ακτινοβολίας, με υψηλή ακρίβεια στόχευσης περίπου ενός χιλιοστού(~1mm), μέσω στερεοτακτικής καθοδήγησης της εικόνας σε ενδοκρανικούς όγκους-στόχους, προστατεύοντας τους πέριξ υγιείς ιστούς. Συνήθως χορηγείται ένα μεμονωμένο κλάσμα, στο οποίο χρησιμοποιούνται δόσεις μεταξύ 15 έως 24Gy. Η κλασματοποιημένη SRS ενδείκνυται κυρίως σε μεγαλύτερου μεγέθους BMs (>3cm)(175) ή σε βλάβες σε περιοχές υψηλού κινδύνου, όπως το στέλεχος ή σε ασθενείς που έχουν επανακτινοβοληθεί και συνίσταται σε κλασματοποιημένες δόσεις από δύο έως 5 συνεδρίες.

Η SRS συστήνεται σε ασθενείς με περιορισμένο αριθμό BMs, 1-4 BMs, προσφέροντας τους όφελος στη συνολική επιβίωση σύμφωνα με πρόσφατες κλινικές μελέτες, ωστόσο υπάρχει μια τάση εφαρμογής της SRS και σε ασθενείς με περισσότερες από 4 BMs. Μια πολυκεντρική μελέτη(JLKG0901) με 1194 ασθενείς με 1-10 BMs, οι οποίοι υπεβλήθησαν σε SRS, επέδειξε παρόμοιο όφελος στη συνολική επιβίωση 10,8 μηνών στους ασθενείς με 2-4 BMs έναντι αυτών με 5-10 BMs(176). Η σχετιζόμενη με την SRS τοξικότητα ήταν ελάχιστη με χαμηλό νευρογνωστικό έλλειμα και περιορισμένες στις αλλαγές στην πρωσοπικότητα και παρόμοια και στις δύο ομάδες ασθενών, των οποίων όμως ο αθροιστικός όγκος των BMs δεν ξεπερνούσε τα 15ml(177).

Λόγω του υψηλού ποσοστού τοπικής υποτροπής σε ασθενείς που υπεβλήθησαν σε χειρουργική εκτομή BMs μόνο, σχεδιάστηκαν δύο τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές για να αξιολογήσουν το όφελος από την προσθήκη SRS στην σημείο εκτομής μετά από χειρουργική επέμβαση BMs. Ο Brown και οι συνάδελφοί του τυχαιοποίησαν 194 ασθενείς οι οποίοι έλαβαν είτε WBRT ή SRS μετά την χειρουργική αφαίρεση(178). Δεν υπήρξε καμία διαφορά στη συνολική επιβίωση(OS), ενώ το γνωστικό έλλειμα ήταν μεγαλύτερο στο σκέλος της WBRT(178). Το ποσοστό τοπικής υποτροπής ήταν σαφώς μικρότερο στους ασθενείς που έλαβαν μετεγχειρητική SRS, ιδιαίτερα σε εκείνους με μεγάλες εξαιρεθείσες BMs.

#### Ολοκράνια ακτινοθεραπεία-WBRT

Η WBRT συνίσταται στη χορήγηση ακτινοβολίας 20-30 Gy, σε 5 με 10 συνεδρίες και εφαρμόζεται ως θεραπεία σταθεροποίησης μετά από τοπική επέμβαση ή ως κύρια θεραπεία σε ασθενείς με πολλαπλές BMs, στους οποίους δεν είναι δυνατή η SRS. Η προσθήκη WBRT μετά από νευροχειρουργική εξαίρεση ή SRS επέδειξε όφελος στον τοπικό έλεγχο της νόσου αλλά όχι στο OS, ενώ συνοδεύτηκε με επιδείνωση στη νευρολογική λειτουργία και για τον λόγο αυτό δεν συστήνεται(179–181). Επίσης, η προσθήκη WBRT μετά από χειρουργική επέμβαση ή SRS 1-3 εγκεφαλικών μεταστάσεων σε ασθενείς με μελάνωμα, στα πλαίσια επικουρικής ακτινοβολίας σε μελέτη φάσης III δεν επέδειξε κανένα όφελος(182).

Όταν η WBRT εφαρμόζεται ως κύρια θεραπεία ασθενών με πολλαπλές BMs, για τις οποίες δεν είναι εφικτή οποιαδήποτε άλλη παρέμβαση, η διάμεση επιβίωση (median survival) που προκύπτει είναι 3-6 μήνες, ενώ μόνο το 10% -15% επιβιώνουν στο 1 έτος(183). Στη μελέτη QUARTZ τυχαιοποιήθηκαν ασθενείς με NSCLC με πολλαπλές BMs, που δεν θεωρούνταν χειρουργήσιμες, να λάβουν τη βέλτιστη υποστηρικτική αγωγή BSC μόνο ή BSC μαζί με WBRT. Και οι δύο ομάδες ασθενών παρουσίασαν παρόμοια συνολική επιβίωση (median survival) περίπου 9 μήνες και παρόμοια ποιότητα ζωής. Ωστόσο, η WBRT έχει ένδειξη σε ασθενείς με πολλαπλές ανεγχείρητες BMs, οι οποίοι διεγνώσθησαν πρόσφατα, σε ασθενείς νεότερης ηλικίας και καλή γενική κατάσταση.

Νεότερες προσεγγίσεις στην WBRT έχουν εφαρμοστεί σε ασθενείς με BMs, με ταυτόχρονη χορήγηση μεγαλύτερης εστιακής ακτινοβολίας (boost) σε μακροσκοπικές BMs ή WBRT με Hippocampal avoiding (HA-WBRT) προσδίδοντας μεγαλύτερο όφελος. Επιπλέον παρατηρήθηκε μια τάση προστασίας του νευρογνωστικού επιπέδου με τη συγχορήγηση Memantine(184).

#### Προφυλακτική ολοκράνια ακτινοθεραπεία-PCI

Η PCI έχει καθιερωθεί σύμφωνα με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες ως standard of care, προλαμβάνοντας την ανάπτυξη BMs, στην αντιμετώπιση τόσο του περιορισμένου σε έκταση μικροκυτταρικού καρκίνου πνεύμονος(limited SCLC)(185) όσο και του εκτεταμένου ΜΚΚΠ(extensive SCLC)(186).

## ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η αποτελεσματικότητα της συστηματικής θεραπείας σε ασθενείς με BMs εξαρτάται από τον βαθμό διείσδυσης της από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό(BBB). Το γεγονός ότι οι BMs προσλαμβάνουν σκιαγραφικό, κατά τη διενέργεια απεικονιστικών εξετάσεων που προβλέπουν ενδοφλέβια χορήγηση σκιαγραφικού, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι κατά τον ίδιο τρόπο θα διανέμονται στις BMs όλα τα αντινεοπλασματικά φάρμακα. Ωστόσο, ο βαθμός διείσδυσης αντινεοπλασματικών φαρμάκων μεγαλύτερων μορίων όπως τα μονοκλωνικά αντισώματα ή τα συζευγμένα χημειοθεραπευτικά φάρμακα από τον BBB, ώστε να έχουν επαρκή ανικαρκινική δράση είναι αβεβαίος κι αποτελεί ένα ξεχωριστό κεφάλαιο. Τα διάφορα αντινεοπλασματικά φάρμακα εμφανίζουν διαφορετικό βαθμό διείσδυσης το καθένα. Φάρμακα με μεγαλύτερο βαθμό διείσδυσης του BBB προσφέρουν καλύτερες ανταποκρίσεις και μεγαλύτερο έλεγχο της νόσου. Η επιλογή της θεραπείας εξαρτάται από τον ιστολογικό τύπο και το μοριακό προφίλ του όγκου και όχι από τη θέση των BMs. Υπάρχουν περιπτώσεις στις οποίες συστήνεται η ιστολογική ταυτοποίηση και ο περαιτέρω μοριακός έλεγχος των BMs αντί της πρωτοπαθούς εστίας ώστε να συλλεχθούν όσο γίνεται περισσότερες πληροφορίες για τον καθορισμό εξατομικευμένης και στοχεύουσας φαρμακευτικής αγωγής. Επίσης θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι προηγούμενες γραμμές θεραπείας για τη λήψη απόφασης της φαρμακευτικής αγωγής καθώς και το προφίλ τοξικότητας των αντίστοιχων θεραπευτικών επιλογών.

Σύμφωνα με πρόσφατες κλινικές μελέτες η ανοσοθεραπεία δρα στις BMs αλλά η χρήση κορτικοστεροειδών έχει αρνητικό αντίκτυπο στην αποτελεσματικότητα της ανοσοθεραπείας στους ασθενείς με BMs.

### Εγκεφαλικές μεταστάσεις από καρκίνο μαστού

Η συστηματική θεραπεία κατέχει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο των BMs από την κακοήθεια μαστού. Διάφορα φάρμακα έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία του καρκίνου μαστού με νόσο στον εγκέφαλο, συμπεριλαμβανομένων κλασικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων όπως η καπεσιταμίνη, η κυκλοφωσφαμίδη, η φθοροουρακίλη, η μεθοτρεξάτη, η βινκριστίνη, η σισπλατίνη, η βινορελμπίνη, η ετοποσίδη, η γεμισιταμπίνη, τα περισσότερα με response rate >30%.

Ασθενείς με BMs από μεταστατικό HER2-Θετικό καρκίνο μαστού ωφελούνται από την αγωγή με στοχευτικό παράγοντα έναντι του HER2. Σε ασθενείς στους οποίους δεν ενδείκνυται νευροχειρουργική επέμβαση σε καλή γενική κατάσταση (PS 0-2), προηγουμένως θεραπευμένους με Trastuzumab αλλά capecitabine – lapatinib naïve, ο συνδυασμός capecitabine-lapatinib επέδειξε στις BMs response rate της τάξης του 38% σε ασθενείς με προηγουμένως ακτινοβολημένες BMs και 66% σε ασθενείς treatment naïve BMs(187,188). Το neratinib plus capecitabine συγκρίθηκε με το lapatinib plus capecitabine στην κλινική μελέτη NALA σε ασθενείς με σταθερές BMs ασυμπτωματικούς και επέδειξε υπεροχή με μείωση της αναγκαιότητας για τοπική παρέμβαση κυρίως RT σε 23% versus 29%(189). Στην κλινική μελέτη EMILIA, στην οποία τυχαιοποιήθηκαν ασθενείς με σταθερές BMs να λάβουν ως

δεύτερης γραμμής θεραπεία μετά από Trastuzumab plus Taxane, TDM-1(Trastuzumab-emtastine) versus lapatinib – capecitabine, φάνηκε όφελος στη συνολική επιβίωση στο σκέλος του TDM-1(median, 26.8 μήνες έναντι 12,9 μηνών)(190). Επιπλέον, το TDM-1 εμφανίζει αντικαρκινική δράση με response rate 44% σε ασθενείς με BMs, που έχουν υποβληθεί προηγουμένως σε τοπική θεραπεία(191).

Ο συνδυασμός Tucatinib-Trastuzumab-Caprecitabine στη 3<sup>η</sup> γραμμή θεραπειάς σε ασθενείς με BMs επέδειξε υπεροχή στη συνολική επιβίωση συγκριτικά με εκείνον του Trastuzumab – Caprecitabine(192). Έχει μελετηθεί και το διπλό block του HER2 με το Trastuzumab-Pertuzumab μαζί με Docetaxel και διαπιστώθηκε ότι ο συνδυασμός καθυστερεί την εμφάνιση εγκεφαλικής νόσου σε σχέση μόνο με Trastuzumab - Docetaxel(193). Λίγες μελέτες έχουν αξιολογήσει τη συστηματική θεραπεία σε ασθενείς με BMs HER2- negative luminal ή triple negative. Το Abemaciclib έδειξε ενδοκρανιακό κλινικό όφελος με πλήρεις, μερικές ανταποκρίσεις και σταθερότητα της νόσου, το οποίο παρέμεινε >6 μήνες στο 25% των ασθενών και PFS 4,4 μήνες σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο μαστού HER2 αρνητικό και ορμονικούς υποδοχείς (HR) θετικούς.

### **Εγκεφαλικές μεταστάσεις από καρκίνο πνεύμονος**

Για ασθενείς με μεταστατικό μη μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονος (NSCLC) χωρίς ενεργοποιητικές ογκογόνες μεταλλάξεις, η μονοθεραπεία με anti PD-1 ή anti PD-L1 ICI στην περίπτωση που εμφανίζουν θετικότητα στο PD-L1 >50% ή συνδυασμού ανοσοθεραπείας με χημειοθεραπεία βασισμένη στην πλατίνα αποτελεί πλέον την ενδεδειγμένη θεραπεία. Επίσης, ο συνδυασμός αναστολέων σημείων ελέγχου με anti- CTLA-4 και anti PD-1 με ή χωρίς χημειοθεραπεία αποτελεί καινούργια ένδειξη στην αντιμετώπιση των ασθενών με μεταστατικό NSCLC(194,195). Η ανοσοθεραπεία αποτελεί μια δραστική θεραπεία για την ενδοκρανιακή νόσο με response rate να κυμαίνεται στο 30%(196). Ωστόσο οι μελέτες, οι οποίες αξιολογούν την αποτελεσματικότητα των ICI συμπεριλαμβάνουν μόνο ασθενείς ασυμπτωματικούς με σταθερές BMs, προηγουμένως θεραπευθείσες, οι οποίοι δεν χρειάζονται αγωγή με κορτικοστεροειδή, καθώς αυτό θα είχε αρνητικό αντίκτυπο στην αποτελεσματικότητα της ανοσοθεραπείας. Δεδομένα από μελέτες ασθενών με «ενεργείς» BMs έδειξαν ότι το response rate στην ανοσοθεραπεία ανευρίσκεται στο 27,3%(197).

Ασθενείς με ογκογόνες μεταλλάξεις όπως η μετάλλαξη στο epidermal growth factor receptor(EGFR), η αναδιάταξη στο γονίδιο anaplastic lymphoma kinase(ALK) ή στο c-ros oncogene(ROS) ή στο Ret proto-oncogene (RET) εμφανίζουν μεγαλύτερη επίπτωση σε BMs. Με τη χορήγηση στοχεύουσας θεραπείας με τα αντίστοιχα TKI επιτυγχάνεται σημαντική βελτίωση στο προσδόκιμο των ασθενών, με τη συνολική επιβίωση να φτάνει >3 έτη σε ασθενείς με EGFR mutation(198) και >5 έτη με ALK rearrangement(199). Οι αναστολείς τυροσινικής κινάσης (TKI) αποτελούν την gold standard θεραπεία γι' αυτούς τους ασθενείς και εμφανίζουν υψηλές ανταποκρίσεις τόσο στην εξωκρανιακή νόσο, όσο και στην ενδοκράνια νόσο διότι έχουν υψηλή διείσδυση του BBB(200).

Η ανοσοθεραπεία σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία βασισμένη στην πλατίνα και ετοποσίδη αποτελεί την ενδεικνυόμενη θεραπεία σε ασθενείς με extensive SCLC, με υψηλές ανταποκρίσεις και σημαντική αποτελεσματικότητα και στην εγκεφαλική νόσο(201).

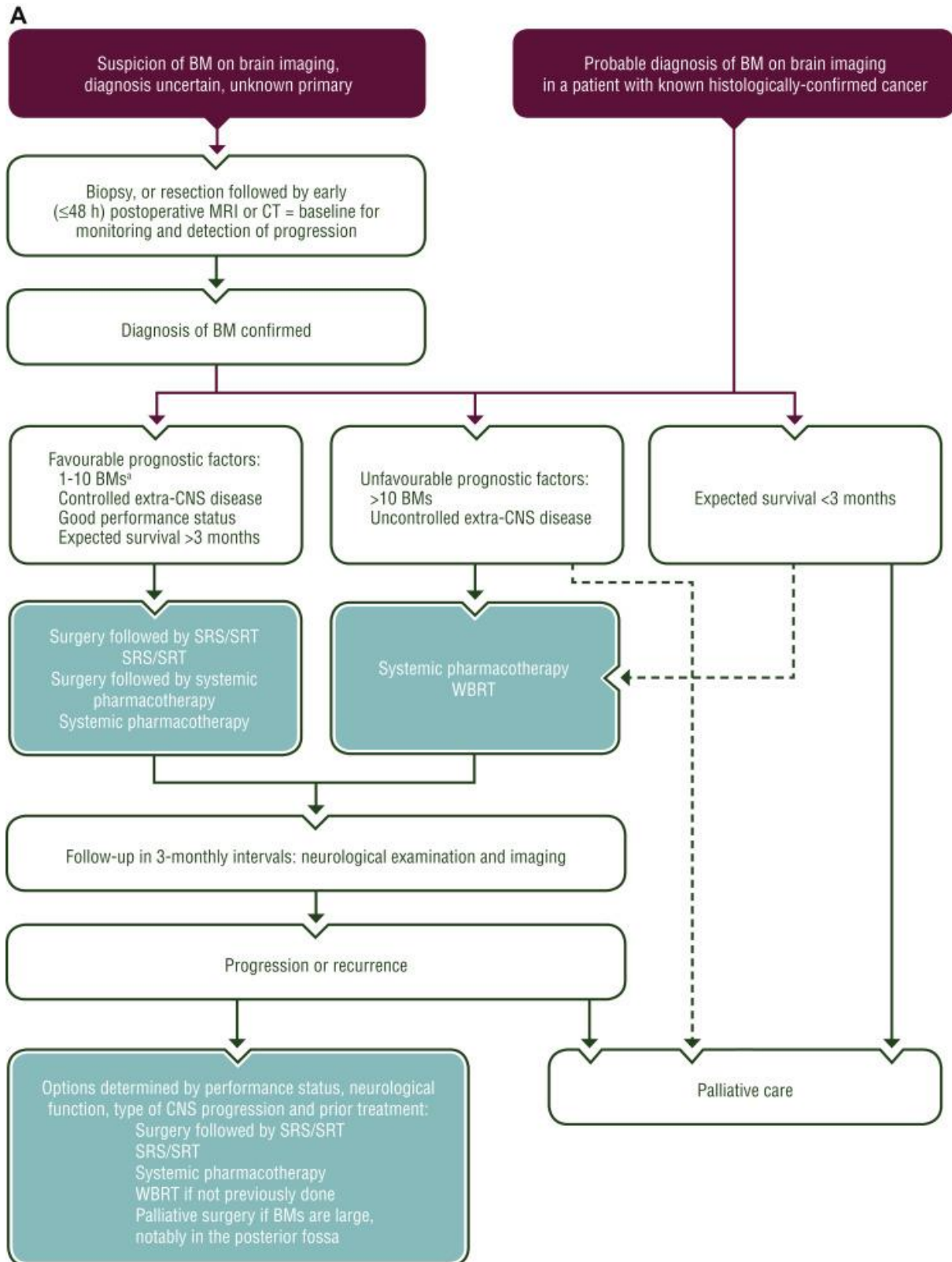
### **Εγκεφαλικές μεταστάσεις από μελάνωμα**

Η συστηματική χημειοθεραπεία βασισμένη σε κλασσικούς κυτταροτοξικούς παράγοντες όπως η Τεμοζολαμίδη, η Ντακαρμαζίνη, η φοτεμουστίνη εμφάνιζε περιορισμένη αντινεοπλασματική δράση σε άτομα με μεταστατικό μελάνωμα με BMs.

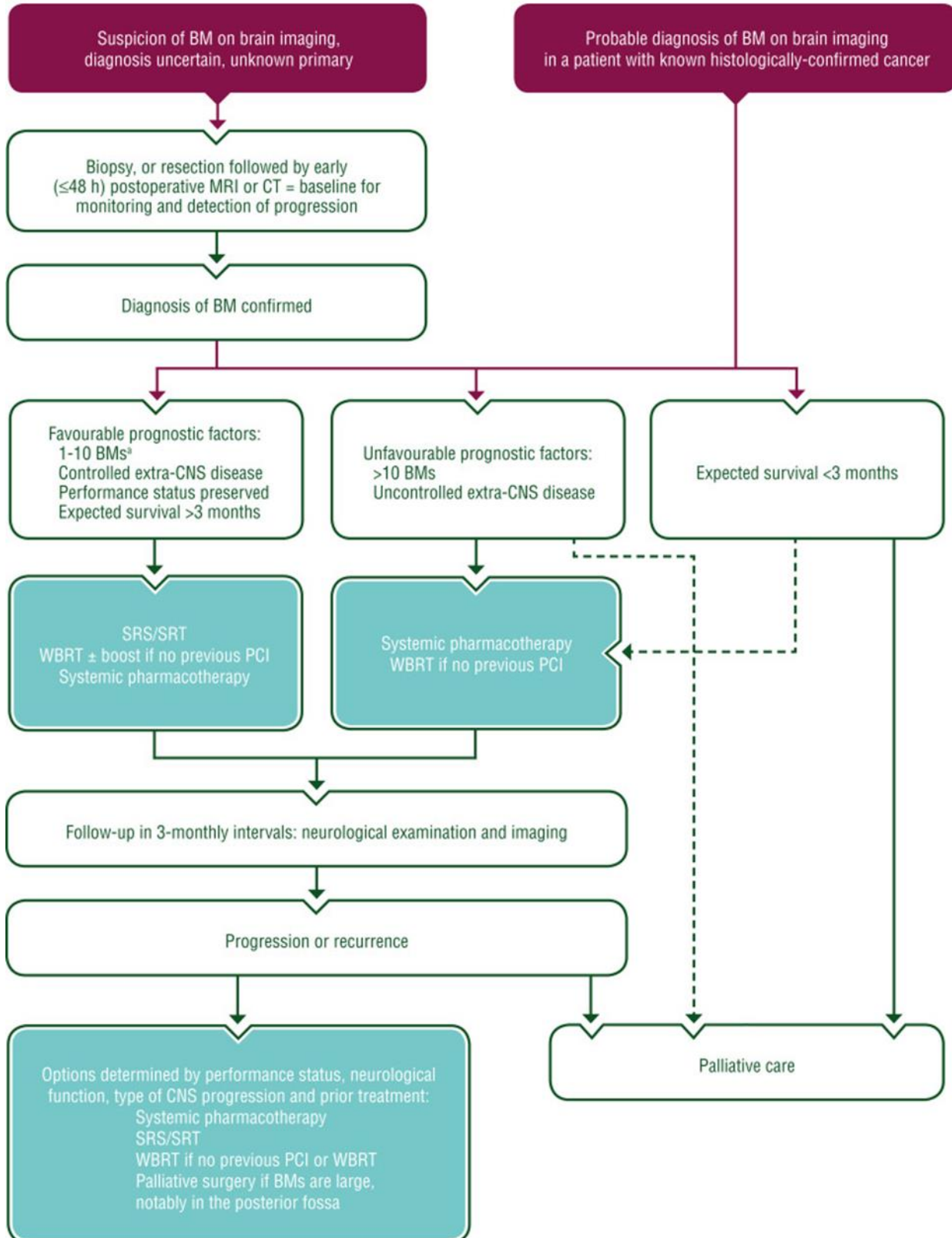
Τα τελευταία χρόνια οι στοχεύουσες θεραπείες με αναστολείς του BRAF σε ασθενείς με μελάνωμα που φέρουν την BRAF μετάλλαξη παρουσιάζουν σημαντική αντινεοπλασματική δραστηριότητα αυξάνοντας σημαντικά τη συνολική επιβίωση. Η μονοθεραπεία με BRAF αναστολείς Vemurafenib ή Dabrafenib βελτίωσε την ενδοκρανιακή ανταπόκριση, φτάνοντας έως το 40% response rate. Περαιτέρω βελτίωση των ανταποκρίσεων της εγκεφαλικής νόσου σε ασθενείς με μελάνωμα παρουσίασε ο συνδυασμός BRAF inhibitor και MEK inhibitor (Dabrafenib – Trametinib). Η συνδυαστική ανοσοθεραπεία με anti-PD-1 και anti-CTLA-4 (Nivolumab – Ipilimumab) σε ασθενείς με εγκεφαλικές μεταστάσεις από μελάνωμα οδήγησε σε συνολικές ανταποκρίσεις της τάξεως του 50%, με διάρκεια ανταποκρίσεων και PFS > 50% στους 18 μήνες. Ο συνδυασμός συστήνεται ως θεραπεία 1<sup>ης</sup> γραμμής όχι μόνο στους ασθενείς με BRAF wild type, αλλά και στους ασθενείς με BRAF mutation.

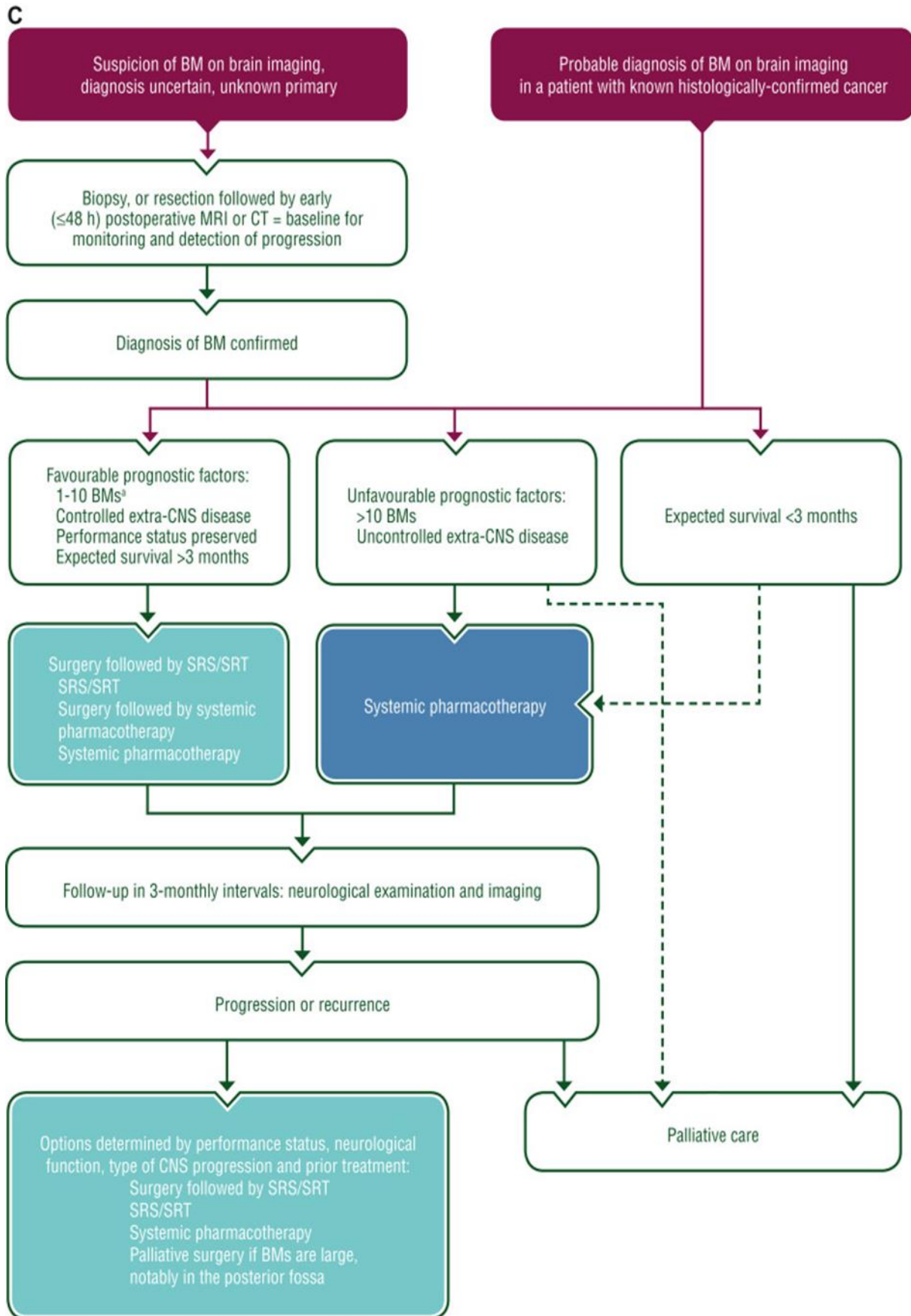
Ασθενείς, BRAF mutated, με πολλαπλές συμπτωματικές BMs ή ασθενείς οι οποίοι χρήζουν αγωγής με 4mg dexamethasone ή ασθενείς που χρήζουν 2<sup>ης</sup> γραμμής θεραπεία, θα πρέπει να λάβουν αγωγή με Dabrafenib-Trametinib.





B





Εικόνα 8. Προτεινόμενος θεραπευτικός αλγόριθμος ασθενών με εγκεφαλικές μεταστάσεις. (A) In general. (B) For SCLC patients. (C) For melanoma patients.

#### 4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να διερευνήσει την ύπαρξη ή μη ανοσολογικής απόκρισης στην εγκεφαλική μετάσταση από ποικίλα κακοήγη νεοπλασμάτα, αλλά και τη συσχέτιση της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή στις εγκεφαλικές μεταστάσεις με αυτή στην αντίστοιχη πρωτοπαθή εστία. Για πολλά χρόνια ο εγκέφαλος θεωρούνταν μη ανοσογόνο όργανο και κατ' επέκταση οι μεταστάσεις στο Κ.Ν.Σ ότι στερούνταν ανοσολογικής απόκρισης. Τα τελευταία χρόνια, η άποψη αυτή τείνει να αναθεωρηθεί, ωστόσο οι γνώσεις μας είναι περιορισμένες, διότι η ανοσολογική απάντηση στο εγκεφαλικό παρέγχυμα μεταστατικών εστιών δεν έχει μελετηθεί αρκετά.

Η επίπτωση εγκεφαλικών μεταστάσεων σε ασθενείς με κακοήθεια ποικίλλει ανάλογα με την εντόπιση της πρωτοπαθούς εστίας, αλλά βαίνει αυξανόμενη κατά τις τελευταίες δεκαετίες. Η εφαρμογή νέων στοχευτικών ανοσοθεραπευτικών προσεγγίσεων έχει αυξήσει την επιβίωση ασθενών και έχει αναδείξει τη σημασία της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή έναντι του όγκου. Η παρουσία της ανοσολογικής διήθησης λεμφοκυττάρων (TILs) και η έκφραση του PD-L1 έχει συσχετιστεί με καλύτερη ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία αποκτώντας προβλεπτικό και προγνωστικό ρόλο. Είναι γνωστό ότι υψηλά μεταλλαξιόγονοι όγκοι, με κύριο το μελάνωμα το οποίο χαρακτηρίζεται από έντονη παρουσία TILs, ανταποκρίνονται σημαντικά στην ανοσοθεραπεία. Σκοπός της μελέτης ήταν η εκτίμηση των TILs και της έκφρασης του PD-L1 τόσο στην εγκεφαλική μετάσταση όσο και στην αντίστοιχη πρωτοπαθή εστία, η ανεύρεση τυχών διαφορών μεταξύ αυτών και η πιθανή συσχέτιση με την ανταπόκριση στην θεραπεία.

Οι όγκοι ακόμη και του ίδιου ιστολογικού τύπου εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια και πολυκλωνικότητα και είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι κατά την διάρκεια της εξέλιξής τους εμφανίζουν περαιτέρω αλλαγές στο μοριακό προφίλ τους. Γεγονός που εξηγεί την αντίσταση στην θεραπεία. Σε κάθε χρονική στιγμή που εμφανίζεται πρόοδος νόσου, τον ασθενή συνοδεύει η πληροφορία του αρχαιακού ιστού και με βάση αυτή γίνεται η επιλογή της θεραπείας. Σκοπός της μελέτης ήταν να ανευρεθούν οι ομοιότητες/διαφορές στην ανοσολογική απάντηση της εγκεφαλικής μετάστασης σε μοριακό επίπεδο όπως αυτές προκύπτουν κατά την εξέλιξη του από την πρωτοπαθή εστία και η συσχέτιση των διαφορών αυτών με την έκβαση της νόσου και την επιβίωση. Περιορισμός της παρούσας διατριβής ήταν το γεγονός ότι πολλοί ασθενείς δεν υπεβλήθησαν σε βιοψία της πρωτοπαθούς εστίας, διότι η ιστολογική ταυτοποίηση για τον προσδιορισμό της πρωτοπαθούς βλάβης, απαραίτητη για τον καθορισμό της θεραπείας, γινόταν από το βιοπτικό υλικό της εγκεφαλικής μετάστασης. Δεδομένης της δυσκολίας που υπάρχει να υποβληθούν οι ασθενείς σε δεύτερη ιστική βιοψία, στην πλειοψηφία τους οι ασθενείς διαθέτουν μόνο βιοψία της εγκεφαλικής μετάστασης και όχι ζεύγος βιοψιών εγκεφαλικής και πρωτοπαθούς εστίας.

Ακολούθως, κατά την μελέτη σκοπός ήταν να αξιολογηθεί το αντίκτυπο της ανοσολογικής διήθησης από TILs στις εγκεφαλικές μεταστάσεις σε δύο παραμέτρους επιβίωσης, τη

συνολική επιβίωση OS από τη στιγμή της διάγνωσης της νόσου(**OS1**) και τη συνολική επιβίωση από τη στιγμή της διάγνωσης των εγκεφαλικών μεταστάσεων(**OS2**).

Συνολικά, ο σκοπός της μελέτης ήταν η περιγραφή της ανοσολογικής απάντησης στην εγκεφαλική μετάσταση και στον πρωτοπαθή όγκο ως προς τις διαφορές /ομοιότητες και η προγνωστική της σημασία για την έκβαση της νόσου, την ανταπόκριση στη θεραπεία και τη συνολική επιβίωση.



## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ





## 5. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν να διερευνήσει την ύπαρξη ή μη ανοσολογικής απόκρισης στην εγκεφαλική μετάσταση από ποικίλα κακοήγη νεοπλάσματα, αλλά και τη συσχέτιση της ανοσολογικής απάντησης της εγκεφαλικής μετάστασης με αυτή της αντίστοιχης πρωτοπαθούς εστίας. Για πολλά χρόνια ο εγκέφαλος θεωρούνταν μη ανοσογόνο όργανο και κατ' επέκταση οι μεταστάσεις στο Κ.Ν.Σ ότι στερούνταν ανοσολογικής απόκρισης. Τα τελευταία χρόνια, η άποψη αυτή τείνει να αναθεωρηθεί, ωστόσο η ανοσολογική απάντηση στο εγκεφαλικό παρέγχυμα μεταστατικών εστιών δεν έχει μελετηθεί αρκετά. Η επίπτωση εγκεφαλικών μεταστάσεων σε ασθενείς με κακοήθειες ποικίλλει ανάλογα με την εντόπιση της πρωτοπαθούς εστίας, αλλά βαίνει αυξανόμενη κατά τις τελευταίες δεκαετίες. Η εφαρμογή νέων στοχευτικών ανοσοθεραπευτικών προσεγγίσεων έχει αυξήσει την επιβίωση ασθενών και έχει αναδείξει τη σημασία της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή έναντι του όγκου. Σκοπός της μελέτης ήταν η εκτίμηση των TILs και της έκφρασης του PD-L1 τόσο στην πρωτοπαθή εστία όσο και στην συνοδό εγκεφαλική μετάσταση, η ανεύρεση τυχών διαφορών μεταξύ αυτών, η προγνωστική της σημασία για την έκβαση της νόσου και η προβλεπτική της σημασία για την ανταπόκριση στη θεραπεία και τη συνολική επιβίωση. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε ιστολογικό υλικό από τις εξαιρεθείσες εγκεφαλικές μεταστάσεις 72 ασθενών, εκ των οποίων υπήρχαν 9 ζεύγη ιστολογικού υλικού από τον πρωτοπαθή όγκο και την εγκεφαλική μετάσταση. Εφαρμόστηκαν χρώσεις με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας σε ιστολογικές τομές, οι οποίες παρασκευάστηκαν από τους αντίστοιχους κύβους παραφίνης, με τη μορφή των αντισωμάτων CD8, CD3, FOXP3, PD-L1 και PD-1 και αξιολογήθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο. Στις ιστολογικές τομές, μέσω της χρώσης hematoxylin-eosin (H&E), μελετήθηκε η ανοσολογική διήθηση των TILs στην εγκεφαλική μετάσταση και στον πρωτοπαθή όγκο, σε όσα δείγματα αυτός ήταν διαθέσιμος, βάση της μέτρησης των TILs τόσο στο στρώμα όσο και ενδοεπιθηλιακά και κατόπιν υπολογίστηκε η πυκνότητά τους. Η εκτίμηση της ανοσολογικής απόκρισης συμπληρώθηκε με την εκτίμηση της θετικότητας στην έκφραση του PD-1/PD-L1 και την ένταση της χρώσης της. Με τις μεθόδους αυτές απώτεροι στόχοι ήταν:

- Η διερεύνηση ύπαρξης ή μη ανοσολογικής διήθησης των TILs στην εγκεφαλική μετάσταση καθώς η παρουσία τους φαίνεται να αποτελεί ανοσολογικό βιοδείκτη.
- Η συσχέτιση της ανοσολογικής διήθησης των TILs στην εγκεφαλική μετάσταση με άλλες κλινικοπαθολογοανατομικές και επιδημιολογικές παραμέτρους : είδος συμπαγούς όγκου, ιστολογικό βαθμό κακοήθειας(grade), ιστολογικός τύπος(αδενοκαρκίνωμα, πλακώδες, κ.α), γενική κατάσταση(PS), ηλικία, συννοσηρότητες, κάπνισμα, αριθμός θεραπευτικών γραμμών που προηγήθηκαν, προηγούμενη θεραπεία με immune checkpoints inhibitors).

- Η διερεύνηση συμφωνίας ή ύπαρξη διαφορών της ανοσολογικής διήθησης των TILs και κατ'επέκταση της ανοσολογικής απόκρισης μεταξύ της πρωτοπαθούς εστίας και της εξαιρεθείσας εγκεφαλικής μετάστασης.
- Ο έλεγχος του αντίκτυπου της ανοσολογικής διήθησης των TILs στην εγκεφαλική μετάσταση σε δύο παραμέτρους : στην ανταπόκριση στην κλασσική χημειοθεραπεία και στην ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία.
- Η διερεύνηση συμφωνίας ή ύπαρξη διαφορών στην έκφραση των ανοσοσημείων ελέγχου PD-1/PD-L1 μεταξύ εγκεφαλικής μετάστασης κι αντίστοιχης πρωτοπαθούς εστίας.
- Η συσχέτιση της ανοσολογικής διήθησης TILs και της έκφρασης PD-1/PD-L1 σε δύο παραμέτρους επιβίωσης : της συνολικής επιβίωσης από την διάγνωση της νόσου (overall survival -OS1) και της συνολικής επιβίωσης από την διάγνωση της μετάστασης στο εγκεφαλικό παρέγχυμα(OS2).

Για τη μελέτη αυτή αποφασίστηκε η συμμετοχή ασθενών διαγνωσθέντων με κακοήθειες συμπαγών όγκων στο Π.Γ.Ν.Ι, κατά το χρονικό διάστημα 2005-2018, οι οποίοι ανέπτυξαν εγκεφαλικές μεταστάσεις κατά την πορεία της νόσου ή τις εμφάνισαν κατά τη διάγνωση της νόσου και για τις οποίες υπεβλήθησαν χειρουργικά σε βιοψία. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε αναδρομικά με ανάκτηση του μπλοκ παραφίνης από τον πρωτοπαθή όγκο και την εξαιρεθείσα εγκεφαλική μετάσταση και από την πρόσβαση στον ιατρικό φάκελο των ασθενών.

## 6. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

Για να αξιολογηθεί η ανοσολογική διήθηση των TILs και η θετικότητα στην έκφραση των PD-1/PD-L1 συντάχθηκε και εφαρμόστηκε το εξής πρωτόκολλο:

### **Βήμα 1<sup>ο</sup>**

Επιλογή των υπό μελέτη ιστολογικών υλικών κατόπιν αναζήτησης τους από το αρχείο του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Π.Γ.Ν.Ι, των ιστολογικών πλακιδίων και των αντίστοιχων κύβων παραφίνης.

### **Βήμα 2<sup>ο</sup>**

Παρασκευή ιστολογικών τομών από τους κύβους παραφίνης, κατόπιν μικροτόμησης για την εφαρμογή ανοσοϊστοχημικών χρώσεων. Η πραγματοποίηση ανοσοϊστοχημικών χρώσεων έγινε με την εφαρμογή των κάτωθι αντισωμάτων:

CD8, CD3, FOXP3, PD-1 και PD-L1

### **Βήμα 3<sup>ο</sup>**

Αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων των ιστολογικών τομών σε οπτικό μικροσκόπιο διπλής συμπαρατήρησης για την αξιολόγηση της ανοσοδιήθησης των TILs και της έκφρασης PD-L1/PD-1 κι ακολούθως καταγραφή των αποτελεσμάτων σε ηλεκτρονικό σύστημα(Excel).

### **Βήμα 4<sup>ο</sup>**

Καταγραφή των κλινικών παθολογοανατομικών κι επιδημιολογικών παραμέτρων δημογραφίας, (είδος συμπαγούς όγκου, ιστολογικό βαθμό κακοήθειας(grade), ιστολογικός τύπος (αδενοκαρκίνωμα, πλακώδες, κ.α), γενική κατάσταση(PS), ηλικία, συννοσηρότητες, κάπνισμα, αριθμός θεραπευτικών γραμμών που προηγήθηκαν, προηγούμενη θεραπεία με immune checkpoints inhibitors), σε ηλεκτρονικό σύστημα (Excel).

### **Βήμα 5<sup>ο</sup>**

Συλλογή και στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων που συλλέχθηκαν στα δύο τελευταία βήματα για την περαιτέρω στατιστική ανάλυση, μόνο και πολυπαραγοντική, με σκοπό τη διερεύνηση πιθανών συσχετίσεων της ανοσολογικής απάντησης στην πρωτοπαθή και μεταστατική εστία, καθώς και τη διερεύνηση πιθανών συσχετίσεων της ανοσολογικής απόκρισης με την έκβαση, την επιβίωση και την πρόγνωση των ασθενών.

## 7.ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

### 7.1 Υλικό

#### 7.1.1 Συλλογή ιστικών δειγμάτων

Η μελέτη αυτή είναι μια αναδρομική μελέτη, η οποία χρησιμοποίησε υλικό από το αρχείο του τμήματος της Παθολογοανατομίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου των Ιωαννίνων(Π.Γ.Ν.Ι). Η επιλογή έγινε με την προϋπόθεση ότι υπήρχε επαρκής ιστός, ώστε να πραγματοποιηθεί πολυπαραμετρική ανοσοϊστοχημική ανάλυση. Η μελέτη επικεντρώθηκε σε ασθενείς με κακοήθεια συμπαγών όγκων, οι οποίοι είτε εκ διαγνώσεως ή κατά την πορεία της νόσου εμφάνισαν εγκεφαλικές μεταστάσεις. Η διάγνωση των όγκων έγινε κατά το χρονικό διάστημα 2005 έως 2018. Το σύνολο των ιστικών δειγμάτων που συγκεντρώθηκε ήταν από 72 ασθενείς. Όλοι οι ασθενείς υπεβλήθησαν σε βιοψία της εγκεφαλικής νόσου, την οποία διαθέτουμε. Οι 61 ασθενείς είχαν υποβληθεί σε βιοψία της πρωτοπαθούς εστίας ενώ η διάγνωση των υπόλοιπων ασθενών βασίστηκε στην ιστολογική ταυτοποίηση της εγκεφαλικής δευτεροπαθούς εντόπισης, για τον καθορισμό της θεραπευτικής προσέγγισης, δεδομένης της δυσκολίας να υποβληθούν σε δεύτερη ιστική βιοψία. Από τις βιοψίες της πρωτοπαθούς εστίας των 62 ασθενών ανακτήθηκε από το αρχείο το βιοπτικό υλικό μόνο 9 ασθενών, ενώ δεν ανευρέθησαν τα υπόλοιπα, τα περισσότερα των οποίων βρισκόντουσαν σε αρχεία άλλων νοσοκομείων, όπως διαπιστώνεται από τις αντίστοιχες ιστολογικές εκθέσεις.

Οι ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη εμφάνιζαν κατά κύριο λόγο καρκίνο πνεύμονος (36 από τους 72 ασθενείς), ακολούθως κολοορθικός καρκίνο, καρκίνο μαστού, μελάνωμα, καρκίνος στομάχου και γαστροοισοφαγικής συμβολής, καρκίνο νεφρού, ο καρκίνος προστάτου, κακοήθεια αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας(ΚΑΠΕ), καρκίνο ουροδόχου κύστεως και ο καρκίνο περιτοναίου.

Όλα τα βιοπτικά δείγματα των ασθενών είχαν μονιμοποιηθεί σε διάλυμα φορμαλδεΐδης και είχαν εγκλεισθεί σε κύβους παραφίνης. Ιστολογικές τομές παρασκευάστηκαν από τους κύβους παραφίνης των ιστικών αυτών δειγμάτων. Ακολούθως, έγινε ανοσόχρωση και προωθήθηκαν για ανοσοϊστοχημική μελέτη, για την εκτίμηση των διηθούντων του όγκου λεμφοκυττάρων TILs και της έκφρασης των PD-1/PD-L1.

#### 7.1.2 Κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά

Οι 72 ασθενείς χειρουργήθηκαν στην Νευροχειρουργική κλινική του ΠΓΝΙ. Στη μελέτη, όλοι οι ασθενείς ήταν ηλικίας άνω των 18 ετών. Ακολούθως, οι ασθενείς παραπέμφθηκαν για

περαιτέρω ογκολογική εκτίμηση και θεραπεία. Από τους 72 ασθενείς, οι 61 αντιμετώπιστηκαν στην Ογκολογική κλινική του ΠΓΝΙ. Συνεπώς, ήταν διαθέσιμος ο ιατρικός φάκελος για την καταγραφή των κλινικών παραμέτρων και της επιβίωσης(Πίνακας 3). Η παρακολούθηση των ασθενών κυμαινόταν από 66 έως 122 μήνες. Η περίοδος επιβίωσης υπολογίσθηκε σε δύο παραμέτρους επιβίωσης : της συνολικής επιβίωσης από την διάγνωση της νόσου (overall survival -OS1) και της συνολικής επιβίωσης από την διάγνωση της μετάστασης στο εγκεφαλικό παρέγχυμα(OS2).

<b>Age at diagnosis (N=71)</b>	
Median (min, max)	64.0(32.0,84.0)
<b>N (%)</b>	
<b>Sex (N=72)</b>	
Female	19(26.4)
Male	53(73.6)
<b>Site of Primary cancer (N=65)</b>	
Bladder cancer	2(3.1)
Breast cancer	6(9.2)
CUP	1(1.5)
Colorectal cancer	7(10.8)
Gastric cancer	2(3.1)
Gastroesophageal cancer	1(1.5)
Lung cancer	36(55.4)
Melanoma	5(7.7)
Peritoneal cancer	1(1.5)
Prostate cancer	2(3.1)
Renal cancer	2(3.1)
<b>Histology of primary cancer (N=61)</b>	
NST	2(3.3)
Adenocarcinoma	34(55.7)
Adenosquamous	2(3.3)
Clear cell	2(3.3)
Melanoma	5(8.2)
Neuroendocrine carcinoma	2(3.3)
Non-small cell lung cancer	7(11.5)
Small cell cancer	4(6.6)
Squamous	3(4.9)
<b>Histology grade of primary cancer (N=30)</b>	
I	1(3.3)
II	1(3.3)

III	28(93.3)
<b>Surgery of primary disease (N=62)</b>	
No	33(53.2)
Yes	29(46.8)
<b>Disease stage of diagnosis (N=57)</b>	
II	6(10.5)
III	12(21.1)
IV	39(68.4)
<b>Metastasis, necrosis (N=57)</b>	
No	18(31.6)
Yes	39(68.4)
<b>Comorbidities (N=62)</b>	
No	31(50.0)
Yes	31(50.0)
<b>Type of comorbidities (N=30)</b>	
<i>Arterial hypertension</i>	15(50.0)
<i>Atrial fibrillation</i>	2(6.7)
<i>Cardiac failure</i>	1(3.3)
<i>Coronary artery disease</i>	9(30.0)
<i>COPD</i>	3(10.0)
<i>Diabetes mellitus</i>	3(10.0)
<i>By pass</i>	1(3.3)
<i>Gastroesophageal reflection</i>	1(3.3)
<b>N of comorbidities (N=30)</b>	
1	26(86.7)
2	4(13.3)
<b>N of systemic therapies (N=62)</b>	
1	27(43.5)
≥2	35(56.5)
<b>N of systemic therapies for metastatic disease (N=61)</b>	
0	3(3.3)
1	33(54.1)
≥2	26(42.6)

---

*Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά του συνόλου των ασθενών και των όγκων τους.*

N, number

All percentages were calculated out of the total number of informative cases per parameter.

## 7.2 Μέθοδοι

### 7.2.1 Ανοσοϊστοχημεία

Για την αξιολόγηση της ανοσοδιήθησης λεμφοκυττάρων TILs και της έκφρασης των PD-1/PD-L1 χρησιμοποιήθηκε το βιοπτικό υλικό, το οποίο ανακτήθηκε από το αρχείο ως block παραφίνης από το οποίο παρασκευάστηκαν ιστολογικά πλακίδια, 72 ασθενών με εγκεφαλική μετάσταση εκ των οποίων οι 9 ασθενείς διέθεταν ζεύγος βιοψιών εγκεφαλικής μετάστασης και πρωτοπαθούς εστίας.

Αρχικά, παρασκευάστηκαν ιστολογικές τομές από τους κύβους παραφίνης κατόπιν μικροτόμησης, από ένα αντιπροσωπευτικό για κάθε ασθενή δείγμα, το οποίο είχε υποστεί μονιμοποίηση σε φορμόλη κι είχε εμβυθιστεί σε παραφίνη FFPE. Το πάχος των τομών ήταν 4mm, όπως συστήνεται από το Consensus methodology for evaluation TILs for breast cancer από τον Salgado et al, Annals of Oncology 2015(202).

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε αποπαραφινοποίηση των τομών, η οποία ακολουθήθηκε από επανυδάτωση με εμβύθιση των τομών σε ρυθμιστικό διάλυμα, τα οποία πραγματοποιήθηκαν αυτοματοποιημένα μέσω της συσκευής Ventana Benchmark XT. Στη συνέχεια, τέθηκαν ανοσοϊστοχημικές χρώσεις με αντισώματα. Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, η πηγή, ο κλώνος και η αραιώση τους παρατίθενται στον

#### **Πίνακα 4:**

Αντίσωμα	Πηγή	Κλώνος	Αραιώση
CD3	Abcam,USA	SP7	1:300
CD8	Dako, Glostrup, Denmark	C8/144B	1:50
FOXP3	Abcam,USA	SP97	1:50
PD-L1	Ventana, Benchmark,Roche	SP142	χωρίς αραιώση έτοιμο προς χρήση
PD-1	CellMarque, Roclin, CA, USA	MRQ-22	1:1000

*Πίνακας 4. Πρωτογενή αντισώματα, η πηγή, ο κλώνος και η αραιώση τους.*

Σε όλες τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις χρησιμοποιήθηκαν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες. Για τους αρνητικούς μάρτυρες στις ιστολογικές τομές, δεν προστέθηκε το πρωτογενές αντίσωμα (negative reagent control-NRC). Τα βασικά στάδια της ανοσοϊστοχημικής μεθοδολογίας είναι τα κάτωθι:

1. Θερμική επεξεργασία των ιστολογικών τομών σε κλίβανο
2. Τοποθέτηση στα ιστολογικά πλακίδια αυτοκόλλητης ταινίας με γραμμοκώδικα
3. Θέρμανση και αποπαραφίνωση του ιστού

4. Αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων με την χρήση κατάλληλου διαλύματος
5. Επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα
6. Ενίσχυση με το σύστημα ενίσχυσης π.χ για το PD-L1 το Ventana
7. Χρήση του αντίστοιχου kit(π.χ για το PD-L1) το Ventana kit
8. Επικάλυψη των ιστολογικών τομών με καλυπτρίδες

Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν whole tissue sections και όχι tissue micro arrays(TMAs) καθώς δεν συστήνονταν για την αξιολόγηση των TILs, διότι δεν υπήρχαν επαρκείς δημοσιευμένες ενδείξεις σύμφωνα με τις οποίες τα TMAs θα αντικατοπτρίζανε την πιθανή ετερογένεια των TILs. Ωστόσο, πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες χρησιμοποιούν TMAs, με αξιόπιστα αποτελέσματα.



### 7.2.2 Εκτίμηση των TILS στις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις

Η εκτίμηση του βαθμού της ανοσοδιήθησης από TILs πραγματοποιήθηκε σε διοφθάλμιο οπτικό μικροσκόπιο πολλαπλής συμπαρατήρησης. Αρχικά, οι χρωματισμένες τομές εξετάστηκαν σε χαμηλή μεγέθυνση ( $\times 100$  magnification) για την επιλογή της υπό αξιολόγηση περιοχής. Πρώτα έπρεπε να αναγνωριστούν οι περιοχές του όγκου και να εξαιρεθούν οι περιοχές νέκρωσης, τεχνικών σφαλμάτων-σύνθλιψης (crush artifacts) καθώς και περιοχές φυσιολογικού ιστού ή λίπους. Τα TILs αξιολογήθηκαν εντός των ορίων του διηθητικού στοιχείου του όγκου. Το διηθητικό όριο συμπεριλήφθηκε στην αξιολόγηση και δεν καταγράφηκε ξεχωριστά (ως διηθητικό όριο εκλήφθηκε η περιοχή 1mm, η οποία διαχωρίζει το νεοπλασματικό στοιχείο από την παρακείμενη περιτομική περιοχή). Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες, δεν συμπεριλήφθηκαν τα TILs εκτός των ορίων του όγκου. Ως θετικότητα, ορίστηκε η σαφής μεμβρανική κυτταροπλασματική ανοσοχρώση για τα CD3 και CD8 λεμφοκύτταρα και η πυρηνική ανοσοχρώση για τα FOXP3 λεμφοκύτταρα. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε υψηλότερη μεγέθυνση ( $\times 400$  magnification) σε συγκεκριμένη επιφάνεια οπτικού πεδίου, την οποία έχει το συγκεκριμένο μικροσκόπιο, με εμβαδόν  $0,24\text{mm}^2$  ( $0.2374625\text{mm}^2$ ). Το εμβαδόν υπολογίστηκε ως εξής:

Κάθε HPF (high magnification  $\times 400$ ) έχει εμβαδόν

$$E = \pi r^2 = 3.14 \times (\text{διάμετρος}/2)^2 = 3.14 \times 0.275^2 = 0.2374625\text{mm}^2 = 0.24\text{mm}^2$$

$$2\text{HPF} \rightarrow \text{Εμβαδόν } 2E = 2 \times 0.2374625\text{mm}^2 = 0.474925\text{mm}^2$$

$$4\text{HPF} \rightarrow \text{Εμβαδόν } 4E = 4 \times 0.2374625\text{mm}^2 = 0,94985\text{mm}^2$$

Ο αριθμός των θετικών ανοσοκυττάρων εκτιμήθηκε σε έως και 10 οπτικά πεδία υψηλής μεγέθυνσης ( $\times 400$ ) στο βιοπτικό υλικό κάθε ασθενούς. Ορίστηκε ότι το κάθε οπτικό πεδίο καταλαμβάνεται από 100% νεοπλασματικό στοιχείο (Tumor Cell Component, TCC). Ακολούθως αναγνωρίστηκε στο κάθε πεδίο το ποσοστό του στρωματικού στοιχείου (% Stromal Cell Component, SC) και το ποσοστό του επιθηλιακού στοιχείου (% Epithelial Cell Component, EC). Ο διαχωρισμός των δύο συστατικών του όγκου βασίστηκε στις κατευθυντήριες οδηγίες όπως ορίστηκαν από τον Salgado et al(202). Ακολούθως, έγινε καταμέτρηση των ενδοογκικών (intratumoral, iTILs) και των στρωματικών (stromal, sTILs) αντίστοιχα. Ως ενδοογκικά TILs ορίζονται τα TILs που βρίσκονται σε άμεση επαφή με τα νεοπλασματικά κύτταρα ή απέχουν από αυτά απόσταση της τάξης ενός λεμφοκυττάρου. Ως στρωματικά TILs ορίζονται τα TILs που βρίσκονται διάσπαρτα στο στρώμα μεταξύ των νεοπλασματικών αθροίσεων. Συνεπώς καταμετρήθηκε ξεχωριστά ο αριθμός των στρωματικών (sCD3, sCD8, sFOXP3) και των ενδοογκικών (iCD3, iCD8, iFOXP3) λεμφοκυττάρων. Επίσης, στην αξιολόγηση δεν εστιάσαμε σε περιοχές hot spot. Τα δεδομένα που προέκυψαν καταγράφηκαν σε ηλεκτρονικό σύστημα.

Ακολούθως, υπολογίστηκε η πυκνότητα των CD8, CD3, FOXP3, τόσο των στρωματικών όσο και των ενδοεπιθηλιακών. Η πυκνότητα (density) ορίστηκε ως ο λόγος του αριθμού των

θετικών κυττάρων προς την εκτιμώμενη επιφάνεια του όγκου (σε mm<sup>2</sup>), δηλαδή προς το επί τοις εκατό του διαμερίσματος (EC ή SC) επί το εμβαδόν(203),(204). Ως παράδειγμα, εάν υποθέσουμε ότι το EC ήταν 60% και το SC ήταν 40% δεδομένου ότι το TCC είναι πάντα 100%, ο αριθμός των θετικών iCD8 ήταν 20 και ο αριθμός των sCD8 ήταν 60 τότε:

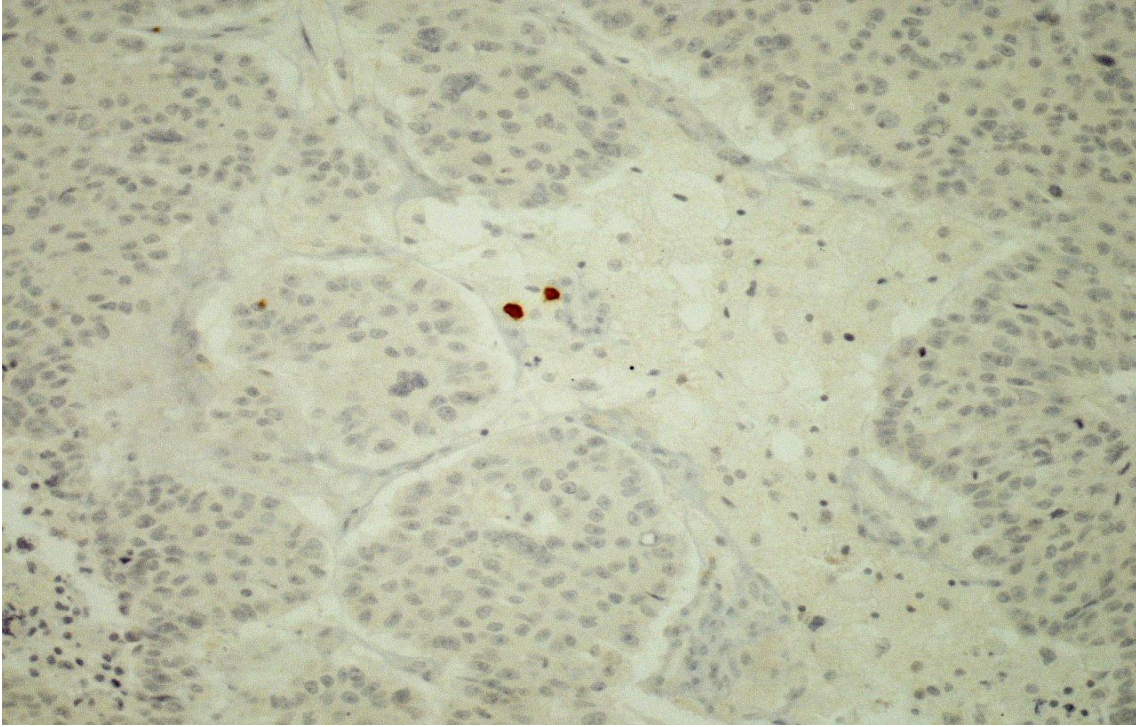
**η πυκνότητα των iCD8 προσδιορίσθηκε ως εξής:**

$$\text{Density} = \frac{\text{count iCD8 (20)}}{\text{TCC(100\%)\times EC(60\%)\times \text{εμβαδόν}(0.24)}$$

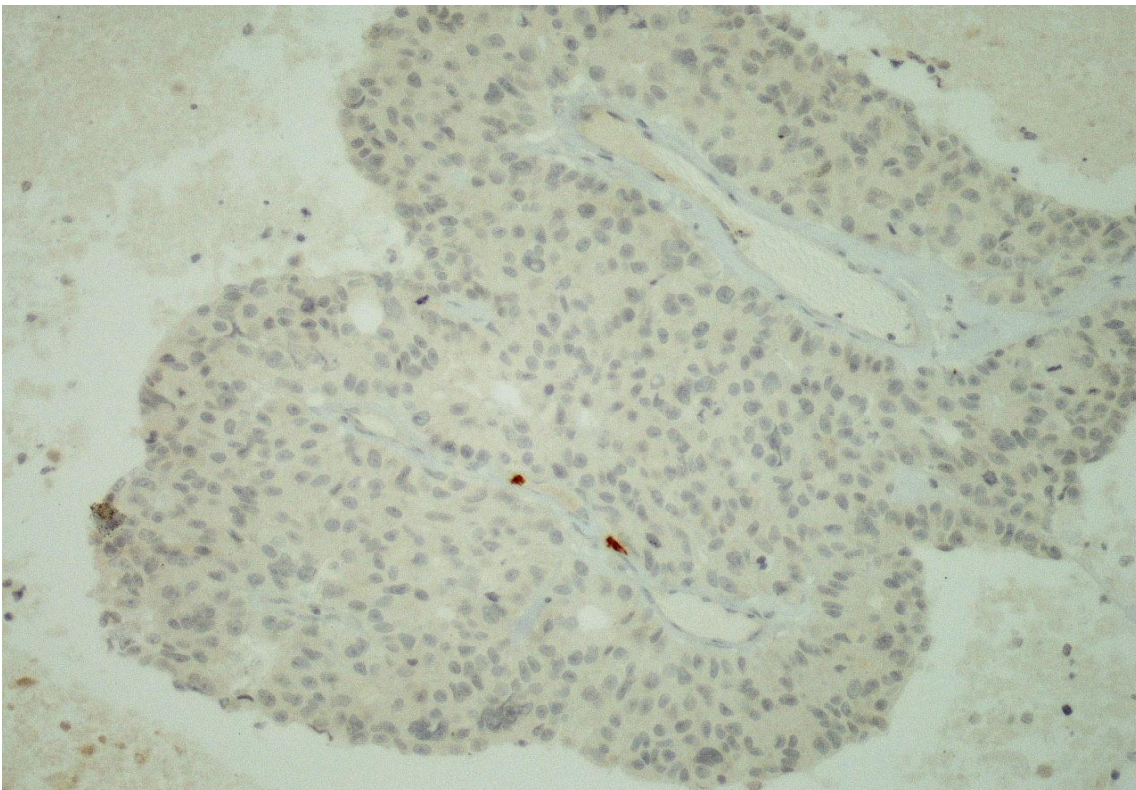
**και η πυκνότητα των sCD8 ως εξής:**

$$\text{Density} = \frac{\text{count sCD8 (60)}}{\text{TCC(100\%)\times SC(40\%)\times \text{εμβαδόν}(0.24)}$$

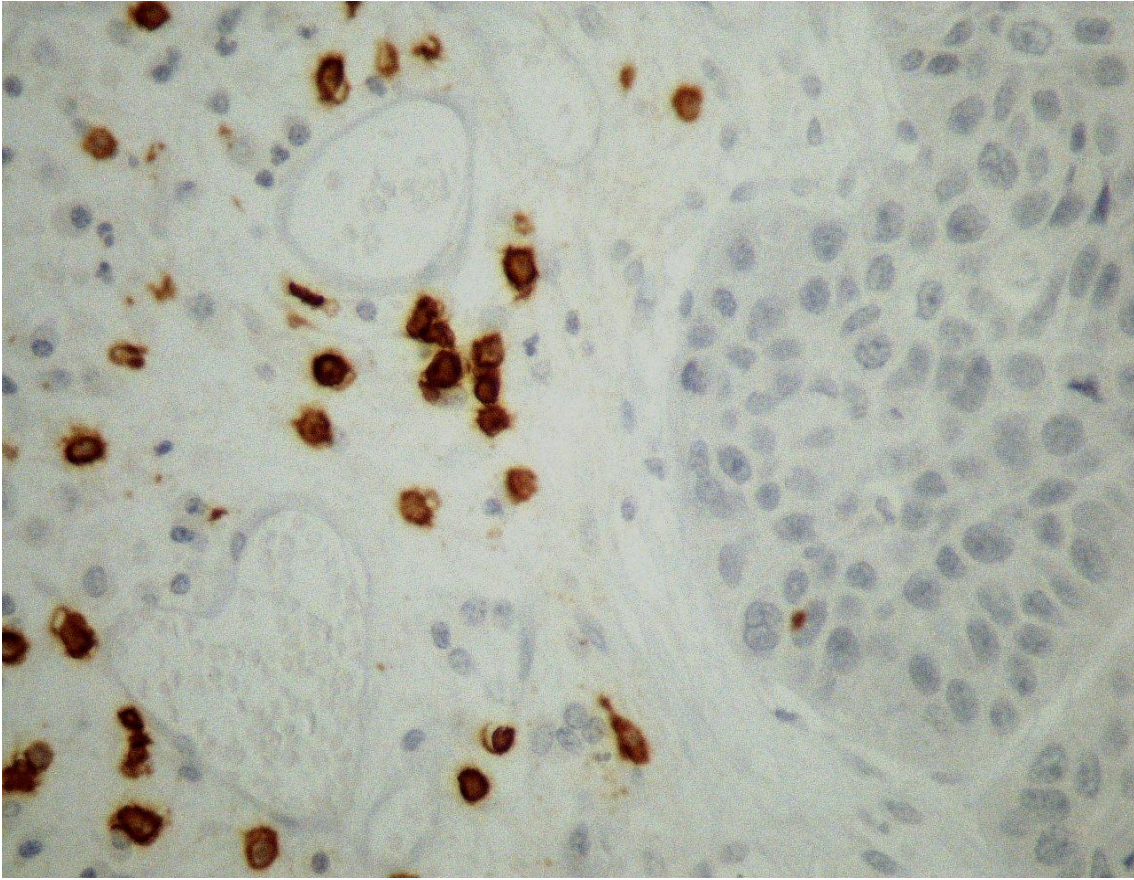
Ο αριθμός των TILs (CD8, CD3, FOXP3) σε κάθε οπτικό πεδίο υπολογίστηκε με καταμέτρηση ενός προς ενός. Η διάμεση τιμή των πυκνοτήτων (median values) των θετικών ανοσοκυττάρων ανά περίπτωση, για κάθε υπό μελέτη λεμφοκυτταρικό πληθυσμό χρησιμοποιήθηκε ως cut-off για να κατηγοριοποιήσει την κάθε περίπτωση σε υψηλής (high) και χαμηλής (low) έκφρασης σε CD3, CD8, FOXP3 στο στρώμα, στο επιθηλιακό στοιχείο και ολικά.



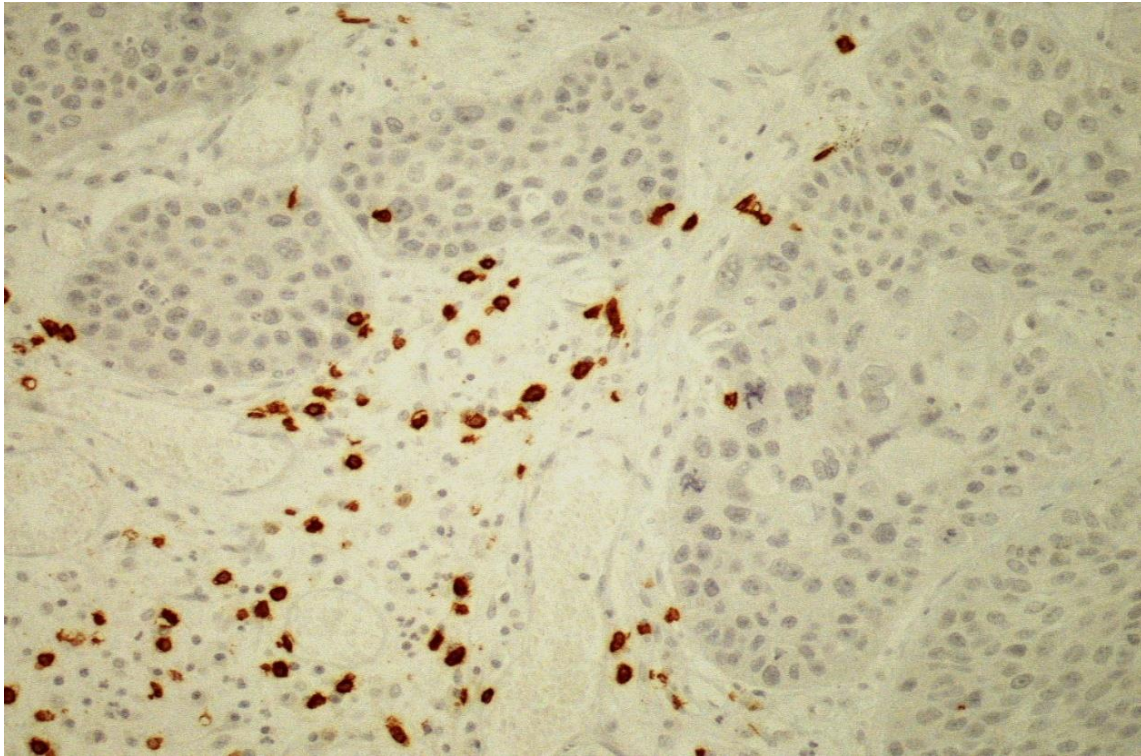
Εικόνα 9. Εικόνα 9. CD8 x200, low stromal, low intraepithelial.



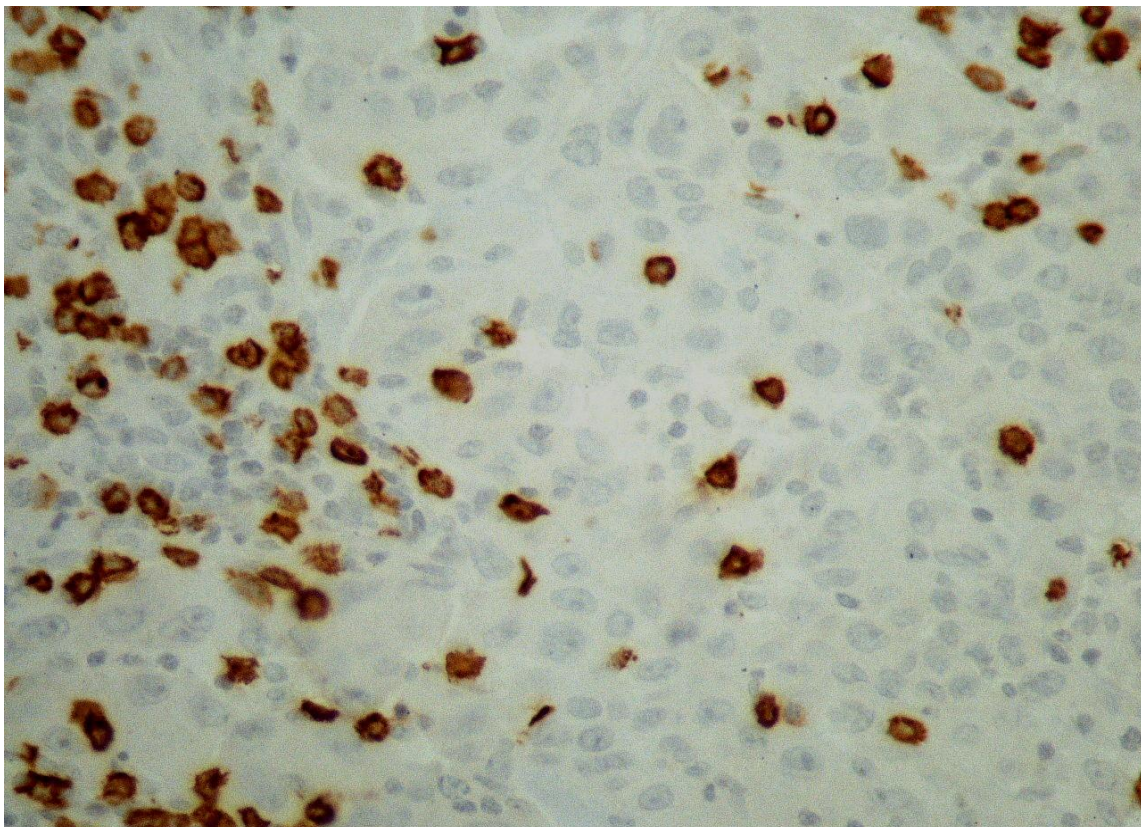
Εικόνα 10. CD8 x200, low stromal, low intraepithelial.



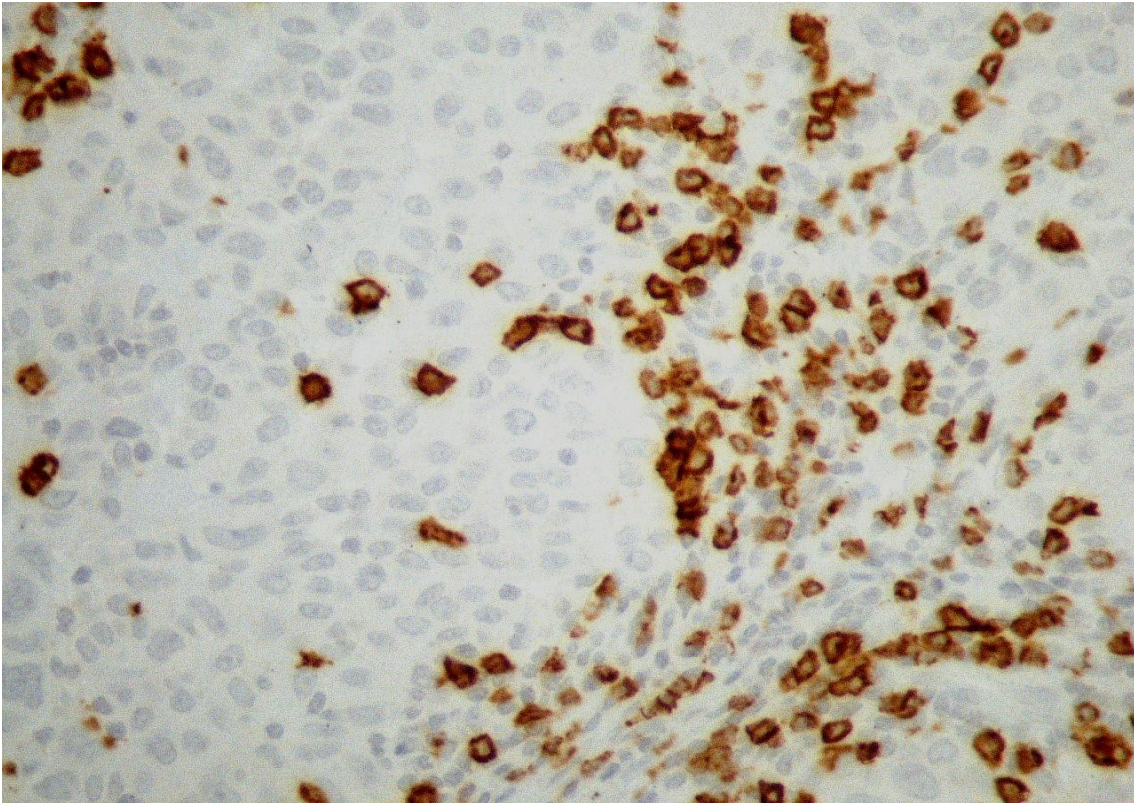
*Εικόνα 11. CD8 x600, high stromal, low intraepithelial.*



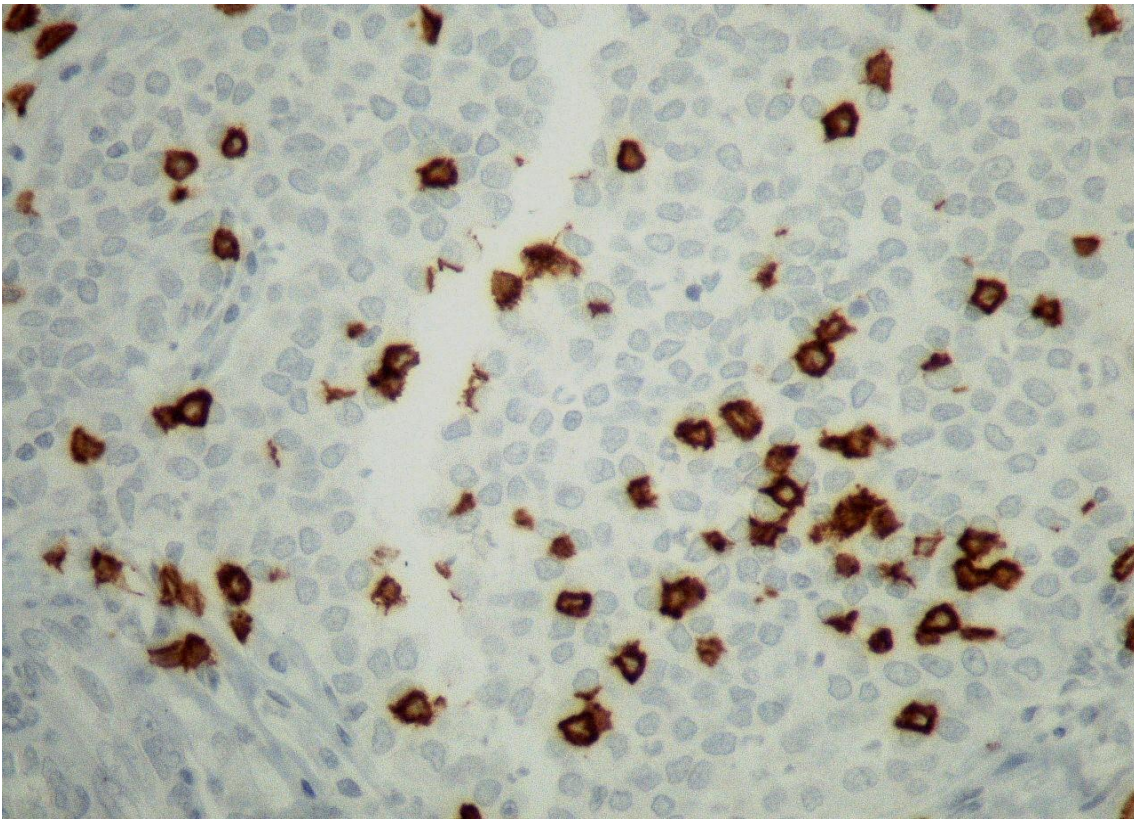
*Εικόνα 12. CD8 x200, high stromal, low intraepithelial.*



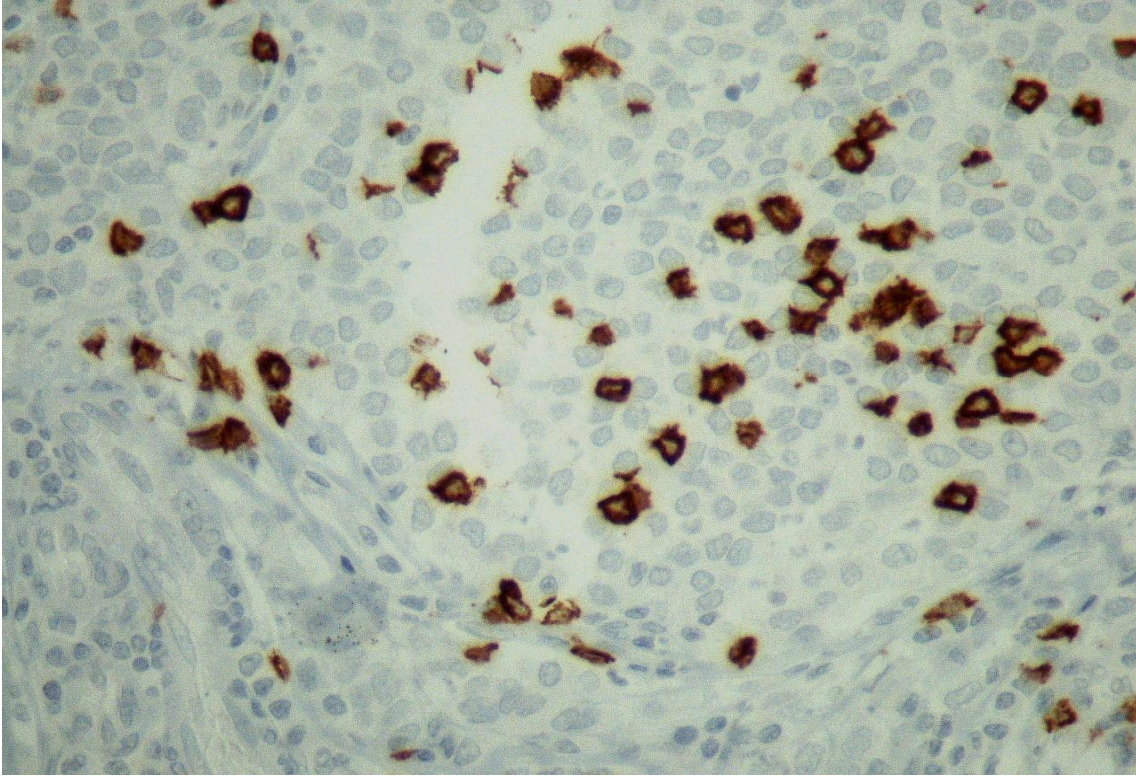
*Εικόνα 13. CD8 x400, high stromal, high intraepithelial.*



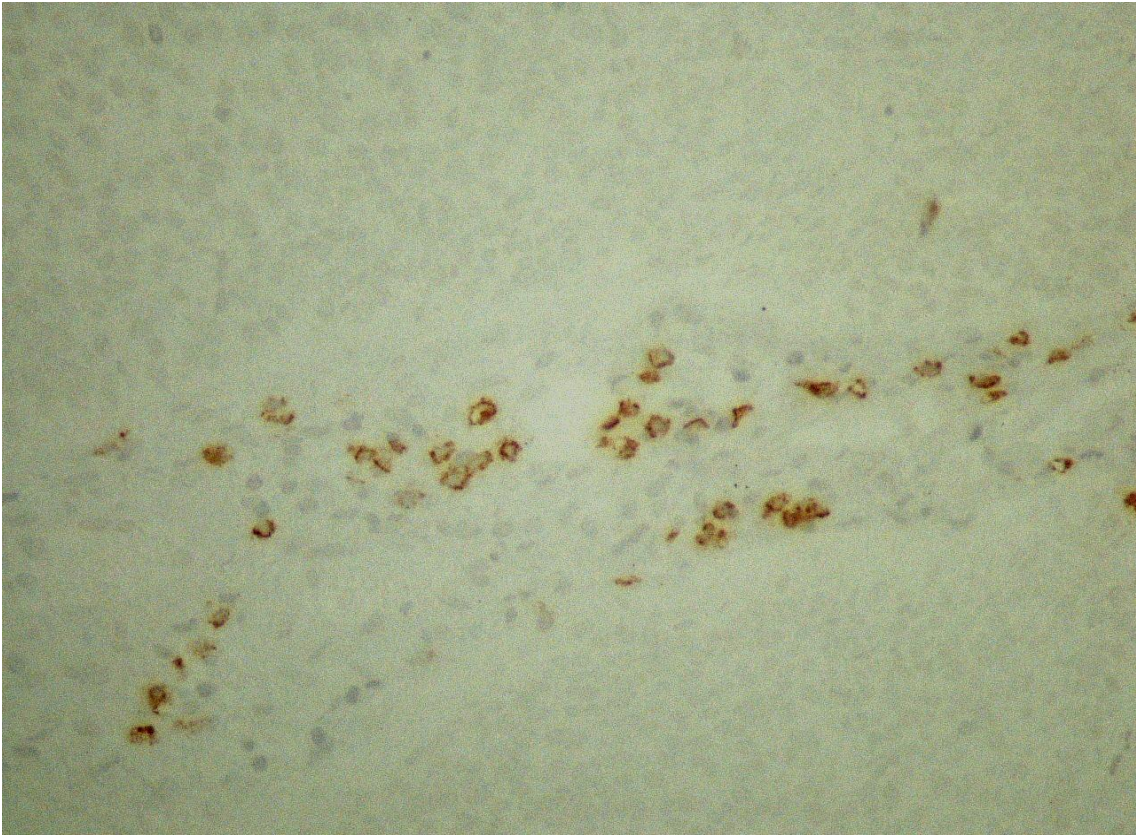
*Εικόνα 14. CD8 x400-1, high stromal, high intraepithelial.*



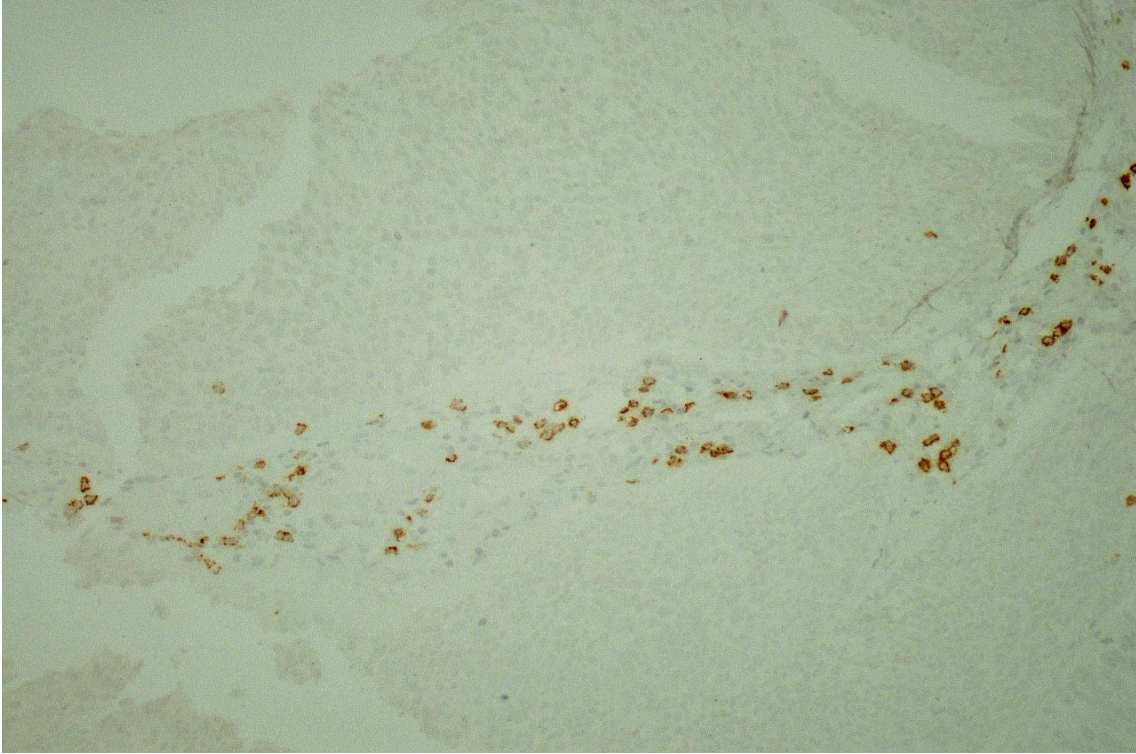
*Εικόνα 15. CD8 x400, low stromal, high intraepithelial.*



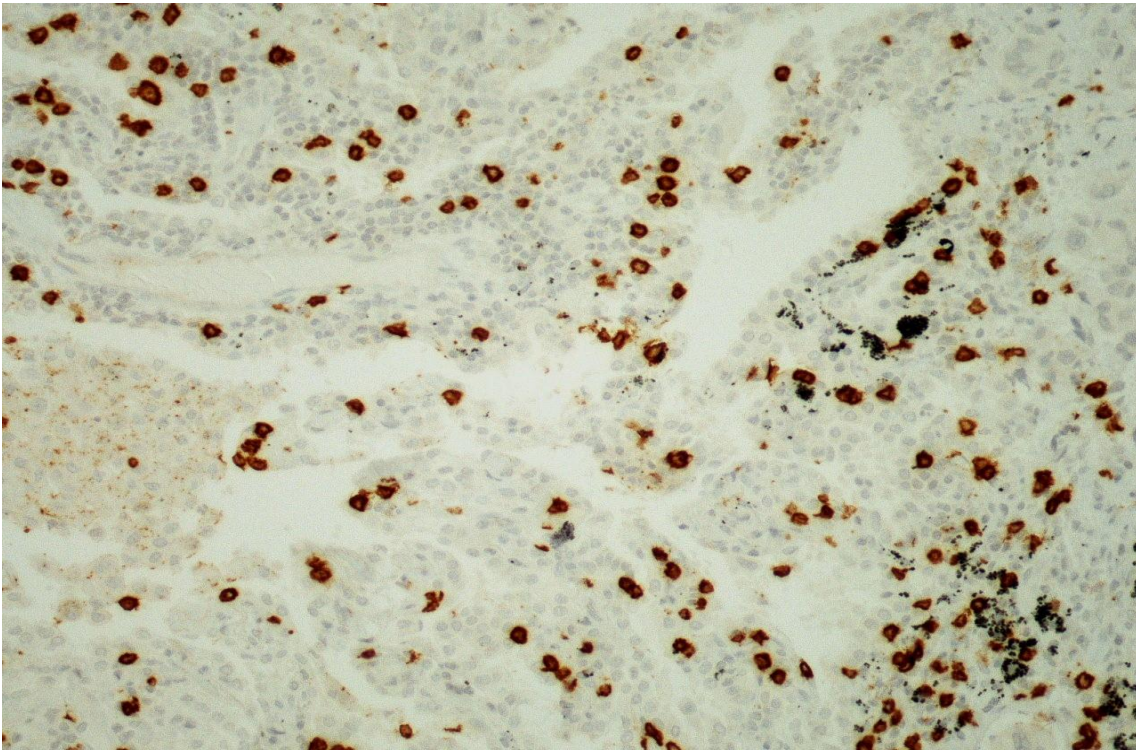
*Εικόνα 16. CD8 x400, low stromal, high intraepithelial.*



*Εικόνα 17. CD8 x400, primary tumor urothelial.*

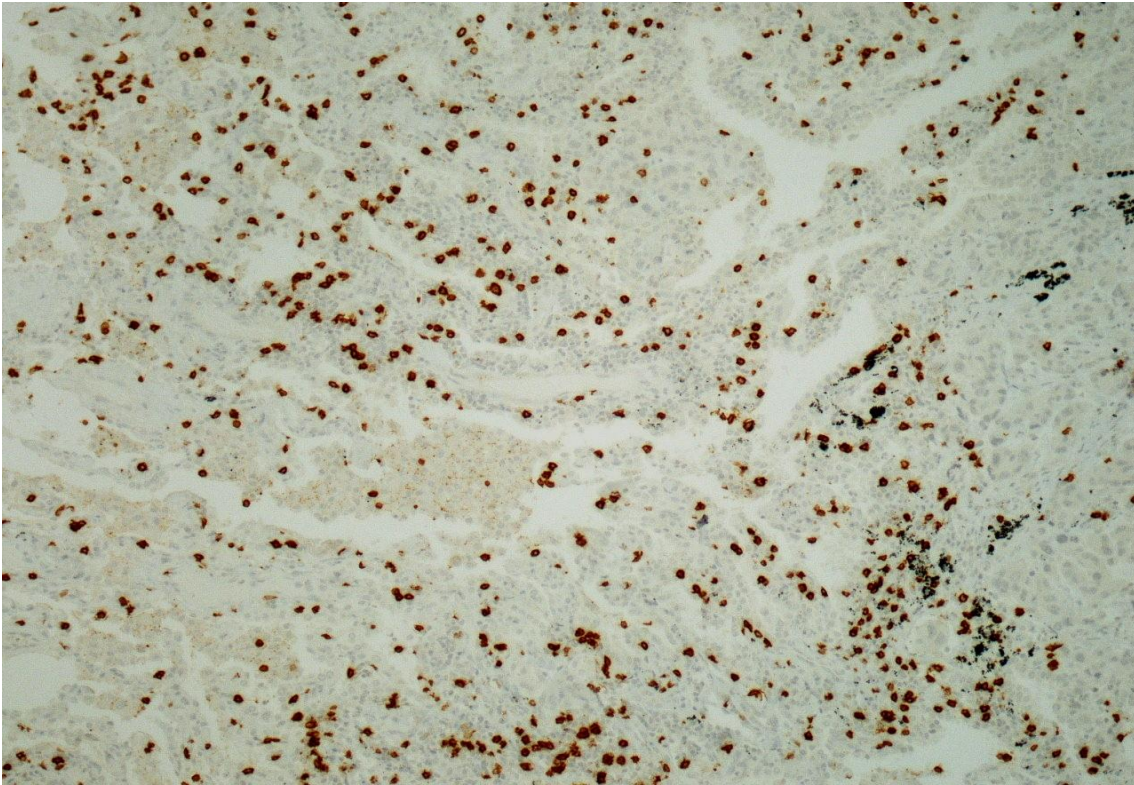


*Εικόνα 18. CD8 x200, primary tumor urothelial.*

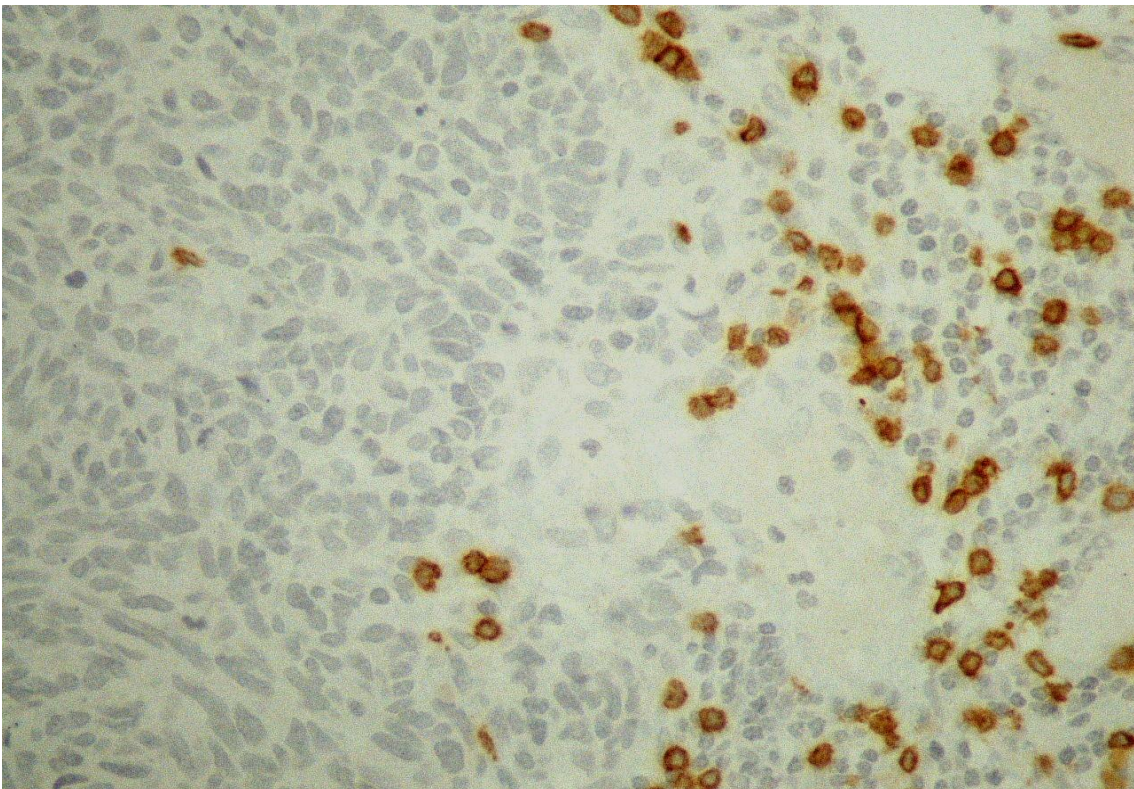


*Εικόνα 19. CD8 x200 primary tumor lung.*

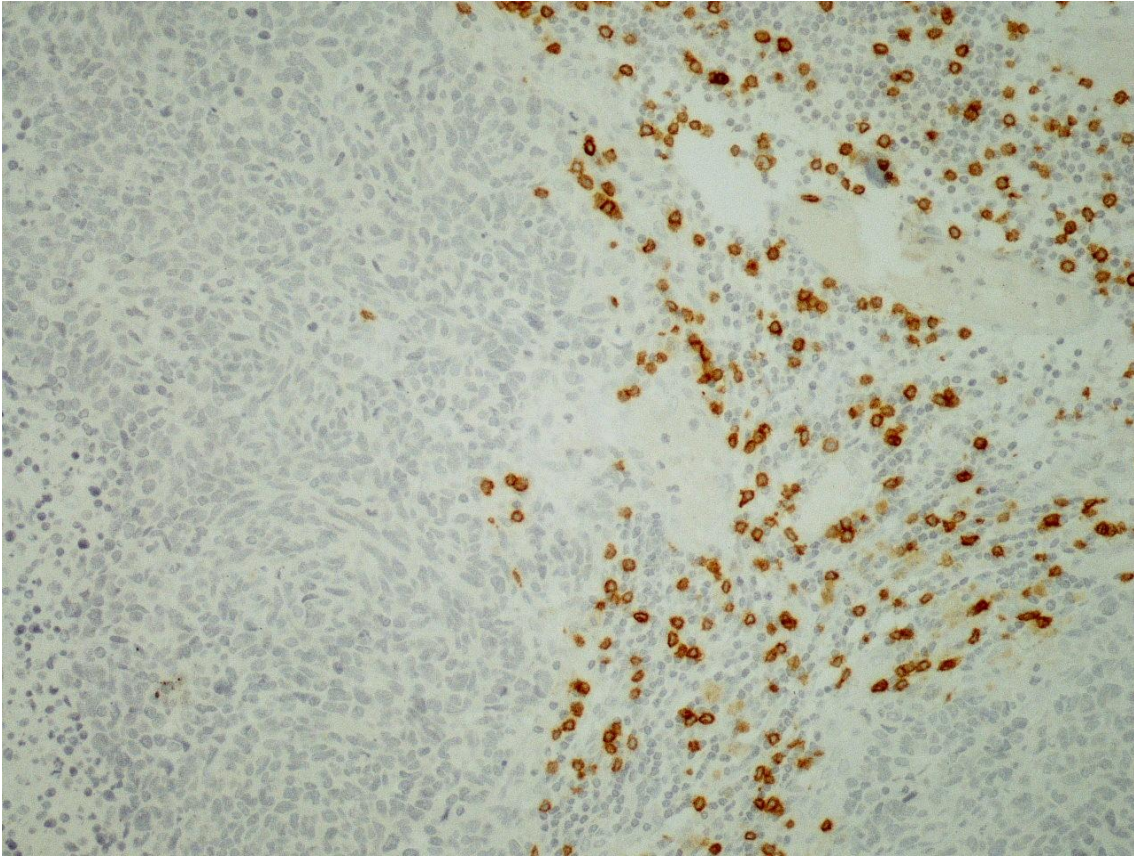




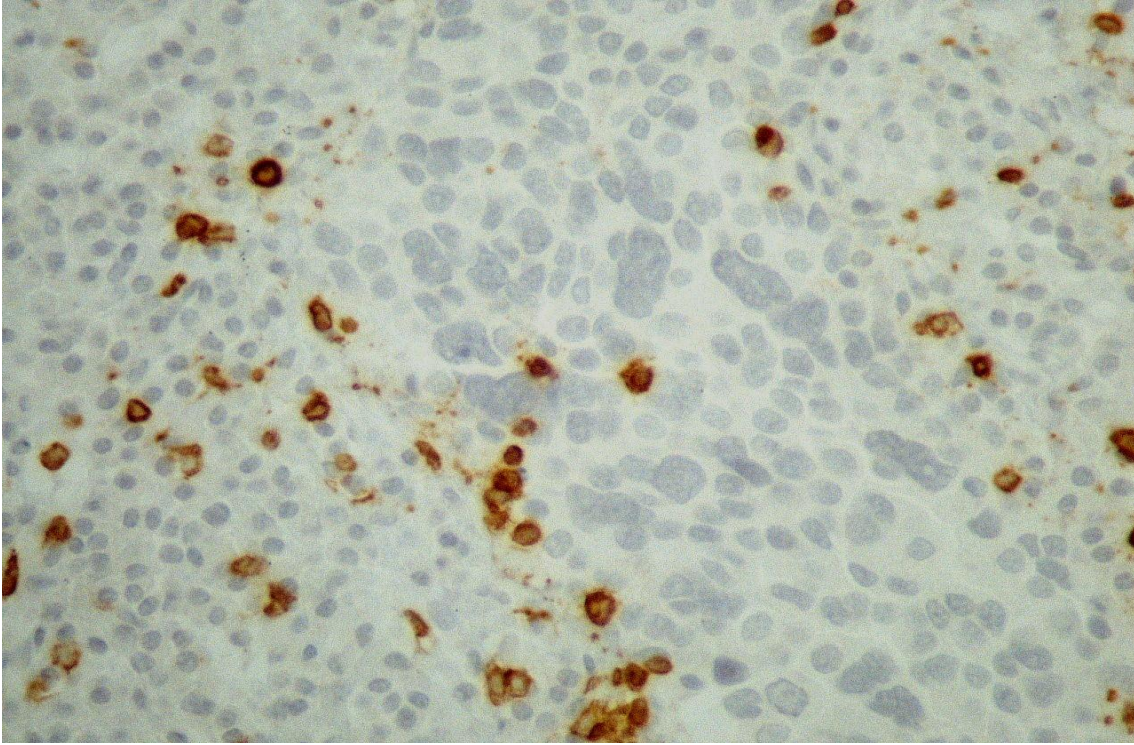
*Εικόνα 20. CD8 x100 primary tumor lung.*



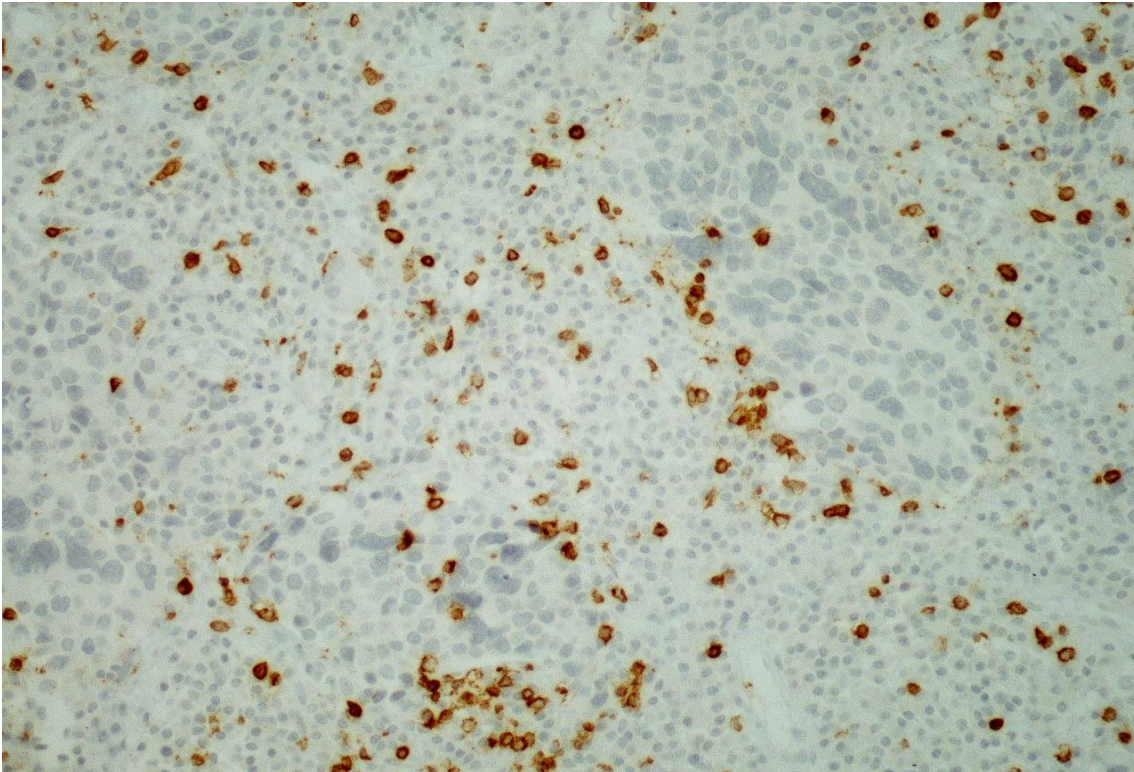
*Εικόνα 21. CD3 x400, high stromal, low intraepithelial*



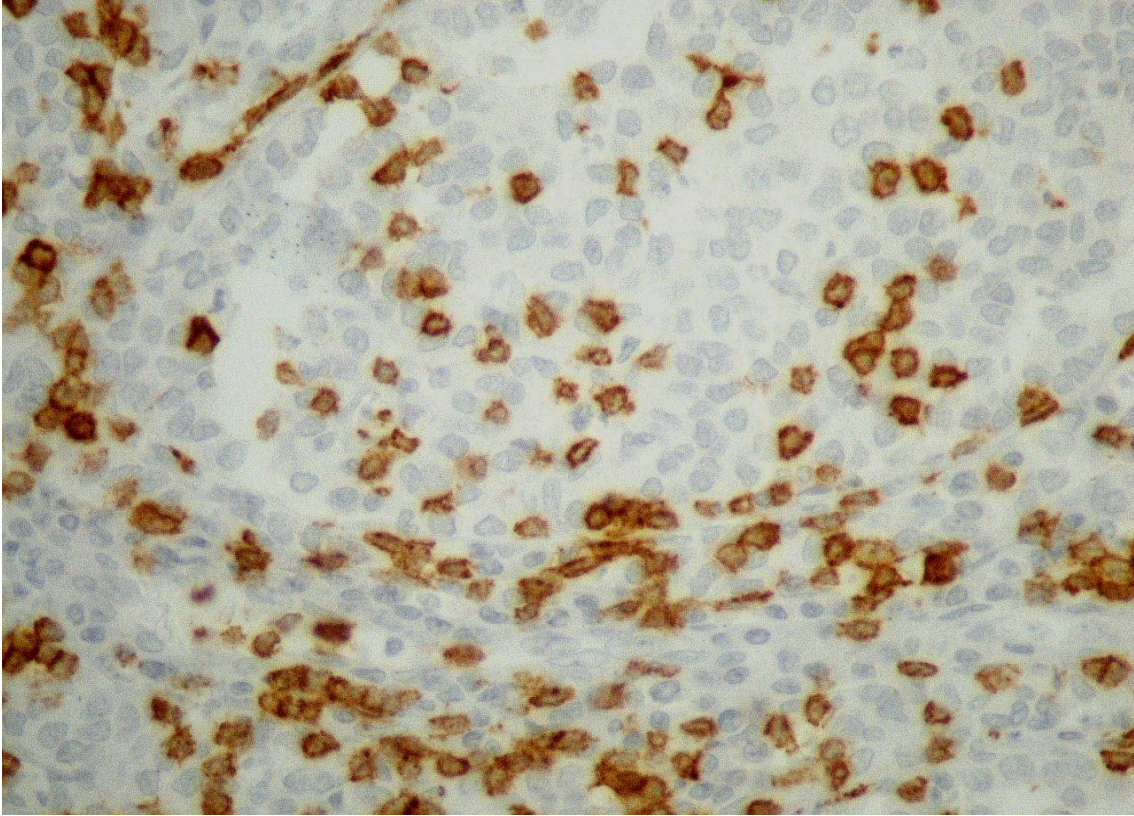
*Εικόνα 22. CD3 x200, high stromal, low intraepithelial*



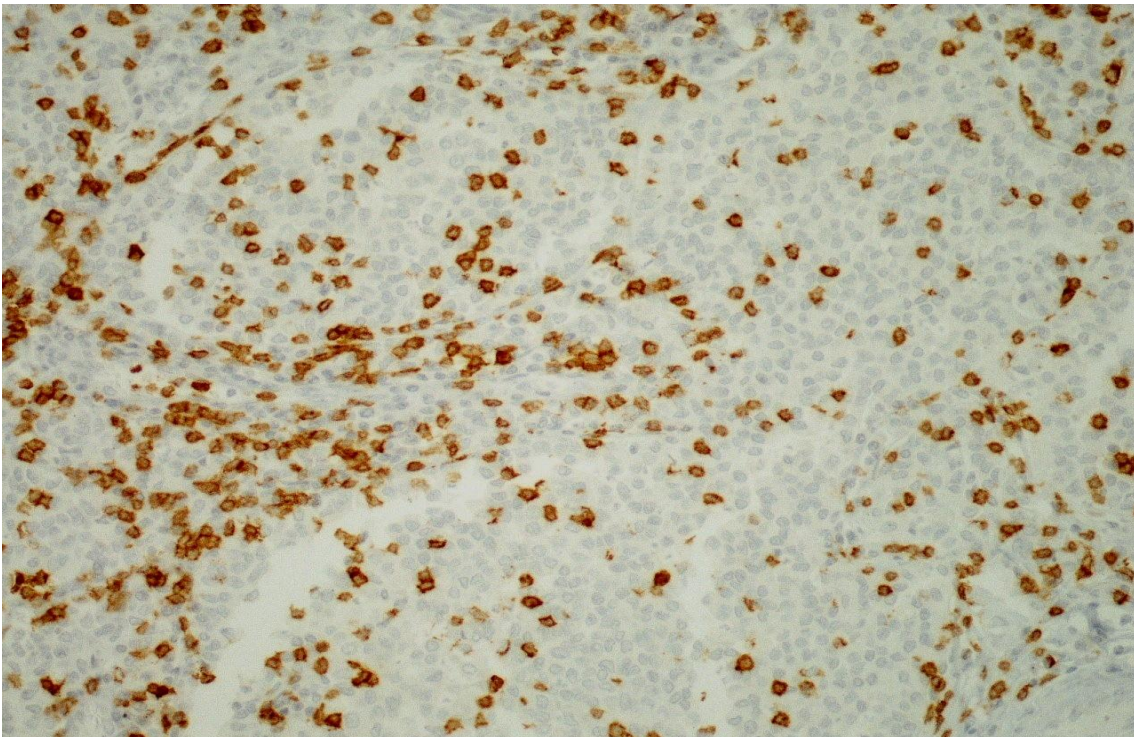
*Εικόνα 23. CD3 x400, high stromal, high intraepithelial.*



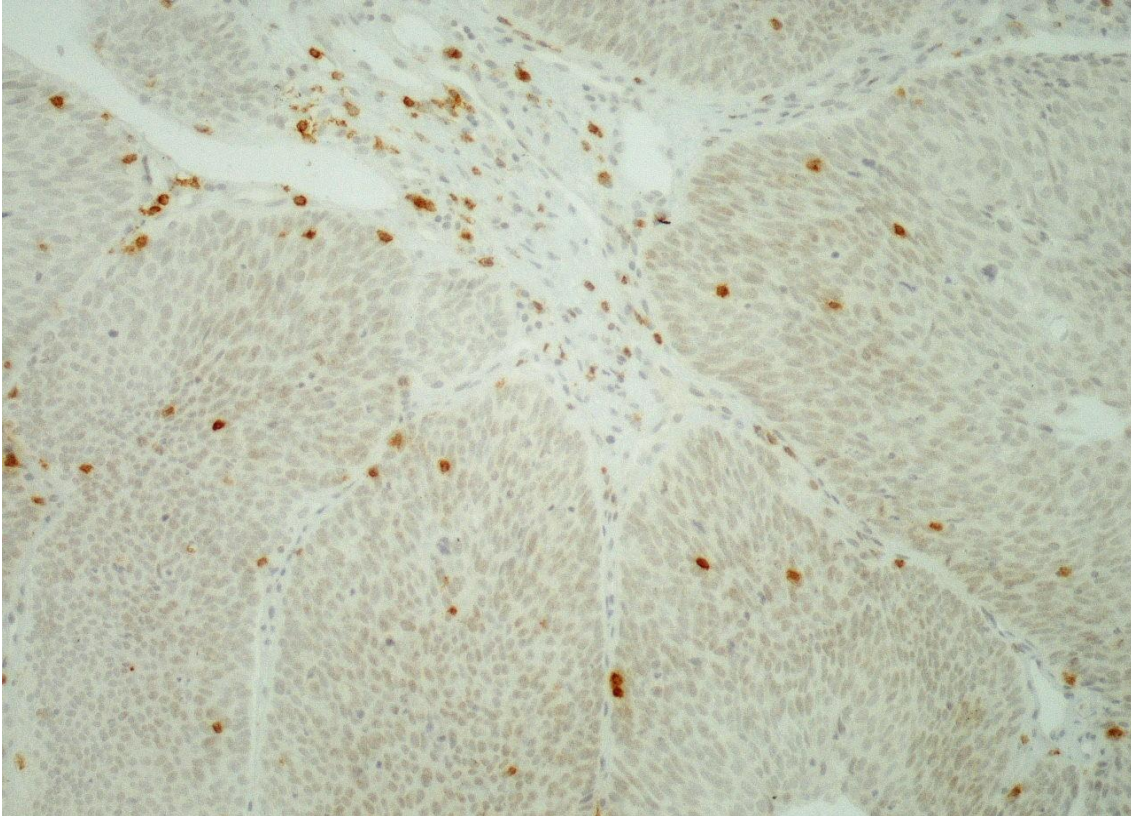
*Εικόνα 24. CD3 x400, high stromal, high intraepithelial.*



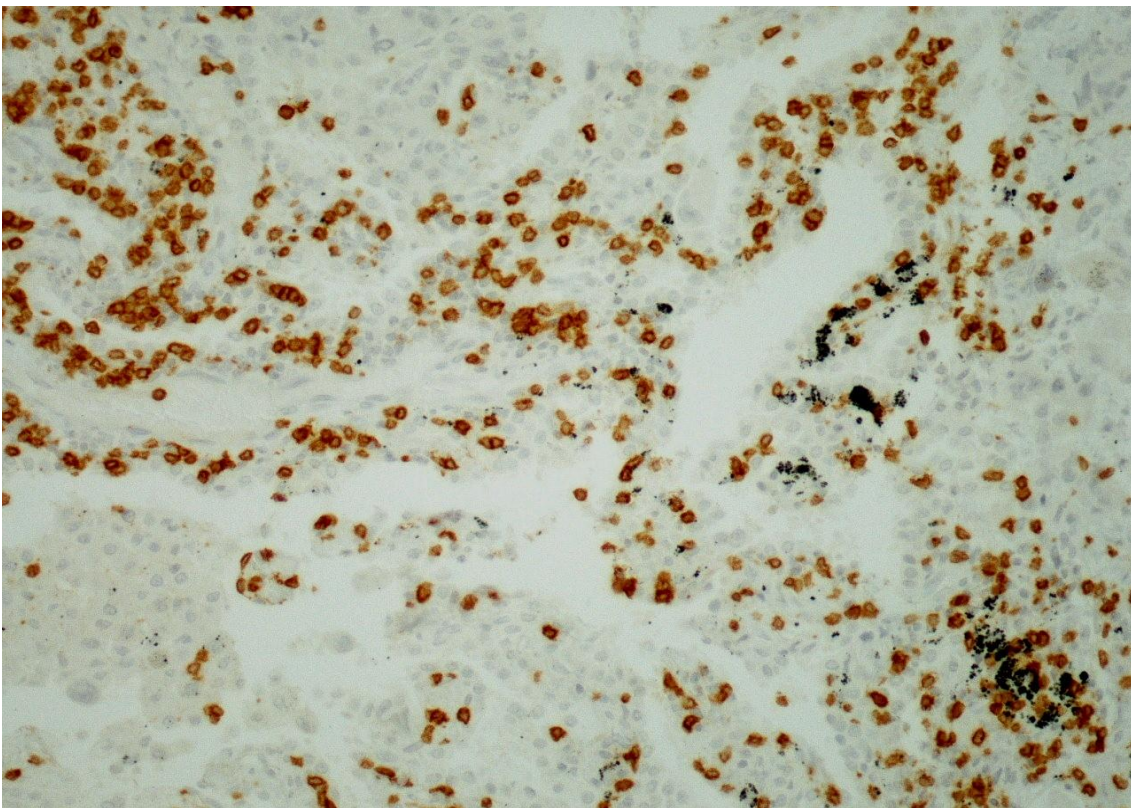
*Εικόνα 25. CD3 x400,high stromal, high intraepithelial.*



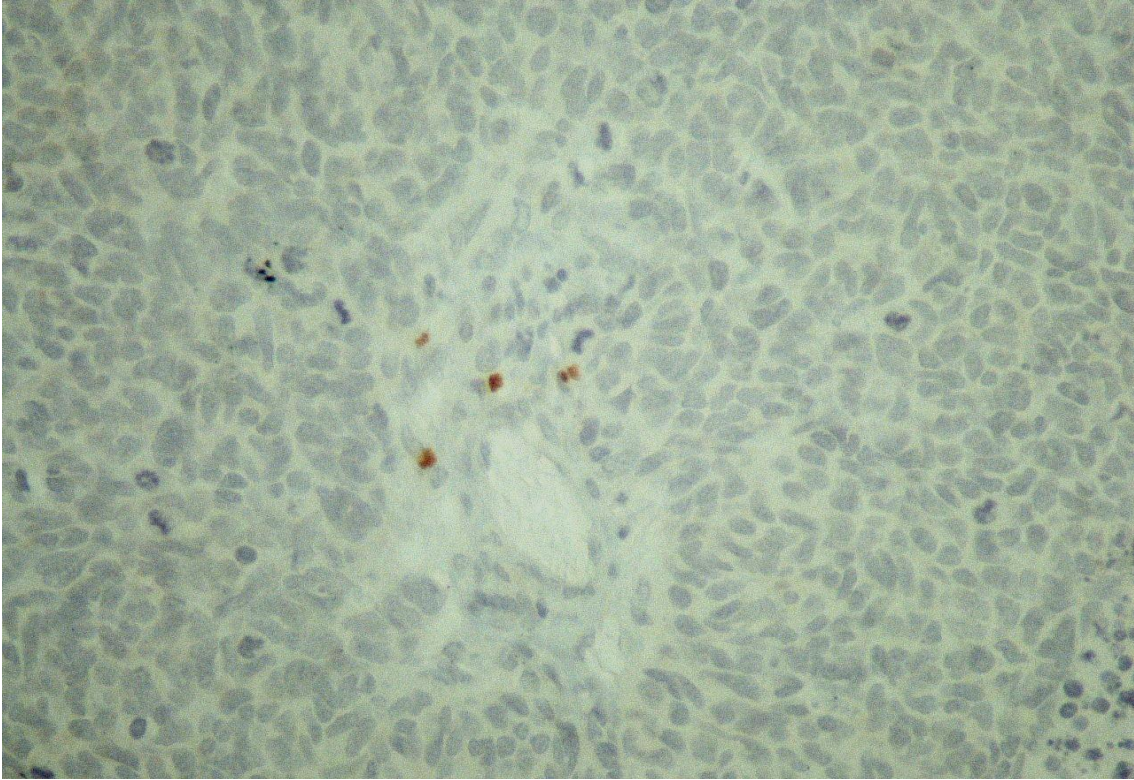
*Εικόνα 26. CD3 x200,high stromal, high intraepithelial.*



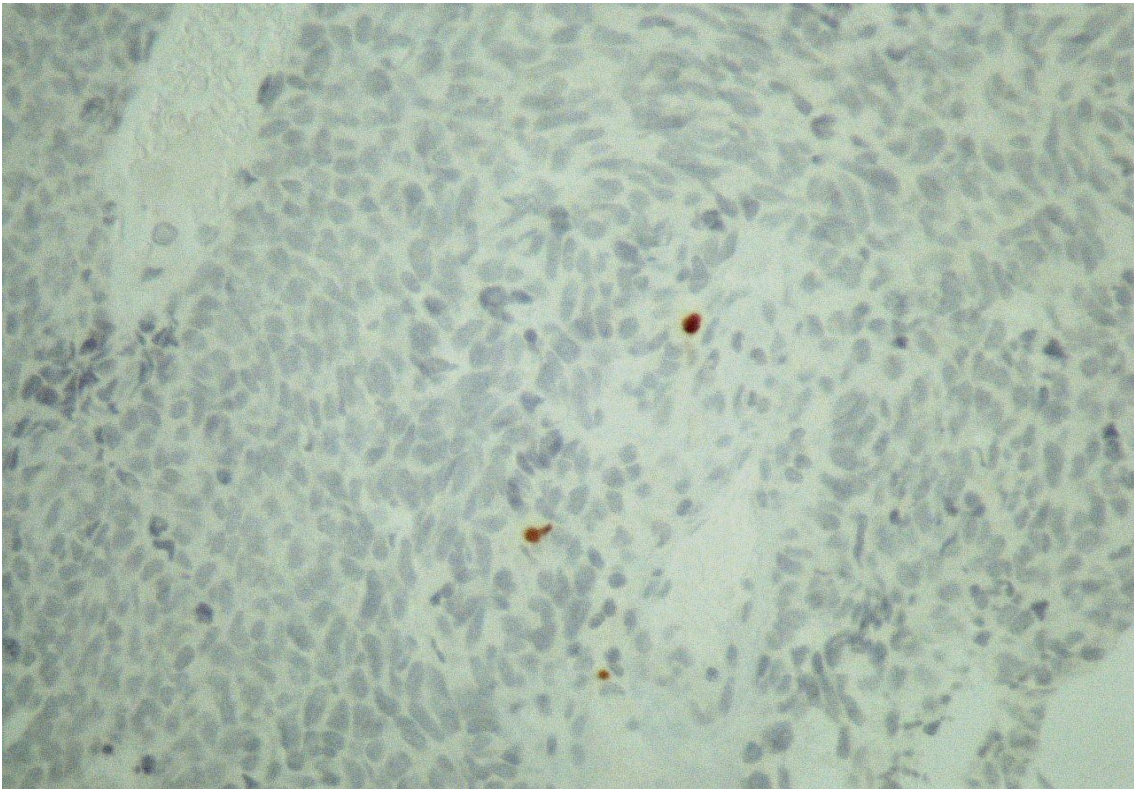
*Εικόνα 27. CD3 x200, primary tumor urothelial.*



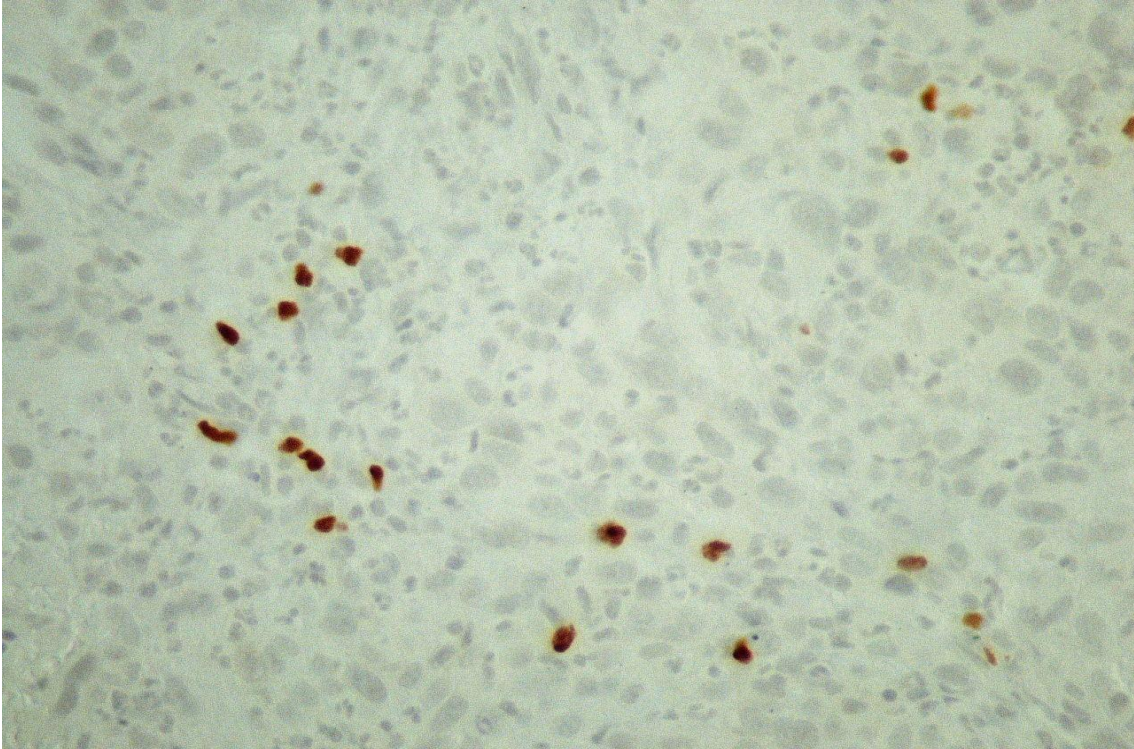
*Εικόνα 28. CD3 x200, primary tumor lung.*



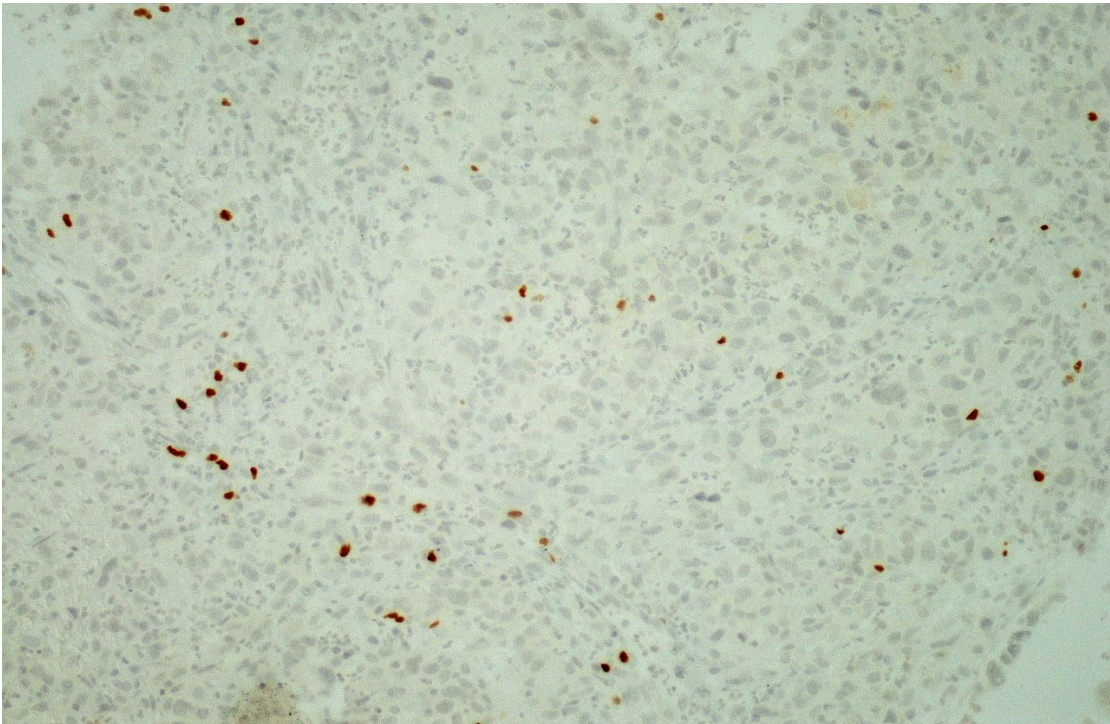
*Εικόνα 29. FOXP3 x400-2*



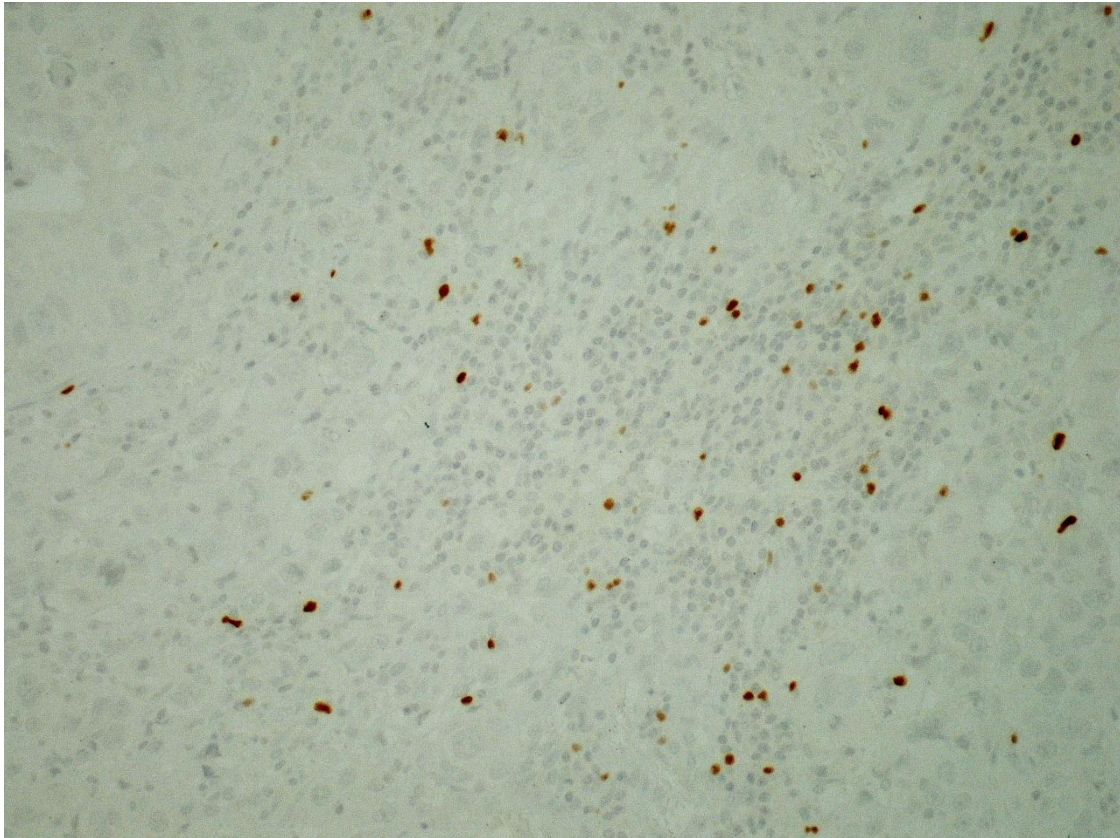
*Εικόνα 30. FOXP3 x400*



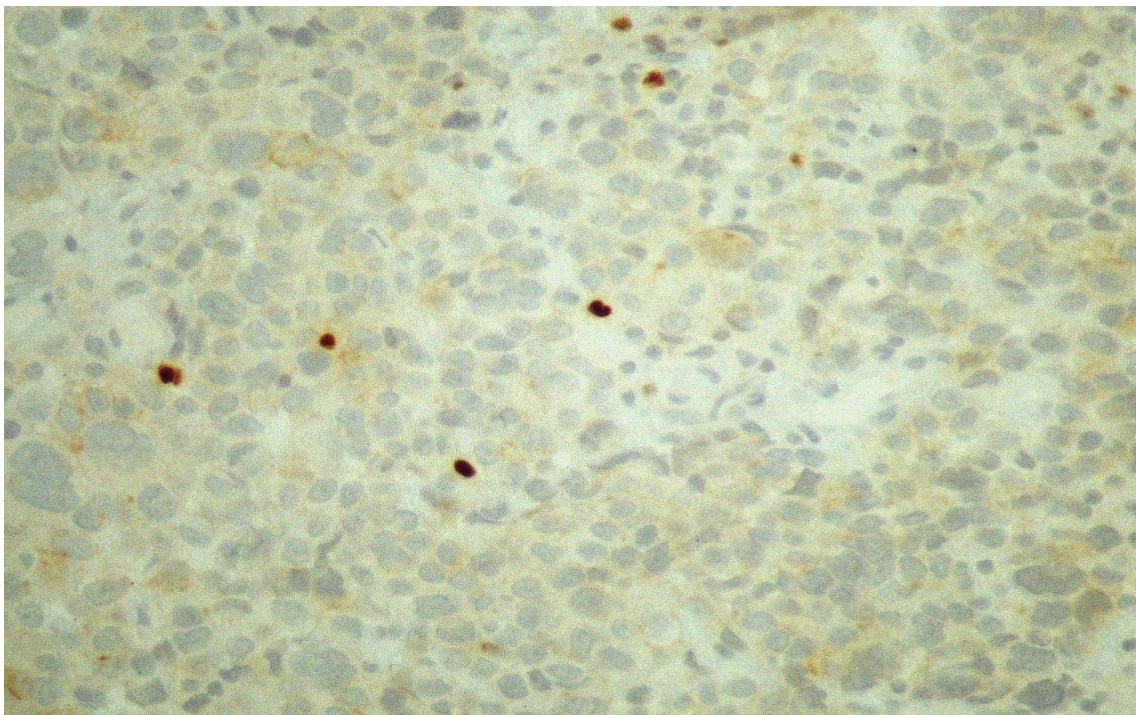
*Εικόνα 31 FOXP3 x400-2*



*Εικόνα 32. FOXP3 x200*

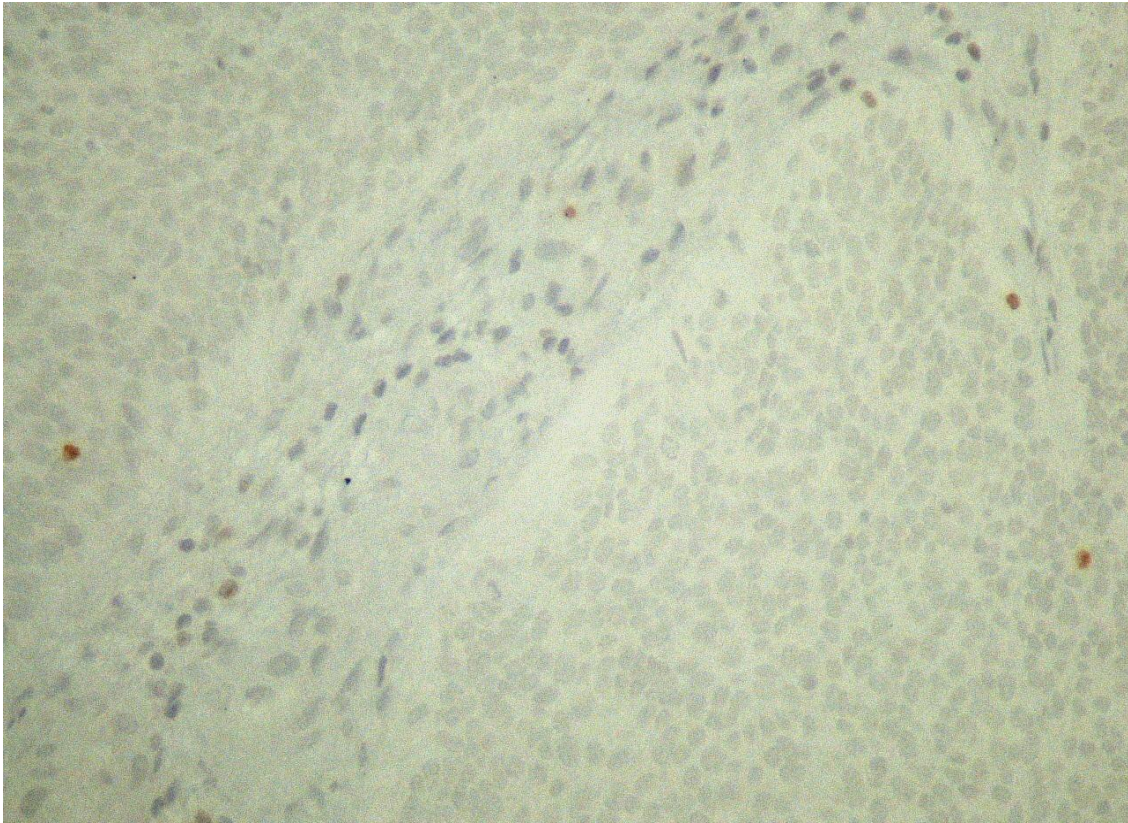


*Εικόνα 33. FOXP3 x200*

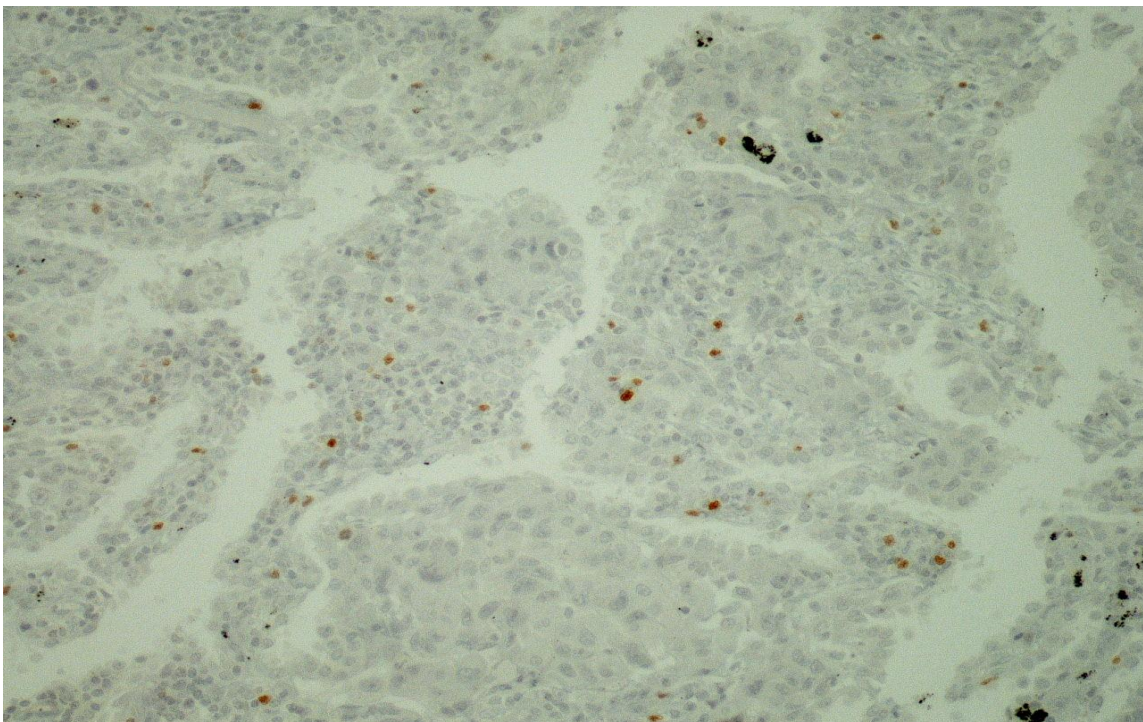


*Εικόνα 34. FOXP3 x400*





*Εικόνα 35. FOXP3 x400, primary tumor urothelial*



*Εικόνα 36. FOXP3 x200, primary tumor lung.*

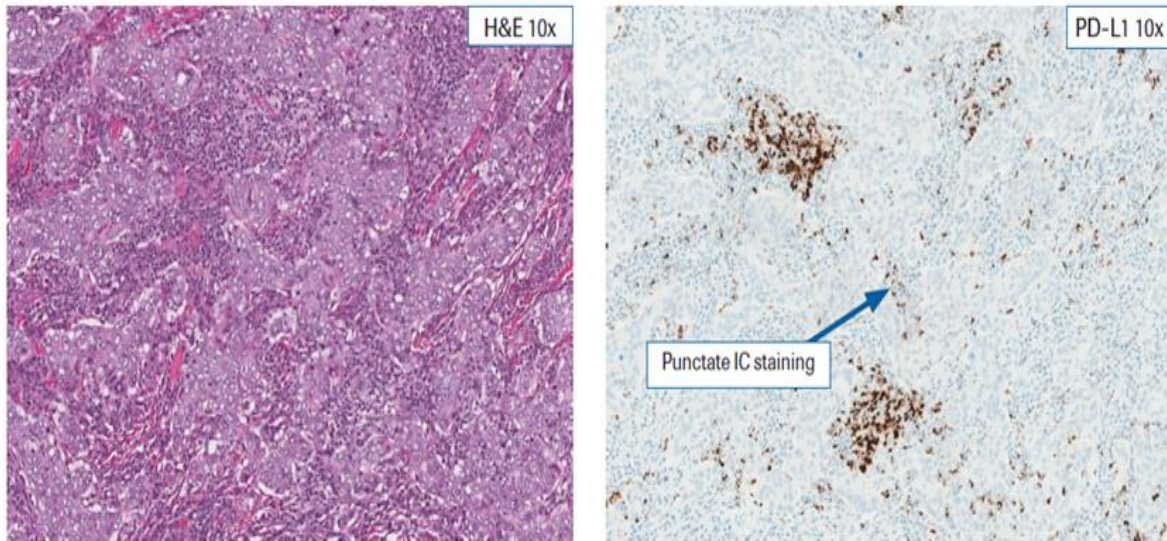
### 7.2.3 Εκτίμηση του PD-L1 στις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις

Η εκτίμηση της θετικής έκφρασης του PD-L1, στις ιστολογικές τομές, πραγματοποιήθηκε με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο με την εφαρμογή του διαγνωστικού τεστ PD-L1(SP142) Ventana. Η ανίχνευση του PD-L1 αντιγόνου πραγματοποιήθηκε σε μικροσκόπιο διπλής συμπαρατήρησης και η εκτίμησή του βασίστηκε στις προτεινόμενες οδηγίες αξιολόγησης του συγκεκριμένου αντισώματος (Interpretation guide for Ventana PD-L1 assay). Η εκτίμηση βασίστηκε στα κάτωθι βήματα:

1. Εξέταση των ιστολογικών τομών σε χαμηλή μεγέθυνση (x2 magnification) αρχικά.
2. Αναγνώριση των περιοχών του όγκου και εξαίρεση των περιοχών νέκρωσης.
3. Επισκόπηση της ανοσόχρωσης στο σύνολο όγκου, τόσο στα φλεγμονώδη κύτταρα(IC) όσο και στα νεοπλασματικά κύτταρα(TC).
4. Ακολούθως, χρησιμοποιήθηκε υψηλότερη μεγέθυνση (x10 ή x20 magnification)
5. Επιβεβαίωση της ανίχνευσης θετικότητας στη χρώση του PD-L1 στα IC, στα TC ή και στα δύο στο στρώμα και ενδοογκικά.
6. Επαναφορά σε χαμηλή μεγέθυνση(2x ή 4x)
7. Βαθμολόγηση της έκφρασης των TC, ως η αναλογία της περιοχής του όγκου επί τοις εκατό που καταλαμβάνεται από TC με θετική ανοσόχρωση στο PD-L1 αντίσωμα, οποιασδήποτε έντασης.
8. Βαθμολόγηση της έκφρασης των IC, ως η αναλογία της περιοχής του όγκου επί τοις εκατό που καταλαμβάνεται από ανοσοκύτταρα με θετική ανοσόχρωση στο PD-L1, οποιασδήποτε έντασης.
9. Αξιολόγηση της έντασης της χρώσης στο ποσοστό θετικών TC, για την οποία χρησιμοποιήθηκε η ημιποσοτική χρώση H-Score. Η ένταση της χρώσης ορίστηκε ως ασθενής(+1), μέτρια(+2), ισχυρή(+3).
10. Τα αποτελέσματα καταγράφηκαν σε ηλεκτρονικό σύστημα για να χρησιμοποιηθούν στη στατιστική ανάλυση.

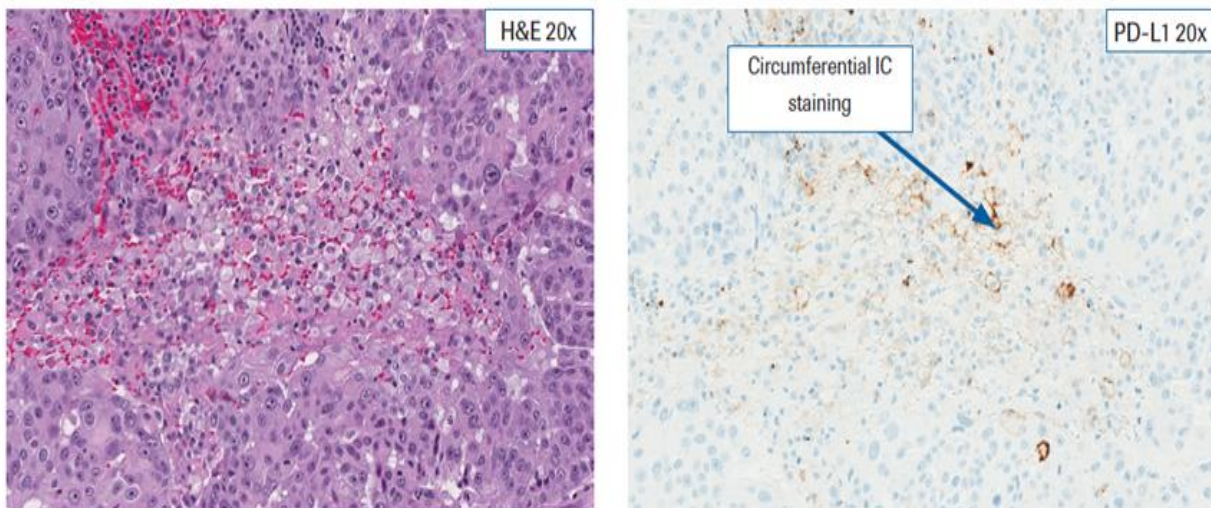
#### **IC ανοσοϊστοχημική χρώση**

Τα ανοσοκύτταρα(IC) υπάρχουν ενδοογκικά(intratumoral) ή στο στρώμα του όγκου(peritumoral). Η ανοόχρωση με το αντίσωμα PD-L1 ανέδειξε έναν ετερογενή πληθυσμό ανοσοκυττάρων, η πλειοψηφία των οποίων ήταν μορφολογικά συνεπής με λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, κοκκιοκύτταρα.

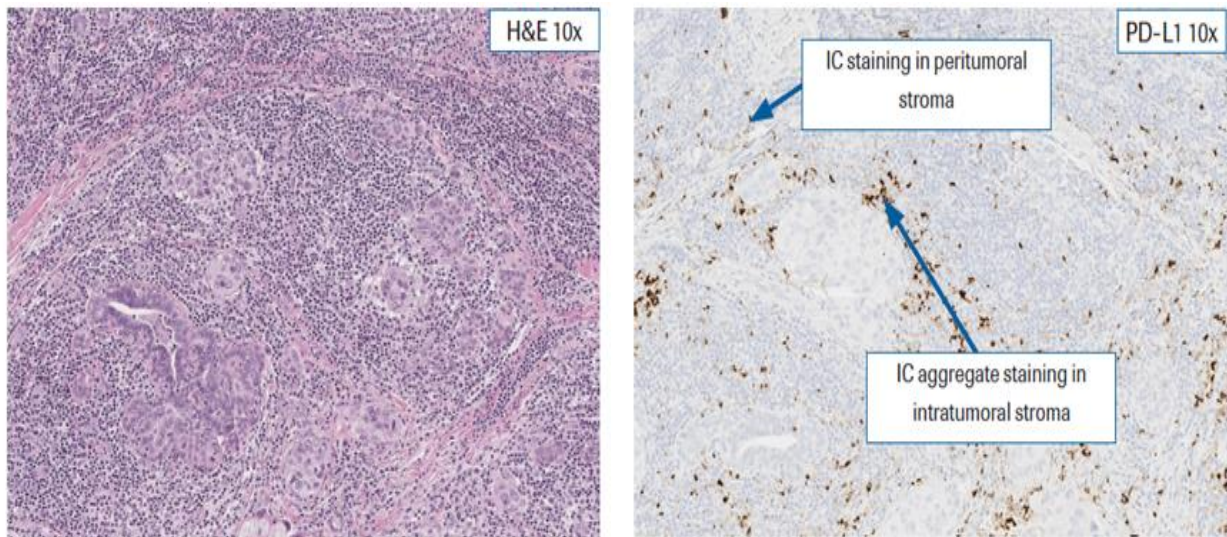


Εικόνα 37. Η θετική χρώση του PD-L1 στα immune cells (IC).

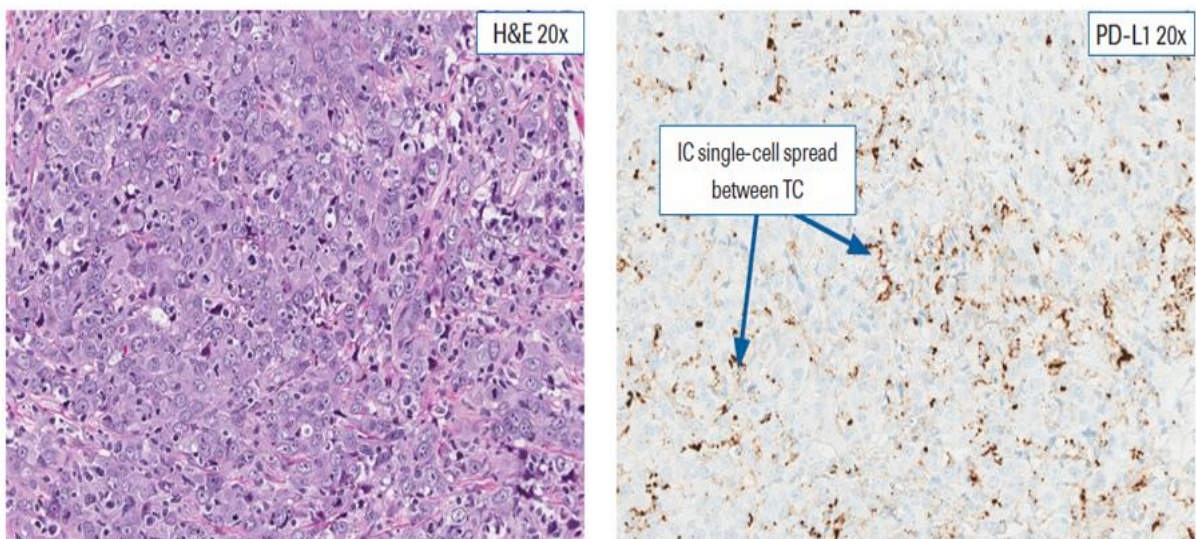
Η θετική χρώση του PD-L1 στα immune cells (IC) εμφανιζόταν συχνότερα είτε με στικτή κοκκώδη χρώση (dark brown punctate) ή γραμμοειδή μεμβρανική (πλήρης ή μερική). Αυτές οι δύο μορφές αποτελούν το κυρίαρχο μοτίβο της χρώσης των IC, στην πλειοψηφία των ιστολογικών τομών.



Εικόνα 38. Σε κάποιες περιπτώσεις, παρατηρήθηκε επίσης ολομεμβρανική χρώση των IC, ειδικά σε κύτταρα που είναι μορφολογικά συνεπή με μακροφάγα και /ή δενδριτικά κύτταρα.



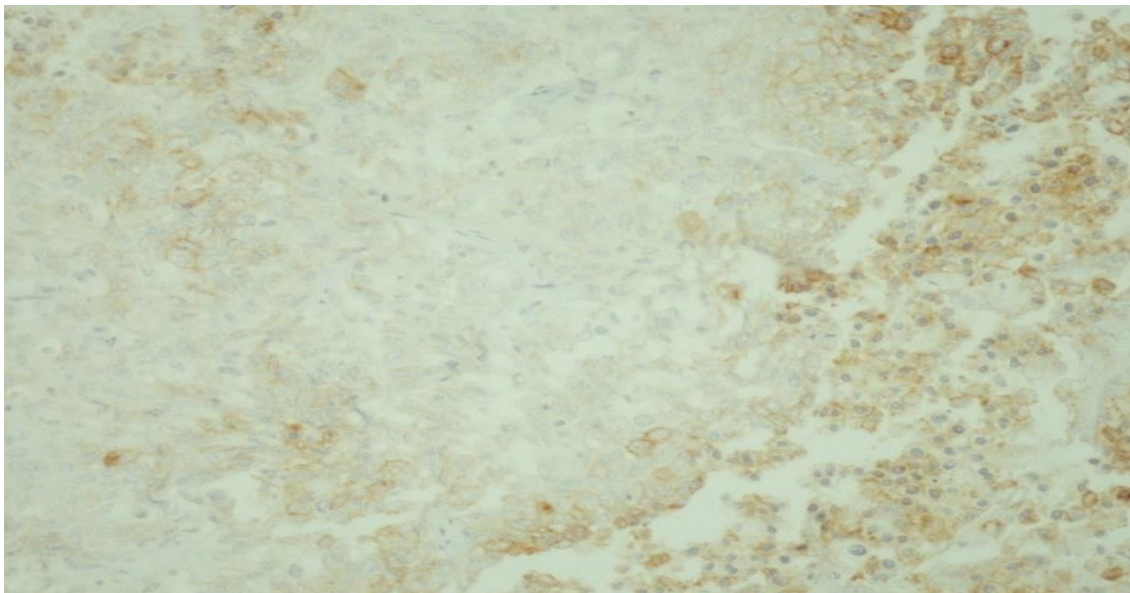
Εικόνα 39. Η χρώση των IC συχνά εμφανίστηκε με τη μορφή συσσωμάτων είτε στα ενδοογκικά ή στα στρωματικά IC, είτε και στα δύο.



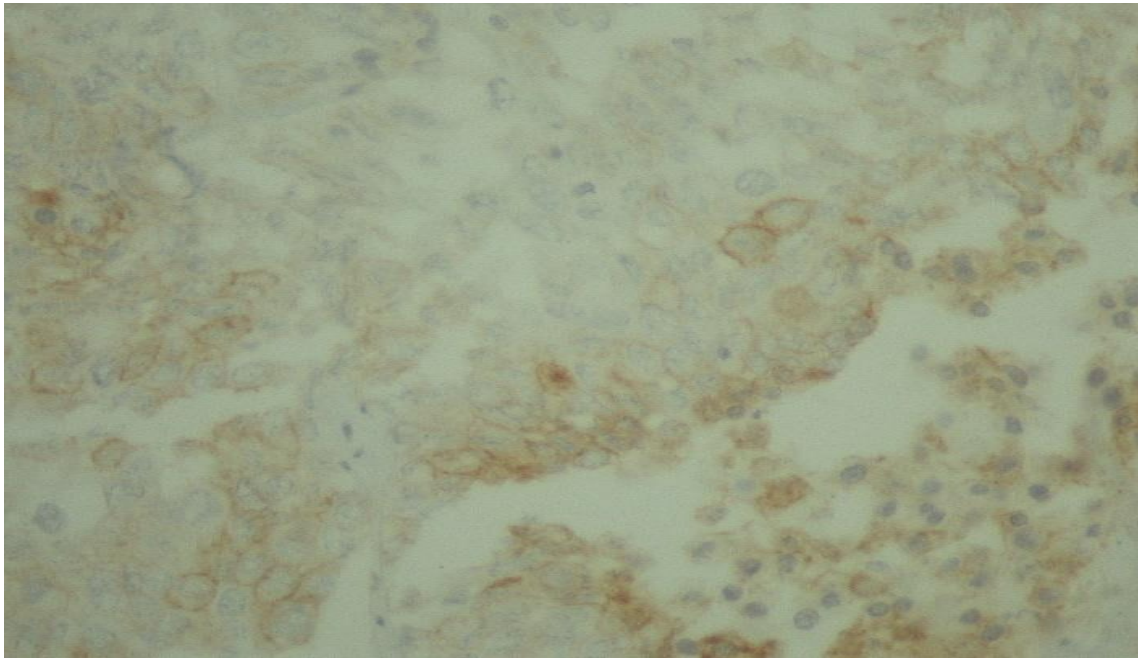
Εικόνα 40. Η χρώση των IC παρατηρήθηκε επίσης με μορφή εστιακών ή διάχυτων ενδοογκικών διάσπαρτων μονοκυττάρων ή μικρών συσσωμάτων διασκορπισμένων μεταξύ των νεοπλασματικών κυττάρων (TC).



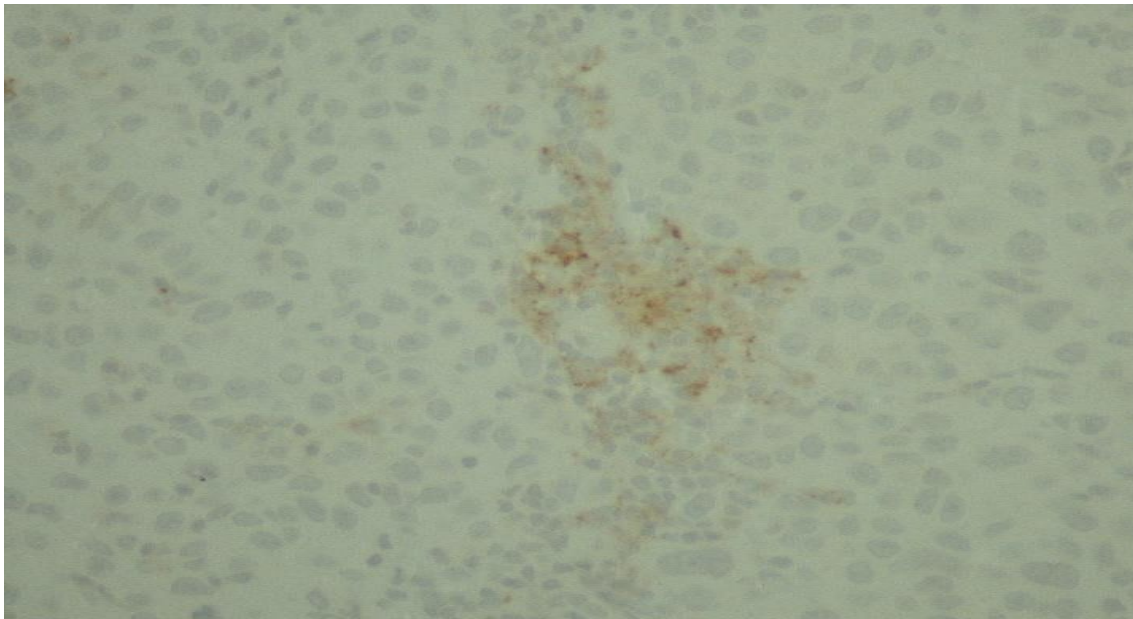
*Εικόνα 41. PDL1 x100.*



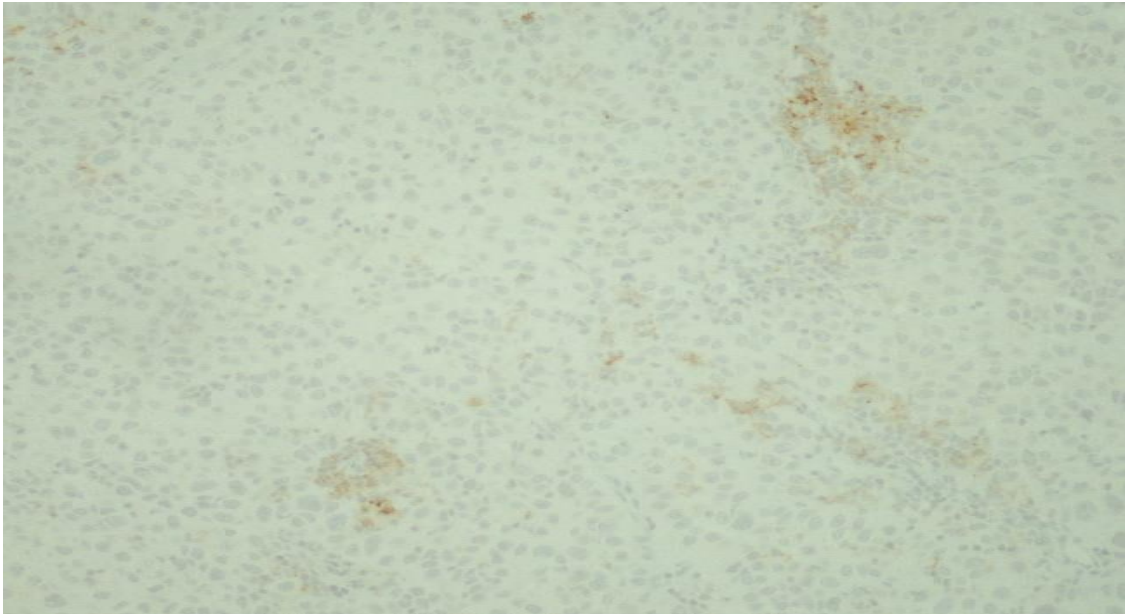
*Εικόνα 42. PDL1 x200.*



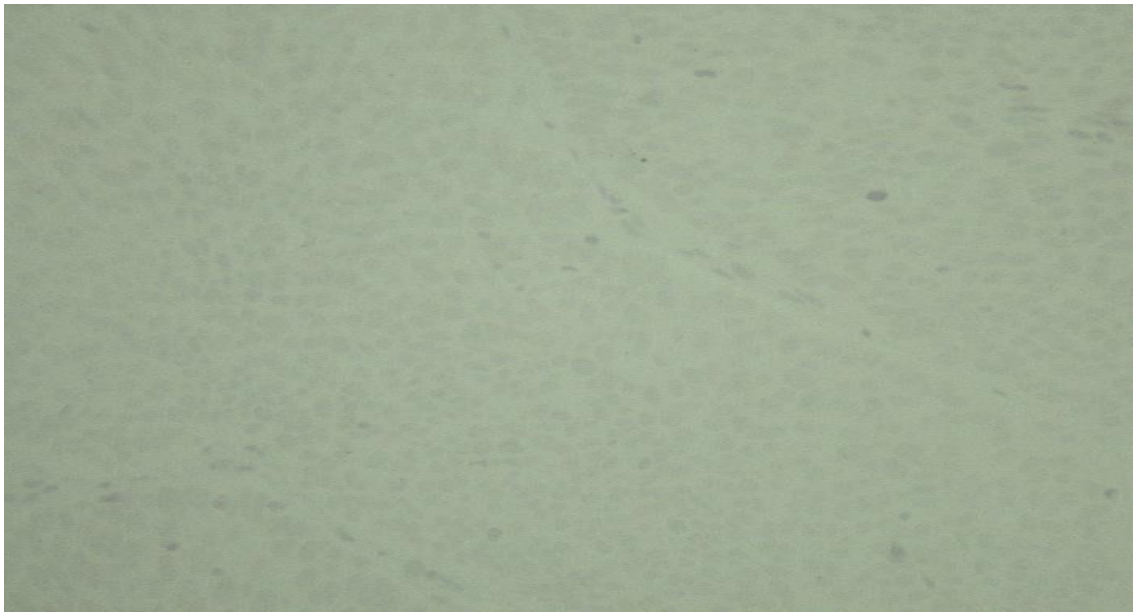
*Εικόνα 43. PDL1 x400.*



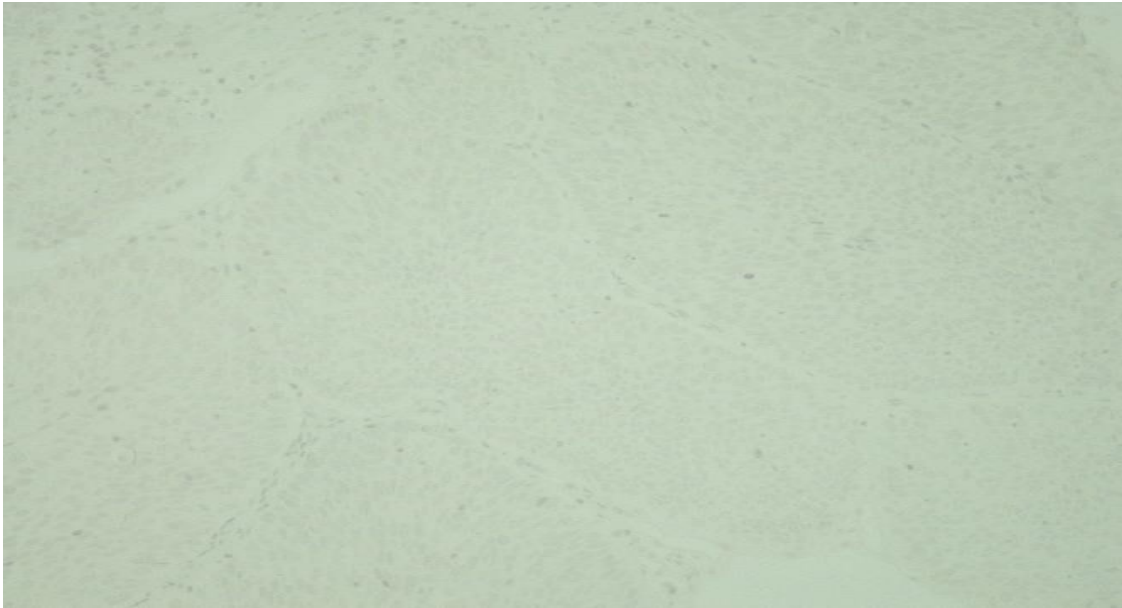
*Εικόνα 44. PDL1 x400, immune cells.*



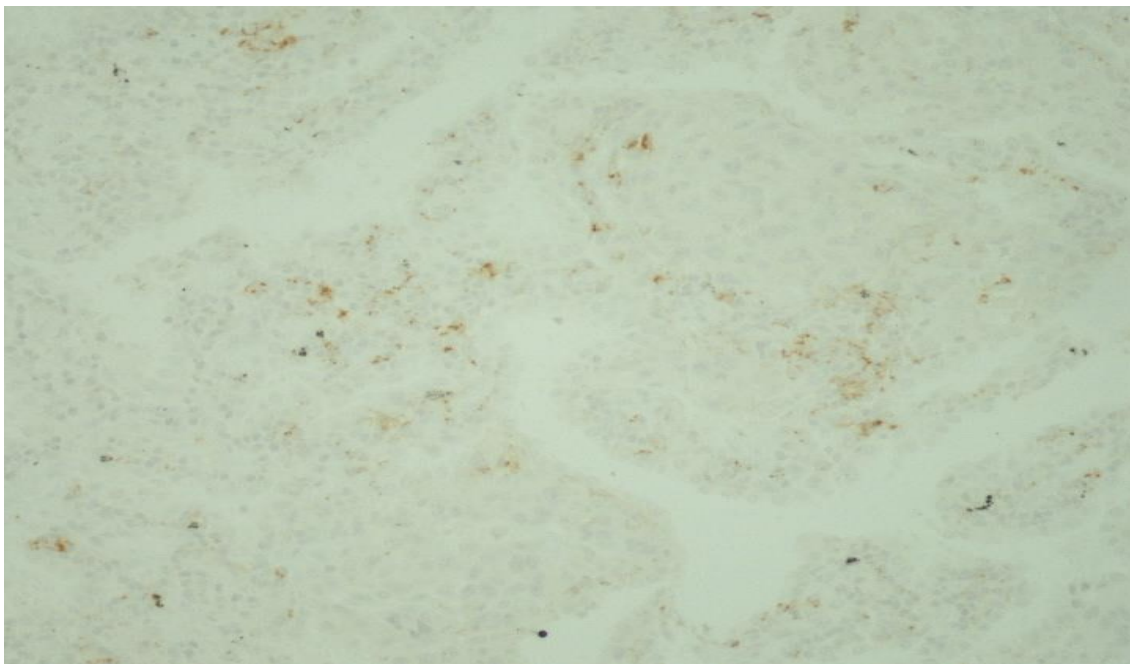
*Εικόνα 45. PDL1 x200, immune cells.*



*Εικόνα 46. PDL1x400,primary , urothelial.*



*Εικόνα 47. PDL1x200,primary tumor, urothelial.*



*Εικόνα 48. PDL1x200,primary tumor, lung.*



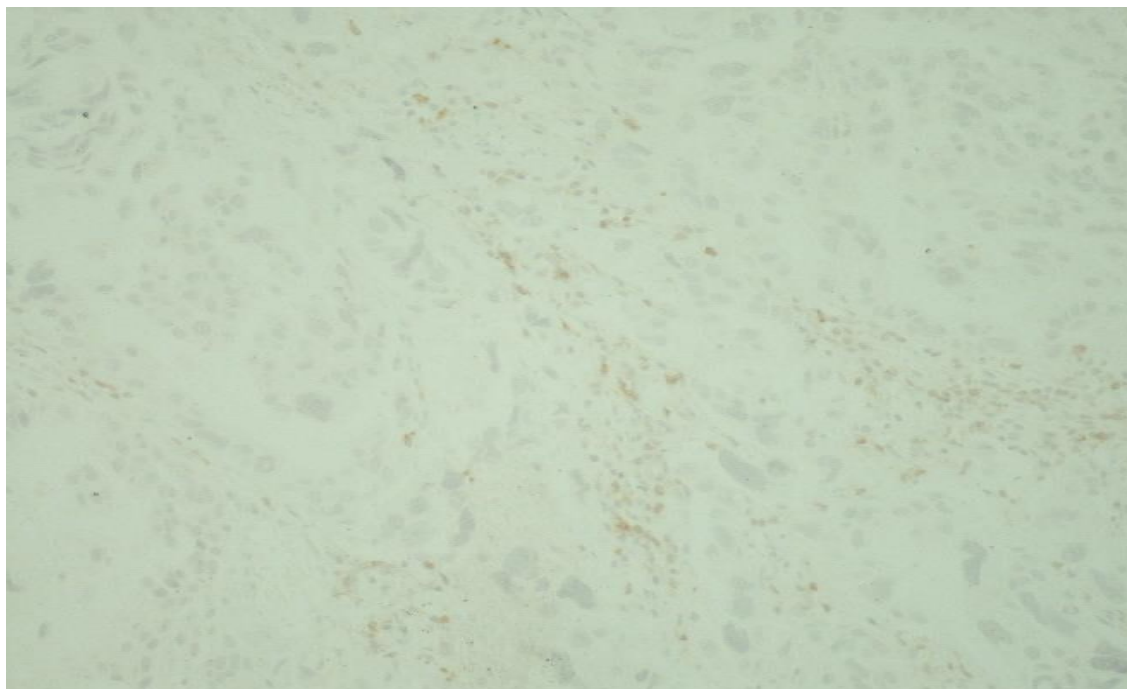


*Εικόνα 49. PDL1x100, primary tumor, lung*

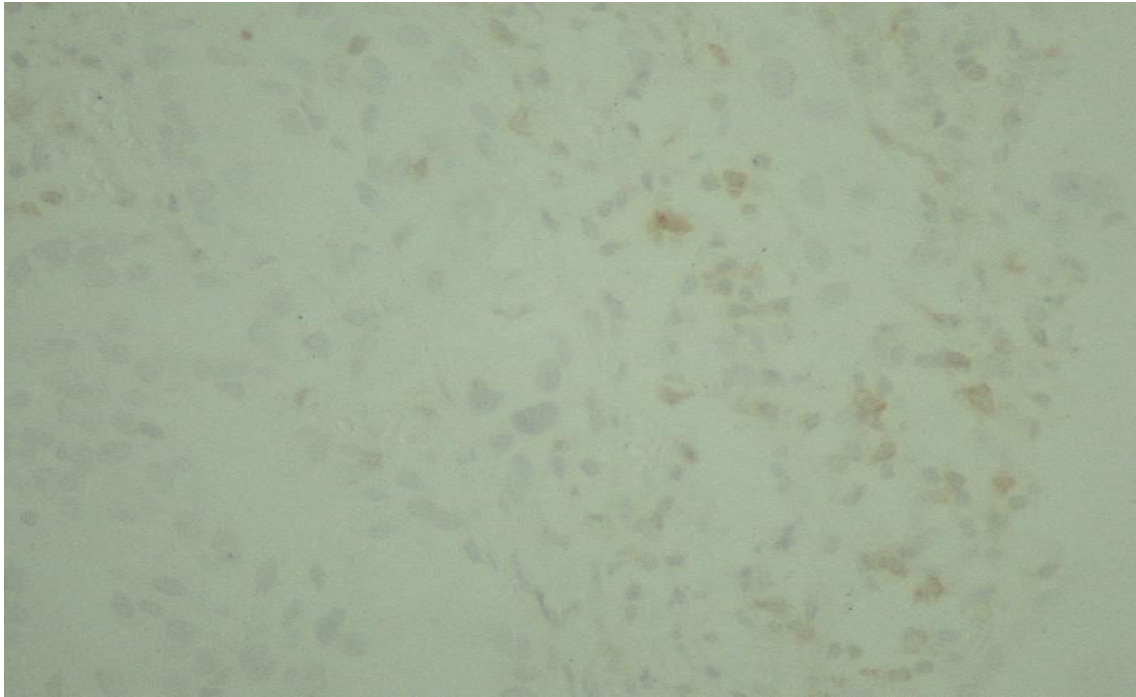
#### 7.2.4 Εκτίμηση του PD-1 στις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις

Η εκτίμηση της θετικής έκφρασης του PD-L1, στις ιστολογικές τομές, πραγματοποιήθηκε με την ανοσοϊστοχημική μέθοδο με την εφαρμογή του διαγνωστικού τεστ PD-1(MRQ-22)CellMarque,Roclin. Η ανίχνευση του PD-1 αντιγόνου πραγματοποιήθηκε σε μικροσκόπιο διπλής συμπαρατήρησης και η εκτίμησή του βασίστηκε στις προτεινόμενες οδηγίες αξιολόγησης του συγκεκριμένου αντισώματος (Interpretation guide for CellMarque, Roclin, CA,USA ). Η εκτίμηση βασίστηκε στα κάτωθι βήματα:

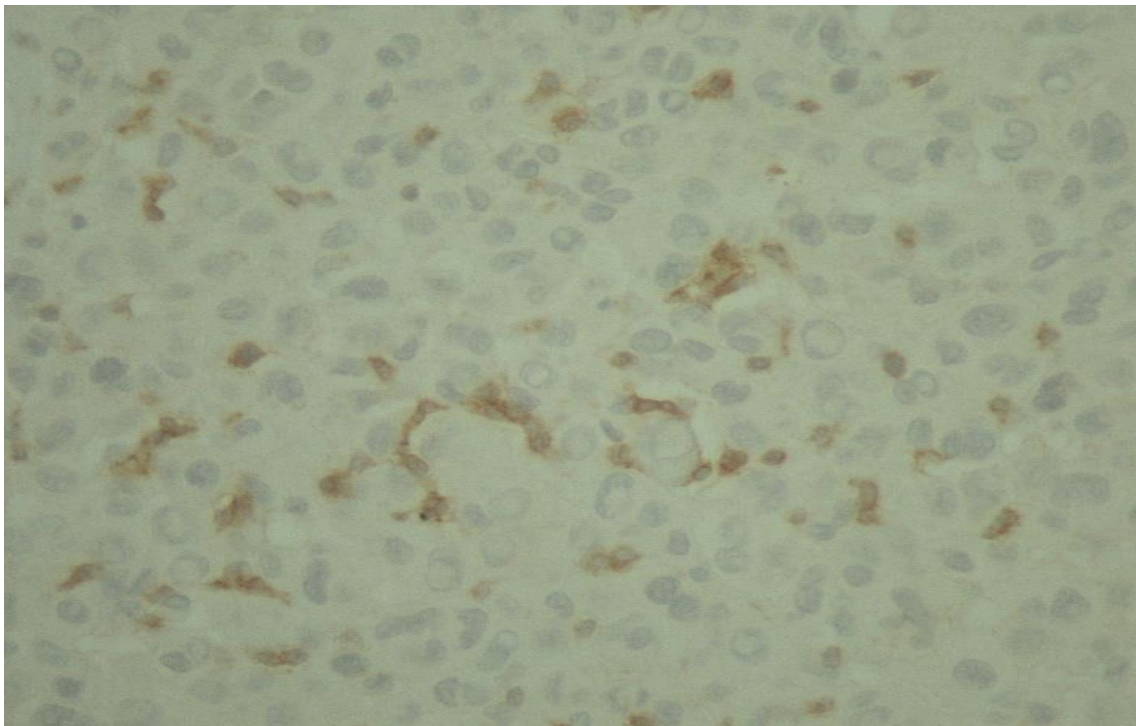
1. Εξέταση των ιστολογικών τομών σε χαμηλή μεγέθυνση (x2 magnification) αρχικά.
2. Αναγνώριση των περιοχών του όγκου και εξαίρεση των περιοχών νέκρωσης.
3. Επισκόπηση της ανοσόχρωσης στο σύνολο όγκου, στα φλεγμονώδη κύτταρα(IC) μόνο.
4. Ακολούθως, χρησιμοποιήθηκε υψηλότερη μεγέθυνση (x10 ή x20 magnification)
5. Επιβεβαίωση της ανίχνευσης θετικότητας στη χρώση του PD-1 στα IC, και στα δύο στο στρώμα και ενδοογκικά.
6. Επαναφορά σε χαμηλή μεγέθυνση(2x ή 4x)
7. Βαθμολόγηση της έκφρασης των IC, ως η αναλογία της περιοχής του όγκου επί τοις εκατό που καταλαμβάνεται από ανοσοκύτταρα με θετική ανοσόχρωση στο PD-1.
8. Τα αποτελέσματα καταγράφηκαν σε ηλεκτρονικό σύστημα για να χρησιμοποιηθούν στη στατιστική ανάλυση.



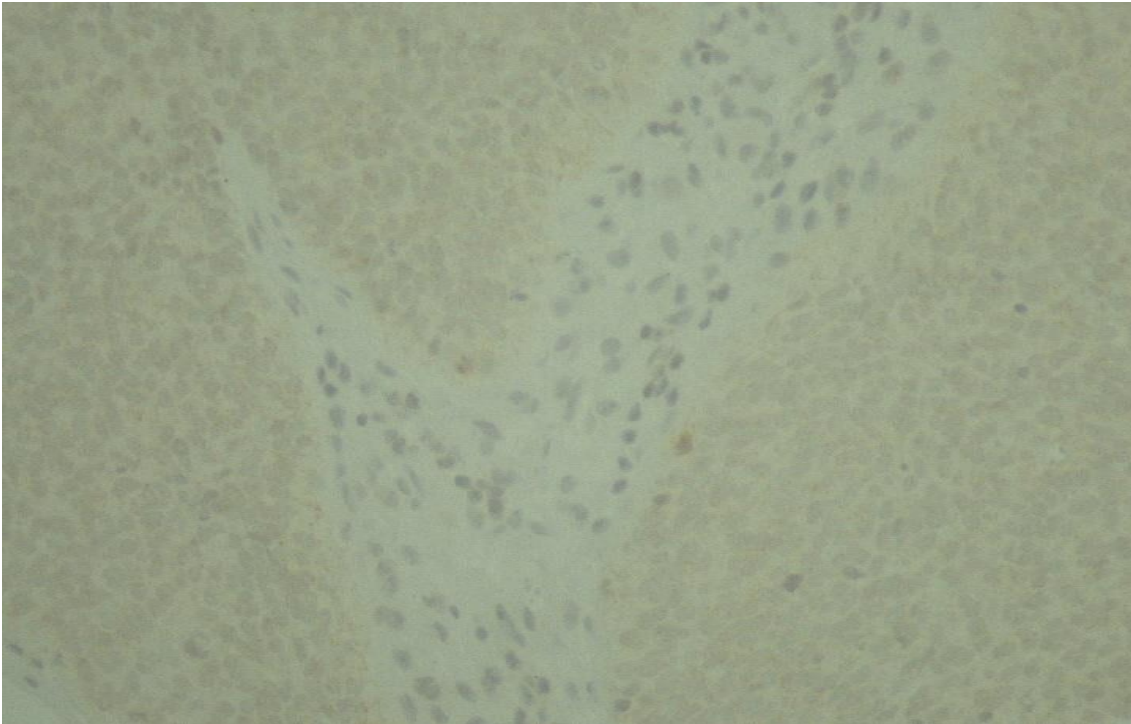
Εικόνα 50.PD1x200.



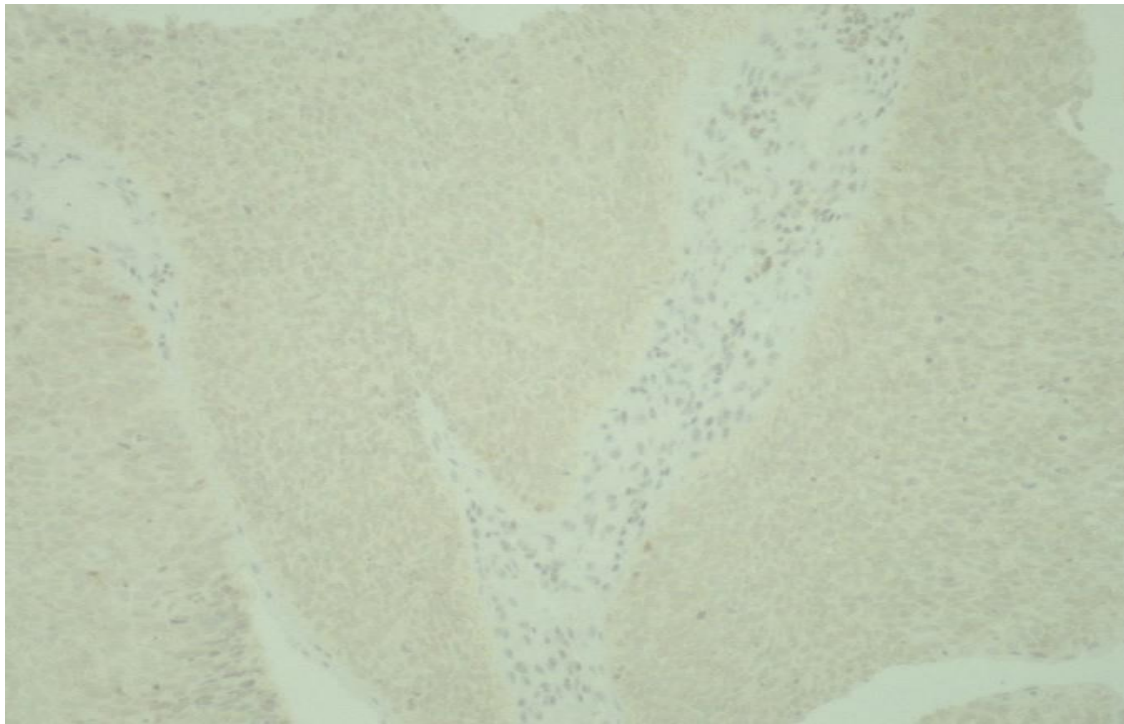
*Εικόνα 51. PD1-χ400.*



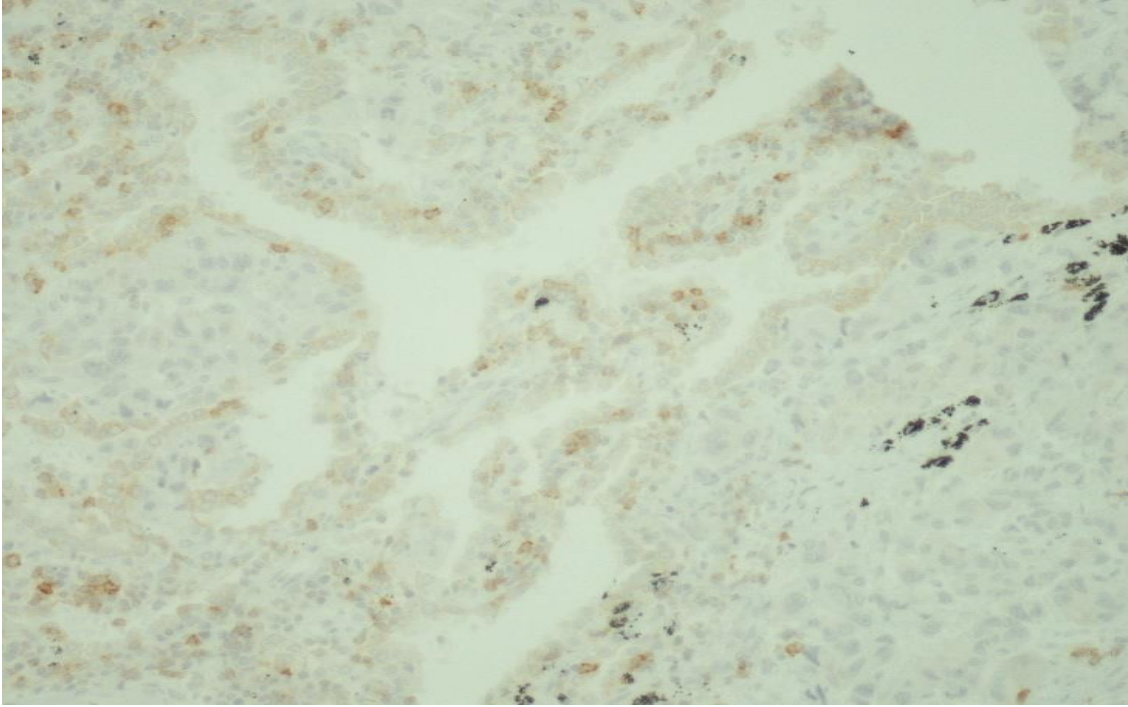
*Εικόνα 52. PD1x400.*



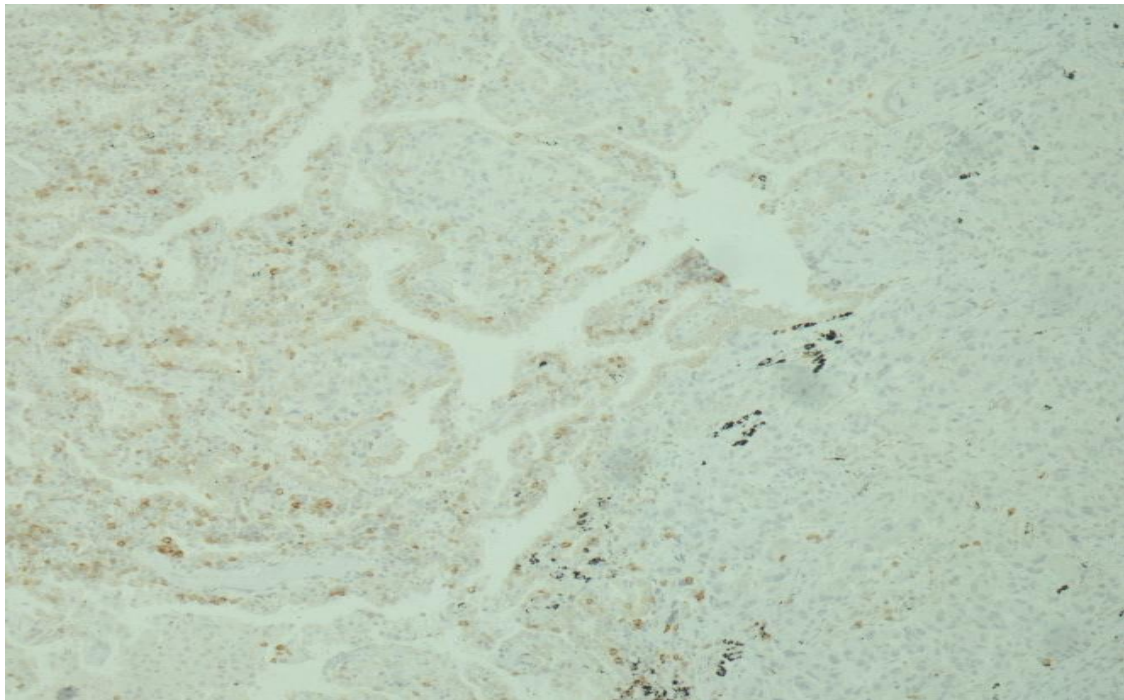
*Εικόνα 53. PD1x400,primary tumor, urothelial.*



*Εικόνα 54. PD1x200,primary tumor, urothelial.*



*Εικόνα 55. PD1x200,primary tumor, lung.*



*Εικόνα 56..4PD1x100, primary tumor, lung*

## 8.ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήσαμε περιγραφικές στατιστικές μεθόδους με μετρήσεις επί τοις εκατό(%), διάμεσες(μέγιστη και ελάχιστη)τιμές για να περιγράψουμε τα χαρακτηριστικά των ασθενών, τα χαρακτηριστικά των εγκεφαλικών μεταστάσεων και των βιοδεικτών που μελετήθηκαν. Οι συσχετίσεις μεταξύ των CD8, CD3, FOXP3, TILs, PDL-1, PD-1 και των κλινικο-παθολογικών παραμέτρων εκτιμήθηκαν με τη χρήση του chi-square test και Fisher's exact test. Οι μη παραμετρικές μέθοδοι Kruskal-Wallis και Wilcoxon rank-sum test χρησιμοποιήθηκαν για να εκτιμήσουμε τις συνεχείς μεταβλητές. Οι συσχετίσεις μεταξύ συνεχών μεταβλητών εκτιμήθηκαν με Spearman. Οι διάμεσες τιμές των αντίστοιχων βιοδεικτών χρησιμοποιήθηκαν ως σημεία cut-off για την κατηγοροποίηση των όγκων σε υψηλής και χαμηλής έκφρασης σε CD3, CD8 και FOXP3, TILs στο στρωματικό στοιχείο, στο ενδοογκικό και στο σύνολο του όγκου. Για την έκφραση του PD-L1 στα Immune Cells χρησιμοποιήθηκε για cut-off η τιμή 1%. Ενώ για την έκφραση του PD-L1 των Tumor cells, οι όγκοι διακρίθηκαν σε 3 κατηγορίες ανάλογα την έκφραση τους : <1%, 1-49% and ≥50%. Για την έκφραση του PD-L1 αξιολογήθηκε η ένταση της χρώσης στο ποσοστό θετικών Tumor cells, για την οποία χρησιμοποιήθηκε η ημιποσοτική χρώση H-Score. Η ένταση της χρώσης ορίστηκε ως ασθενής(+1), μέτρια(+2), ισχυρή(+3). Το PD-1 αναλύθηκε ως συνεχή μεταβλητή.

Η συνολική επιβίωση- overall survival (OS) διακρίθηκε σε δύο παραμέτρους OS1 και OS2. OS1 ορίστηκε ως το χρονικό διάστημα από την αρχική διάγνωση έως την ημερομηνία θανάτου (από οποιαδήποτε αιτία) ή την ημερομηνία τελευταίας επαφής. OS2 ορίστηκε ως το χρονικό διάστημα από την διάγνωση των εγκεφαλικών μεταστάσεων έως την ημερομηνία θανάτου (από οποιαδήποτε αιτία) ή την ημερομηνία τελευταίας επαφής. Τα ποσοστά επιβίωσης OS1 και OS2 ελήφθησαν μέσω αναλύσεων καμπυλών Kaplan-Meier και συσχετίστηκαν μεταξύ των ομάδων με διπλής όψεως log-rank test. Εφαρμόστηκαν μονομεταβλητά Cox regression models για την αξιολόγηση της επίδρασης των κλινικοπαθολογοανατομικών παραμέτρων και των βιοδεικτών υπό μελέτη στο OS1 και OS2. Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, το αντίκτυπο κάθε λεμφοκυτταρικού βιοδείκτη το οποίο συσχετίστηκε μονομεταβλητά με την έκβαση των ασθενών κι ακολούθως συσχετίστηκε με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους που έδειξαν στατιστική σημαντικότητα ή τάση μονομεταβλητά ( $p < 0,10$ ).

## 9.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Συνολικά 72 ασθενείς, οι οποίοι διεγνώσθησαν με εγκεφαλικές δευτεροπαθείς εντοπίσεις, κατά τη χρονική περίοδο Δεκέμβριο του 2005 έως τον Μάιο του 2008 συμπεριλήφθησαν στην παρούσα ανάλυση. Από τους 72 ασθενείς διαθέσιμα κλινικοπαθολογικά δεδομένα υπήρχαν για τους 62 ασθενείς.

Η μέση ηλικία τη στιγμή της διάγνωσης ήταν τα 64 έτη( κυμαίνεται μεταξύ 32-84), με τους περισσότερους ασθενείς να είναι άντρες(73,6%).

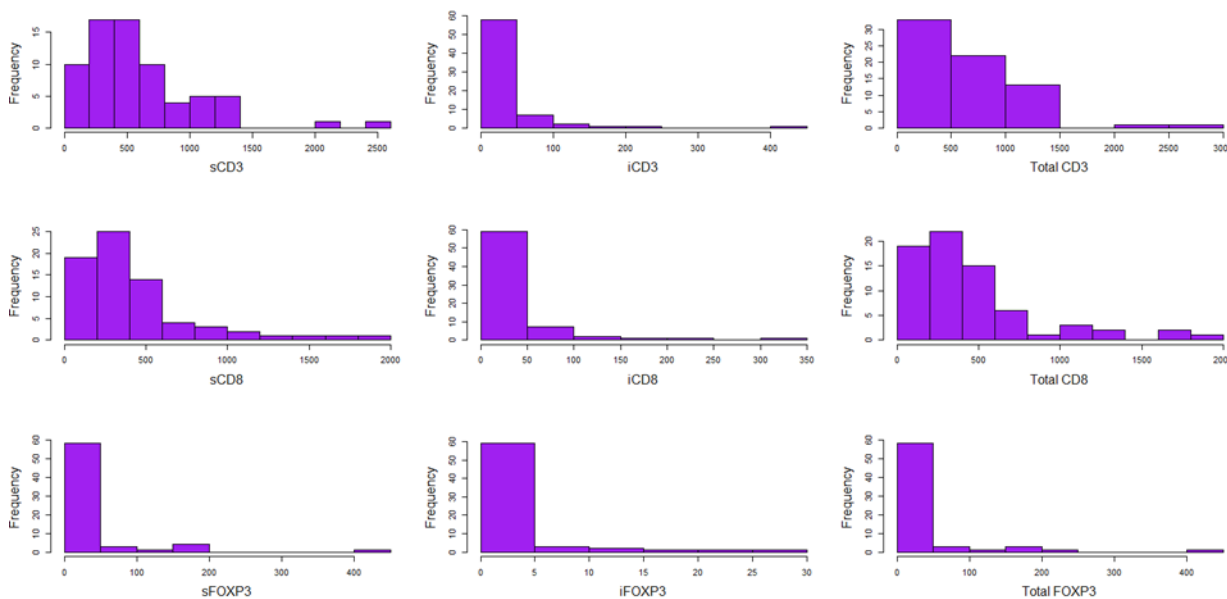
Από τα παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των όγκων, η πλειοψηφία αυτών εμφανίζουν ιστολογικά υψηλού βαθμού κακοήθεια, grade III(93.3%) και οι περισσότερες πρωτοπαθείς εστίες αφορούν τον πνεύμονα(55,4%).

Οι μισοί ασθενείς αναφέρουν συννοσηρότητες n=31 από τους 62, με κύρια συννοσηρότητα την αρτηριακή υπέρταση, η οποία αναφέρεται στους μισούς ασθενείς.

Οι 29 από τους 62 ασθενείς με διαθέσιμα από τον ιατρικό φάκελο δεδομένα (46,8%) υπεβλήθησαν σε χειρουργική εξαίρεση της πρωτοπαθούς εστίας και 22 από αυτούς (75,9%) έλαβαν ακολούθως επικουρική χημειοθεραπεία. Όλοι οι ασθενείς υπεβλήθησαν σε ακτινοβολία εφ' ολοκλήρου του εγκεφάλου.

Περισσότεροι από τους μισούς ασθενείς (54.1%) κατά την πορεία της νόσου τους έλαβαν μόνο μια γραμμή συστηματικής θεραπείας για μεταστατική νόσο, ενώ 26 ασθενείς (42.6%) έλαβαν δύο ή περισσότερες γραμμές θεραπείας. Τα χαρακτηριστικά του συνόλου των ασθενών και των όγκων τους παρατίθενται στον **πίνακα 3**.

Η αξιολόγηση των CD3, CD8, FOXP3, PDL-1, PD-1 και TILs πραγματοποιήθηκε για 62 από τους 72 όγκους (86,1%). Τα δεδομένα σχετικά με τα CD3, CD8 και FOXP3 ήταν διαθέσιμα για το 97,2% (n=70), 98,6% (n=71) και 93,1% (n=67) της κοόρτης της μελέτης, αντίστοιχα. Τα δεδομένα PD-1 και PDL-1 ήταν διαθέσιμα για το 97,2% (n=70) και το 94,4% (n=68) της συνολικής κοόρτης, αντίστοιχα, ενώ η πυκνότητα των TILs μετρήθηκε για 70 ασθενείς (97,2%). Τα ιστογράμματα των κατανομών για CD8, CD3 και FOXP3 απεικονίζονται στο **διάγραμμα 1**.



**Διάγραμμα 1. Ιστογράμματα συχνότητας για CD3, CD8, FOXP3**

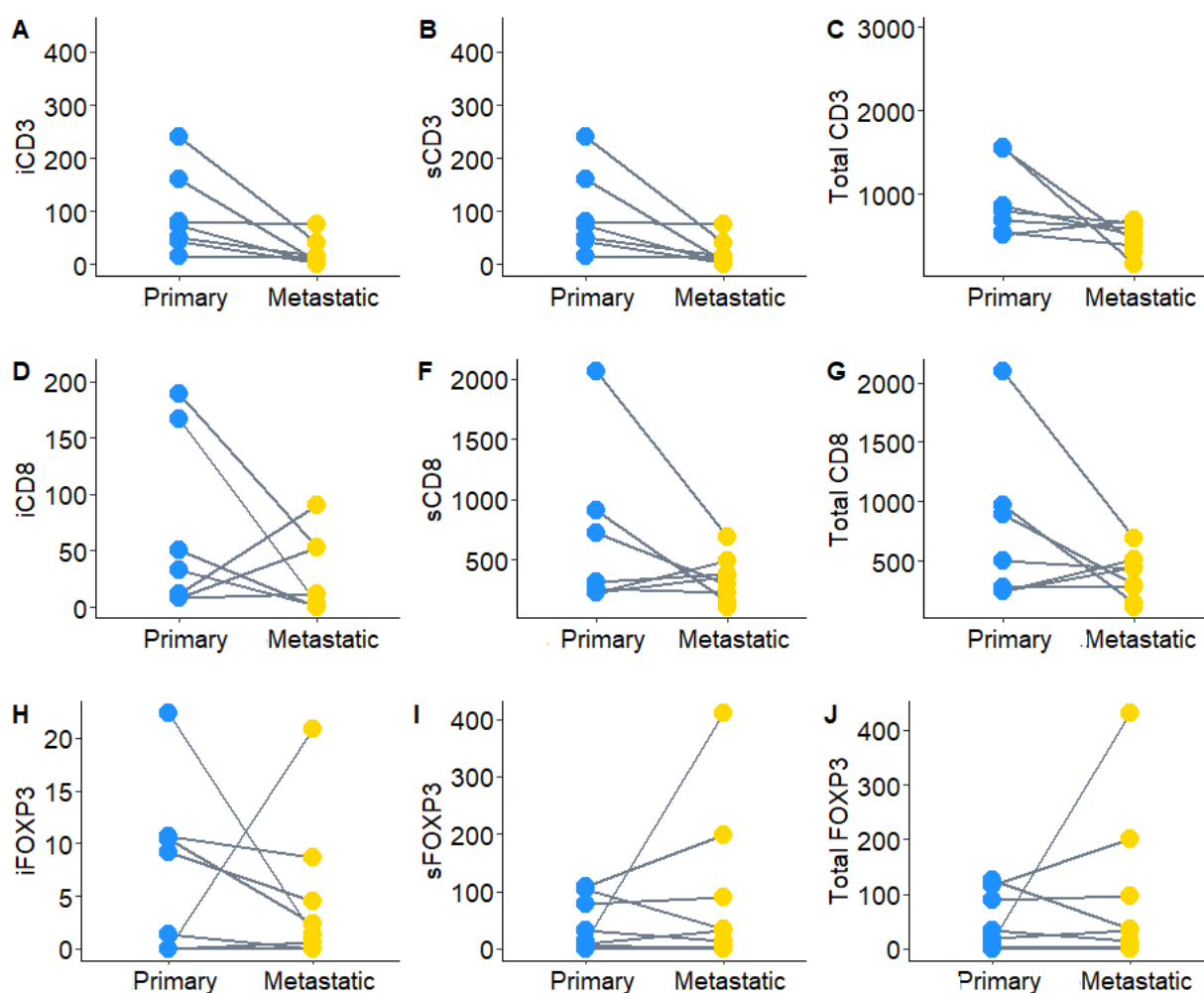
Ακολούθως, εξετάστηκε η ύπαρξη ενδεχόμενης συσχέτισης μεταξύ των κλινικοπαθολογικών παραμέτρων που έχουμε λάβει υπόψη μας και της έκφρασης (υψηλής ή χαμηλής) των λευκοκυτταρικών ανοσοδιήθησης βιοδεικτών και των PD-L1 και PD-1. Καμία σημαντική συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των επιλεγμένων κλινικοπαθολογικών παραμέτρων και της έκφρασης CD3, CD8, FOXP3 (στρωματικό, ενδοογκικό και ολικό) και PD-L1/PD-1 (συμπληρωματικά πίνακας 1). Ομοίως, η πυκνότητα PD-1 και TILs δεν συσχετίστηκε σημαντικά με καμία από τις εξεταζόμενες κλινικές παραμέτρους (όλες οι τιμές  $p > 0,050$ ).

### **Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης της συσχέτισης ανοσολογικής απάντησης μεταξύ πρωτοπαθούς εστίας και εγκεφαλικής μετάστασης.**

Από τους 72 ασθενείς, οι 9 διέθεταν ζεύγος βιοπτικού υλικού εγκεφαλικής μετάστασης και πρωτοπαθούς εστίας. Από τους 9 ασθενείς, οι 5 ασθενείς διέθεταν βιοπτικό υλικό πρωτοπαθούς εστίας, η οποία αφορούσε καρκίνο πνεύμονος, οι 2 είχαν πρωτοπαθή εστία τον καρκίνο μαστού, 1 ασθενής είχε πρωτοπαθή εστία νεφροκυτταρικό καρκίνωμα νεφρού και 1 ασθενής είχε πρωτοπαθή εστία ουροθηλιακό καρκίνωμα.

Δεδομένα από τα ζεύγη από τον πρωτοπαθή όγκο και τη μετάσταση ήταν διαθέσιμα μόνο για 7 όγκους όσον αφορά την πυκνότητα των TILs. Τέσσερις από αυτούς είχαν αυξημένη πυκνότητα TILs στη μετάσταση σε σύγκριση με τους πρωτοπαθείς όγκους, 2 είχαν μειωθεί, ενώ δεν παρατηρήθηκε αλλαγή σε έναν όγκο. Τα ζευγαρωμένα διαγράμματα για τις τιμές των CD3, CD8 και FOXP3 στον πρωτοπαθή όγκο και τη μετάσταση παρουσιάζονται στο **διάγραμμα 2**.



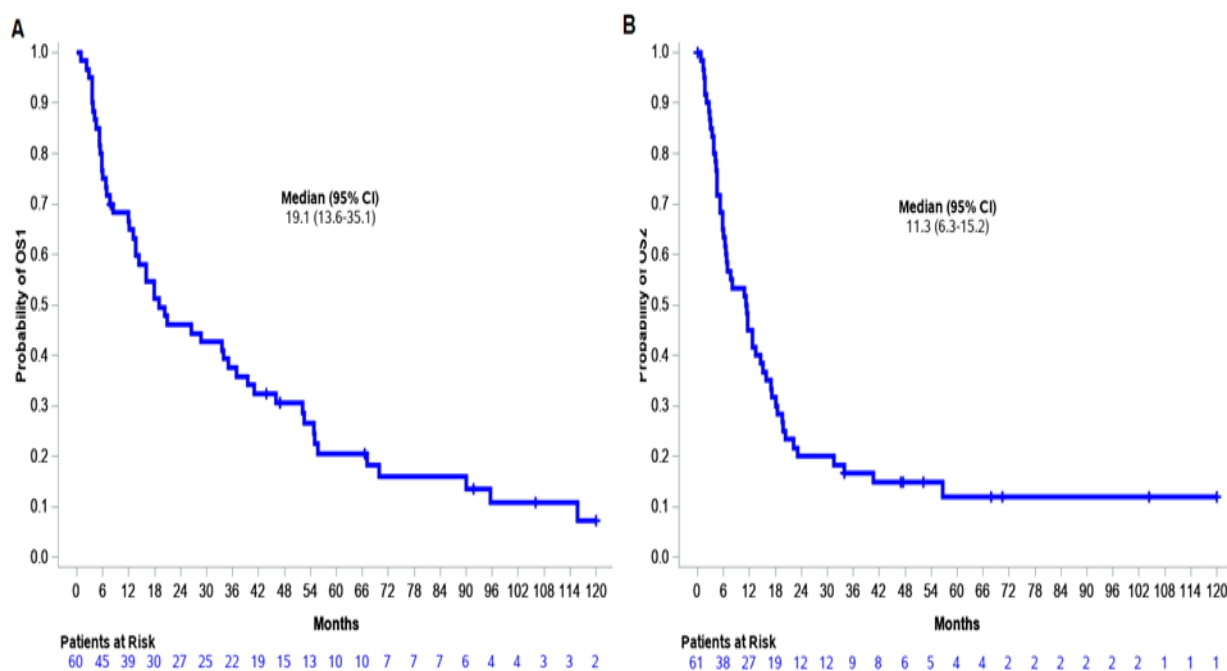


Διάγραμμα 2. Συζευγμένα δεδομένα από τον πρωτοπαθή όγκο και τη μετάσταση για CD3, CD8 and FOXP3. Paired plots of CD3, CD8 and FOXP3 values in primary and metastatic samples.

Όλοι οι όγκοι είχαν μειωμένα iCD3 στα μεταστατικά δείγματα και περισσότεροι από τους μισούς όγκους είχαν επίσης μειωμένα sCD3 και ολικών CD3 στα μεταστατικά δείγματα. Όσον αφορά το CD8, τέσσερις από τους επτά όγκους με διαθέσιμα δεδομένα και για τα δύο δείγματα είχαν μειωμένα επίπεδα iCD8, sCD8 και ολικών CD8 στη μετάσταση. Από τους εννέα όγκους με συζευγμένα δεδομένα για το FOXP3, 5 όγκοι (55,5%) είχαν αύξηση στα επίπεδα sFOXP3 και ολικά επίπεδα FOXP3 στη μετάσταση, ενώ 5 όγκοι είχαν μειωμένα επίπεδα iFOXP3. Τα επίπεδα έκφρασης PD-1 αυξήθηκαν στα μεταστατικά δείγματα για 4 από τους εννέα όγκους (44,4%) με διαθέσιμα δεδομένα. Η έκφραση PD-L1 στα καρκινικά κύτταρα δεν άλλαξε στη μετάσταση σε σύγκριση με τις τιμές που παρατηρήθηκαν στους πρωτοπαθείς όγκους για τους περισσότερους ασθενείς (4/9, 44,4%), ενώ αύξηση παρατηρήθηκε μόνο σε δύο ασθενείς (22,2%). Η έκφραση PD-L1 στα κύτταρα του ανοσοποιητικού μειώθηκε στη μετάσταση για την πλειονότητα των ασθενών με διαθέσιμα δεδομένα ζεύξης (44,4%).

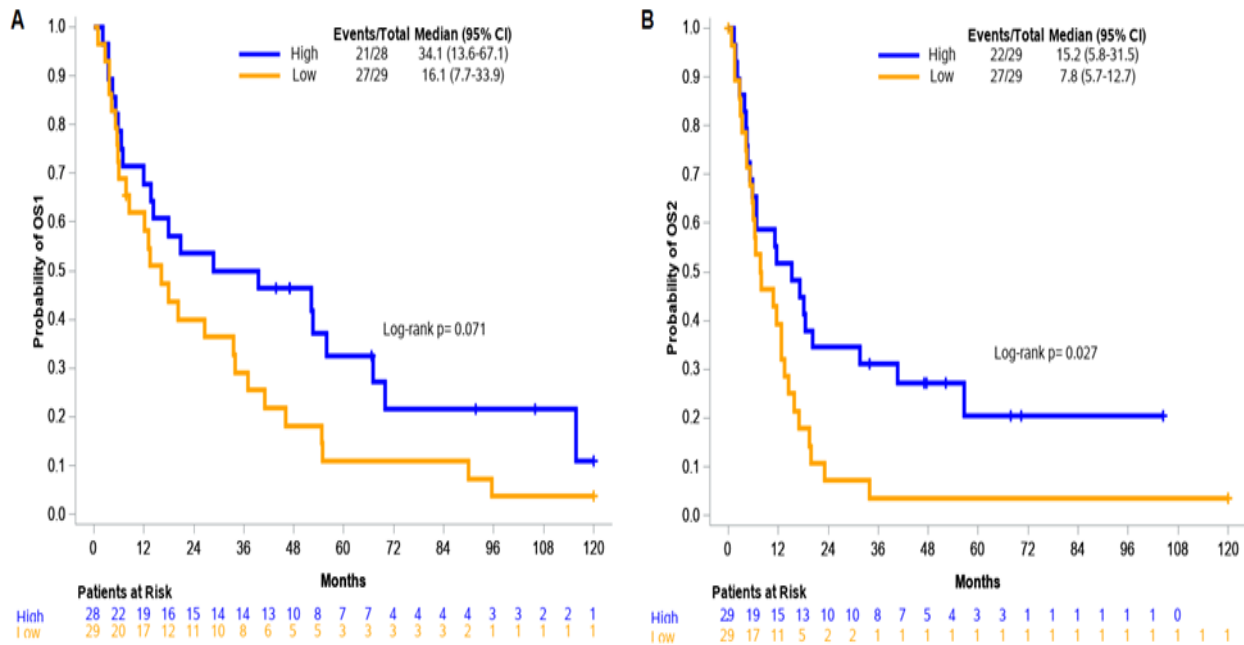
**Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης της συσχέτισης της συνολικής επιβίωσης σε δύο παραμέτρους OS1 και OS2 με την ανοσολογική απόκριση τόσο στις εγκεφαλικές μεταστάσεις, όσο και στις πρωτοπαθείς εστίες.**

Τα δεδομένα παρακολούθησης ήταν διαθέσιμα για 61 ασθενείς (84,7%). Αξίζει να σημειωθεί ότι μόνο η ημερομηνία διάγνωσης της εγκεφαλικής μετάστασης αλλά όχι η ημερομηνία αρχικής διάγνωσης ήταν διαθέσιμη για έναν ασθενή και ως εκ τούτου το OS1 υπολογίστηκε για 60 ασθενείς (83,3%). Οι ασθενείς παρακολουθήθηκαν για διάμεσο χρονικό διάστημα 106,03 μήνες (95% CI 66,6-122,2) και κατά τη διάρκεια αυτής της χρονικής περιόδου αναφέρθηκαν συνολικά 52 θάνατοι (85,2%). Η διάμεση τιμή OS1 ήταν 19,1 μήνες (95% CI 13,6-35,1) και η διάμεση τιμή OS2 ήταν 11,35 μήνες (95% CI 6,3-15,2). Τα ποσοστά OS1 και OS2 για 5 χρόνια ήταν 20,4% και 11,9%, αντίστοιχα( **διάγραμμα 3**)



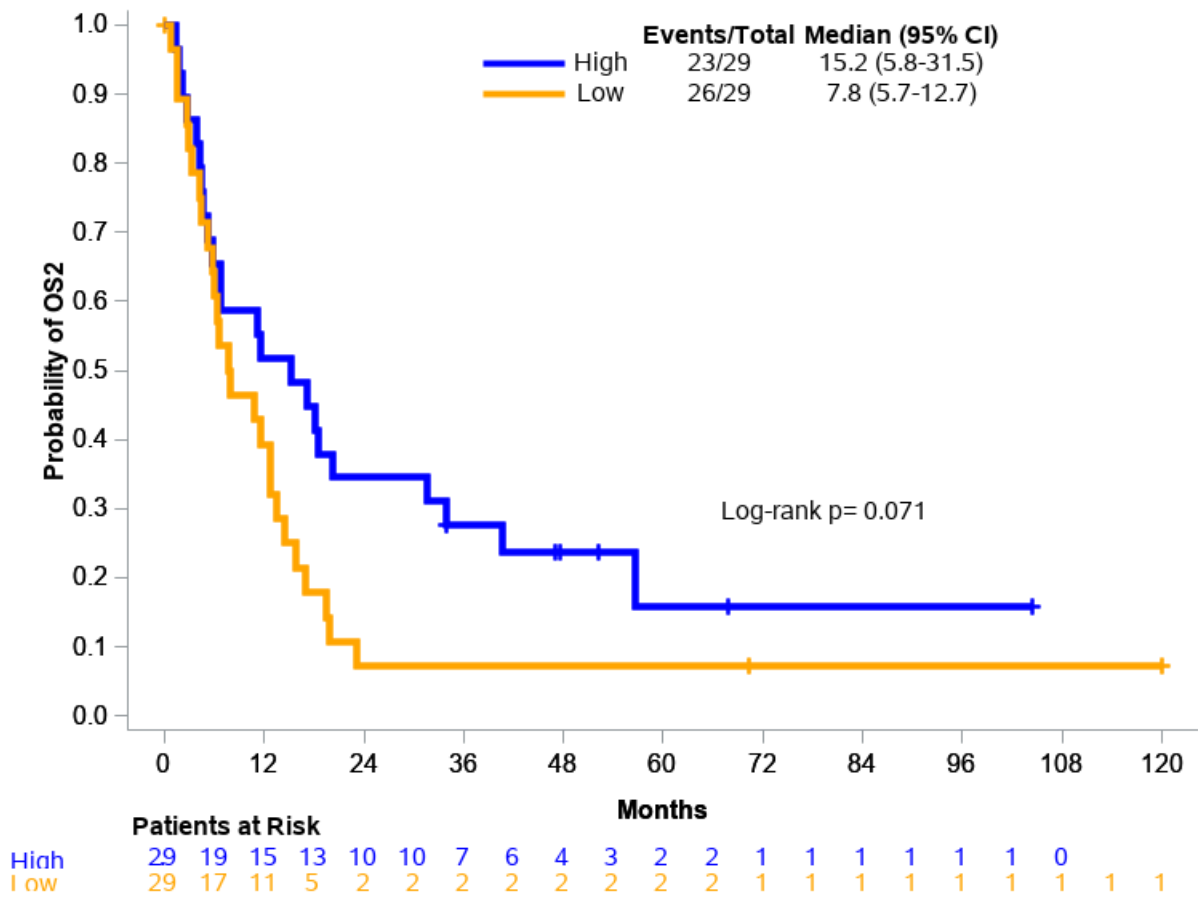
**Διάγραμμα 3.** Η καμπύλη Kaplan-Meier σε σχέση με (A) OS1 και (B) OS2 για το σύνολο των ασθενών με διαθέσιμα δεδομένα παρακολούθησης

Μόνο μια τάση προς αυξημένο κίνδυνο θανάτου παρατηρήθηκε για ασθενείς με χαμηλή έκφραση του sFOXp3 σε σχέση με το OS1 (HR=1,69, 95% CI 0,95-3,00, p=0,074)( **διάγραμμα 4A**), ενώ οι υπόλοιποι βιοδείκτες που εξετάστηκαν δεν έδειξαν καμία σημαντική προγνωστική αξία για το OS1. Όσον αφορά το OS2, οι ασθενείς με χαμηλή έκφραση sFOXp3 είχαν σημαντικά μικρότερο OS2 σε σύγκριση με εκείνους με υψηλή έκφραση του sFOXp3 (HR=1,90, 95% CI 1,07-3,40, p=0,030)( **διάγραμμα 4B**).



Διάγραμμα 4. Οι καμπύλες Kaplan-Meier όπως διαμορφώθηκαν από τη συσχέτιση της έκφρασης sFOXP3 με την συνολική επιβίωση (A) OS1 και (B) OS2.

Επίσης, παρατηρήθηκε μια τάση, σύμφωνα με την οποία σε ασθενείς με χαμηλή έκφραση ολικού FOXP3 ανιχνεύθηκε μικρότερο OS2, σε αντίθεση με αυτούς με υψηλή έκφραση (HR=1,69, 95% CI 0,95-2,99, p=0,074) (διάγραμμα 5, πίνακας 5)



Διάγραμμα 5. Η καμπύλη Kaplan-Meier βασισμένη στη συσχέτιση της έκφρασης των ολικών FOXP3 με την OS2. Kaplan-Meier curve based on total FOXP3 expression with respect to OS2.

	<i>OS1</i>			<i>OS2</i>		
	Event/Total	HR (95% CI)	p-value	Event/Total	HR (95% CI)	p-value
<b>iCD3</b>						
Low	25/28	1.26 (0.72-2.20)	0.427	25/28	1.16 (0.66-2.02)	0.608
High	24/30	Reference	--	25/31	Reference	--
<b>sCD3</b>						
Low	22/27	0.98 (0.56-1.72)	0.944	22/27	0.96 (0.55-1.67)	0.878
High	27/31	Reference	--	28/32	Reference	--
<b>Total CD3</b>						
Low	23/27	1.06 (0.60-1.87)	0.833	23/27	1.02 (0.58-1.77)	0.958
High	26/31	Reference	--	27/32	Reference	--
<b>iCD8</b>						
Low	25/29	0.93 (0.53-1.61)	0.786	25/29	0.83 (0.48-1.45)	0.513
High	25/30	Reference	--	26/31	Reference	--
<b>sCD8</b>						
Low	28/32	1.15 (0.66-2.02)	0.622	28/32	1.09 (0.63-1.89)	0.763
High	22/27	Reference	--	23/28	Reference	--
<b>Total CD8</b>						
Low	28/32	1.15 (0.66-2.02)	0.622	28/32	1.09 (0.63-1.89)	0.763
High	22/27	Reference	--	23/28	Reference	--

<b>iFOXP3</b>						
Low	26/29	1.25 (0.70-2.20)	0.45	26/29	1.58 (0.89-2.81)	0.118
High	22/28	Reference	--	23/29	Reference	--
<b>sFOXP3</b>						
Low	27/29	1.69 (0.95-3.00)	0.074	27/29	1.90 (1.07-3.40)	<b>0.030</b>
High	21/28	Reference	--	22/29	Reference	--
<b>Total FOXP3</b>						
Low	26/29	1.42 (0.80-2.52)	0.226	26/29	1.69 (0.95-2.99)	0.074
High	22/28	Reference	--	23/29	Reference	--
<b>PDL-1 immune cells</b>						
0-1%	35/39	1.23 (0.64-2.34)	0.535	35/39	1.54 (0.82-2.89)	0.177
≥1%	13/18	Reference	--	14/19	Reference	--
<b>PDL-1 tumor cells</b>						
0-1%	34/37	--*		35/38	--*	
1-49%	13/19			13/19		
≥50%	1/1			1/1		
<b>PD-1</b>		0.99 (0.95-1.03)	0.534		0.98 (0.94-1.03)	0.478
<b>TILs<sup>^</sup></b>		1.00 (0.99-1.01)	0.645		1.00 (0.99-1.01)	0.938
<b>PDL-1 H-score<sup>^</sup></b>		0.99 (0.98-1.01)	0.771		0.99 (0.97-1.01)	0.427

*Πίνακας 5. Hazard ratios and 95% confidence intervals estimated by univariate Cox regression models with respect to OS1 and OS2*

HR, hazard ratio; CI, confidence interval

\*Hazard ratios were not calculated due to the extremely low number of patients (with the event of interest) in one the categories of the respective variable.

Significant p-values are shown in bold.

Λαμβάνοντας υπόψη την ηλικία και τον αριθμό των συστηματικών θεραπειών που χορηγήθηκαν [παράμετροι που έδειξαν προγνωστική σημασία ή τάση για το OS1 και το OS2 (**Πίνακας 6**)], η χαμηλή έκφραση του sFOXP3 δεν βρέθηκε να εμφανίζει προγνωστική αξία για το OS1 (HR=1,66, 95% CI 0,91-3,01, p=0,098), ενώ η αυξανόμενη ηλικία και ο χαμηλότερος αριθμός συστηματικών θεραπειών που χορηγήθηκαν διατήρησαν τη δυσμενή προγνωστική τους σημασία στο πολυπαραγοντικό αυτό μοντέλο (HR=1,06, 95% CI 1,02-1,10, p=0,002 και HR=2,4 CI 1,31-4,58, p=0,005, αντίστοιχα).

Parameter	OS1			OS2		
	Event/Total	HR (95% CI)	p-value	Event/Total	HR (95% CI)	p-value
<b>Age at diagnosis</b>		1.07 (1.03-1.10)	<b>&lt;0.001</b>		1.03 (1.00-1.06)	0.069
<b>Comorbidities</b>						
No	24/29	0.65 (0.37-1.15)	0.139	24/29	1.14 (0.66-1.98)	0.642
Yes	26/30	Reference	--	27/31	Reference	--
<b>Sex</b>						
Female	15/17	0.69 (0.37-1.26)	0.225	15/17	1.40 (0.77-2.57)	0.274
Male	36/43	Reference	--	37/44	Reference	--
<b>N of systemic therapies</b>						
1	21/25	2.61 (1.45-4.68)	<b>0.001</b>	21/25	1.70 (0.97-2.99)	0.064
≥2	29/34	Reference	--	30/35	Reference	--
<b>Arterial hypertension</b>						
No	14/15	2.13 (0.94-4.80)	0.068	14/15	2.07 (0.95-4.53)	0.068



Yes	11/14	Reference	--	12/15	Reference	--
-----	-------	-----------	----	-------	-----------	----

*Πίνακας 6. Hazard ratios and 95% confidence intervals estimated by univariate Cox regression models for clinicopathological parameters with respect to OS1 and OS2.*

HR, hazard ratio; CI, confidence interval

Significant p-values are shown in bold.

**Πίνακας 6.** *Hazard ratios and 95% confidence intervals estimated by univariate Cox regression models for clinicopathological*

## 10.ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ένα βασικό χαρακτηριστικό της έρευνας αυτής είναι ότι μέχρι σήμερα δεν υπάρχει καμία αντίστοιχη στα ελληνικά δεδομένα, ενώ και στην παγκόσμια βιβλιογραφία οι μελέτες στον τομέα αυτό είναι περιορισμένες. Πρόκειται για τη μελέτη της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή σε πρωτοπαθείς όγκους και σε συνοδές εγκεφαλικές μεταστάσεις σε ασθενείς με ποικίλες νεοπλασίες και ακολούθως της συσχέτισής τους. Η αξιολόγηση της ανοσολογικής απόκρισης βασίστηκε στην εκτίμηση της ανοσολογικής διήθησης από λεμφοκύτταρα, δηλαδή από TILs, συγκεκριμένων υποτύπων (CD3, CD8, FOXP3) και της έκφρασης του PD-L1/PD-1, με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας. Για τη μελέτη μας, χρησιμοποιήθηκε το βιοοπτικό υλικό από εγκεφαλικές μεταστάσεις 72 ασθενών, από τους οποίους οι 9 διέθεταν βιοψία κι από την πρωτοπαθή εστία.

Οι εγκεφαλικές μεταστάσεις, παρά τις προσπάθειες που έχουν γίνει με την εφαρμογή καινοτόμων θεραπειών για την αντιμετώπισή τους, προσδίδουν κακή πρόγνωση. Ωστόσο, η θεραπευτική προσέγγιση με ανοσοθεραπεία έχει αυξήσει την επιβίωση των ασθενών και έχει αναδείξει τη σημασία της ανοσολογικής απάντησης για την κατανόηση, αλλά και τον περαιτέρω σχεδιασμό του θεραπευτικού πλάνου. Η παρουσία ανοσολογικής διήθησης λεμφοκυττάρων TILs και η έκφραση PD-L1 στον όγκο έχει συσχετιστεί με μεγαλύτερη ανταπόκριση στους immune checkpoints inhibitors, αποκτώντας προβλεπτικό ρόλο. Είναι γενικά αποδεκτό ότι υψηλά μεταλλαξιγόνοι όγκοι, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από έντονη παρουσία TILs εμφανίζουν υψηλές ανταποκρίσεις στην ανοσοθεραπεία(78). Η αντινεοπλασματική δράση των ICI φαίνεται να είναι περιορισμένη στις μεταστάσεις στον εγκέφαλο(205). Προκειμένου να εξηγηθεί αυτή η διαφορά, στο επίκεντρο των μελετών, βρέθηκε ο ρόλος του ανοσοποιητικού στο μικροπεριβάλλον του όγκου(TME) στον εγκέφαλο.

Σημαντικές διαφορές αναφέρονται στη βιβλιογραφία για το ανοσολογικό μικροπεριβάλλον του όγκου μεταξύ της πρωτοπαθούς και δευτεροπαθούς εγκεφαλικής βλάβης. Ο Berghoff και οι συνάδελφοί του, όταν μελέτησαν την ανοσολογική απόκριση στο TME σε πρωτοπαθείς εστίες αδενοκαρκινώματος στον πνεύμονα και στις συνοδές εγκεφαλικές μεταστάσεις, παρατήρησαν ότι η πυκνότητα ανοσοδιήθησης από TILs και συγκεκριμένα των CD3+, CD8+, CD45, PD-1 ήταν υψηλότερη στην πρωτοπαθή εστία σε σχέση με την εγκεφαλική μετάσταση, ενώ η έκφραση PD-L1 ανευρέθη πιο υψηλή στην εγκεφαλική μετάσταση(206).Ειδικότερα, ένα εύρημα της μελέτης μας που επιβεβαιώνει αυτή τη διαφορά αποτελεί η μείωση της πυκνότητας των ολικών CD3 στα ιστικά δείγματα των εγκεφαλικών μεταστάσεων έναντι της πρωτοπαθούς. Δεδομένα από τα ζεύγη πρωτοπαθούς εστίας – μετάστασης ήταν διαθέσιμα μόνο για 7 ασθενείς, ως προς τα TILs και η μείωση αυτή των CD3+ αφορούσε όλους τους ασθενείς. Όλες οι εγκεφαλικές μεταστάσεις είχαν μειωμένα iCD3 και σε περισσότερους από τους μισούς ασθενείς ήταν επίσης μειωμένα τα sCD3.

Η αναχαίτηση αυτή της ανοσοαπόκρισης αποτυπώθηκε στη μελέτη μας και από το ότι ανευρέθησαν μειωμένα τα ολικά CD8, τόσο τα ενδοεπιθηλιακά όσο και τα στρωματικά στις

εγκεφαλικές μεταστάσεις, παρότι υπήρχε υψηλή παρουσία CD8 λεμφοκυττάρων στα δείγματα των πρωτοπαθών εστιών. Από δεδομένα διάφορων μελετών, όπως αυτή του Gallon και των συνεργατών του, αποδεικνύεται ότι ανάλογα με το στάδιο του καρκίνου προσαρμόζεται και η ανοσολογική απάντηση. Ο Gallon και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι σε πρώιμα στάδια του κολοορθικού καρκίνου υπάρχει υψηλή έκφραση σε CD8 λεμφοκύτταρα και η οποία σχετίζεται με ευνοϊκότερη πρόγνωση(3). Τα CD8 λεμφοκύτταρα, γνωστά για την κυτταροτοξική τους δράση και κατ' επέκταση αντινεοπλασματική φαίνεται να κυριαρχούν στα πρώιμα στάδια καρκίνου και να μειώνονται στο μεταστατικό στάδιο που χαρακτηρίζεται από δυσμενή έκβαση.

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε επιπλέον και η έκφραση των FOXP3 ανοσοκυττάρων συγκριτικά με την πρωτοπαθή και δευτεροπαθή εντόπιση. Ενδιαφέρον εύρημα της ερευνάς μας αποτελεί η διαπίστωση της αύξησης των FOXP3-Treg στις εγκεφαλικές μεταστάσεις έναντι των αντίστοιχων πρωτοπαθών εστιών. Όπως γνωρίζουμε τα FOXP3 παρά τον πολύπλοκο ρόλο που διαδραματίζουν στο ανοσοποιητικό σύστημα, είναι γνωστά για τις ανοσοκατασταλτικές τους δραστηριότητες. Συνεπώς, η αύξηση αυτή των FOXP3 έρχεται σύμφωνη με την κακή έκβαση των ασθενών με εγκεφαλικές μεταστάσεις.

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία προσπάθειες έχουν γίνει να εξηγήσουν το γεγονός γιατί οι εγκεφαλικές μεταστάσεις δεν ανταποκρίνονται στην ανοσοθεραπεία τόσο καλά όσο οι πρωτοπαθείς όγκοι. Ο Ryoul Kim και οι συνεργάτες του μελέτησαν τον TME τόσο στις πρωτοπαθείς εστίες, που αφορούσαν αποκλειστικά των πνεύμονα όσο και στις αντίστοιχες εγκεφαλικές μεταστάσεις(207). Βάσει των αποτελεσμάτων της μελέτης τους διαπιστώθηκε υψηλότερη πυκνότητα TILs και PD-1 στους πρωτοπαθείς όγκους, όπου σχετίζονταν με καλύτερες ανταποκρίσεις. Η υπόθεση αυτή ενισχύθηκε και από τον Bergoff και τους συνεργάτες του, οι οποίοι μελέτησαν, όπως προαναφέρθηκε, το ρόλο ως βιοδείκτη των TILs – PD1 και PD-L1 σε πρωτοπαθείς και εγκεφαλικές εστίες. Διαπίστωσαν ότι το PD-1 υπερέχει στις πρωτοπαθείς εστίες έναντι των εγκεφαλικών μεταστάσεων, ενώ υψηλότερη ανοσοέκφραση σε PD-L1 κατέδειξαν στις εγκεφαλικές μεταστάσεις συγκριτικά με τους πρωτοπαθείς όγκους(206). Επιπρόσθετα, καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ συνολικής επιβίωσης και ανοσοδιήθησης TILs ή ανοσοέκφρασης PD-L1, δεν παρατηρήθηκε(206). Η μείωση αυτή παρατηρήθηκε και στη δική μας μελέτη, όπου πέντε στους εννέα ασθενείς εμφάνισαν μείωση του PD-1 στα μεταστατικά δείγματα. Ωστόσο, τα επίπεδα έκφρασης PD-1 εμφάνισαν αύξηση στα μεταστατικά δείγματα για 4 από τους εννέα όγκους (44,4%) με διαθέσιμα δεδομένα. Η διαφορά αυτή στη δική μας μελέτη πιθανά οφείλεται στην ποικιλία της πρωτοπαθούς εστίας, καθώς οι 5 από τους εννέα ασθενείς είχαν καρκίνο πνεύμονος, οι 2 είχαν καρκίνο μαστού, 1 ασθενής είχε νεφροκυτταρικό καρκίνωμα νεφρού και 1 ασθενής είχε ουροθηλιακό καρκίνωμα. Επιπλέον, μια άλλη διαφορά εντοπίζεται στο γεγονός ότι ελάχιστοι ασθενείς έλαβαν ανοσοθεραπεία, καθώς αυτή θα επηρέαζε την πορεία της νόσου και τη συνολική επιβίωση.

Μια άλλη παράμετρος που μελετήθηκε στην ερεύνα μας είναι η συσχέτιση της έκφρασης του PD-L1 στους πρωτοπαθείς όγκους και στις εγκεφαλικές μεταστάσεις. Η έκφραση του PD-

L1 στα καρκινικά κύτταρα δεν άλλαξε στη μετάσταση σε σύγκριση με τις τιμές που παρατηρήθηκαν στους πρωτοπαθείς όγκους για τους περισσότερους ασθενείς (στο 44,4% των ασθενών, 4 στους 9), ενώ αύξηση παρατηρήθηκε σε 2 μόνο ασθενείς(22,2%). Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα συμπίπτει με πρόσφατη μελέτη, που αφορούσε πρωτοπαθείς όγκους καρκίνου του πνεύμονος με εγκεφαλικές μεταστάσεις(207). Σε αυτή τη μελέτη όπως και στην δική μας δεν παρατηρήθηκε καμία αξιοσημείωτη διαφορά της έκφρασης του PD-L1 στα καρκινικά κύτταρα των πρωτοπαθών όγκων και συνοδών εγκεφαλικών μεταστάσεων. Από την άλλη πλευρά υπάρχουν δεδομένα μελετών που δείχνουν μείωση του PD-L1 των καρκινικών κυττάρων στην εγκεφαλική μετάσταση. Επιπρόσθετα, στην μελέτη μας παρατηρήθηκε ότι η έκφραση του PD-L1 στα ανοσοποιητικά κύτταρα μειώθηκε στη μετάσταση για την πλειονότητα των ασθενών με διαθέσιμα ζεύγη.

Ένας άλλος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να αναδείξει τυχόν συσχέτιση της ανοσολογικής απόκρισης με την συνολική επιβίωση των ασθενών (OS) σε ασθενείς με εγκεφαλικές μεταστάσεις. Η συνολική επιβίωση εκτιμήθηκε στη βάση δύο παραμέτρων, συνολική επιβίωση από την ημερομηνία της αρχικής διάγνωσης(OS1) και συνολική επιβίωση από την ημερομηνία διάγνωσης της εγκεφαλικής νόσου(OS2). Είναι πλέον γνωστός ο προγνωστικός ρόλος της έκφρασης του PD-L1 στα καρκινικά κύτταρα και η υψηλή έκφρασή του σχετίζεται με πτωχή πρόγνωση σε πολλούς συμπαγείς όγκους τόσο σε προχωρημένα στάδια της νόσου όσο και σε πρώιμα(82). Για τον λόγο αυτό αποτελεί κύριο μηχανισμό στόχευσης για την αντιμετώπιση της κακοήθους νεοπλασίας. Ωστόσο, στη δική μας μελέτη δεν προέκυψε καμία σημαντική προγνωστική αξία της έκφρασης του PD-1 και του PD-L1 για την συνολική επιβίωση OS1 και OS2. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι οι περισσότεροι ασθενείς μας αντιμετωπίστηκαν θεραπευτικά σε χρονική περίοδο, όπου η ανοσοθεραπεία δεν είχε εφαρμοστεί κλινικά.

Δεδομένα από τη διεθνή βιβλιογραφία καταδεικνύουν την προγνωστική αξία της παρουσίας των TILs σε ποικίλα κακοήθη νεοπλάσματα. Ωστόσο, σύμφωνα με τη μελέτη μας δεν προέκυψε καμία συσχέτιση της ανοσοδιήθησης TILs και της συνολικής επιβίωσης OS1 και OS2. Αξίζει να αναφερθεί ότι η εργασία μας διεξήχθη σε ασθενείς που αντιμετωπίστηκαν το χρονικό διάστημα 2005-2018, στο οποίο δεν υπήρχε η θεραπευτική επιλογή της ανοσοθεραπείας.

Επιπλέον, ο προγνωστικός ρόλος των FOXP3-Tregs αποτέλεσε κομμάτι της ερευνάς μας. Τα FOXP3 αποτελούν καταστολείς της ανοσολογικής απόκρισης και η ύπαρξή τους σχετίζεται με δυσμενή έκβαση των ασθενών. Παρόλη την κατανόηση της δράσης τους, σε πολλές μελέτες στη διεθνή βιβλιογραφία τα αποτελέσματα για την προγνωστική τους αξία είναι αντιφατικά. Σε άλλες μελέτες, όπως αυτή του Miyake και των συνεργατών του, σε ασθενείς με ουροθηλιακό καρκίνωμα, η έντονη διήθηση από FOXP3 σχετίστηκε με δυσμενή επιβίωση (208), ενώ σε άλλες όπως αυτή του Salama και των συνεργατών του, παρατηρήθηκε μία παράδοση θετική προγνωστική αξία των FOXP3, σε ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου(209). Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε μια τάση αυξημένου κινδύνου θανάτου για τους ασθενείς με χαμηλή έκφραση sFOXP3 σε σχέση με το OS1, σε αντίθεση με αυτούς με

υψηλή έκφραση. Ενώ, οι υπόλοιποι υπό εξέταση ανοσοφαινότυποι (CD3, CD8) λεμφοκυττάρων δεν ανέδειξαν καμία προγνωστική αξία. Όσον αφορά το OS2, οι ασθενείς με χαμηλή πυκνότητα σε sFOXP3 εμφάνισαν χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με τους ασθενείς με υψηλή πυκνότητα. Η συνολική επιβίωση από την στιγμή της διάγνωσης των εγκεφαλικών μεταστάσεων ήταν σημαντικά μικρότερη στους ασθενείς με χαμηλή έκφραση sFOXP3. Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα των ερευνών πάνω στην προγνωστική αξία των FOXP3 θα μπορούσαν να οφείλονται στη διαφορετική μεθοδολογία ταυτοποίησης τους καθώς και στην ετερογένεια που διέπει τον όγκο στα διαφορετικά στάδια της καρκινογένεσης.

Η ηλικία και ο αριθμός των συστηματικών θεραπειών που χορηγήθηκαν εμφάνισαν προγνωστική αξία για τη συνολική επιβίωση, OS1 και OS2. Από τα αποτελέσματα της εργασίας μας φάνηκε ότι η αυξανόμενη ηλικία και ο χαμηλότερος αριθμός συστηματικών θεραπειών διατήρησαν τη δυσμενή προγνωστική τους σημασία, στο πολυπαραγοντικό αυτό μοντέλο, με αντίκτυπο το πτωχό προσδόκιμο και τη μικρότερη συνολική επιβίωση, όπως αναμενόταν.

Παρά το περιορισμένο δείγμα ασθενών με διαθέσιμο ζεύγος πρωτοπαθούς όγκου και εγκεφαλικής μετάστασης καθώς και την ιδιομορφία που παρουσίαζε το δείγμα που επεξεργαστήκαμε (εγκεφαλικές μεταστάσεις από ποικίλα κακοήγη νεοπλάσματα), τα αποτελέσματα της μελέτης μπορούν να κριθούν ως ικανοποιητικά. Συγκεκριμένα, η μελέτη μας κατάφερε να αναδείξει την ανοσολογική απάντηση στις εγκεφαλικές μεταστάσεις και να αποδείξει ότι ο εγκέφαλος αποτελεί ένα ανοσογόνο όργανο. Επίσης, διαπιστώθηκε ανοσολογική ετερογένεια μεταξύ της πρωτοπαθούς εστίας και της εγκεφαλικής μετάστασης, με το εγκεφαλικό παρέγχυμα να χαρακτηρίζεται από την επικράτηση ανοσοκυττάρων, τα οποία δεν επάγουν την ανοσοαπόκριση, αλλά παρουσιάζουν ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες.

## 11.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή εξάγεται το συμπέρασμα ότι ο εγκέφαλος ως ξενιστής παρουσιάζει ανοσολογική δραστηριότητα με διαφορετικά όμως ανοσολογικά χαρακτηριστικά έναντι της πρωτοπαθούς εστίας. Το εγκεφαλικό παρέγχυμα αποτελεί ένα ιδιαίτερο ανοσολογικό μικροπεριβάλλον, το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλή παρουσία διηθούντων T λεμφοκυττάρων, στην πλειοψηφία των οποίων πρόκειται για ανοσοφαινότυπους, γνωστούς για την ανοσοκατασταλτική τους δράση, με κύριο υποπληθυσμό τα FOXP3.

Συγκεκριμένα, νέο εύρημα αποτελεί η μείωση της πυκνότητας των ολικών CD3 στα ιστικά δείγματα των εγκεφαλικών μεταστάσεων έναντι της πρωτοπαθούς. Όλες οι εγκεφαλικές μεταστάσεις είχαν μειωμένα iCD3 και σε περισσότερους από τους μισούς ασθενείς ήταν επίσης μειωμένα τα sCD3. Είναι γνωστό ότι τα CD3 αποτελούν ανοσοφαινότυπο των T λεμφοκυττάρων, τα οποία επάγουν την ανοσοαπόκριση και εμφανίζουν έντονη αντινεοπλασματική δράση. Επιπλέον, μείωση παρατηρήθηκε και στα ολικά CD8, τόσο στα ενδοεπιθηλιακά όσο και στα στρωματικά στις εγκεφαλικές μεταστάσεις, παρότι υπήρχε υψηλή παρουσία CD8 λεμφοκυττάρων στα δείγματα των πρωτοπαθών εστιών.

Ενδιαφέρον, εύρημα αποτελεί η διαπίστωση της αύξησης των FOXP3-Treg στις εγκεφαλικές μεταστάσεις έναντι των αντίστοιχων πρωτοπαθών εστιών. Όπως γνωρίζουμε τα FOXP3 παρά τον πολύπλοκο ρόλο που διαδραματίζουν στο ανοσοποιητικό σύστημα, είναι γνωστά για τις ανοσοκατασταλτικές τους δραστηριότητες. Συνεπώς, η αύξηση αυτή των FOXP3 έρχεται σύμφωνη με την κακή έκβαση των ασθενών με εγκεφαλικές μεταστάσεις.

Τα επίπεδα έκφρασης PD-1 μειώθηκαν στα μεταστατικά δείγματα για τους περισσότερους ασθενείς. Η έκφραση PD-L1 των καρκινικών κυττάρων δεν άλλαξε στη μετάσταση σε σύγκριση με τις τιμές που παρατηρήθηκαν στους πρωτοπαθείς όγκους, για τους περισσότερους ασθενείς. Από την άλλη πλευρά διαπιστώθηκε μείωση της έκφρασης του PD-L1 των ανοσοποιητικών κυττάρων για την πλειονότητα των ασθενών με διαθέσιμα ζεύγη(44,4%). Ευρήματα τα οποία συμπίπτουν με τα αποτελέσματα παρόμοιων μελετών, που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία.

Καμία σημαντική συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των επιλεγμένων κλινικοπαθολογικών παραμέτρων και της έκφρασης CD3, CD8, FOXP3 (στρωματικά, ενδοογκικά και ολικά) και PD-L1/PD-1. Ομοίως, η πυκνότητα PD-1 και TILs δεν συσχετίστηκε σημαντικά με καμία από τις εξεταζόμενες κλινικές παραμέτρους (όλες οι τιμές  $p>0,050$ ).

Δεν προέκυψε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση των ανοσοκυττάρων στο νεοπλασματικό ιστό και της συνολικής επιβίωσης OS1 των ασθενών. Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε μόνο μια τάση αυξημένου κινδύνου θανάτου για τους ασθενείς με χαμηλή έκφραση sFOXP3 σε σχέση με το OS1, σε αντίθεση με αυτούς με υψηλή έκφραση. Ενώ, οι υπόλοιποι υπό εξέταση ανοσοφαινότυποι (CD3, CD8) λεμφοκυττάρων δεν ανέδειξαν καμία προγνωστική αξία. Όσον αφορά το OS2, οι ασθενείς με χαμηλή πυκνότητα σε sFOXP3 εμφάνισαν χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με τους ασθενείς με υψηλή πυκνότητα. Οι

υπόλοιποι υπό εξέταση βιοδείκτες δεν εμφάνισαν καμία σημαντική προγνωστική αξία για το OS2. Η συνολική επιβίωση από τη στιγμή της διάγνωσης των εγκεφαλικών μεταστάσεων ήταν σημαντικά μικρότερη στους ασθενείς με χαμηλή έκφραση sFOXP3. Είναι γνωστό ότι τα FOXP3 παρουσιάζουν μεγάλη ενδοογκική ετερογένεια και αυτό τα καθιστά αμφιλεγόμενα σε προγνωστική αξία. Αυτός είναι κι ο λόγος που απαιτείται μεγαλύτερη ερευνητική προσπάθεια, ώστε να αποσαφηνιστεί καλύτερα η επίδρασή του στο μικροπεριβάλλον του καρκίνου, στα διάφορα στάδια της εξέλιξής του.

Επίσης, δεν προέκυψε καμία σημαντική προγνωστική αξία της έκφρασης του PD-1 και του PD-L1 για τις δύο παραμέτρους της συνολικής επιβίωσης (OS1 και OS2) των ασθενών. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι οι περισσότεροι ασθενείς μας αντιμετωπίστηκαν θεραπευτικά σε χρονική περίοδο, όπου η ανοσοθεραπεία δεν είχε εφαρμοστεί κλινικά. Λόγω του περιορισμού αυτού κατέσκει δύσκολη η διεξαγωγή αποτελεσμάτων της επίπτωσης του PD/PD-L1 στην επιβίωση.

Ένα άλλο εύρημα αποτελεί ότι η αυξανόμενη ηλικία και ο χαμηλότερος αριθμός συστηματικών θεραπειών διατήρησαν τη δυσμενή προγνωστική τους σημασία, στο πολυπαραγοντικό αυτό μοντέλο, με αντίκτυπο το πτωχό προσδόκιμο και τη μικρότερη συνολική επιβίωση, όπως αναμενόταν.

Συμπερασματικά, το εγκεφαλικό παρέγχυμα δεν στερείται ανοσολογικής απόκρισης και η στόχευσή του με νεότερες ανοσοθεραπευτικές προσεγγίσεις αποτελούν μία πρόκληση για νέες ερευνητικές προσπάθειες.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Εισαγωγή.** Η επίπτωση εγκεφαλικών μεταστάσεων σε ασθενείς με κακοήθεια ποικίλλει ανάλογα με την εντόπιση της πρωτοπαθούς εστίας, αλλά βαίνει αυξανόμενη κατά τις τελευταίες δεκαετίες. Η εφαρμογή νέων στοχευτικών ανοσοθεραπευτικών προσεγγίσεων έχει αυξήσει την επιβίωση ασθενών και έχει αναδείξει τη σημασία της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή έναντι του όγκου, η ύπαρξη όμως εγκεφαλικής νόσου παραμένει κακός προγνωστικός παράγοντας. Η παρουσία της ανοσολογικής διήθησης λεμφοκυττάρων (TILs) και η έκφραση του PD-L1/PD-1 έχει συσχετιστεί με καλύτερη ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία και καλύτερη πρόγνωση στην επιβίωση, αποκτώντας προβλεπτικό και προγνωστικό ρόλο σε πολλά κακοήθη νεοπλασμάτα. Η ύπαρξη ανοσολογικής απάντησης αποκτά ολοένα και περισσότερο χαρακτήρα βιοδείκτη και η ύπαρξη της στις εγκεφαλικές μεταστάσεις αποτελεί αντικείμενο μελέτης για την κατανόηση του ρόλου του ανοσοποιητικού συστήματος στο Κ.Ν.Σ και το αντίκτυπο που μπορεί να έχει στην εξέλιξη της νόσου, στην πρόγνωση και στην ενδεχόμενη ανταπόκριση σε νεότερες στοχευτικές θεραπευτικές επιλογές.

Ωστόσο, η ανοσολογική απάντηση στο εγκεφαλικό παρέγχυμα δεν έχει μελετηθεί αρκετά, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία. Για πολλά χρόνια ο εγκέφαλος θεωρούνταν μη ανοσογόνο όργανο και κατ' επέκταση οι μεταστάσεις στο Κ.Ν.Σ ότι στερούνταν ανοσολογικής απόκρισης. Τα τελευταία χρόνια, η άποψη αυτή τείνει να αναθεωρηθεί, οι γνώσεις μας όμως παραμένουν περιορισμένες, λόγω της διαφορετικότητας του εγκεφαλικού παρεγχύματος και του μικροπεριβάλλοντος των εγκεφαλικών μεταστάσεων.

**Σκοπός.** Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η διερεύνηση της ανοσολογικής απάντησης του ξενιστή σε πρωτοπαθείς όγκους και σε συνοδές εγκεφαλικές μεταστάσεις στο Κ.Ν.Σ, από ποικίλα κακοήθη νεοπλασμάτα. Συγκεκριμένα, να διερευνηθεί η ύπαρξη ή μη ανοσολογικής απόκρισης στην εγκεφαλική μετάσταση. Η αξιολόγηση της ανοσολογικής απόκρισης αποφασίστηκε να πραγματοποιηθεί με την εκτίμηση των ανοσοκυττάρων διηθούντων του όγκου TILs και της ανοσοέκφρασης της programmed cell death protein 1 receptor (PD-1), programmed cell death protein 1 receptor ligand (PD-L1), στα ιστικά δείγματα τόσο των εγκεφαλικών μεταστάσεων όσο και των πρωτοπαθών όγκων.

Ακολούθως, σκοπός της μελέτης ήταν να διερευνηθεί η ύπαρξη τυχόν διαφορών/ομοιοτήτων μεταξύ της ανοσολογικής δραστηριότητας των πρωτοπαθών όγκων σε σχέση με αυτή των εγκεφαλικών μεταστάσεων και η προγνωστική της σημασία για την έκβαση της νόσου, την ανταπόκριση στη θεραπεία και τη συνολική επιβίωση. Η συνολική επιβίωση OS θα αξιολογούνταν σε δύο παραμέτρους, από τη στιγμή της διάγνωσης της νόσου (**OS1**) και τη συνολική επιβίωση από τη στιγμή της διάγνωσης των εγκεφαλικών μεταστάσεων (**OS2**).

**Μέθοδοι.** Η μελέτη αυτή είναι μια αναδρομική μελέτη, για την οποία χρησιμοποιήθηκε από συνολικά 72 ασθενείς βιοπτικό υλικό εγκεφαλικών μεταστάσεων από ποικίλα κακοήθη νεοπλασμάτα. Αξιοποιήθηκε επίσης το βιοπτικό υλικό του πρωτοπαθούς όγκου σε όσους ασθενείς υπήρχε διαθέσιμο ζεύγος πρωτοπαθούς και εγκεφαλικής εστίας. Πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική ανάλυση για συγκεκριμένους ανοσοφαινότυπους



διηθούντων λεμφοκυττάρων-TILs ( CD3, CD8, FOXP3) και έκφρασης PD-L1/PD-1. Ακολούθως, υπολογίστηκε η πυκνότητα των CD8, CD3, FOXP3, τόσο των στρωματικών όσο και των ενδοεπιθηλιακών. Η θετική έκφραση PD-L1 εκτιμήθηκε στα καρκινικά κύτταρα και στα ανοσοποιητικά κύτταρα και ακολούθησε αξιολόγηση της έντασης της ανοσόχρωσης στο ποσοστό των καρκινικών κυττάρων με την ημιποσοτική χρώση H-Score. Για τη μελέτη επιλέχθηκαν κλινικοπαθολογικοί παράμετροι, οι οποίοι εξετάστηκαν για πιθανή συσχέτιση με την ανοσολογική απόκριση.

**Αποτελέσματα.** Από την έρευνα προέκυψε ότι ο εγκέφαλος ως ξενιστής παρουσιάζει ανοσολογική δραστηριότητα με διαφορετικά όμως ανοσολογικά χαρακτηριστικά έναντι της πρωτοπαθούς εστίας. Διαπιστώθηκε πως το εγκεφαλικό παρέγχυμα αποτελεί ένα ιδιαίτερο ανοσολογικό μικροπεριβάλλον, το οποίο χαρακτηρίζεται από υψηλή παρουσία διηθούντων T λεμφοκυττάρων, στην πλειοψηφία των οποίων πρόκειται για ανοσοφαινότυπους, γνωστούς για την ανοσοκατασταλτική τους δράση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα ανοσοκύτταρα λεμφοκυτταρικής διήθησης-TILs, τα οποία κυριαρχούν στα ιστικά δείγματα πρωτοπαθών εστιών αφορούν τους ανοσοφαινότυπους εκείνους CD3/CD8 που επάγουν την ανοσολογική απάντηση του ξενιστή προς τον όγκο. Αντίθετα, στα ιστικά δείγματα των συνοδών εγκεφαλικών μεταστάσεων κυριαρχούν τα FOXP3(Tregs), γνωστά για τις ανοσοκατασταλτικές του ιδιότητες. Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με χαμηλή έκφραση FOXP3 είχαν μικρότερη συνολική επιβίωση, όσον αφορά την OS2 και εμφάνιζαν μια τάση αυξημένου κινδύνου θανάτου σε σχέση με το OS1 σε αντίθεση με αυτούς με υψηλή έκφραση. Συνεπώς, όπως προέκυψε από τη μελέτη μας, οι ασθενείς με χαμηλή πυκνότητα σε FOXP3 εμφάνισαν χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με τους ασθενείς με υψηλή πυκνότητα. Είναι γνωστό ότι τα FOXP3 παρουσιάζουν μεγάλη ενδοογκική ετερογένεια και αυτό τα καθιστά αμφιλεγόμενα σε προγνωστική αξία.

## ABSTRACT

**Introduction.** The incidence of brain metastases in patients with malignancy varies depending on the location of the primary site but has been increasing in recent decades. The implementation of new targeted immunotherapeutic approaches has increased patient survival and highlighted the importance of the host's immune response to tumor, but the presence of brain disease remains a poor prognostic factor. The presence of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and expression of programmed cell death protein 1 receptor and its ligand (PD-1/PD-L1) has been associated with a better response to immunotherapy and a better prognosis for survival, acquiring a predictive and prognostic role in many malignancies. The existence of an immune response is becoming more and more biomarker and its existence in brain metastases is the subject of a study to understand the role of the immune system in the CNS and the impact it can have on the progression of the disease, the prognosis and the possible response to newer targeted treatment options.

However, the immune response to cerebral parenchyma has not been sufficiently studied, according to the international literature. For many years the brain was considered a non-immunogenic environment and consequently it was thought that metastases in the CNS lacked an immune response. In recent years, this view tends to be revised, but our knowledge remains limited, due to the diversity of the cerebral parenchyma and the microenvironment of brain metastases.

**Aim.** The aim of this study was to investigate the host's immune response to primary tumors and concomitant brain metastases in the CNS from a variety site of malignancies. Specifically, the aim was to investigate the presence or absence of an immune response in brain metastases. Evaluation of the immune response was decided to be performed by assessing the tumor infiltrating TILs and the expression of programmed cell death protein 1 receptor (PD-1) and its ligand (PD-L1), in tissue samples of both brain metastases as well as primary tumors.

Subsequently, the aim of the study was to investigate the existence of any differences / similarities between the immune activity of primary tumors in relation to that of brain metastases and its prognostic significance for the outcome of the disease, the response to treatment and overall survival. Overall OS survival would be assessed in two parameters, once from the time of diagnosis of the disease (OS1) and second overall survival from the time of diagnosis of brain metastases (OS2).

**Methods.** This study is a retrospective study, for which a total of 72 patients used biopsy material of brain metastases from various malignancies. The biopsy material of the primary tumor was also used in those patients in whom paired samples of primary tumor and brain metastases were available. Immunohistochemical analysis was performed for tumor infiltrated lymphocytes-TILs (CD3, CD8, FOXP3) and PD-L1 / PD-1 expression. Then, the densities of CD8, CD3, FOXP3, both stromal and intraepithelial, were calculated. Positive expression of PD-L1 was assessed in tumor cells and immune cells, followed by evaluation of the intensity of immunostaining in the percentage of cancer cells by semi-quantitative H-Score

staining. Clinical parameters were selected for the study, which were examined for possible correlation with the immune response.

**Results.** The study demonstrated that the brain as a host exhibits immune activity with different immune characteristics against the primary tumors. The cerebral parenchyma was found to be a special microenvironment, which is characterized by a high presence of tumor infiltrated lymphocytes TILs, the majority of which are leukocytes subsets associated with dampening of the immune response. Our findings suggest that the tumor infiltration lymphocytes (TILs), which predominate in the tissue samples of primary sites, consist mainly of CD3 / CD8 that induce immune response. In contrast, tissue samples of concomitant brain metastases are dominated by FOXP3 (Tregs), known for their immunosuppressive properties. In this study, it was observed that regarding OS2, patients with low expression of FOXP3 had significantly shorter OS2 compared to those with high expression of FOXP3. Furthermore, it was found only a trend toward increased risk of death for patients with low expression of FOXP3 with respect to OS1. Consequently, according to these results patients with low density at FOXP3 had a worse prognosis compared to patients with high density. FOXP3s are known to demonstrate controversial prognostic value due to their strong intratumoral heterogeneity.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Demaria S, Pikarsky E, Karin M, Coussens LM, Chen YC, El-Omar EM, Trinchieri G, Dubinett SM, Mao JT, Szabo E, Krieg A, Weiner GJ, Fox BA, Coukos G, Wang E, Abraham RT, Carbone M. LMTC and inflammation: promise for biologic therapy. *J Immunother* 2010 M-51. doi: 10.1097/CJI.0b013e3181d32e74. P 20386472; PP. No Title.
2. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*. 2014;27:16–25. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
3. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313(5795):1960-1964, 2006
4. Holmgaard RB, Zamarin D, Li Y, Gasmi B, Munn DH, Allison JP, Merghoub T, Wolchok JD. Tumor-Expressed IDO Recruits and Activates MDSCs in a Treg-Dependent Manner. *Cell Rep*. 2015 Oct 13;13(2):412-24. doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.077. Epub 2015 Sep 24. PMID.
5. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):860-7. doi: 10.1038/nature01322. PMID: 12490959; PMCID: PMC2803035.
6. Lavin Y, Mortha A, Rahman A, Merad M. Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol*. 2015 Dec;15(12):731-44. doi: 10.1038/nri3920. PMID: 26603899; PMCID: PMC4706379.
7. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy [published correction appears in *Immunity*. 2014 Nov 20;41(5):866]. *Immunity*. 2014;41(1):49-61. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.010.
8. Kitamura T, Qian BZ, Pollard JW. Immune cell promotion of metastasis. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(2):73-86. doi:10.1038/nri3789.
9. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002 Nov;23(11):549-55. doi: 10.1016/s1471-4906(02)02302-5. PMID: 12401408.
10. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(7):399-416. doi:10.1038/nrclinonc.2016.217.
11. DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao SL, Madden SF, Gallagher WM, Wadhwani N, Keil SD, Junaid SA, Rugo HS, Hwang ES, Jirström K, West BL, Coussens LM. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy, *Cancer Discov* 1 (2011), 54–67. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)].

12. Qian BZ, Zhang H, Li J, He T, Yeo EJ, Soong DY, Carragher NO, Munro A, Chang A, Bresnick AR, Lang RA, Pollard JW. FLT1 signaling in metastasis-associated macrophages activates an inflammatory signature that promotes breast cancer metastasis. *J Exp Med*. 20.
13. Mazziere R, Pucci F, Moi D, Zonari E, Ranghetti A, Berti A, Politi LS, Gentner B, Brown JL, Naldini L, De Palma M. Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. *Cancer cell*. 2011;19:512–526. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)] .
14. Mildner A, Jung S. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity*. 2014 May 15;40(5):642-56. doi: 10.1016/j.immuni.2014.04.016. PMID: 24837101.
15. Tran Janco JM, Lamichhane P, Karyampudi L, Knutson KL. Tumor-infiltrating dendritic cells in cancer pathogenesis. *J Immunol*. 2015 Apr 1;194(7):2985-91. doi: 10.4049/jimmunol.1403134. PMID: 25795789; PMCID: PMC4369768.
16. Filley AC, Dey M. Dendritic cell based vaccination strategy: an evolving paradigm. *J Neurooncol*. 2017; 133: 223–235. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
17. Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. 2015; 15: 471–485. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
18. Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, Diamond M, Matsushita H, Kohyama M, Calderon B, Schraml BU, Unanue ER, Diamond MS, Schreiber RD, Murphy TL, Murphy KM. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322: 1097–1100. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
19. Vacchelli E, Ma Y, Baracco EE et al. C antitumor immunity requires formyl peptide receptor 1. *Science* 2015;350(6263):972-978. doi:10. 1126/science. aad0779. No Title.
20. Mukherji, B., Chakraborty, N. G., Yamasaki, S., Okino, T., Yamase, H., Sporn, J. R., Kurtzman, S. K., Ergin, M. T., Ozols, J., & Meehan, J. (1995). Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(17):8078-8082. doi:10.1073/pnas.92.17.8078.
21. Nestle, F. O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G., & Schadendorf, D. (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nature medicine*, 4(3), 328–332. <https://doi.org/10.1038/nm0398-328>.
22. Beer, T. M., Bernstein, G. T., Corman, J. M., Glode, L. M., Hall, S. J., Poll, W. L., Schellhammer, P. F., Jones, L. A., Xu, Y., Klystra, J. W., & Frohlich, M. W. (2011). Randomized trial of autologous cellular immunotherapy with sipuleucel-T in androgen- dependent prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17(13):4558-4567. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-3223.
23. Wilgenhof, S., Corthals, J., Heirman, C., van Baren, N., Lucas, S., Kvistborg, P., Thielemans, K., & Neyns, B. (2016). Phase II Study of Autologous Monocyte-Derived mRNA Electroporated

Dendritic Cells (TriMixDC-MEL) Plus Ipilimumab in Patients With Pretreated Advanced Melanoma. *J Clin Oncol*. 2016;34(12):1330-1338. doi:10.1200/JCO.2015.63.4121.

24. Lavin, Y., Kobayashi, S., Leader, A., Amir, E. D., Elefant, N., Bigenwald, C., Remark, R., Sweeney, R., Becker, C. D., Levine, J. H., Meinhof, K., Chow, A., Kim-Shulze, S., Wolf, A., Medaglia, C., Li, H., Rytlewski, J. A., Emerson, R. O., Solovyov, A., Greenbaum BD, Sanders C, Vignali M, Beasley MB, Flores R, Gnjatic S, Pe'er D, Rahman A, Amit I, Merad M. (2017). Innate immune landscape in early lung adenocarcinoma by paired single-cell analyses. *Cell* 169:750–765 DOI 10.1016/j.cell.2017.04.014.
25. Böttcher, J. P., Bonavita, E., Chakravarty, P., Brees, H., Cabeza-Cabrero, M., Sammicheli, S., Rogers, N. C., Sahai, E., Zelenay, S., & Reis e Sousa, C. (2018). NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell*, 172(5), 1022–1037.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.004>.
26. Kolaczowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 13(3), 159–175. <https://doi.org/10.1038/nri3399>.
27. Donskov F. (2013). Immunomonitoring and prognostic relevance of neutrophils in clinical trials. *Seminars in cancer biology*, 23(3), 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.02.001>.
28. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*. 2009;16(3):183-194. doi:10.1016/j.ccr.2009.06.017.
29. Governa V, Trella E, Mele V, Tornillo L, Amicarella F, Cremonesi E, Muraro MG, Xu H, Droscher R, Däster SR, et al. (2017). The Interplay Between Neutrophils and CD8(+) T Cells Improves Survival in Human Colorectal Cancer. *Clin. Cancer Res*. 2017, 23, 3847–3858. [CrossRef]
30. Takeshima, T., Pop, L. M., Laine, A., Iyengar, P., Vitetta, E. S., & Hannan, R. (2016). Key role for neutrophils in radiation-induced antitumor immune responses: Potentiation with G-CSF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (2016) Oct 4;113(40):11300-11305.
31. Wang, T. T., Zhao, Y. L., Peng, L. S., Chen, N., Chen, W., Lv, Y. P., Mao, F. Y., Zhang, J. Y., Cheng, P., Teng, Y. S., Fu, X. L., Yu, P. W., Guo, G., Luo, P., Zhuang, Y., & Zou, Q. M. (2017). Tumour-activated neutrophils in gastric cancer foster immune suppression and disease progression through GM-CSF-PD-L1 pathway *Gut* 2017;66:1900-1911.
32. Gabrilovich DI. (2017); Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res*. 5(1):3-8. doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0297.
33. Tohme, S., Yazdani, H. O., Al-Khafaji, A. B., Chidi, A. P., Loughran, P., Mowen, K., Wang, Y., Simmons, R. L., Huang, H., & Tsung, A. (2016). Neutrophil Extracellular Traps Promote the

Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress. *Cancer research*, 76(6), 1367–1380. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1591>

34. Coca, S., Perez-Piqueras, J., Martinez, D., Colmenarejo, A., Saez, M. A., Vallejo, C., Martos, J. A., & Moreno, M. (1997). The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*, 79(12), 2320–2328. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19970615\)79:12<2320::aid-cnrcr5>3.0.co;2-p](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19970615)79:12<2320::aid-cnrcr5>3.0.co;2-p).
35. Ishigami, S., Natsugoe, S., Tokuda, K., Nakajo, A., Che, X., Iwashige, H., Aridome, K., Hokita, S., & Aikou, T. (2000). Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer*, 88(3), 577–583.
36. Liu, X. V., Ho, S. S., Tan, J. J., Kamran, N., & Gasser, S. (2012). Ras activation induces expression of Raet1 family NK receptor ligands. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 189(4), 1826–1834. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200965>.
37. Guerra, N., Tan, Y. X., Joncker, N. T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., Knoblaugh, S., Cado, D., Greenberg, N. M., & Raulet, D. H. (2008). NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity*, 28(4), 57.
38. Liu, R. B., Engels, B., Arina, A., Schreiber, K., Hyjek, E., Schietinger, A., Binder, D. C., Butz, E., Krausz, T., Rowley, D. A., Jabri, B., & Schreiber, H. (2012). Densely granulated murine NK cells eradicate large solid tumors. *Cancer research*, 72(8), 1.
39. Andrews, D. M., Sullivan, L. C., Baschuk, N., Chan, C. J., Berry, R., Cotterell, C. L., Lin, J., Halse, H., Watt, S. V., Poursine-Laurent, J., Wang, C. R., Scalzo, A. A., Yokoyama, W. M., Rossjohn, J., Brooks, A. G., & Smyth, M. J. (2012). Recognition of the Major Histocompatibility Complex (MHC) Class Ib Molecule H2-Q10 by the Natural Killer Cell Receptor Ly49C. *The Journal of biological chemistry*, 291(36), 18740–18752. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.737130>.
40. De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(3):137-148. doi:10.1038/nri3804.
41. de Visser, K. E., Korets, L. V., & Coussens, L. M. (2005). De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer cell*, 7(5), 411–423. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.04.014>.
42. Schioppa, T., Moore, R., Thompson, R. G., Rosser, E. C., Kulbe, H., Nedospasov, S., Mauri, C., Coussens, L. M., & Balkwill, F. R. (2011). B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- $\alpha$  during squamous carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(26), 10662–10667. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100994108>.
43. Olkhanud, P. B., Damdinsuren, B., Bodogai, M., Gress, R. E., Sen, R., Wejksza, K., Malchinkhuu, E., Wersto, R. P., & Biragyn, A. (2011). Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer

metastasis by converting resting CD4<sup>+</sup> T cells to T-regulatory cells. *Cancer research*, 71(10), 3505–3515. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4316>.

44. Pylayeva-Gupta, Y., Das, S., Handler, J. S., Hajdu, C. H., Coffre, M., Koralov, S. B., & Bar-Sagi, D. (2016). IL35-Producing B Cells Promote the Development of Pancreatic Neoplasia. *Cancer discovery*, 6(3), 247–255. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15->.
45. Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., & Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature reviews. Cancer*, 12(4), 298–306. <https://doi.org/10.1038/nrc3245>.
46. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, et al. Towards the introduction of the “Immunoscore” in the classification of malignant tumours. *J Pathol*. 2014;232(2):199-209. doi:10.1002/path.4287.
47. Donnem, T., Kilvaer, T. K., Andersen, S., Richardsen, E., Paulsen, E. E., Hald, S. M., Al-Saad, S., Brustugun, O. T., Helland, A., Lund-Iversen, M., Solberg, S., Gronberg, B. H., Wahl, S. G., Helgeland, L., Fløtten, O., Pohl, M., Al-Shibli, K., Sandanger, TM, Pezzella F, Busund LT, Bremnes RM. Strategies for clinical implementation of TNM-immunoscore in resected nonsmall-cell lung cancer. *Annals of Oncology*. 2016;27:225–232. doi: 10.1093/annonc/mdv560. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)].
48. Halama, N., Michel, S., Kloor, M., Zoernig, I., Benner, A., Spille, A., Pommerencke, T., von Knebel, D. M., Folprecht, G., Lubber, B., Feyen, N., Martens, U. M., Beckhove, P., Gnjatic, S., Schirmacher, P., Herpel, E., Weitz, J., Grabe, N., & Jaeger, D. (2011). Localization and density of immune cells in the invasive margin of human colorectal cancer liver metastases are prognostic for response to chemotherapy. *Cancer Research*, 71(17), 5670–5677. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0268>.
49. Kirilovsky, A., Marliot, F., El Sissy, C., Haicheur, N., Galon, J., & Pagès, F. (2016). Rational bases for the use of the Immunoscore in routine clinical settings as a prognostic and predictive biomarker in cancer patients. *International immunology*, 28(8) 373–382. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxw021>.
50. Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. 1996. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77: 1303–1310. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)].
51. Gao, G., Wang, Z., Qu, X., & Zhang, Z. (2020). Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC cancer*, 20(1), 179. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-6668-z>.
52. Chen B, Li H, Liu C, et al. Prognostic value of the common tumour-infiltrating lymphocyte subtypes for patients with non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *PLoS One*. 2020;15(11):e0242173. Published 2020 Nov 10. doi:10.1371/journal.pone.0242173.



53. Wang, E., Shibutani, M., Nagahara, H., Fukuoka, T., Iseki, Y., Okazaki, Y., Kashiwagi, S., Tanaka, H., & Maeda, K. (2021). Prognostic value of the density of tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer liver metastases. *Oncology letters*, 22(6), 83.
54. Schreiber, R., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 331, 1565–1570 (2011).
55. Speiser, D. E., Ho, P. C., & Verdeil, G. (2016). Regulatory circuits of T cell function in cancer. *Nature reviews. Immunology*, 16(10), 599–611. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.80>.
56. Salgado, R., Denkert, C., Demaria, S., Sirtaine, N., Klauschen, F., Pruneri, G., Wienert, S., Van den Eynden, G., Baehner, F. L., Penault-Llorca, F., Perez, E. A., Thompson, E. A., Symmans, W. F., Richardson, A. L., Brock, J., Criscitiello, C., Bailey, H., Ignatiadis, M., Floris, G., Sparano, J., ... International TILs Working Group 2014 (2015). The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 26(2), 259–271. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu450>
57. Speiser, D. E., Ho, P. C., & Verdeil, G. (2016). Regulatory circuits of T cell function in cancer. *Nature reviews. Immunology*, 16(10), 599–611. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.80>.
58. Matsushita, H., Vesely, M. D., Koboldt, D. C., Rickert, C. G., Uppaluri, R., Magrini, V. J., Arthur, C. D., White, J. M., Chen, Y. S., Shea, L. K., Hundal, J., Wendl, M. C., Demeter, R., Wylie, T., Allison, J. P., Smyth, M. J., Old, L. J., Mardis, E. R., & Schreiber, R. D. (2012). Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature*, 482(7385), 400–404. <https://doi.org/10.1038/nature10755>.
59. Teng MW, Galon J, Fridman WH, Smyth MJ. From mice to humans: developments in cancer immunoediting. *J Clin Invest*. 2015;125(9):3338-3346. doi:10.1172/JCI80004.
60. Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M., & Hafler, D. A. (2010). FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature reviews. Immunology*, 10(7), 490–500. <https://doi.org/10.1038/nri2785>.
61. Ward-Hartstonge KA, Kemp RA. Regulatory T-cell heterogeneity and the cancer immune response. *Clin Transl Immunology*. 2017;6(9):e154. Published 2017 Sep 15. doi:10.1038/cti.2017.43.
62. Campbell D. J. (2015). Control of Regulatory T Cell Migration, Function, and Homeostasis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 195(6), 2507–2513. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500801>.
63. Takeuchi, Y., & Nishikawa, H. (2016). Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *International immunology*, 28(8), 401–409. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxw025>.

64. Saleh, R., & Elkord, E. (2020). Acquired resistance to cancer immunotherapy: Role of tumor-mediated immunosuppression. *Seminars in cancer biology*, 65, 13–27. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.017>.
65. Schlecker, E., Stojanovic, A., Eisen, C., Quack, C., Falk, C. S., Umansky, V., & Cerwenka, A. (2012). Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 189(12), 5602–5611. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201018>.
66. Allaoui R, Hagerling C, Desmond E, Warfvinge CF, Jirstrom K, Leandersson K. 2017. Infiltration of  $\gamma\delta$  T cells, IL-17+ T cells and FoxP3+ T cells in human breast cancer. *Cancer Biomark* 20: 395–409. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
67. Bidwell, B. N., Slaney, C. Y., Withana, N. P., Forster, S., Cao, Y., Loi, S., Andrews, D., Mikeska, T., Mangan, N. E., Samarajiwa, S. A., de Weerd, N. A., Gould, J., Argani, P., Möller, A., Smyth, M. J., Anderson, R. L., Hertzog, P. J., & Parker, B. S. (2012). Silencing of Irf7 pathways in breast cancer cells promotes bone metastasis through immune escape. *Nature medicine*, 18(8), 1224–1231. <https://doi.org/10.1038/nm.2830>.
68. Mego, M., Gao, H., Cohen, E. N., Anfossi, S., Giordano, A., Sanda, T., Fouad, T. M., De Giorgi, U., Giuliano, M., Woodward, W. A., Alvarez, R. H., Valero, V., Ueno, N. T., Hortobagyi, G. N., Cristofanilli, M., & Reuben, J. M. (2016). Circulating Tumor Cells (CTC) Are Associated with Defects in Adaptive Immunity in Patients with Inflammatory Breast Cancer. *Journal of Cancer*, 7(9), 1095–1104. <https://doi.org/10.7150/jca.13098>.
69. Sun WW, Xu ZH, Lian P, Gao BL, Hu JA. Characteristics of circulating tumor cells in organ metastases, prognosis, and T lymphocyte mediated immune response. *Onco Targets Ther*. 2017;10:2413-2424. Published 2017 May 4. doi:10.2147/OTT.S130087.
70. Queirolo P, Spagnolo F, Ascierto PA, et al. (2014). Efficacy and safety of ipilimumab in patients with advanced melanoma and brain metastases. *J Neurooncol*. 118(1):109-116. doi:10.1007/s11060-014-1400-y.
71. Goldberg, S. B., Gettinger, S. N., Mahajan, A., Chiang, A. C., Herbst, R. S., Sznol, M., Tsiouris, A. J., Cohen, J., Vortmeyer, A., Jilaveanu, L., Yu, J., Hegde, U., Speaker, S., Madura, M., Ralabate, A., Rivera, A., Rowen, E., Gerrish, H., Yao, X., Chiang, V., ... Kluger, H. M. (2016). Pembrolizumab for patients with melanoma or non-small-cell lung cancer and untreated brain metastases: early analysis of a non-randomised, open-label, phase 2 trial. *The Lancet. Oncology*, 17(7), 976–983. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30053-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30053-5).
72. Di Giacomo AM, Valente M, Cerase A, et al. Immunotherapy of brain metastases: breaking a “dogma”. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):419. Published 2019 Oct 17. doi:10.1186/s13046-019-1426-2.

73. Taggart, D., Andreou, T., Scott, K. J., Williams, J., Rippaus, N., Brownlie, R. J., Ilett, E. J., Salmond, R. J., Melcher, A., & Loriger, M. (2018). Anti-PD-1/anti-CTLA-4 efficacy in melanoma brain metastases depends on extracranial disease and augmentation of CD8<sup>+</sup> T cell trafficking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(7), E1540–E1549. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714089115>.
74. Erfani, N., Mehrabadi, S. M., Ghayumi, M. A., Haghshenas, M. R., Mojtahedi, Z., Ghaderi, A., & Amani, D. (2012). Increase of regulatory T cells in metastatic stage and CTLA-4 over expression in lymphocytes of patients with non-small cell lung cancer (NSCL). *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, *77*(2), 306–311. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2012.04.011>.
75. Wang, Q., Feng, M., Yu, T., Liu, X., & Zhang, P. (2014). Intratumoral regulatory T cells are associated with suppression of colorectal carcinoma metastasis after resection through overcoming IL-17 producing T cells. *Cellular immunology*, *287*(2), 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.01.002>.
76. Ye, L. Y., Chen, W., Bai, X. L., Xu, X. Y., Zhang, Q., Xia, X. F., Sun, X., Li, G. G., Hu, Q. D., Fu, Q. H., & Liang, T. B. (2016). Hypoxia-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Hepatocellular Carcinoma Induces an Immunosuppressive Tumor Microenvironment to Promote Metastasis. *Cancer research*, *76*(4), 818–830. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0977>.
77. Pardoll DM. (2012)The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.*;12(4):252-264. Published 2012 Mar 22. doi:10.1038/nrc3239.
78. Bouwhuis MG, Gast A, Figl A, et al. Polymorphisms in the CD28/CTLA4/ICOS genes: role in malignant melanoma susceptibility and prognosis?. *Cancer Immunol Immunother.* 2010;59(2):303-312. doi:10.1007/s00262-009-0751-2.
79. Chen S, Wang Y, Chen Y, et al. Investigation of Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 polymorphisms in non-small cell lung cancer: a case-control study. *Oncotarget.* 2017;8(44):76634-76643. Published 2017 Sep 4. doi:10.18632/oncotarget.20638.
80. Hadinia, A., Hossieni, S. V., Erfani, N., Saberi-Firozi, M., Fattahi, M. J., & Ghaderi, A. (2007). CTLA-4 gene promoter and exon 1 polymorphisms in Iranian patients with gastric and colorectal cancers. *Journal of gastroenterology and hepatology*, *22*(12), 2.
81. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell.* 2015;27(4):450-461. doi:10.1016/j.ccell.2015.03.001.
82. Tuminello, S., Sikavi, D., Veluswamy, R., Gamarra, C., Lieberman-Cribbin, W., Flores, R., & Taioli, E. (2020). PD-L1 as a prognostic biomarker in surgically resectable non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Translational lung cancer research*, *9*(4), 1343–1360. <https://doi.org/10.21037/tlcr-19-638>.

83. Gotwals, P., Cameron, S., Cipolletta, D., Cremasco, V., Crystal, A., Hewes, B., Mueller, B., Quarantino, S., Sabatos-Peyton, C., Petruzzelli, L., Engelman, J. A., & Dranoff, G. (2017). Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy. *Nature reviews. Cancer*, *17*(5), 286–301. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.17>.
84. Berghoff, A. S., Venur, V. A., Preusser, M., & Ahluwalia, M. S. (2016). Immune Checkpoint Inhibitors in Brain Metastases: From Biology to Treatment. American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meet.
85. Wang, X., Guo, G., Guan, H., Yu, Y., Lu, J., & Yu, J. (2019). Challenges and potential of PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy for glioblastoma. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, *38*(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s13046-019>.
86. Cagney DN, Martin AM, Catalano PJ, et al. Incidence and prognosis of patients with brain metastases at diagnosis of systemic malignancy: a population-based study. *Neuro Oncol*. 2017;*19*(11):1511-1521. doi:10.1093/neuonc/nox077.
87. Ostrom, Q. T., Wright, C. H., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2018). Brain metastases: epidemiology. *Handbook of clinical neurology*, *149*, 27–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811161-1.00002-5>.
88. Svokos KA, Salhia B, Toms SA. Molecular biology of brain metastasis. *Int J Mol Sci*. 2014;*15*(6):9519-9530. Published 2014 May 28. doi:10.3390/ijms15069519.
89. Smedby KE, Brandt L, Bäcklund ML, Blomqvist P. Brain metastases admissions in Sweden between 1987 and 2006. *Br J Cancer*. 2009; *101*: 1919. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
90. Ali, A., Goffin, J. R., Arnold, A., & Ellis, P. M. (2013). Survival of patients with non-small-cell lung cancer after a diagnosis of brain metastases. *Current oncology (Toronto, Ont.)*, *20*(4), e300–e306. <https://doi.org/10.3747/co.20.1481>.
91. Petrelli F, Lazzari C, Ardito R, et al. Efficacy of ALK inhibitors on NSCLC brain metastases: A systematic review and pooled analysis of 21 studies. *PLoS One*. 2018;*13*(7):e0201425. Published 2018 Jul 27. doi:10.1371/journal.pone.0201425.
92. Al-Shamy, G., & Sawaya, R. (2009). Management of brain metastases: the indispensable role of surgery. *Journal of neuro-oncology*, *92*(3), 275–282. <https://doi.org/10.1007/s11060-009-9839-y>.
93. Brown, P. D., Jaeckle, K., Ballman, K. V., Farace, E., Cerhan, J. H., Anderson, S. K., Carrero, X. W., Barker, F. G., 2nd, Deming, R., Burri, S. H., Ménard, C., Chung, C., Stieber, V. W., Pollock, B. E., Galanis, E., Buckner, J. C., & Asher, A. L. (2016).

94. Prabhu RS, Press RH, Patel KR, Boselli DM, Symanowski JT, et al. Single-Fraction Stereotactic Radiosurgery (SRS) Alone Versus Surgical Resection and SRS for Large Brain Metastases: A Multi-institutional Analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2017; 99: 45.
95. Quigley MR, Bello N, Jho D, Fuhrer R, Karlovits S, et al. Estimating the additive benefit of surgical excision to stereotactic radiosurgery in the management of metastatic brain disease. *Neurosurgery* 2015; 76: 707–712. [PubMed] [Google Scholar].
96. Knisely JP, Yu JB, Flanigan J, Sznol M, Kluger HM, et al. Radiosurgery for melanoma brain metastases in the ipilimumab era and the possibility of longer survival. *J Neurosurg.* 2012; 117: 227–233. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
97. Silk AW, Bassetti MF, West BT, Tsien CI, Lao CD. Ipilimumab and radiation therapy for melanoma brain metastases. *Cancer Med.* 2013; 2: 899–906. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
98. Ribatti, D., Mangialardi, G., & Vacca, A. (2006). Stephen Paget and the “seed and soil” theory of metastatic dissemination. *Clinical and experimental medicine*, 6(4), 145–149. <https://doi.org/10.1007/s10238-006-0117-4>.
99. Holmgaard, R. B., Zamarin, D., Li, Y., Gasmi, B., Munn, D. H., Allison, J. P., Merghoub, T., & Wolchok, J. D. (2015). Tumor-Expressed IDO Recruits and Activates MDSCs in a Treg-Dependent Manner. *Cell reports*, 13(2), 412–424. <https://doi.org/10.1016/j.celr>.
100. Munn, D. H., & Mellor, A. L. (2016). IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. *Trends in immunology*, 37(3), 193–207. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.002>.
101. Pickup, M. W., Mouw, J. K., & Weaver, V. M. (2014). The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO reports*, 15(12), 1243–1253. <https://doi.org/10.15252/embr.201439246>.
102. Bremnes, R. M., Dønnem, T., Al-Saad, S., Al-Shibli, K., Andersen, S., Sirera, R., Camps, C., Marinez, I., & Busund, L. T. (2011). The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell.
103. Poggi, A., Musso, A., Dapino, I., & Zocchi, M. R. (2014). Mechanisms of tumor escape from immune system: role of mesenchymal stromal cells. *Immunology letters*, 159(1-2), 55–72. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.03.001>.
104. Bunt, S. K., Sinha, P., Clements, V. K., Leips, J., & Ostrand-Rosenberg, S. (2006). Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(1), 284–290. <https://doi.org/10>.
105. Parker KH, Beury DW, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Critical Cells Driving Immune Suppression in the Tumor Microenvironment. *Adv Cancer Res.* 2015;128:95-139. doi:10.1016/bs.acr.2015.04.002.

106. Galdiero, M. R., Bonavita, E., Barajon, I., Garlanda, C., Mantovani, A., & Jaillon, S. (2013). Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology*, 218(11), 1402–1410. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2013.06.003>.
107. Laoui, D., Movahedi, K., Van Overmeire, E., Van den Bossche, J., Schouppe, E., Mommer, C., Nikolaou, A., Morias, Y., De Baetselier, P., & Van Ginderachter, J. A. (2011). Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. *The International journal of developmental biology*, 55(7-9), 861–867. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113371dl> .
108. Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M. L., Knutson, K. L., Chen, L., ... Zou, W. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature medicine*, 10(9), 942–949. <https://doi.org/10.1038/nm1093> .
109. Noman MZ, Desantis G, Janji B, et al. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 $\alpha$ , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J Exp Med*. 2014;211(5):781-790. doi:10.1084/jem.20131916.
110. Watkins SK, Zhu Z, Riboldi E, et al. FOXO3 programs tumor-associated DCs to become tolerogenic in human and murine prostate cancer [retracted in: *J Clin Invest*. 2015 May;125(5):2179]. *J Clin Invest*. 2011;121(4):1361-1372. doi:10.1172/JCI44325.
111. Pedroza-Gonzalez A, Zhou G, Vargas-Mendez E, Boor PP, Mancham S, et al. Tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression by Tr1 cells in human liver tumors. *Oncoimmunology*. 2015; 4: e1008355. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
112. Matsui T, Connolly JE, Michnevitz M, Chaussabel D, Yu CI, et al. CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J Immunol*. 2009; 182: 6815–6823. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
113. Chaudhary B, Elkord E. Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment and Cancer Progression: Role and Therapeutic Targeting. *Vaccines (Basel)*, 2016; 4. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
114. Strilic B, Offermanns S. Intravascular Survival and Extravasation of Tumor Cells. *Cancer Cell*. 2017; 32: 282–293. [PubMed] [Google Scholar].
115. Furlow PW, Zhang S, Soong TD, Halberg N, Goodarzi H, et al. Mechanosensitive pannexin-1 channels mediate microvascular metastatic cell survival. *Nat Cell Biol*. 2015; 17: 943. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
116. Douma S, Van Laar T, Zevenhoven J, Meuwissen R, Van Garderen E, et al. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature*. 2004; 430: 1034. [PubMed] [Google Scholar].

117. Kopp HG, Placke T, Salih HR. Platelet-Derived Transforming Growth Factor- $\beta$  Down-Regulates NKG2D Thereby Inhibiting Natural Killer Cell Antitumor Reactivity. *Cancer Res.* 2009; 69: 7775–7783. [PubMed] [Google Scholar].
118. Chitadze G, Lettau M, Bhat J, Wesch D, Steinle A, et al. Shedding of endogenous MHC class I-related chain molecules A and B from different human tumor entities: Heterogeneous involvement of the “a disintegrin and metalloproteases” 10 and 17. *Int J Cancer.* 2013; 133: 1557–1566. [PubMed] [Google Scholar].
119. Placke T, Örgel M, Schaller M, Jung G, Rammensee HG, et al. Platelet-derived mhc class i confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res.* 2012; 72: 440–448. [PubMed] [Google Scholar].
120. Gil-Bernabé AM, Ferjancic S, Tlalka M, Zhao L, Allen PD, et al. Recruitment of monocytes/macrophages by tissue factor-mediated coagulation is essential for metastatic cell survival and premetastatic niche establishment in mice. *Blood.* 2012; 119: 3164–3175. [PubMed] [Google Scholar].
121. Chen Q, Zhang XH, Massagué J. Macrophage Binding to Receptor VCAM-1 Transmits Survival Signals in Breast Cancer Cells that Invade the Lungs. *Cancer Cell.* 2011; 20: 538–549. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
122. Hamilton G, Rath B, Klameth L, Hochmair MJ. Small cell lung cancer: Recruitment of macrophages by circulating tumor cells. *Oncoimmunology.* 2016; 5: e1093277. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
123. Qian B, Deng Y, Im JH, Muschel RJ, Zou Y, et al. A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth. *PLoS One.* 2009; 4: e6562. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
124. Wrobel JK, Toborek M. Blood–brain Barrier Remodeling during Brain Metastasis Formation. *Mol Med.* 2016; 22: 32–40. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
125. Reymond N, d’Água BB, Ridley AJ. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2013; 13: 858–870. [PubMed] [Google Scholar].
126. Fazakas C, Wilhelm I, Nagyoszi P, Farkas AE, Haskó J, et al. Transmigration of melanoma cells through the blood-brain barrier: role of endothelial tight junctions and melanoma-released serine proteases. *PLoS One.* 2011; 6: e20758. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
127. Sevenich L, Bowman RL, Mason SD, Quail DF, Rapaport F, et al. Analysis of tumour- and stroma-supplied proteolytic networks reveals a brain-metastasis-promoting role for cathepsin S. *Nat Cell Biol.* 2014; 16: 876–888. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
128. Carbonell WS, Ansorge O, Sibson N, Muschel R, et al. The Vascular Basement Membrane as “Soil” in Brain Metastasis. *PLoS One.* 2009; 4. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].

129. Heyn C, Ronald JA, Ramadan SS, Snir JA, Barry AM, et al. In vivo MRI of cancer cell fate at the single-cell level in a mouse model of breast cancer metastasis to the brain. *Magn Reson Med*. 2006; 56: 1001–1010. [PubMed] [Google Scholar].
130. Amit M, Laider-Trejo L, Shalom V, Shabtay-Orbach A, Krelin Y, et al. Characterization of the melanoma brain metastatic niche in mice and humans. *Cancer Med*. 2013; 2: 155–163. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
131. Chen Q, Boire A, Jin X, Valiente M, Er EE, et al. Carcinoma-astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. *Nature*. 2016; 533: 493–498. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
132. He BP, Wang JJ, Zhang X, Wu Y, Wang M, et al. Differential reactions of microglia to brain metastasis of lung cancer. *Mol Med*. 2006; 12: 161–170. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
133. Shumakovich MA, Mencio CP, Siglin JS, Moriarty RA, Geller HM, et al. Astrocytes from the brain microenvironment alter migration and morphology of metastatic breast cancer cells. *FASEB J*. 2017. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
134. Winkler F The brain metastatic niche. *J Mol Med (Berl)*. 2015; 93: 1213–1220. [PubMed] [Google Scholar].
135. Xing F, Kobayashi A, Okuda H, Watabe M, Pai SK, et al. Reactive astrocytes promote the metastatic growth of breast cancer stem-like cells by activating Notch signalling in brain. *EMBO Mol Med*. 2013; 5: 384–396. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
136. Brantley EC, Guo L, Zhang C, Lin Q, Yokoi K et al. Nitric Oxide-Mediated Tumoricidal Activity of Murine Microglial Cells. *Transl Oncol*. 2010; 3: 380–388. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
137. Louie E, Chen XF, Coomes A, Ji K, Tsirka S, et al. Neurotrophin-3 modulates breast cancer cells and the microenvironment to promote the growth of breast cancer brain metastasis. *Oncogene*. 2013; 32: 4064–4077. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
138. Pukrop T, Dehghani F, Chuang HN, Lohaus R, Bayanga K, et al. Microglia promote colonization of brain tissue by breast cancer cells in a Wnt-dependent way. *Glia*. 2010; 58: 1477–1489. [PubMed] [Google Scholar].
139. Liu Y, Kosaka A, Ikeura M, Kohanbash G, Fellows-Mayle W, et al. Premetastatic soil and prevention of breast cancer brain metastasis. *Neuro-Oncol*. 2013; 15: 891–903. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
140. Yan HH, Jiang J, Pang Y, Achyut BR, Lizardo M, et al. CCL9 induced by TGF- $\beta$  signaling in myeloid cells enhances tumor cell survival in the premetastatic organ. *Cancer Res*. 2015; 75: 5283–5298. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].



141. Roy A, Libard S, Weishaupt H, Gustavsson I, Uhrbom L, et al. Mast cell infiltration in human brain metastases modulates the microenvironment and contributes to the metastatic potential. *Front Oncol.* 2017; 7: 115. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
142. Mouttet D, Laé M, Caly M, Gentien D, Carpentier S, et al. Estrogen-receptor, progesterone-receptor and her2 status determination in invasive breast cancer. Concordance between immuno-histochemistry and mapquant microarray based assay. *PLoS One.* 2016; 11: e0146474. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
143. Jin J, Gao Y, Zhang J, Wang L, Wang B, et al. Incidence, pattern and prognosis of brain metastases in patients with metastatic triple negative breast cancer. *BMC Cancer.* 2018; 18: 446. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
144. Yonemori K, Tsuta K, Ono M, Shimizu C, Hirakawa A, et al. Disruption of the blood brain barrier by brain metastases of triple-negative and basal-type breast cancer but not HER2/neu-positive breast cancer. *Cancer.* 2010; 116: 302–308. [PubMed] [Google Scholar].
145. Avraham HK, Jiang S, Fu Y, Nakshatri H, Ovadia H, et al. Angiopoietin-2 mediates blood-brain barrier impairment and colonization of triple-negative breast cancer cells in brain. *J Pathol.* 2014; 232: 369–381. [PubMed] [Google Scholar].
146. Custódio-Santos T, Videira M, Brito MA. Brain metastasization of breast cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2017; 1868: 132–147. [PubMed] [Google Scholar].
147. Racila E, Racila DM, Ritchie JM, Taylor C, Dahle C, et al. The pattern of clinical breast cancer metastasis correlates with a single nucleotide polymorphism in the C1qA component of complement. *Immunogenetics.* 2006; 58: 1–8. [PubMed] [Google Scholar].
148. Zhenjiang L, Rao M, Luo X, Sandberg E, Bartek J Jr, et al., Mesothelin-specific immune responses predict survival of patients with brain metastasis. *EBioMedicine.* 2017; 23: 20–24. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
149. Chuang HN, van Rossum D, Sieger D, Siam L, Klemm F, et al. Carcinoma cells misuse the host tissue damage response to invade the brain. *Glia.* 2013; 61: 1331–1346. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
150. Erdmann RB, Gartner JG, Leonard WJ, Ellison CA. Lack of functional TSLP receptors mitigates Th2 polarization and the establishment and growth of 4T1 primary breast tumours but has different effects on tumour quantities in the lung and brain. *Scand J Immunol.* 2013; 78: 408–418. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
151. Berghoff AS, Lassmann H, Preusser M, Höftberger R. Characterization of the inflammatory response to solid cancer metastases in the human brain. *Clin Exp Metastasis* 2013; 30: 69–81. [PubMed] [Google Scholar].

152. McGranahan N, Furness AJ, Rosenthal R, Ramskov S, Lyngaa R et al. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science*. 2016; 351: 1463–1469. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
153. Mansfield Aaron S., Ren Hongzheng, Sutor Shari, Sarangi Vivekananda, Nair Asha, et al. Contraction of T cell richness in lung cancer brain metastases. *Scientific Reports*. 2018; 8: 2171. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
154. Roy A, Libard S, Weishaupt H, Gustavsson I, Uhrbom L, et al. Mast Cell Infiltration in Human Brain Metastases Modulates the Microenvironment and Contributes to the Metastatic Potential. *Front Oncol*. 2017; 7: 115. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
155. Samlowski WE, Moon J, Witter M, Atkins MB, Kirkwood JM, et al. High frequency of brain metastases after adjuvant therapy for high-risk melanoma. *Cancer Medicine*. 2017; 6: 2576–2585. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
156. Klein A, Sagi-Assif O, Meshel T, Telerman A, Izraely S et al. CCR4 is a determinant of melanoma brain metastasis. *Oncotarget*. 2017; 8: 31079–31091. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
157. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res*. 2009; 69: 2000–2009. [PubMed] [Google Scholar].
158. Kaur A, Webster MR, Marchbank K, Behera R, Ndoeye A, et al. Corrigendum: sFRP2 in the aged microenvironment drives melanoma metastasis and therapy resistance. *Nature*. 2016; 537: 254. [PubMed] [Google Scholar].
159. Du Four S, Maenhout SK, De Pierre K, Renmans D, Niclou SP, et al. Axitinib increases the infiltration of immune cells and reduces the suppressive capacity of monocytic MDSCs in an intracranial mouse melanoma model. *Oncoimmunology*. 2015; 4: e998107. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
160. Jackson CM, Kochel CM, Nirschl CJ, Durham NM, Ruzevick J, et al. Systemic Tolerance Mediated by Melanoma Brain Tumors is Reversible by Radiotherapy and Vaccination. *Clin Cancer Res*. 2016; 22: 1161–1172. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
161. Michl M, Thurmaier J, Schubert-Fritschle G, Wiedemann M, Laubender RP, et al. Brain Metastasis in Colorectal Cancer Patients: Survival and Analysis of Prognostic Factors. *Clin Colorectal Cancer*, 2015; 14: 281–90. [PubMed] [Google Scholar].
162. Ogawa M, Watanabe M, Hasegawa T, Ichihara K, Yoshida K, et al. Expression of CXCR-4 and IDO in human colorectal cancer: An immunohistochemical approach. *Mol Clin Oncol*. 2017; 6: 701–704. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].

163. Lan YT, Jen-Kou L, Lin CH, Yang SH, Lin CC, et al. Mutations in the RAS and PI3K pathways are associated with metastatic location in colorectal cancers. *J Surg Oncol*. 2015; 111: 905–910. [PubMed] [Google Scholar].
164. Yaeger R, Cowell E, Chou JF, Gewirtz AN, Borsu L, et al. RAS mutations affect pattern of metastatic spread and increase propensity for brain metastasis in colorectal cancer. *Cancer*. 2015; 121: 1195–203. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
165. Kamp MA, Rapp M, Slotty PJ, et al. Incidence of local in-brain progression after supramarginal resection of cerebral metastases. *Acta Neurochir (Wien)*. 2015;157(6):905-911. doi:10.1007/s00701-015-2405-9.
166. Yoo H, Kim YZ, Nam BH, et al. Reduced local recurrence of a single brain metastasis through microscopic total resection. *J Neurosurg*. 2009;110(4):730-736.
167. Patel AJ, Suki D, Hatiboglu MA, Rao VY, Fox BD, Sawaya R. Impact of surgical methodology on the complication rate and functional outcome of patients with a single brain metastasis. *J Neurosurg*. 2015;122(5):1132-1143. doi:10.3171/2014.9.JNS13939.
168. Sanmillan JL, Fernández-Coello A, Fernández-Conejero I, Plans G, Gabarrós A. Functional approach using intraoperative brain mapping and neurophysiological monitoring for the surgical treatment of brain metastases in the central region. *J Neurosurg*. 2017;126(3):698-707. doi:10.3171/2016.2.JNS152855.
169. Suh JH, Kotecha R, Chao ST, Ahluwalia MS, Sahgal A, Chang EL. Current approaches to the management of brain metastases. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020;17(5):279-299. doi:10.1038/s41571-019-0320-3.
170. Kamp MA, Munoz-Bendix C, Mijderwijk HJ, et al. Is 5-ALA fluorescence of cerebral metastases a prognostic factor for local recurrence and overall survival?. *J Neurooncol*. 2019;141(3):547-553. doi:10.1007/s11060-018-03066-y.
171. Vecht CJ, Haaxma-Reiche H, Noordijk EM, et al. Treatment of single brain metastasis: radiotherapy alone or combined with neurosurgery?. *Ann Neurol*. 1993;33(6):583-590. doi:10.1002/ana.410330605.
172. Patchell RA, Tibbs PA, Walsh JW, et al. A randomized trial of surgery in the treatment of single metastases to the brain. *N Engl J Med*. 1990;322(8):494-500. doi:10.1056/NEJM199002223220802.
173. Shah AH, Semonche A, Eichberg DG, et al. The Role of Laser Interstitial Thermal Therapy in Surgical Neuro-Oncology: Series of 100 Consecutive Patients. *Neurosurgery*. 2020;87(2):266-275. doi:10.1093/neuros/nyz424.
174. Srinivasan ES, Grabowski MM, Nahed BV, Barnett GH, Fecci PE. Laser interstitial thermal therapy for brain metastases. *Neurooncol Adv*. 2021;3(Suppl 5):v16-v25. Published 2021 Nov 27. doi:10.1093/noajnl/vdab128.

175. Lehrer EJ, Peterson JL, Zaorsky NG, et al. Single versus Multifraction Stereotactic Radiosurgery for Large Brain Metastases: An International Meta-analysis of 24 Trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2019;103(3):618-630. doi:10.1016/j.ijrobp.2018.10.038.
176. Yamamoto M, Serizawa T, Higuchi Y, et al. A Multi-institutional Prospective Observational Study of Stereotactic Radiosurgery for Patients With Multiple Brain Metastases (JLGK0901 Study Update): Irradiation-related Complications and Long-term Maintenance of Mini-Mental State Examination Scores. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2017;99(1):31-40. doi:10.1016/j.ijrobp.2017.04.037.
177. Sahgal A, Aoyama H, Kocher M, et al. Phase 3 trials of stereotactic radiosurgery with or without whole-brain radiation therapy for 1 to 4 brain metastases: individual patient data meta-analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2015;91(4):710-717. doi:10.1016/j.ijrobp.2014.10.024.
178. Brown PD, Ballman KV, Cerhan JH, et al. Postoperative stereotactic radiosurgery compared with whole brain radiotherapy for resected metastatic brain disease (NCCTG N107C/CEC-3): a multicentre, randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(8):1049-1060. doi:10.1016/S1470-2045(17)30441-2.
179. Mahajan A, Ahmed S, McAleer MF, et al. Post-operative stereotactic radiosurgery versus observation for completely resected brain metastases: a single-centre, randomised, controlled, phase 3 trial [published correction appears in *Lancet Oncol.* 2017 Aug;18(8):e433] [published correction appears in *Lancet Oncol.* 2017 Sep;18(9):e510]. *Lancet Oncol.* 2017;18(8):1040-1048. doi:10.1016/S1470-2045(17)30414-X.
180. Patchell RA, Tibbs PA, Regine WF, et al. Postoperative radiotherapy in the treatment of single metastases to the brain: a randomized trial. *JAMA.* 1998;280(17):1485-1489. doi:10.1001/jama.280.17.1485.
181. Kocher M, Soffiatti R, Abacioglu U, et al. Adjuvant whole-brain radiotherapy versus observation after radiosurgery or surgical resection of one to three cerebral metastases: results of the EORTC 22952-26001 study. *J Clin Oncol.* 2011;29(2):134-141. doi:10.1200/JCO.2010.30.1655.
182. Hong AM, Fogarty GB, Dolven-Jacobsen K, et al. Adjuvant Whole-Brain Radiation Therapy Compared With Observation After Local Treatment of Melanoma Brain Metastases: A Multicenter, Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol.* 2019;37(33):3132-3141. doi:10.1200/JCO.19.01414.
183. Tsao M, Xu W, Sahgal A. A meta-analysis evaluating stereotactic radiosurgery, whole-brain radiotherapy, or both for patients presenting with a limited number of brain metastases. *Cancer.* 2012;118(9):2486-2493. doi:10.1002/cncr.26515.

184. Brown PD, Pugh S, Laack NN, et al. Memantine for the prevention of cognitive dysfunction in patients receiving whole-brain radiotherapy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neuro Oncol.* 2013;15(10):1429-1437. doi:10.1093/neuonc/not114.
185. Aupérin A, Arriagada R, Pignon JP, et al. Prophylactic cranial irradiation for patients with small-cell lung cancer in complete remission. Prophylactic Cranial Irradiation Overview Collaborative Group. *N Engl J Med.* 1999;341(7):476-484.
186. Slotman B, Faivre-Finn C, Kramer G, et al. Prophylactic cranial irradiation in extensive small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2007;357(7): 664-672.
187. Lin NU, Diéras V, Paul D, et al. Multicenter phase II study of lapatinib in patients with brain metastases from HER2-positive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(4):1452-1459. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1080.
188. Bachelot T, Romieu G, Campone M, et al. Lapatinib plus capecitabine in patients with previously untreated brain metastases from HER2-positive metastatic breast cancer (LANDSCAPE): a single-group phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2013;14(1):64-71. doi:10.1016/S1470-2045(12)70432-1.
189. Saura C, Oliveira M, Feng YH, et al. Neratinib Plus Capecitabine Versus Lapatinib Plus Capecitabine in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Previously Treated With  $\geq 2$  HER2-Directed Regimens: Phase III NALA Trial. *J Clin Oncol.* 2020;38(27):3138-3149. doi:10.1200/JCO.20.00147.
190. Krop IE, Lin NU, Blackwell K, et al. Trastuzumab emtansine (T-DM1) versus lapatinib plus capecitabine in patients with HER2-positive metastatic breast cancer and central nervous system metastases: a retrospective, exploratory analysis in EMILIA. *Ann Oncol.* 2015;26(1):113-119. doi:10.1093/annonc/mdu486.
191. Jacot W, Pons E, Frenel JS, et al. Efficacy and safety of trastuzumab emtansine (T-DM1) in patients with HER2-positive breast cancer with brain metastases. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;157(2):307-318. doi:10.1007/s10549-016-3828-6.
192. Lin NU, Borges V, Anders C, et al. Intracranial Efficacy and Survival With Tucatinib Plus Trastuzumab and Capecitabine for Previously Treated HER2-Positive Breast Cancer With Brain Metastases in the HER2CLIMB Trial. *J Clin Oncol.* 2020;38(23):2610-2619. doi:10.1200/JCO.20.00775.
193. Swain SM, Baselga J, Miles D, et al. Incidence of central nervous system metastases in patients with HER2-positive metastatic breast cancer treated with pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel: results from the randomized phase III study CLEOPATRA. *Ann Oncol.* 2014;25(6):1116-1121. doi:10.1093/annonc/mdu133.

194. Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2018;378(22):2078-2092. doi:10.1056/NEJMoa1801005.
195. Gadgeel SM, Lukas RV, Goldschmidt J, et al. Atezolizumab in patients with advanced non-small cell lung cancer and history of asymptomatic, treated brain metastases: Exploratory analyses of the phase III OAK study. *Lung Cancer*. 2019;128:105-112. doi:10.1016/j.lungcan.2018.12.017.
196. Goldberg SB, Schalper KA, Gettinger SN, et al. Pembrolizumab for management of patients with NSCLC and brain metastases: long-term results and biomarker analysis from a non-randomised, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2020;21(5):655-663. doi:10.1016/S1470-2045(20)30111-X.
197. Hendriks LEL, Henon C, Auclin E, et al. Outcome of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer and Brain Metastases Treated with Checkpoint Inhibitors. *J Thorac Oncol*. 2019;14(7):1244-1254. doi:10.1016/j.jtho.2019.02.009.
198. Ramalingam SS, Vansteenkiste J, Planchard D, et al. Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC. *N Engl J Med*. 2020;382(1):41-50. doi:10.1056/NEJMoa1913662.
199. Mok T, Camidge DR, Gadgeel SM, et al. Updated overall survival and final progression-free survival data for patients with treatment-naive advanced ALK-positive non-small-cell lung cancer in the ALEX study. *Ann Oncol*. 2020;31(8):1056-1064. doi:10.1016/j.annonc.2020.04.478.
200. Tan AC, Itchins M, Khasraw M. Brain Metastases in Lung Cancers with Emerging Targetable Fusion Drivers. *Int J Mol Sci*. 2020;21(4):1416. Published 2020 Feb 19. doi:10.3390/ijms21041416.
201. Paz-Ares L, Dvorkin M, Chen Y, et al. Durvalumab plus platinum-etoposide versus platinum-etoposide in first-line treatment of extensive-stage small-cell lung cancer (CASPIAN): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2019;394(10212):1929-1939. doi:10.1016/S0140-6736(19)32222-6.
202. Salgado R, Denkert C, Demaria S, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015;26(2):259-271. doi:10.1093/annonc/mdu450.
203. Beguinot M, Dauplat MM, Kwiatkowski F, et al. Analysis of tumour-infiltrating lymphocytes reveals two new biologically different subgroups of breast ductal carcinoma in situ. *BMC Cancer*. 2018;18(1):129. Published 2018 Feb 3. doi:10.1186/s12885-018-4013-6.
204. Koletsa T, Kotoula V, Koliou GA, et al. Prognostic impact of stromal and intratumoral CD3, CD8 and FOXP3 in adjuvantly treated breast cancer: do they add information over stromal tumor-

infiltrating lymphocyte density. *Cancer Immunol Immunother.* 2020;69(8):1549-1564. doi:10.1007/s00262-020-02557-0.

205. Carson MJ, Doose JM, Melchior B, Schmid CD, Ploix CC. CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol Rev.* 2006;213:48–65.
206. A.S. Berghoff, C. Inan, G. Ricken, G. Widhalm, K. Dieckmann, P. Birner, F. Oberndorfer, B. Dome, R. Bartsch, C. Zielinski, M. Preusser, Tumor-Infiltrating Lymphocytes (Tils) and Pd-L1 Expression in Non- Small Cell Lung Cancer Brain Metastases (Bm) and Matched Primary Tumors (Pt), *Annals of Oncology*, Volume 25, Supplement 4, 2014, Page iv465, ISSN 0923-7534, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu349.103>.
207. Kim, R., Keam, B., Kim, S. *et al.* Differences in tumor microenvironments between primary lung tumors and brain metastases in lung cancer patients: therapeutic implications for immune checkpoint inhibitors. *BMC Cancer* **19**, 19 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12885-018-5214-8>
208. Miyake, Makito et al. “Regulatory T Cells and Tumor-Associated Macrophages in the Tumor Microenvironment in Non-Muscle Invasive Bladder Cancer Treated with Intravesical Bacille Calmette-Guérin: A Long-Term Follow-Up Study of a Japanese Cohort.” *International journal of molecular sciences* vol. 18,10 2186. 19 Oct. 2017, doi:10.3390/ijms18102186
209. Salama, P., Phillips, M., Grieu, F., Morris, M., Zeps, N., Joseph, D., Platell, C., & Iacopetta, B. (2009). Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(2), 186–192. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.7229>