



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
Α' ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΓΕΝΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

«ΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ»

**«ΕΙΔΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΣΕ ΤΡΙΠΛΑ ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ
ΜΑΣΤΟΥ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ, ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΚΑΙ
ΠΡΟΒΛΕΠΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ»**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

της

ΑΝΔΡΙΑΝΗΣ Ι. ΤΣΙΑΚΟΥ

ΔΕΡΜΑΤΟΛΟΓΟΥ-ΑΦΡΟΔΙΣΙΟΛΟΓΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2019

Στη μητέρα μου,

Όρκος του Ιπποκράτη (αρχαίο κείμενο) :

1. Όμνυμι Απόλλωνα ιητρόν και Άσκληπιόν και Ύγείαν και Πανάκειαν και θεούς πάντας τε και πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατά δύναμιν και κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε και ζυγγραφὴν τήνδε.
2. Ἠγήσεσθαι μὲν τόν διδάξαντά με την τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, και βίου κοινώσεσθαι, και χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσεσθαι, και γένος τό ἐξ αὐτοῦ ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, και διδάξειν τήν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ και ζυγγραφῆς, παραγγελίης τε και ἀκροήσιος και τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσι και τοῖσι τοῦ ἐμέ διδάξαντος και μαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε και ὠρκισμένοις νόμῳ ιητρικῷ, ἄλλῳ δέ οὐδενί.
3. Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατά δύναμιν και κρίσιν ἐμήν, ἐπί δηλήσει δέ και ἀδικίῃ εἴρξειν.
4. Οὐ δώσω δέ οὐδέ φάρμακον οὐδενί αἰτηθεῖς θανάσιμον, οὐδέ ὑφηγήσομαι ζυμβουλίην τοιήνδε· ὁμοίως δέ οὐδέ γυναικί πεσσόν φθόριον δώσω.
5. Ἄγνωσ δε και ὀσίως διατηρήσω βίον τόν ἐμόν και τέχνην τήν ἐμήν.
6. Οὐ τεμέω δε οὐδέν μην λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δε ἐργάτησιν ἀνδράσιν πρήξιος τῆσδε.
7. Ἐς οἰκίας δε ὀκόσας ἄν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτός ἐών πάσης ἀδικίης ἐκουσίης και φθορίας τῆς τε ἄλλης και ἀφροδισίων ἔργων ἐπί τε γυναικείων σωμάτων και ἀνδρείων, ἐλευθέρων τε και δούλων.
8. Ἄ δ' ἄν ἐν θεραπείῃ ἤ ἰδῶ ἤ ακούσω, ἤ και ἄνευ θεραπείης κατά βίον ἀνθρώπων, ἅ μή χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἕξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγγέμενος εἶναι τά τοιαῦτα.
9. Όρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι και μή ζυγχέοντι εἴη ἐπαύρασθαι και βίου και τέχνης, δοξαζομένῳ παρά πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τόν αἰεὶ χρόνον· παραβαίνοντι δέ και ἐπιορκέοντι, τάναντία τουτέων.

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

ΟΡΚΙΖΟΜΑΙ ΕΤΟΜ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΤΟΝ ΙΑΤΡΟ ΚΑΙ ΕΤΟΝ ΑΣΚΛΗΠΙΟ ΚΑΙ ΕΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΕΤΗΝ ΠΑΝΑΚΕΙΑ ΚΑΙ Ε΄ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΘΕΟΥΣ ΕΠΙΚΑΛΟΥΜΕΝΟΥΣ ΤΗΝ ΜΑΡΤΥΡΙΑ ΤΟΥΣ, ΝΑ ΤΗΡΗΣΩ ΠΙΣΤΑ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ ΑΥΤΟ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΚΑΙ ΤΟ ΣΥΜΒΟΛΑΙΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ. ΝΑ ΘΕΩΡΩ ΑΥΤΟΝ ΠΟΥ ΜΟΥ ΔΙΔΑΣΕ ΑΥΤΗ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΙΕΟ ΜΕ ΤΟΥΣ ΓΟΝΕΙΣ ΜΟΥ ΚΑΙ ΝΑ ΜΟΙΡΑΕΤΩ ΜΑΖ ΤΟΥ ΤΑ ΥΠΑΡΧΟΝΤΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΑ ΧΡΗΜΑΤΑ ΜΟΥ ΑΝ ΕΧΕΙ ΑΝΑΓΧΗ ΦΡΟΝΤΙΔΑΣ. ΝΑ ΘΕΩΡΩ ΤΟΥΣ ΑΠΟΓΟΝΟΥΣ ΤΟΥΣ ΙΕΟΥΣ ΜΕ Τ΄ ΑΔΕΛΦΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΝΑ ΤΟΥΣ ΔΙΔΑΣΩ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΑΥΤΗ ΑΝ ΘΕΛΟΥΝ ΝΑ ΤΗ ΜΑΘΟΥΝ, ΧΩΡΙΣ ΔΜΟΙΒΗ ΚΑΙ ΕΥΜΒΟΛΑΙΟ ΚΑΙ ΝΑ ΜΕΤΑΔΩΣΩ ΜΕ ΓΑΡΑΓΓΕΛΙΚΣ, ΟΔΗΓΕΣ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΥΛΕΣ ΟΛΗ ΤΗΝ ΥΠΟΛΟΙΠΗ ΓΝΩΣΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΣΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΜΟΥ ΚΑΙ ΣΤΑ ΠΑΙΔΙΑ ΕΚΕΙΝΟΥ ΠΟΥ ΜΕ ΔΙΔΑΣΕ ΚΑΙ ΕΤΟΥΣ ΑΛΛΟΥΣ ΜΑΘΗΤΕΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΚΑΝΕΙ ΤΡΑΠΗΤΗ ΣΥΜΦΩΝΙΑ ΜΑΖΙ ΜΟΥ ΚΑΙ Ε΄ ΑΥΤΟΥΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΟΡΚΙΣΘΕΙ ΕΤΟΜ ΙΑΤΡΙΚΟ ΝΟΜΟ ΚΑΙ ΕΞ ΚΑΝΕΝΑΝ ΑΛΛΟ ΚΑΙ ΝΑ ΘΕΡΑΠΕΥΩ ΤΟΥΣ ΠΑΣΧΟΝΤΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΥΝΑΜΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΜΟΥ ΧΩΡΙΣ ΤΟΤΕ, ΕΚΟΥΣΙΩΣ, ΝΑ ΤΟΥΣ ΒΛΑΨΩ Ή ΝΑ ΤΟΥΣ ΑΔΙΚΗΣΩ. ΚΑΙ ΝΑ ΜΗ ΔΩΣΩ ΠΟΤΕ ΞΕ ΚΑΝΕΜΑ, ΕΣΤΩ ΚΙ ΑΝ ΜΟΥ ΤΟ ΖΗΤΗΣΕΙ, ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΟ ΦΑΡΜΑΚΟ, ΟΥΤΕ ΝΑ ΔΩΣΩ ΠΟΤΕ ΤΕΤΟΙΑ ΣΥΜΒΟΥΛΗ. ΟΜΟΙΩΣ, ΝΑ ΜΗ ΔΩΣΩ ΠΟΤΕ ΞΕ ΓΥΝΑΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΟ ΓΙΑ Ν΄ ΑΠΟΒΑΛΕΙ. ΝΑ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΔΕ ΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ ΚΑΘΑΡΗ ΚΑΙ ΑΓΝΗ. ΚΑΙ ΝΑ ΜΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΗΣΩ ΠΑΣΧΟΝΤΕΣ ΑΓΟ ΝΙΘΟΥΣ ΑΛΛΑ Ν΄ ΑΦΗΣΩ ΤΗΝ ΠΡΑΞΗ ΑΥΤΗ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΕΔΙΚΟΥΣ. ΚΑΙ Ε΄ ΟΠΟΙΑ ΣΠΙΤΙΑ ΚΙ ΑΝ ΜΠΩ, ΝΑ ΜΠΩ ΓΙΑ ΤΗΝ ΩΦΕΛΕΙΑ ΤΩΝ ΠΑΣΧΟΝΤΩΝ ΑΠΟΦΕΥΓΟΜΤΑΣ ΚΑΘΕ ΕΚΟΥΣΙΑ ΑΔΙΚΙΑ ΚΑ ΒΛΑΒΗ ΚΑΙ ΚΑΘΕ ΓΕΜΕΤΗΣΙΑ ΠΡΑΞΗ ΚΑΙ ΜΕ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΕ ΑΝΔΡΕΣ, ΕΛΕΥΘΕΡΟΥΣ ΚΑΙ ΔΟΥΛΟΥΣ. ΚΑΙ ΟΤΙ ΔΩ Ή ΑΚΟΥΕΩ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΕΚΗΣΗ ΤΟΥ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΟΣ ΜΟΥ, Ή Κ΄ ΕΚΤΟΣ, ΓΙΑ ΤΗ ΖΩΗ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΠΟΤΕ ΝΑ ΚΟΙΜΟΠΟΙΗΘΕΙ, ΝΑ ΣΙΩΠΗΣΩ ΚΑΙ ΝΑ ΤΟ ΤΗΡΗΣΩ ΜΥΣΤΙΚΟ. ΑΝ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΑΥΤΟ ΤΗΡΗΣΩ ΠΙΣΤΑ ΚΑΙ ΔΕΝ ΤΟΝ ΑΦΕΤΗΣΩ, ΕΙΘΕ Ν΄ ΑΤΟΛΔΥΣΩ ΓΙΑ ΠΑΝΤΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΖΩΗ ΜΟΥ ΚΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗ ΜΟΥ, ΑΝ ΟΜΩΣ ΠΑΡΑΒΩ ΚΑ΄ ΑΦΕΤΗΣΩ ΤΟΝ ΟΡΚΟ ΜΟΥ ΝΑ ΥΠΟΣΤΩΤΑ ΑΝΤΙΘΕΤΑ ΑΠΟ ΑΥΤΑ.

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ
ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:13/10/13**

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 15/07/19

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ:
24/07/19**

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗΣ: 16/12/19

Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει και αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα (Νόμος 5343/1932, άρθρο 202, παράγραφος 2).

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- 1) **Ρηγόπουλος Δημήτριος:** Καθηγητής-Διευθυντής της Α Πανεπιστημιακής Δερματολογικής κλινικής, Νοσοκομείο Δερματικών και Αφροδισίων Νόσων «Ανδρέας Συγγρός». **(Επιβλέπων).**
- 2) **Ζωγράφος Γεώργιος:** Αναπληρωτής Πρύτανης, Καθηγητής-Διευθυντής Χειρουργικής, Α Προπαιδευτική Πανεπιστημιακή Κλινική, «Ιπποκράτειο» Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών.
- 3) **Λάζαρης Ανδρέας:** Επίκουρος Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής & Γενικής Παθολογίας, Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής, Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- 4) **Φλώρα Ζαγουρή:** Παθολόγος- Ογκολόγος, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πανεπιστημιακής Θεραπευτικής κλινικής Νοσοκομείου «Αλεξάνδρα» Γ.Ν.Α , Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- 5) **Αλέξανδρος Στρατηγός:** Καθηγητής Α Πανεπιστημιακής Δερματολογικής κλινικής, Νοσοκομείο Δερματικών και Αφροδισίων Νόσων «Ανδρέας Συγγρός».
- 6) **Βασίλιος Κουλούλιας:** Αναπληρωτής Καθηγητής Ακτινοθεραπευτικής Ογκολογίας, Β Εργαστήριο Ακτινολογίας, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Π.Γ.Ν «Αττικών»
- 7) **Άννα Ζυγογιάννη:** Επίκουρη Καθηγήτρια Ακτινοθεραπευτικής Ογκολογίας Ε.Κ.Π.Α , Αρεταίειο Νοσοκομείο

Ο ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

Πέτρος Π. Σφηκάκης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή μου εκτίμηση και ευγνωμοσύνη σε όλους όσους συνετέλεσαν στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Ιδιαίτερος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή και Διευθυντή της Α Πανεπιστημιακής Δερματολογικής Αφροδιοισιολογικής κλινικής Αθηνών, κ. Δημήτριο Ρηγόπουλο για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας με την επιστημονική και την ηθική του στήριξη έως τη διεκπεραίωση της. Επίσης τον Διευθυντή-Καθηγητή της Α Προπαιδευτικής Χειρουργικής κλινικής της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, κ. Γεώργιο Ζωγράφο, για την ευκαιρία που μου προσέφερε και την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα. Θα ήθελα να απευθύνω ένα θερμό ευχαριστώ προς τον Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής κ. Ανδρέα Χ. Λάζαρη για τη συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή μου και για την αξιολόγηση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Δρ. Γεώργιο Σαμέλη, Παθολόγο-Ογκολόγο Συντονιστή Διευθυντή Ογκολογικής Μονάδος Ι.Γ.Ν.Α και πρόεδρο της Ελληνικής και Διεθνούς Εταιρείας Μοριακά Στοχευμένων Εξατομικευμένων Θεραπειών (Ε.Δ.Ε.Μ..Σ.Ε.Θ) για την απόφαση του Δ.Σ της εταιρείας να ενισχύσει οικονομικά τη συγκεκριμένη Διδακτορική Διατριβή προκειμένου να πραγματοποιηθεί στο Εργαστήριο Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ η μοριακή ανάλυση των δειγμάτων υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας Μοριακής Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, κ. Μαρίας Γαζούλη.

Φυσικά δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την Δρ. Φλώρα Ζαγουρή, Παθολόγο-Ογκολόγο, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια στη Θεραπευτική κλινική της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, για την αρωγή της στην συγκέντρωση του βιολογικού υλικού, για τη συνεχή καθοδήγησή, τις πολύτιμες υποδείξεις και την αέναη στήριξη της κατά τη διεξαγωγή και καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας εργασίας.

Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Αθηνά Κλάδη-Σκανδάλη, βιοχημικό για τη βιοστατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων και τη συνεισφορά της στη συγγραφή των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Επώνυμο :Τσιάκου

Όνομα :Ανδριανή

ΤΙΤΛΟΙ ΣΠΟΥΔΩΝ:

1995, Αποφοίτηση από το 2ο Λύκειο Βούλας.Βαθμός πτυχίου: «Λίαν Καλώς».

2000,Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Αθήνας, Σχολή Επαγγελματών Υγείας και Πρόνοιας, Τμήμα Επισκεπτών Υγείας.Βαθμός πτυχίου: «Λίαν Καλώς».

2006, Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Βαθμός πτυχίου: «Λίαν Καλώς».

ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ:

2006-2008: Επιστημονικός συνεργάτης, Ογκολογική Μονάδα «Ιπποκράτειο» Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών.

2008-2010: Ειδικευόμενη ιατρός Ή Παθολογική Κλινική Γενικό Νοσοκομείο Καλαμάτας.

2011-2013: Αγροτικός ιατρός Υπόχρεος Υπηρεσίας Υπαίθρου, Κέντρο Υγείας Αταλάντης, Γενικό Νοσοκομείο Λαμίας.

2013-2015: Επιστημονικός συνεργάτης, Ιδιωτικό Δερματολογικό-Αφροδισιολογικό Ιατρείο.

2015-2019: Ειδικευόμενη ιατρώ Α Πανεπιστημιακής Κλινικής του Νοσοκομείου Δερματικών και Αφροδισίων Νόσων Αθηνών «Ανδρέας Συγγρός».

2019 εως σήμερα: Απόκτηση τίτλου ειδικότητας στη Δερματολογία-Αφροδισιολογία και παραμονή στο Νοσοκομείο Δερματικών και Αφροδισίων Νόσων Αθηνών «Ανδρέας Συγγρός» με παράταση σύμβασης.

ΔΙΕΘΝΕΙΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ:

PUBLICATIONS INDEXED IN PUBMED:

- 1) G.F Samelis, K.A. Ekmektzoglou, **A.I Tsiakou** et all. Metastatic melanoma: Case report of a patient with seventeen months of complete remission, five years survival and review of the literature. Journal of B.U.ON (Official journal of the Balkan union of oncology) 14 (4):717-20, Oct-Dec 2009
- 2) G.F Samelis, K.A Ekmektzoglou, S.Giannakaki, **A.I Tsiakou**. More than 54 months survival of a patient with lung adenocarcinoma after maintenance therapy with pemetrexed (Alimta).Journal of B.U.ON (Official journal of the Balkan union of oncology) 15 (4):797, Oct-Dec 2010
- 3) G.F Samelis, K.A. Ekmektzoglou, **A.I Tsiakou** et all.Survival benefit during Zoledronic acid and docetaxel-based chemotherapy in metastatic hormone-refractory prostate cancer patients: an institutional report.Journal of B.U.ON (Official journal of the Balkan union of oncology) 16(4):738-43, Oct-Dec 2011
- 4) G.F Samelis, K.A. Ekmektzoglou, **A.I Tsiakou**. Survival benefit with the combination of docetaxel, gemcitabine and erlotinib in advanced and/or metastatic pancreatic cancer patients.Hepatogastroenterology;58(110-111):1776-81 Sept-Oct 2001
- 5) G.F Samelis, K.A. Ekmektzoglou, **A.I Tsiakou**. The continuation of bevacizumab following disease progression in patients with metastatic colorectal cancer offers a survival benefit.Hepatogastroenterology; 58(112):1968-71
- 6) Despoina Kalapanida, Flora Zagouri, Maria Gazouli, **Andriani Tsiakou**, Eleni Zografos, Constantine Dimitrakakis, Spyridon Marinopoulos, Aris Giannos, Theodoros N. Sergentanis, Efstathios Kastritis, Evangelos Terpos, Meletios-Athanasios Dimopoulos. Evaluation of MET T10101 and MET rs40239 single-nucleotide polymorphisms in triple-negative breast cancer: a case-control study. OngoTargets and Therapy 2019;12 4195-4202
- 7) **Tsiakou Andriani**, Zagouri Flora, Zografos Eleni, Samelis George, Gazouli Maria, Kalapanida Despoina, Giannos Aris, Marinopoulos Spyros, Dimitrakakis Konstantinos, Lazaris C. Andreas, Rigopoulos Dimitrios, Zografos George. Prognostic significance of miR34 rs4938723 T>C polymorphism in triple negative breast cancer patients (TNBC), Clinical Biochemistry, <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2019.03.009>

8) **Tsiakou Andriani**, Zagouri Flora, Zografos Eleni, Samelis George, Gazouli Maria, Kalapanida Despoina, Giannos Aris, Marinopoulos Spyros, Dimitrakakis Konstantinos, Lazaris C. Andreas, Rigopoulos Dimitrios, Zografos George. Prognostic significance of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) gene rs4143815 polymorphism in triple negative breast cancer patients (TNBC), *Clinical Biochemistry*, <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2019.03.009>

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ:

1) «Παραγαγγλίωμα δωδεκαδακτύλου-έναν ιδιαίτερα σπάνιος νευροενδοκρινικός όγκος», Ανδριανή Τσιάκου, Αριστείδης Γρηγοριάδης, Γεώργιος Ζωγράφος, *ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ ΠΕΠΤΙΚΟΥ*, Δεκέμβριος 2005.

2) «Γαστρεντερικοί στρωματικοί όγκοι: Ιματινίμη και νεότερες φαρμακευτικές εξελίξεις», Γεώργιος Φ. Σαμέλης, Κωνσταντίνος Α. Εκμεκτζόγλου, Ανδριανή Ι. Τσιάκου, *ΒΗΜΑ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ*, Ιούνιος 2007, τόμος 6, τεύχος 1.

3) «Η θέση της Ιματινίμης και των νεότερων φαρμακευτικών εξελίξεων στην αντιμετώπιση των γαστρεντερικών όγκων», Γεώργιος Φ. Σαμέλης, Κωνσταντίνος Α. Εκμεκτζόγλου, Ανδριανή Ι. Τσιάκου, *ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΠΡΟΛΗΨΙΣ*, Ιανουάριος-Μάρτιος 2008, τόμος 3, τεύχος 1.

4) «2ης Γραμμής Χημειοθεραπεία με Πακλιταξέλη και Καρβοπλατίνη σε ασθενείς με προχωρημένο Καρκίνο στομάχου», Γεώργιος Φ. Σαμέλης, Κωνσταντίνος Α. Εκμεκτζόγλου, Βασιλική Π. Κίτσου, Ανδριανή Ι. Τσιακού, *ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ ΠΕΠΤΙΚΟΥ*, Ιανουάριος-Μάρτιος 2008, τόμος 8, τεύχος 1.

5) «Ασθενής με μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα: Μια ασυνήθιστη θεραπευτική προσέγγιση με επιβίωση πάνω από 13 χρόνια. Περιγραφή περιστατικού και ανασκόπηση της βιβλιογραφίας», Γ.Φ. Σαμέλης, Μ.Β Πελεχρίνη, Κ.Α Εκμεκτζόγλου, Μ.Γ Καραμανίδη, Α.Ι Τσιάκου, Ε. Κωνσταντουλάκης, *ΒΗΜΑ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ*, Ιανουάριος-Ιούνιος 2009, τόμος 8, τεύχος 1-2.

ΟΜΙΛΙΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ:

- 1) 5ο ΣΥΝΕΔΡΙΟ Ε.Δ.Ε.Μ.Σ.ΕΘ με θέμα:Στοχευμένες Ανοσοθεραπείες σε συμπαγείς κακοήθειες.27-28 Απριλίου 2018.Αθήνα. Τίτλος ομιλίας:Δερματολογικές παρενέργειες από τις ανοσοθεραπείες και των συνδυασμών τους.
- 2) Διημερίδα με θέμα:Η Ογκολογία στην Ελληνική περιφέρεια.26-27 Οκτωβρίου 2018.Κω.Τίτλος ομιλίας:Συχνότερα δερματολογικά προβλήματα στον ογκολογικό ασθενή και η αντιμετώπισή τους.
- 3) Εαρινή διμερίδα Ελληνικής Δερματολογικής και Αφροδισιολογικής Εταιρείας.19-20 Απριλίου 2019.Αθήνα.Τίτλος ομιλίας:Δερματικές ανεπιθυμητες ενεργειες απο χημειοθεραπευτικα: τι κανω;
- 4) 1η Επιστημονική Ημερίδα Ειδικευομένων Δερματολογίας – Αφροδισιολογίας Νοσοκομείο «Α. Συγγρός».Αθήνα.Τίτλος ομιλίας:Ο ρολος της ηωσινοφιλιας στο περιφερικο αιμα ως παθογενετικος μηχανισμος στο πομφολυγωδες πεμφιγοειδες. Παρατηρησεις απο το νοσοκομειο «Α. Συγγρος».
- 5) Διημερίδα με θέμα: Η ογκολογία στην Ελληνική περιφέρεια.25-26 οκτωβρίου 2019.Κω.Τίτλος ομιλίας: Παρενέργειες ανοσοθεραπείας και στοχευμένων θεραπειών.

ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ (POSTERS):

ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ:

1) The continuation of Bevacizumab, following disease progression in patients with metastatic colorectal cancer offers a survival benefit.

G.F Samelis, A. Tsiakou, M.Karamanidi, M. Pelechrini, A. Zaganides, K. Ekmektzoglou; Hippokration General Hospital of Athens, Athens, Greece

ASCO 45th Annual Meeting, Orlando,Florida, U.S.A May 29-June 2 2009

2) Biweekly 2nd line chemotherapy with bevacizumab (BM) in patients with metastatic colorectal cancer.

G.F. Samelis, K.A. Ekmektzoglou, V.P. Kitsou, A.I. Tsiakou. Oncology Department- Hippokration General Hospital of Athens-Greece

73rd Annual Scientific Meeting of the American College of the Gastroenterology, Orlando, Florida, U.S.A October 3-8, 2008

3) Improvement of pain control and quality of life with erlotinib based chemotherapy in patients with metastatic pancreatic cancer.

Georgios Fotios Samelis, Andriani I. Tsiakou, Maria Karamanides, Maria Pelechrini, Konstantinos Ekmektzoglou

Oncology, Hippokrateion General Hospital of Athens, Athens, Greece

MASCC (Multinational Association of supportive care in cancer) International Symposium, Rome Italy June 25-27, 2009

4) Persistent urticaria in hospitalized children

A.I. Tsiakou, E. Karachanidi, T. Syriopoulou, E. Kostopoulou

Pediatric department Kalamata General Hospital, Kalamata,

Dematologic department, Kalamata General Hospital, Kalamata

10th ESPD (European Society of Pediatric Dermatology)

Lausanne, Switzerland, May 20-22, 2010

5) Scarletina in the 18th century: Descriptions-Therapeutic

A.I. Tsiakou, E. Karachanidi, T. Syriopoulou, E. Kostopoulou

Pediatric department Kalamata General Hospital, Kalamata,

Dematologic department, Kalamata General Hospital, Kalamata

10th ESPD (European Society of Pediatric Dermatology)

Lausanne, Switzerland, May 20-22, 2010

6) Survival and quality of life with the combination of docetaxel and gemcitabine-erlotinib based chemotherapy in patients with advanced and/or metastatic pancreatic cancer

G.F Samelis, K.A Ekmektzoglou, A.I.Tsiakou, S. Giannakaki., M.M Konstadoulakis

8th BUON (Balkan Union of Oncology) Congress, Sibiu, Romania, September 8-11 2010

7) The administration of docetaxel and zoledronic acid (ZOL) offers a survival and quality of life benefit in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer (mHRPC)

G.F Samelis, K.A Ekmektzoglou, A.I.Tsiakou, G. Georgoulas, K. Christophilopoulos, K. Rebelakos

8th BUON (Balkan Union of Oncology) Congress, Sibiu, Romania, September 8-11 2010

8) Giant invasive squamous cell carcinoma on erythrodermic mycosis fungoides

M. Politou, A. Tsiakou, M. Pompou, M. Papoutsaki, E. Nikolaidou, C. Antoniou

13th Congress of the EADO 2017, Athens, Greece, May 3-6, 2017

9) Amelanotic naevoid melanoma arising from a medium sized congenital naevus in a young woman

M. Politou, A. Tsiakou, M. Pompou, N.Fekkas

13th Congress of the EADO 2017, Athens, Greece May 3-6 2017

10) Impetigo herpetiformis in a nulligravida woman

A. Tsiakou, M. Politou, M. Pompou, E. Nikolaidou, C. Antoniou

26th European Academy of Dermatology and Venereology Congress, Geneva, Switzerland,
September 13-17, 2017

11) Lichenoid drug eruption due to omalizumab. A case report.

A. Tsiakou, M. Politou, M. Pompou, E. Nikolaidou, C. Antoniou

26th European Academy of Dermatology and Venereology Congress, Geneva, Switzerland,
September 13-17, 2017

12) A late responder patient with plaque psoriasis to secucinumab. A case report.

A. Tsiakou, M. Politou, M. Pompou, E. Nikolaidou, C. Antoniou

26th European Academy of Dermatology and Venereology Congress, Geneva, Switzerland,
September 13-17, 2017

ΠΑΝΕΛΛΗΝΙΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ:

1) Θεραπεία μεταστατικού και τοπικά προχωρημένου Ca νεφρού με βάση την Σουνιτινίμπη

Ανδιανή Ι. Τσιάκου, Γεώργιος Φ. Σαμέλης, Φωτεινή Ματσιακού, Ελένη Ρες, Χριστιάνα
Ιωσηφίδη, Μαρία Γκρέκ, Παύλος Παπακώστας

Ογκολογική Μονάδα Ιπποκρατείου Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών

14ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα, 8-10 Μαΐου 2008

2) Λειχηνοειδές φαρμακευτικό εξάνθημα μετά από χορήγηση Omalizumab. Πρώτο διεθνώς
αναφερόμενο περιστατικό.

Μ.Πολίτου, Μ.Πομπού, Α. Τσιάκου, Ν.Φέκκας

Α Πανεπιστημιακή Δερματολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής Αθηνών. Νοσ. «Α.Συγγρός»

12ο Πανελλήνιο Συνέδριο Δερματολογίας & Αφροδισιολογίας, Αθήνα, 3-6 Νοεμβρίου 2016

3) Πολυεστιακό σταθερό φαρμακευτικό εξάνθημα επαγόμενο από μεφαιναμικό οξύ.Παρουσίαση περιστατικού

Μ.Πολίτου, Α. Τσιάκου, Η. Νικολαΐδου, Μ.Πομπού,Μ. Παπουτσάκη, Χ.Αντωνίου

Α Πανεπιστημιακή Δερματολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής Αθηνών. Νοσ. «Α.Συγγρός»

12ο Πανελλήνιο Συνέδριο Δερματολογίας & Αφροδισιολογίας, Αθήνα, 3-6 Νοεμβρίου 2016

4) Ερπητοειδές κηρίο της κύησης σε μη έγκυο, άτεκνη γυναίκα.Παρουσίαση περιστατικού

Μ.Πολίτου, Α. Τσιάκου, Μ.Πομπού, Η. Νικολαΐδου Χ.Αντωνίου

Α Πανεπιστημιακή Δερματολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής Αθηνών. Νοσ. «Α.Συγγρός»

12ο Πανελλήνιο Συνέδριο Δερματολογίας & Αφροδισιολογίας, Αθήνα, 3-6 Νοεμβρίου 2016

5) Εξωγενές σύνδρομο Cushing σε ενήλικα από χρήση πολύ ισχυρών τοπικών κορτικοστεροειδών επί εξαιτίας.Παρουσίαση περιστατικού

Α. Τσιάκου, Μ.Πολίτου Μ.Πομπού, Η. Νικολαΐδου Χ.Αντωνίου

Α Πανεπιστημιακή Δερματολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής Αθηνών. Νοσ. «Α.Συγγρός»

12ο Πανελλήνιο Συνέδριο Δερματολογίας & Αφροδισιολογίας, Αθήνα, 3-6 Νοεμβρίου 2016

6) Επιτυχής θεραπεία ανθεκτικής ερυθράς ιονθείου πιτυρίασης σε ενήλικα ασθενή με adalimumab.

Μαρία Πολίτου, Ανδριανή Τσιάκου, Αναστάσιος Γιαννούκος, Νικόλαος Πούντος, Μαρία Πομπού, Ηλέκτρα Νικολαΐδου

Α Πανεπιστημιακή Δερματολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής Αθηνών. Νοσ. «Α.Συγγρός»

11ο Πανελλήνιο Συνέδριο Δερματολογίας Αφροδισιολογίας, Θεσσαλονίκη, 25-28 Ιουνίου 2015

7) Παρουσίαση περιστατικού: Χορήγηση secukinumab σε ασθενή με ψωρίαση και μυασθένεια Gravis.

Μαρία Πολίτου, Ανδριανή Τσιάκου, Αναστάσιος Γιαννούκος, Νικόλαος Πούντος, Μαρία Πομπού, Ηλέκτρα Νικολαΐδου

Α Πανεπιστημιακή Δερματολογική Κλινική Ιατρικής Σχολής Αθηνών. Νοσ. «Α.Συγγρός»

11ο Πανελλήνιο Συνέδριο Δερματολογίας Αφροδισιολογίας, Θεσσαλονίκη, 25-28 Ιουνίου 2015

ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΕΡΓΟ:

ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ:

1) Recent Advances of chemoradiation in Oncology

2nd ESMO ADVANCED COURSE

December 8-9, 2006

Athens , Greece

2) Gastrointestinal Cancers Symposium

January 19-21, 2007

Orlando, Florida, U.S.A

3) 5th International Symposium on Targeted Anticancer Therapies

March 8-10, 2007

Amsterdam, The Netherlands

4) 14th European Cancer Conference (ECCO 14)

September 23-27, 2007

Barcelona, Spain

5) Evolving consensus in GIST management

October 3-5, 2008

Warsaw, Poland

6) Annual Chemotherapy Foundation Symposium

November 4-8, 2008

New York, U.S.A

7) KWI-300-104 Investigators meeting (GCP training)

June 12-14, 2008

Heviz, Hungary,

8) 10th ESPD Congress (European Society for Pediatric Dermatology)

May 20-22, 2010

Lausanne, Switzerland

9) ESMO (European Society of Medical Oncologists) Congress

September 28 – October 2, 2012

Vienna, Austria

10) Breast Cancer in Young Women Conference

November 8-10 , 2012

Dublin, Ireland

11) 5th World Congress of Dermatoscopy

June 14-16, 2018

Thessaloniki, Greece

12) 5th World Psoriasis & Psoriatic Arthritis Conference 2018

June 27-30, 2018

Stockholm, Sweden

13) EORTC CLTF Annual Meeting 2019

September 26-28, 2019

Athens, Greece

ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ:

1) 4ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ογκολογίας Πεπτικού

3-4 Δεκεμβρίου 2004

Αθήνα

2) 14ο Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας

Πανεπιστημιακή Παθολογική-Ογκολογική Κλινική ΠΑ.Γ.Ν.Η

25-29 Οκτωβρίου 2006

Ηράκλειο, Κρήτης

3) 10ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μαστολογίας

20-22 Απριλίου 2007

Δράμα

4) 3ο Πανελλήνιο Διαιτητικό Αντικαρκινικό Συνέδριο

26-29 Απριλίου 2007

Αθήνα

5) Η Ογκολογία του σήμερα και του αύριο κατευθυντήριες οδηγίες για την καθ'ημέρα πράξη και μελλοντικές προοπτικές Ογκολογική Μονάδα Γ.Ν.Α «ΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ»

14-15 Δεκεμβρίου 2007

Αθήνα

6) 3ο Πανελλήνιο Forum Ογκολογίας

4-6 Ιουλίου 2008

Χανιά

7) 15ο Πανελλήνιο συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας

26-28 Μαρτίου 2009

Αθήνα

8) 1ο Πανελλήνιο Συνέδριο Υποειδικοτήτων στη Δερματολογία

25-27 Σεπτεμβρίου 2009

Αθήνα

9) 11ο Πανελλήνιο Συνέδριο Δερματολογίας Αφροδισιολογίας

25-28 Ιουνίου 2015

Θεσσαλονίκη

10) Συνέδριο Ε.Δ.Ε.Μ.Σ.Ε.Θ με θέμα:Εφαρμογή των Μοριακά Στοχευμένων θεραπειών στους συμπαγείς όγκους

8-9 Απριλίου 2016

Βόλος

11) 3ο Συνέδριο Ε.Δ.Μ.Σ.Ε.Θ: «Στοχευμένες θεραπείες σε συμπαγείς-αιματολογικές κακοήθειες και σε ψυχιατρικές παθήσεις».

6-7 Μαΐου 2016

Καλαμάτα

12) 12ο Πανελλήνιο Συνέδριο Δερματολογίας και Αφροδισιολογίας

3-6 Νοεμβρίου 2016

Αθήνα

13) Πανελλήνιο Συνέδριο Ε.Δ.Ε.Μ.Σ.Ε.Θ με θέμα «Στοχευμένες Ανοσοθεραπείες σε Συμπαγείς Κακοήθειες»

27-28 Απριλίου 2018

Αθήνα

14) 14ο Πανελληνίου Συνεδρίου Δερματολογίας και Αφροδισιολογίας

1-4 Νοεμβρίου 2018

Αθήνα

15) «Πανελλήνιο Συνέδριο Δερματοχειρουργικής, Αισθητικής Δερματολογίας και Laser»

16-19 Ιανουαρίου 2019

Αθήνα

16) 7ο Πανελλήνιο Συνέδριο Μελανώματος

7-9 Ιουνίου 2019

Αθήνα

ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ:

1) Σεμινάρια Ελληνικής Ακαδημίας Ογκολογίας (Ε.Α.Κ.Ο).

Τριετούς κύκλου σπουδών

Οκτώβριος 2006-Οκτώβριος 2009

2) 5ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο

Καρκίνος μαστού: Από το γονίδιο στη θεραπεία

16-18 Νοεμβρίου 2006

Θεσσαλονίκη

3) KWI-300-104 Investigators meeting and GCP (Good Clinical Practice) training

12th-14th June 2008

Heviz, Hungary

4) 56ο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο της Ελληνικής Εταιρείας Δερματοχειρουργικής

10 Απριλίου 2016

Αθήνα, Ελλάδα

ΆΛΛΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ:

1) Συμμετοχή σε ερευνητικά πρωτόκολλα: Co-investigator σε Μελέτη φάσης 4, " Apraisal" Study, της εταιρείας GENESIS,

2) Μέλος Οργανωτικής Επιτροπής:3η Επιστημονική Ημερίδα Ά ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ Γ.Ν.Α. «ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ», 28 Μαΐου 2005

3) Μέλος Οργανωτικής Επιτροπής: 4η Επιστημονική Δημερίδα:Αμφιλεγόμενα σημεία στον καρκίνο του μαστού

30/11/07 & 1/12/07, Αμφιθέατρο Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, Αθήνα

4) Μέλος Επιστημονικής Επιτροπής :

Επετειακή Ημερίδα για την 30ετία της ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ

27 Φεβρουαρίου 2010, Ίδρυμα Ευγενίδου, Αθήνα

Μέλος του M.A.S.C.C (Multinational Association of supportive care in cancer)

Μέλος της E.A.D.V (European Academy of Dermatology and Venereology)

Μέλος της E.Δ.Α.Ε (Ελληνικής Δερματολογικής και Αφροδισιολογικής Εταιρείας)

Μέλος της H.S.D.S (Ελληνικής Εταιρείας Δερματοχειρουργικής)

Μέλος της E.Δ.Ε.Μ.Σ.Ε.Θ (Ελληνική και Διεθνής Εταιρεία Μοριακά Στοχευμένων Εξατομικευμένων Θεραπειών)

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ:

Αγγλικά: Proficiency

Γαλλικά: 1er Degre du D.E.L.F-A2

Ιταλικά:Celi 3

ΓΝΩΣΗ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟΥ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗ:

European computer driving license (E.C.D.L)

Basic concept, Powerpoint, Word, Excel, Internet, Access

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	27
1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	27
1.2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	28
1.2.1 Επιβαρυντικοί παράγοντες του καρκίνου του μαστού	28
1.2.2 Γενετική βάση του καρκίνου του μαστού	29
1.2.3 Μοριακή βάση του καρκίνου του μαστού.....	30
1.2.4 Ταξινόμηση καρκίνου του μαστού	32
1.2.4.1 Ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού	33
1.2.4.2 Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού	35
1.2.5 Προληπτικός έλεγχος και διάγνωση του καρκίνου του μαστού.....	38
1.2.6 Πρόγνωση του καρκίνου του μαστού	39
1.2.7 Θεραπεία του καρκίνου του μαστού.....	41
1.2.8 Μοριακοί δείκτες στον καρκίνο του μαστού	42
1.2.9 Γονιδιακές Υπογραφές.....	43
1.3 ΜΙΚΡΟRNA (MICRORNAs, MIRNAS)	45
1.3.1 Γενικά	45
1.3.2 Ρόλος των miRNAs στον καρκίνο.....	45
1.3.3 Ρόλος των miRNAs στον καρκίνο του μαστού	48
1.3.4 Ρόλος του miR-34 στον καρκίνο.....	50
1.4 ΑΝΟΣΟΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΕΛΕΓΧΟΥ ΤΟΥ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ.....	55
1.4.1 Γενικά Στοιχεία.....	55
1.4.2 Αναστολείς ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος.....	56
1.4.2.1 Σύνοψη των αναστολέων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος	56
1.4.2.2 Το ανοσοποιητικό σημείο ελέγχου CTLA-4	62
1.4.2.3 Ρυμιστικοί μηχανισμοί της αρνητικής συν-διέγερσης μέσω του CTL-4	63
1.4.2.4 Ανοσοποιητικοί αναστολείς σημείων ελέγχου που στοχεύουν το CTLA-4	64
1.4.2.5 Το ανοσοποιητικό σημείο ελέγχου PD-1	65
1.4.2.6 Ρυμιστικοί μηχανισμοί της αρνητικής συν-διέγερσης μέσω του PD-1.....	66
1.4.2.7 Ανοσοποιητικοί αναστολείς σημείων ελέγχου που στοχεύουν το PD-1	68
1.4.2.8 Αναστολείς ανοσοποιητικού σημείου ελέγχου που στοχεύουν το PD-L1.....	69
1.4.3 Το ανοσοποιητικό σύστημα στους τριπλά αρνητικούς ασθενείς με καρκίνο μαστού.....	70
1.4.4 Η ανοσοθεραπεία στους τριπλά αρνητικούς ασθενείς με καρκίνο μαστού.....	71
1.5 Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	72
1.5.1 Γενικά Στοιχεία.....	72
1.5.2 Οι πολυμορφισμοί στον καρκίνο.....	73
1.5.2.1 Ευαισθησία των πολυμορφισμών στον καρκίνο	74
1.5.2.2 Τα αποτελέσματα των πολυμορφισμών στον καρκίνο	74
1.5.3 Η σημασία των πολυμορφισμών στον καρκίνο του μαστού.....	76
1.5.4 Συσχέτιση του πολυμορφισμού rs4143815-PDL1 με τον κίνδυνο καρκίνου	78
1.5.5 Συσχέτιση του πολυμορφισμού rs4938723-miR-34 με τον κίνδυνο καρκίνου	80
ΣΚΟΠΟΣ	82
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	83
2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΤΡΙΠΛΑ ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.....	83
2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΑΠΟ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΣ ΜΑΡΤΥΡΕΣ	84

2.3	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΜΟΝΗΡΕΙΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ PD-L1 rs4143815 C>G ΚΑΙ miR-34 rs493872 C>T	85
2.4	ΒΙΟΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	86
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	87
3.1	ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ miR34 rs4938723 T>C ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΤΡΙΠΛΑ ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΥΓΙΩΝ ΜΑΡΤΥΡΩΝ	87
3.2	ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ miR34 rs4938723 T>C ΜΕ ΤΑ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ	88
3.3	ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΑΞΙΑΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ miR34 rs4938723 T>C ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΤΡΙΠΛΑ ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.....	91
3.4	ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ PD-L1 rs4143815 C> G ΜΕΤΑΞΥ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΤΡΙΠΛΑ ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΜΑΣΤΟΥ (TNBC) ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΣ ΜΑΡΤΥΡΕΣ	95
3.5	ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ PD-L1 rs4143815 C> G ΜΕ ΤΙΣ ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΑΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ	96
3.6	ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ PD-L1 rs4143815 C> G ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΤΡΙΠΛΑ ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΜΑΣΤΟΥ (TNBC)	98
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	103
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	106
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	106
	ABSTRACT	122

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καρκίνος και Καρκινικοί δείκτες

Με τον όρο «καρκίνος» περιγράφεται ένα ετερογενές σύνολο νόσων, που μπορούν να επηρεάσουν οποιοδήποτε ιστό του σώματος, και χαρακτηρίζονται από τη γρήγορη δημιουργία μη φυσιολογικών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα και τελικά αναπτύσσονται πέρα από το φυσιολογικό τους περιβάλλον διηθώντας παρακείμενα ή ακόμα και απομακρυσμένα όργανα. Παρόλο που η πρώτη αναφορά της συγκεκριμένης νόσου τοποθετείται στα αρχαία κίολας χρόνια περίπου το 1600 π.Χ., εξακολουθεί, ακόμα και στις μέρες μας να είναι ένα μείζον πρόβλημα υγείας σε παγκόσμιο επίπεδο, όπως φαίνεται κι από τις αντίστοιχες στατιστικές μελέτες. Ένας λόγος για τα υψηλά ποσοστά θνησιμότητας είναι το γεγονός ότι πρόκειται για μία σύνθετη και πολυπαραγοντική ασθένεια, η οποία συχνά δεν εμφανίζει συμπτώματα στα αρχικά στάδια. Η έγκαιρη διάγνωση είναι πολύ σημαντική και αποτελεί την κυριότερη προϋπόθεση για την επιτυχή αντιμετώπιση της. Εξίσου σημαντικό ρόλο παίζει επίσης η αξιόπιστη πρόγνωση, δηλαδή η έγκυρη πρόβλεψη της εξέλιξης της ασθένειας καθώς και της ανταπόκρισης του ασθενούς στην εφαρμοζόμενη θεραπεία.

Σημαντικό ρόλο προς αυτή την κατεύθυνση παίζουν οι καρκινικοί δείκτες οι οποίοι στην κλινική πράξη εφαρμόζονται με σκοπό την έγκαιρη διάγνωση, τον προληπτικό έλεγχο του γενικού πληθυσμού, την πρόγνωση της νόσου, την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας και τον έλεγχο της ανταπόκρισης στη θεραπεία. Καρκινικός δείκτης μπορεί να είναι είτε μία ουσία που υπάρχει ή παράγεται από τα καρκινικά κύτταρα ή από τον ξενιστή σαν απάντηση στην παρουσία του όγκου και η οποία μπορεί να μετρηθεί στο αίμα ή σε εκκρίσεις και χρησιμοποιείται για τη διάκριση του καρκινικού από τον υγιή ή για την ανίχνευση του όγκου, είτε ένα μόριο, μία ουσία ή μια διαδικασία, που μεταβάλλεται ποσοτικά ή ποιοτικά σε καρκινικές καταστάσεις και η μεταβολή αυτή μπορεί να ανιχνευθεί μέσω κάποιας εργαστηριακής μεθόδου. Ιδανικά ένα καρκινικός δείκτης θα πρέπει να έχει αυξημένη αναλυτική και διαγνωστική ευαισθησία και ειδικότητα, να μπορεί να ανιχνευθεί πριν την κλινική διάγνωση της ασθένειας, να υπάρχει αντιστοιχία των μεταβολών του δείκτη με το μέγεθος και το βαθμό κακοήθειας του όγκου, την εξέλιξη της νόσου και την παρουσία μεταστάσεων, να μπορεί να ανιχνευθεί εύκολα και οικονομικά σε εύκολα προσβάσιμα βιολογικά υλικά όπως αίμα και ούρα.

Αν και η αναζήτηση νέων καρκινικών δεικτών μετρά πολλά χρόνια, δεν έχει αναγνωριστεί ακόμα ένας καρκινικός δείκτης που να πληροί τα προαναφερθέντα κριτήρια

ενώ λίγοι έχουν βρει ευρεία εφαρμογή στην κλινική πράξη (1). Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων δεικτών αποτελούν το PSA για τον καρκίνο του προστάτη που βρίσκει εφαρμογή στον προληπτικό έλεγχο του ανδρικού πληθυσμού, στην πρόγνωση και την παρακολούθηση της πορείας της ασθένειας καθώς και οι υποδοχείς ER/PR/HER-2 που βοηθούν στην πρόγνωση των ασθενών με καρκίνο του μαστού αλλά κυρίως στην επιλογή των κατάλληλων θεραπειών.

1.2 Καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο συχνή μορφή κακοήθειας και η δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο στον γυναικείο πληθυσμό (2), ενώ στον ανδρικό πληθυσμό αποτελεί μία σπάνια ασθένεια. Πιο αναλυτικά αντιπροσωπεύει το 1% των περιπτώσεων και μόλις το 0.2% όλων των καρκίνων που παρουσιάζονται στον ανδρικό πληθυσμό(2).

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει σημαντικά βήματα τόσο στην έγκαιρη διάγνωση της νόσου, κυρίως χάρη στη μαστογραφία, όσο και στην πρόγνωση και την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας που βασίζονται σε ευρέως χρησιμοποιούμενους δείκτες (ιστολογικός τύπος, βαθμός κακοήθειας και μέγεθος του όγκου), σε αλγόριθμους (π.χ. Nottingham Prognostic Index-NPI), όπου συνυπολογίζονται πολλές από τις παραπάνω παραμέτρους, στη μοριακή ταξινόμηση των όγκων του μαστού σε τέσσερις κατηγορίες, (Αυλικού τύπου A-Luminal A, Αυλικού τύπου B- Luminal A, HER-2 θετικοί και τριπλά αρνητικοί όγκοι-Triple Negative) και τέλος στις γονιδιακές υπογραφές (π.χ. Oncotype DX, MammaPrint)(3).

Παρόλα αυτά, ο καρκίνος του μαστού αποτελεί μια ιδιαίτερα ετερογενή και πολύπλοκη νεοπλασία και η πολυπλοκότητα αυτή δεν μπορεί να περιγραφεί μόνο με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους που χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική πράξη. Έτσι, η λύση αυτού του προβλήματος φαίνεται να βρίσκεται στην κατανόηση των μοριακών και γενετικών αλλαγών που οδηγούν στον καρκίνο, με τελικό στόχο την δημιουργία του γονιδιακού προφίλ του κάθε όγκου ξεχωριστά και την εξατομικευμένη αντιμετώπιση της νόσου.

1.2.1 Επιβαρυντικοί παράγοντες του καρκίνου του μαστού

Στους επιβαρυντικούς παράγοντες του καρκίνου του μαστού περιλαμβάνονται δημογραφικοί, γενετικοί, ορμονικοί και παράγοντες που σχετίζονται με τον τρόπο ζωής. Αρχικά, το φύλο ο σημαντικότερος δημογραφικός παράγοντας σε ότι αφορά την εμφάνιση της ασθένειας, καθώς η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού στις γυναίκες είναι σχεδόν εκατονταπλάσια σε σχέση με αυτήν των ανδρών (4). Ένας ακόμα σημαντικός

επιβαρυντικός παράγοντας είναι η ηλικία καθώς μελέτες δείχνουν ότι η πιθανότητα εμφάνισης της νόσου αυξάνεται σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας αλλά και η κληρονομικότητα αφού το 10-20% των περιστατικών καρκίνου του μαστού έχει οικογενή ή κληρονομική αιτιολογία. Ο βαθμός συγγένειας, η ηλικία και ο αριθμός των συγγενικών προσώπων που νόσησαν καθορίζουν τον κίνδυνο ανάπτυξης της νόσου (4).

Από την άλλη πλευρά ο κληρονομικός καρκίνος του μαστού σχετίζεται με την ύπαρξη μεταλλάξεων σε γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας που κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο, όπως τα *BRCA1* και *BRCA2*. Ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου στα άτομα που φέρουν μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια είναι 60%-80%, και οι μεταλλάξεις στο *BRCA1* συνδέονται με μεγαλύτερες πιθανότητες εμφάνισης της νόσου (65%) σε σχέση με αυτές στο *BRCA2* (45%). Επίσης, ο κληρονομούμενος καρκίνος του μαστού μπορεί να σχετίζεται με διάφορα άλλα γενετικά σύνδρομα (π.χ. Li-Fraumeni, Cowden, Peutz-Jegher, Αταξία-Τελαγγειεκτασία), τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού και για τα οποία ευθύνονται τα γονίδια: *TP53*, *PTEN*, *STK11/LKB1* και *ATM* αντίστοιχα (5).

Τέλος η επίδραση των ορμονών είναι ένας πολύ σημαντικός επιβαρυντικός παράγοντας για τον καρκίνο του μαστού. Η συμμετοχή των οιστρογόνων και της προγεστερόνης στον καρκίνο του μαστού αποδεικνύεται άριστα από την πανίσχυρη προστατευτική δράση της πρόωμης, αυτόματης ή τεχνητής εμμηνόπαυσης καθώς κι από την παρατηρούμενη μείωση στα ποσοστά επίπτωσης της νόσου στην ηλικία της εμμηνόπαυσης. (6). Επιπλέον, υπάρχει επιβεβαιωμένη συσχέτιση ανάμεσα στην εμφάνιση της νόσου και συγκεκριμένες αναπαραγωγικές παραμέτρους της γυναίκας, όπως η ηλικία της εμμηναρχής, της εμμηνόπαυσης και της πρώτης εγκυμοσύνης, η ατεκνία και η διάρκεια του θηλασμού, οι οποίες αποτελούν μέτρο της συσσωρευτικής δόσης των ορμονών στην οποία εκτίθεται ο αδένας (7). Τέλος, η χρήση εξωγενώς χορηγούμενων ορμονικών σκευασμάτων, είτε ως θεραπεία υποκατάστασης είτε ως αντισυλληπτική αγωγή, φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού και μάλιστα με έναν χρόνο- και δόσο-εξαρτώμενο τρόπο.

1.2.2 Γενετική βάση του καρκίνου του μαστού

Η καρκινογένεση του μαστού περιλαμβάνει πολλαπλές γενετικές αλλαγές οι οποίες ανήκουν σε μεταλλάξεις λειτουργικής ενεργοποίησης (gain of function) ογκογονιδίων ή σε μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας (loss of function) κάποιων ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Ακόμη έχουν περιγραφεί προσθήκες γενετικού υλικού στη χρωμοσωμική περιοχή 1q, απώλειες γενετικού υλικού στις περιοχές 16q και 17q καθώς και εμπλουτισμός στην 11q (8)

αλλά και κληρονομήσιμες μεταλλάξεις που συνδέονται με αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης της νόσου (9,10).

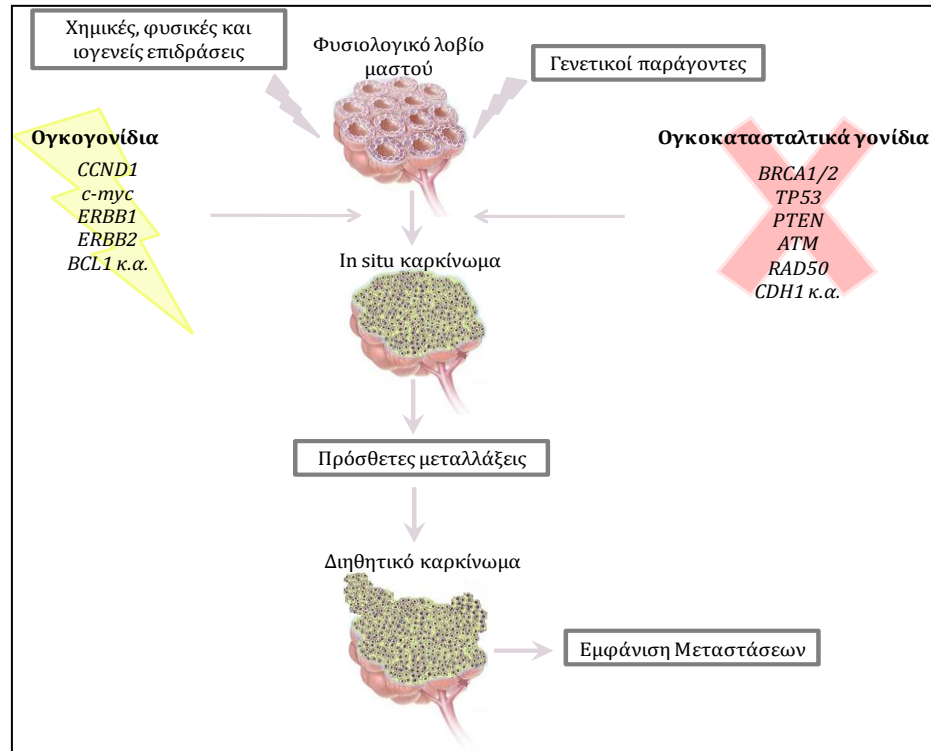
Οι μεταλλάξεις λειτουργικής ενεργοποίησης των ογκογονιδίων είναι εξ'ολοκλήρου σωματικές και απαιτείται η ύπαρξη ενός μεταλλαγμένου αλληλομόρφου για την εμφάνιση του καρκινικού φαινοτύπου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα πρώτο-ογκογονιδίων με άμεση σχέση με τον καρκίνο του μαστού είναι τα *HER-2*, *EGFR*, *RAS*, και *MYC* (9). Οι μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά γονίδια μπορεί να είναι είτε κληρονομήσιμες είτε σωματικές. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί κληρονομήσιμες μεταλλάξεις, που σχετίζονται με αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης της νόσου, σε δέκα ογκοκατασταλτικά γονίδια τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση της ακεραιότητας του γονιδιώματος (10,11). Βασικότεροι εκπρόσωποι αυτών των γονιδίων είναι τα *BRCA1* και *BRCA2*, τα οποία ελέγχονται στην κλινική ρουτίνα στα πλαίσια του γενετικού ελέγχου γυναικών με οικογενειακό ιστορικό. Αξίζει, επίσης, να αναφερθεί ότι μέχρι σήμερα έχει επιβεβαιωθεί η συσχέτιση 19 πολυμορφισμών ενός νουκλεοτίδιου (Single Nucleotide Polymorphisms-SNPs) με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου (11,12). Τέλος όπως αναφέρθηκε παραπάνω ο κληρονομούμενος καρκίνος του μαστού μπορεί να σχετίζεται με διάφορα άλλα γενετικά σύνδρομα όπως τα Li-Fraumeni, Cowden, Peutz-Jegher, Αταξία-Τελαγγειεκτασία για τα οποία ευθύνονται μεταλλάξεις στα γονίδια *TP53*, *PTEN*, *STK11/LKB1* και *ATM* αντίστοιχα (12).

1.2.3 Μοριακή βάση του καρκίνου του μαστού

Η παθολογία του καρκίνου του μαστού σε μοριακό επίπεδο είναι πολυδιάστατη και χαρακτηρίζεται από πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε μη κωδικά μόρια RNA-γονίδια-πρωτεΐνες/ορμόνες, η φυσιολογική δράση των οποίων έχει αλλάξει εξαιτίας γενετικών αλλαγών ή/και της επίδρασης περιβαλλοντικών παραγόντων. Τα μέχρι τώρα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι σε μοριακό επίπεδο ο καρκίνος του μαστού οφείλεται στη διαταραγμένη δράση των στεροειδών ορμονών του φύλου (παράγραφος 1.2.1), στην ενεργοποίηση συγκεκριμένων ογκογονιδίων και στην απενεργοποίηση ορισμένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Επίσης πειραματικά δεδομένα των τελευταίων χρόνων καταδεικνύουν την σημαντική συμβολή των μικρών μη κωδικών RNA (microRNAs) στα μοριακά μονοπάτια που οδηγούν στη σταδιακή μετάβαση των φυσιολογικών κυττάρων του μαστικού αδένου σε καρκινικά με μεταστατική ικανότητα (παράγραφος 1.7.2).

Τα ογκογονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες διαμεσολαβούν βασικές φυσιολογικές λειτουργίες και ομαδοποιούνται σε:

1. Αυξητικούς παράγοντες και μεμβρανικούς υποδοχείς αυτών
2. Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην ενδοκυττάρια μεταγωγή μηνυμάτων
3. Πρωτεΐνες που εντοπίζονται στον πυρήνα και δρουν σαν μεταγραφικοί παράγοντες
4. Μέλη του δικτύου των κυκλινών (13).



Εικόνα 1.1 Σύνοψη ογκογονιδίων και ογκοκατασταλτικών γονιδίων που εμπλέκονται στον καρκίνο του μαστού

Είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι οι αυξητικοί παράγοντες, όπως ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (Transform Growth Factor-TGFβ), μέλη της οικογένειας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factors-EGF), ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (Fibroblast Growth Factor-FGF) και οι ινσουλινόμορφοι αυξητικοί παράγοντες 1 και 2 (IGF1, IGF2)], μέσω των αντίστοιχων υποδοχέων, αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές πολλών διεργασιών της καρκινογένεσης του μαστού. Επιπλέον, η ελαττωματική δράση πολλών πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε ενδοκυτταρικούς καταρράκτες μεταγωγής σήματος, η οποία οφείλεται σε α) μεταλλάξεις ή μεταβολή της έκφρασης τους και β) μεταλλάξεις σε ανωροϊκούς (upstream) υποδοχείς, έχει συμπληρωματική συνεισφορά στη μοριακή βάση του καρκίνου του μαστού. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων μονοπατιών με απορυθμισμένη δράση στον καρκίνο του μαστού, αποτελούν τα

Ras/Raf/MEK/ERK και PI3K/PTEN/AKT τα οποία υπό φυσιολογικές συνθήκες ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων απαραίτητων για πολλαπλές κυτταρικές λειτουργίες (π.χ. απόπτωση) (14). Στην τρίτη κατηγορία ογκογονιδίων με σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση του μαστού ανήκουν αυτά που κωδικοποιούν διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες όπως οι c-Myc, E2fA (υποδοχέας της θυρεοειδούς ορμόνης), c-Jun, c-Fos, Ly1-1 κ.α. Βασικότερος εκπρόσωπος αυτής της κατηγορίας είναι ο c-Myc, η έκφραση του οποίου είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο αυξητικός παράγοντας TGF- β καταστέλλει την έκφραση του c-Myc γονιδίου, ενώ το BRCA1 την μεταγραφική του δραστηριότητα. Απώλεια αυτών των ογκοκατασταλτικών γονιδίων οδηγεί σε απορρύθμιση του c-Myc, με αποτέλεσμα την επαγωγή της ανάπτυξης του όγκου και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (15). Τέλος, οι κυκλίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του μαστού, γεγονός που δικαιολογεί την εκτεταμένη έρευνα για την πιθανή τους αξία σαν δείκτες πρόγνωσης. Στον καρκίνο του μαστού ενδιαφέρουν έχουν οι κυκλίνες D και E (13).

Στον αντίποδα των ογκογονιδίων βρίσκονται τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, τα οποία επίσης επηρεάζουν την αύξηση, διαφοροποίηση και ομοιόσταση των φυσιολογικών κυττάρων, αλλά ανταγωνιζόμενα τα ενεργοποιημένα μετασχηματιστικά ογκογονίδια καταστέλλουν τον καρκινικό φαινότυπο. Ογκοκατασταλτικά γονίδια με σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του μαστού είναι τα *BRCA1/2*, *TP53*, *PTEN* και *Rb*. Τα *BRCA1/2* κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA και στη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος (9,16). Το *TP53* κωδικοποιεί μία πυρηνική πρωτεΐνη η οποία συμμετέχει στη ρύθμιση της αντιγραφής και της μεταγραφής καθώς και στην απόπτωση. Όμοια με τα *BRCA1/2*, οι μεταλλάξεις στο *TP53* συνοδεύονται από αποτυχία ενεργοποίησης της απόπτωσης μετά από βλάβη στο DNA, επιβίωση των ελαττωματικών κυτταρικών κλώνων και τελικά οδηγούν στην ογκογένεση (17). Τέλος, το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (*Rb*) κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη-ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου που μπορεί να επηρεάσει την είσοδο στη φάση G1.

1.2.4 Ταξινόμηση καρκίνου του μαστού

Σύμφωνα με τις τρέχουσες κατευθυντήριες οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, ο καρκίνος του μαστού ταξινομείται στις διάφορες κατηγορίες βάσει συγκεκριμένων κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών του όγκου. Η κατηγοριοποίηση αυτή βοηθά στην επιλογή της κατάλληλης θεραπείας καθώς και στην εγκυρότερη πρόγνωση της νόσου. Παρόλα αυτά, λόγω της μεγάλης προόδου στην αποκρυπτογράφηση της γενετικής και

μοριακής βάσης του καρκίνου του μαστού, υπάρχουν πλέον πολλά δεδομένα διαθέσιμα τα οποία αξιοποιούνται στην κλινική πράξη για τη μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού. Η μοριακή ταξινόμηση βασίζεται στον προσδιορισμό της έκφρασης συγκεκριμένων υποδοχέων και γονιδίων, είναι συμπληρωματική της ιστοπαθολογικής κατάταξης του καρκίνου του μαστού και συμβάλλει στην πρόγνωση της νόσου, την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας αλλά και την πρόβλεψη της ανταπόκρισης των ασθενών στις διαφορετικές θεραπείες.

1.2.4.1 Ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού

Τα καρκινώματα του μαστού είναι συνήθως επιθηλιακά (αδενοκαρκινώματα) και σπανιότερα μη επιθηλιακά (π.χ. σαρκώματα) και ταξινομούνται ιστολογικά σε: α) μη διηθητικά (in-situ) και β) διηθητικά (Εικόνα 1.2).

Τα **in-situ καρκινώματα** προκύπτουν από κακοήθη επιθηλιακά κύτταρα τα οποία είναι εντοπισμένα αποκλειστικά στην περιοχή από την οποία προέρχονται χωρίς να εξαπλώνονται στη βασική μεμβράνη. Η αδυναμία αντιμετώπισης αυτών των όγκων μπορεί να οδηγήσει στην περαιτέρω καρκινική εξαλλαγή τους και στην εξέλιξη τους σε διηθητικά καρκινώματα. Τα in-situ καρκινώματα διακρίνονται σε πορογενή in-situ (Ductal Carcinoma in-situ- DCIS) και λοβιακά in-situ καρκινώματα (Lobular Carcinoma in-situ-LCIS). Στα DCIS, τα καρκινικά κύτταρα του επιθηλίου βρίσκονται στους πόρους του μαστικού αδένου και αποτελούν το 80% όλων των in-situ καρκινωμάτων και το 20% των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού που διαγιγνώσκονται με τη μαστογραφία. Τα DCIS διακρίνονται σε Comedo και Noncomedo. Στην περίπτωση των LCIS τα καρκινικά κύτταρα εντοπίζονται στους γαλακτοφόρους αδένες και η αναγνώριση αυτών των καρκινωμάτων συχνά είναι δύσκολη καθώς δεν εμφανίζουν κλινικά συμπτώματα και δεν είναι εύκολη η ανίχνευση τους με τη μαστογραφία. Τα LCIS θεωρούνται από πολλούς προ-καρκινικές βλάβες καθώς συχνά δεν παρατηρείται εξέλιξη τους σε διηθητικό καρκίνο του μαστού, αλλά η ύπαρξη τέτοιων αλλοιώσεων συνδέεται με σημαντικά αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου του μαστού τόσο στον μαστό που ανιχνεύθηκε όσο και στον άλλο μαστό.

Στα διηθητικά καρκινώματα του μαστού, σε αντίθεση με τα in-situ, τα καρκινικά κύτταρα διασπείρονται μέσω της βασικής μεμβράνης στο περιβάλλον παρέγχυμα του μαστού, τους λεμφαδένες ή και σε πιο απομακρυσμένες περιοχές. Το 95% των περιπτώσεων αυτών είναι αδενοκαρκινώματα επιθηλιακής προέλευσης, ενώ πιο σπάνιοι είναι οι όγκοι των συνδετικών ιστών, οι οποίοι προέρχονται από στρωματικά κύτταρα (Φυλλοειδείς όγκοι,

σαρκώματα), λεμφώματα και δευτεροπαθή νεοπλασμάτα του μαστού προερχόμενα από πρωτοπαθείς όγκους άλλων οργάνων.

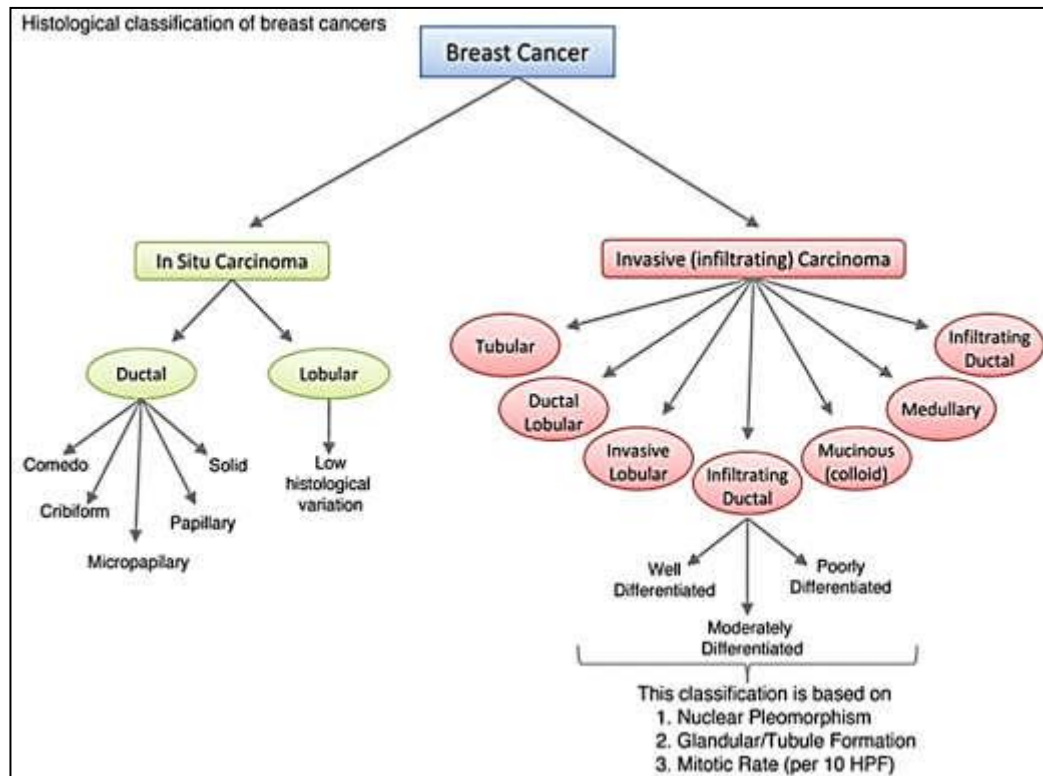
Τα διηθητικά καρκινώματα διακρίνονται επιπλέον σε πορογενές (Invasive Ductal Carcinoma-IDC) και λοβιακό διηθητικό καρκίνωμα (Invasive Lobular Carcinoma-ILC), φλεγμονώδες καρκίνωμα του μαστού και στη Νόσο Paget της θηλής του μαστού. Τα IDCs είναι η πιο συχνή κατηγορία (65-80%) των διηθητικών όγκων και χωρίζονται σε υποκατηγορίες βάσει ιστοπαθολογικών χαρακτηριστικών τα οποία συμβάλλουν στην έγκυρη πρόγνωση της νόσου. Η δεύτερη πιο συχνή κατηγορία (10-15%) των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού είναι τα ILCs. Οι ασθενείς που πάσχουν από τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου συχνά εμφανίζουν μεταστάσεις στο περιτόναιο, τις ωθήκες, τη μήτρα και πιο σπάνια στους πνεύμονες και την πλευρική κοιλότητα (pleural cavity).

Μία σπάνια αλλά ιδιαίτερα επιθετική μορφή καρκίνου του μαστού είναι το φλεγμονώδες καρκίνωμα, το οποίο κλινικά χαρακτηρίζεται από την διασπορά των καρκινικών κυττάρων στους μασχालιαίους αδένες κατά τη διάγνωση της νόσου. Τέλος, η Νόσος Paget της θηλής του μαστού είναι ένας επίσης σπάνιος τύπος καρκίνου ο οποίος είναι επιθηλιακής προέλευσης και αντιπροσωπεύει διήθηση της επιδερμίδας της θηλής του μαστού από καρκινωμάτωση κύτταρα. Συνήθως συνοδεύει το πορογενές καρκίνωμα και η εκδήλωση της νόσου συνοδεύεται από την εμφάνιση έντονων κλινικών συμπτωμάτων (εκζεματοειδείς αλλοιώσεις της θηλής του μαστού, κνησμός, καύσος και/ή αιματηρό έκκριμα της θηλής του μαστού) στο 70% των ασθενών (18).

Άλλοι σπάνιοι τύποι καρκίνου του μαστού είναι:

1. **Μυελοειδές καρκίνωμα**, το οποίο αντιπροσωπεύει το 5-7% του συνόλου των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού. Η πρόγνωση σε γενικές γραμμές είναι πολύ καλή.
2. **Βλεννώδες καρκίνωμα**, αποτελούν το 2-3% και εμφανίζεται σε γυναίκες μεγάλης ηλικίας. Αναπτύσσεται βραδύτερα από το διηθητικό καρκίνωμα των πόρων.
3. **Θηλώδες καρκίνωμα**, το οποίο είναι σπάνιο και αντιπροσωπεύει το 0.3-3% του συνόλου των καρκινωμάτων του μαστού. Η πρόγνωση είναι καλή και οι μεταστάσεις στους μασχालιαίους λεμφαδένες είναι σπάνιες.
4. **Σωληνώδες καρκίνωμα**, το οποίο χαρακτηρίζεται από καλή πρόγνωση.
5. **Αδενοκυστικό καρκίνωμα**, του οποίου η συχνότητα ανέρχεται στο 0.1% του συνόλου των καρκινωμάτων του μαστού και είναι χαμηλής κακοήθειας.
6. **Μεταπλαστικό καρκίνωμα**, του οποίου η συχνότητα είναι μικρότερη του <1% και το μέγεθός τους ξεπερνάει τα 4εκ.

7. **Νευροενδοκρινείς όγκοι**
8. **Αποκρινές**, ανοσοϊστοχημικά εκφράζουν bcl2 (-) ER- GCDHR-15(+)
9. **Μικροθηλώδες**
10. **Αταξινόμητα**, τα οποία αντιπροσωπεύουν περίπου το 3% χωρίς σαφή μορφολογικά χαρακτηριστικά (19).

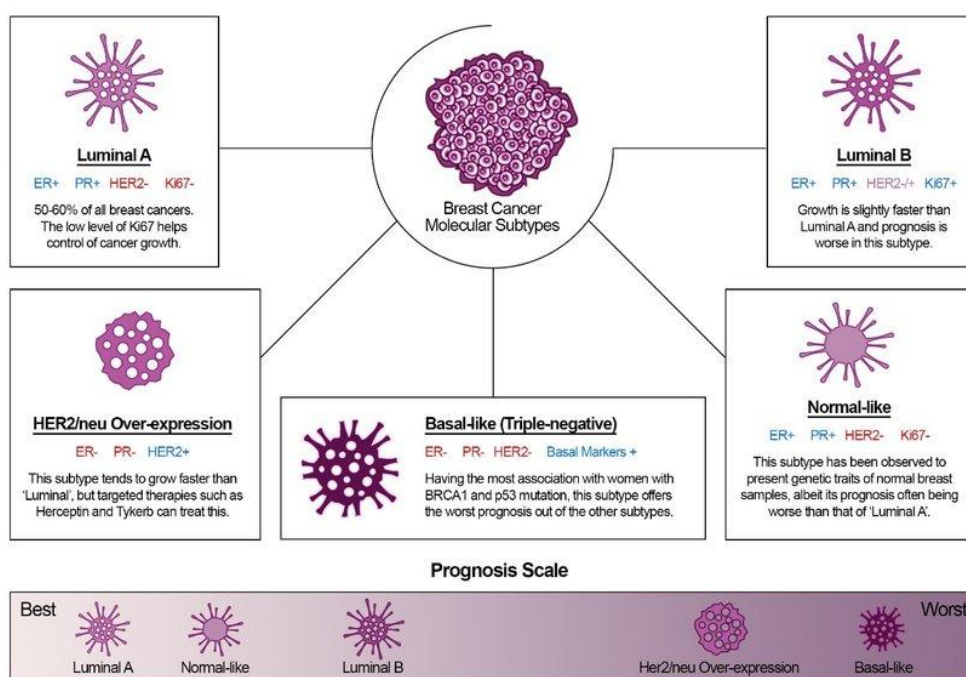


Εικόνα 1.2 Ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού (19).

1.2.4.2 Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού βρίσκεται στο επίκεντρο των ερευνών τα τελευταία 30 χρόνια και τα αποτελέσματα είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά σε ότι αφορά την κατανόηση της βιολογίας αυτής της πολυπαραγοντικής και ετερογενούς νόσου. Σήμερα είμαστε σε θέση να ανιχνεύουμε τις μοριακές αλλαγές που έχουν οδηγήσει στην ανάπτυξη της νόσου σε κάθε ασθενή ξεχωριστά, γεγονός που μας δίνει το πλεονέκτημα της δημιουργίας του γονιδιακού προφίλ του κάθε όγκου ξεχωριστά και του πιο ακριβούς βιολογικού χαρακτηρισμού της νόσου σε σχέση με την παραδοσιακή ιστοπαθολογική ταξινόμηση (20). Η απαρχή της μοριακής εποχής του καρκίνου του μαστού έγινε με την εργασία των Perou et. al το 2000, η οποία έφερε πραγματική επανάσταση στην διαλεύκανση της μοριακής βιολογίας της

συγκεκριμένης ασθένειας αφού διαπιστώθηκε ότι αλλαγές στην έκφραση πολλών γονιδίων, μεταξύ των οποίων τα *ER*, *ERBB2*, *Ki-67*, *TP53*, χαρακτηρίζουν συγκεκριμένους όγκους του μαστού και συνδέονται με την επιθετικότητα της νόσου και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Στην κλινική πράξη τα αποτελέσματα αυτά άνοιξαν τον δρόμο για την μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού σε τέσσερις μοριακούς υπότυπους. Έτσι, αναγνωρίστηκαν όγκοι των οποίων το πρότυπο της έκφρασης των γονιδίων ήταν όμοιο με αυτό των αυλικών (Luminal A and B) ή των βασικών (Basal-like) επιθηλιακών κυττάρων και όγκοι με HER-2(+) φαινότυπο (Erb-B2 overexpression) (21,22).



Εικόνα 1.3 Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού (23).

Τα Luminal A καρκινώματα αποτελούν το 50-60% των συνολικών περιπτώσεων περιλαμβάνουν όγκους που είναι θετικοί στη έκφραση των ER και των PR υποδοχέων, αρνητική στην έκφραση του HER-2 και έχουν μειωμένα επίπεδα του πυρηνικού αντιγόνου Ki-67. Σε μοριακό επίπεδο οι Luminal A όγκοι υπερεκφράζουν γονίδια που ελέγχονται από τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν οι οιστρογονικοί υποδοχείς και υποεκφράζουν γονίδια που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ανοσοϊστοχημικά οι συγκεκριμένοι όγκοι χαρακτηρίζονται από την έκφραση των Bcl-2 και της κυτοκερατίνης CK8/18 και την απουσία έκφρασης του υποδοχέα EGFR και της κυτοκερατίνης CK5/6. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν όλα τα λοβιακά in situ καρκινώματα και η πλειονότητα των

διηθητικών λοβιακών καρκινωμάτων και κλινικά τα Luminal A καρκινώματα έχουν την καλύτερη πρόγνωση και ανταποκρίνονται στην ορμονοθεραπεία (20,24).

Οι Luminal B όγκοι αποτελούν το 10-20% του συνόλου των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού και όμοια με τους Luminal A είναι ER θετικοί ή/και PR θετικοί. Ωστόσο, οι Luminal B είναι HER-2 θετικοί, χαρακτηρίζονται από αυξημένη έκφραση του πυρηνικού αντιγόνου Ki-67 και είναι πιο επιθετικοί, μεγαλύτερου βαθμού κακοήθειας και φυσικά έχουν χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με τους Luminal A (24).

Οι HER-2 θετικοί όγκοι αποτελούν το 15% του συνόλου των περιπτώσεων και υπερεκφράζουν το γονίδιο *HER-2* και τον αντίστοιχο υποδοχέα αλλά και γονίδια που ελέγχονται από το συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι. Οι όγκοι αυτής της κατηγορίας συχνά παρουσιάζουν μεταλλάξεις στο *p53* και σε αντίθεση με τους Luminal είναι αρνητικοί ως προς την έκφραση των ER και PR. Αναφορικά με την κλινική συμπεριφορά τους, οι HER-2 θετικοί έχουν υψηλό βαθμό κακοήθειας και δυσμενή πρόγνωση. Ωστόσο, οι ασθενείς με HER-2 θετικούς όγκους εμφανίζουν πολύ καλή ανταπόκριση στη στοχευμένη θεραπεία με το μονοκλωνικό αντίσωμα trastuzumab (20,24).

Τα βασικού τύπου (Basal-like) καρκινώματα μαστού, είναι μια ξεχωριστή κατηγορία όγκων με χαρακτηριστική μορφολογική, ανοσοϊστοχημική και γενετική έκφραση. Το βασικό χαρακτηριστικό τους είναι η απουσία έκφρασης των υποδοχέων ER, PR και HER-2, γεγονός που δικαιολογεί τον χαρακτηρισμό τους σαν "τριπλά αρνητικοί όγκοι". Η πλειονότητα αυτών των καρκινωμάτων είναι πολύ επιθετικοί και χαρακτηρίζονται από κακή πρόγνωση καθώς είναι αυξημένου μέγεθους με συμπαγή αρχιτεκτονική και με υψηλό βαθμό κακοήθειας. Συχνά παρουσιάζουν διήθηση των παρακείμενων λεμφαδένων και αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα. Το 80-90% των περιπτώσεων τριπλά αρνητικού καρκίνου ανήκουν στην κατηγορία των πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων ενώ το υπόλοιπο 10-20% είναι σπάνιοι όγκοι, όπως το μυελοειδές καρκίνωμα, το λοβιακό καρκίνωμα, το αποκρινές καρκίνωμα, και το μεταπλαστικό καρκίνωμα.

Η μεγάλη βιολογική αλλά και κλινική ετερογένεια της συγκεκριμένης κατηγορίας μαστικών όγκων οδήγησε τους Lehmann et. al να προχωρήσουν σε περαιτέρω κατηγοριοποίηση των τριπλά αρνητικών όγκων σε 6 κατηγορίες βάσει συγκεκριμένων μοριακών αλλαγών. Πιο αναλυτικά όγκοι οι οποίοι εμφανίζουν 1. αυξημένη κυτταρική διαίρεση, 2. υπερέκφραση μονοπατιών που συνδέονται με την επιδιόρθωση του DNA, 3. αυξημένη έκφραση του ki-67 και 4. καλή ανταπόκριση σε αντιμιτωτικά φάρμακα που στοχεύουν τον κυτταρικό κύκλο ανήκουν στην κατηγορία basal-like 1 (BL1). Η δεύτερη κατηγορία ονομάζεται basal-like 2 (BL2) και περιλαμβάνει όγκους που χαρακτηρίζονται από

αυξημένη δραστηριότητα των μονοπατιών EGF, NGF, MET, Wnt/ β -catenin, και IGF1 και αυξημένη έκφραση των μυοεπιθηλιακών δεικτών (TP63). Τόσο οι basallike 1 όσο και οι basallike 2 όγκοι ανταποκρίνονται καλά στη θεραπεία με πλατίνα και αναστολείς PARP. Μία τρίτη κατηγορία τριπλά αρνητικών μαστικών όγκων είναι γνωστή ως immunomodulatory(IM) και περιλαμβάνει όγκους που υπερεκφράζουν δείκτες που συνδέονται με ανοσολογική απόκριση καθώς ρυθμίζουν τη λειτουργία των T- και B-κυττάρων, των NK κυττάρων αλλά και τη δράση πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών (π.χ. NF κ B μονοπάτι, JAK/STAT μονοπάτι κ..α.). Οι όγκοι στους οποίους παρατηρείται ελαττωματική λειτουργία των μηχανισμών που ελέγχουν το φαινόμενο EMT αλλά και την κυτταρική προσκόλληση και κινητικότητα ανήκουν στις κατηγορίες mesenchymal (M) και mesenchymalstem-like (MSL). Τέλος, πολλοί τριπλά αρνητικοί όγκοι παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση των ανδρογονικών υποδοχέων και συνεπώς ευαισθησία στους AR-ανταγωνιστές και ανήκουν στην κατηγορία luminalAR (LAR) (25).

Η μοριακή ταξινόμηση συμπληρώνει και βελτιώνει την ήδη υπάρχουσα κατηγοριοποίηση του καρκίνου του μαστού και συμβάλλει σημαντικά στην καλύτερη πρόγνωση της ασθένειας καθώς οι μοριακές/γονιδιακές τροποποιήσεις συνεπάγονται ουσιαστικά τη διαφορετική κλινική πορεία της ασθένειας (21). Αυτό όμως που αξίζει να τονιστεί είναι ότι η μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο των κλινικών γιατρών για την διάκριση των ασθενών που έχουν περισσότερες πιθανότητες να ανταποκριθούν στη χορηγούμενη θεραπεία από αυτούς θα παρουσιάσουν ανθεκτικότητα σε αυτήν (26).

1.2.5 Προληπτικός έλεγχος και διάγνωση του καρκίνου του μαστού

Οι τρέχουσες προσεγγίσεις για τον έλεγχο του ασυμπτωματικού γυναικείου πληθυσμού ηλικίας 45-54 ετών και άνω των 55 ετών είναι η εφαρμογή μαστογραφίας ανά έτος και διέττα αντίστοιχα. Σε γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού προτείνεται ετήσιος έλεγχος σε συνδυασμό με μαγνητική τομογραφία και μαστογραφία από την ηλικία των 30 ετών (27). Η διάγνωση του καρκίνου του μαστού γίνεται με αμφοτερόπλευρη ψηλάφηση των μαστών και των περιοχικών λεμφαδένων και με εφαρμογή απεικονιστικών μεθόδων δηλαδή μαστογραφία, υπερηχογράφημα και μαγνητική τομογραφία. Σε κάθε περίπτωση, η εγκυρότητα της διάγνωσης διασφαλίζεται αποκλειστικά και μόνο με την παθολογοανατομική εξέταση του βιοπτικού υλικού (3).

Η μαστογραφία επιτρέπει την απεικόνιση μη ψηλαφητών αλλοιώσεων του αδένου και όγκων μικρής διαμέτρου σε προκλινική φάση. Μέχρι στιγμής είναι η μοναδική μέθοδος έγκαιρης διάγνωσης της νόσου, αν και τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονος σκεπτικισμός αναφορικά με τα οφέλη έναντι των αρνητικών επιπτώσεων της ευρείας εφαρμογής της (27). Το υπερηχογράφημα εφαρμόζεται για τη διάκριση των κυστικών από τους συμπαγείς όγκους αλλά η σημαντικότερη συμβολή του είναι η αύξηση της διαγνωστικής ισχύς της συνδυασμένης εφαρμογής μαστογραφία-κλινική εξέταση. Μία ακόμα διαγνωστική μέθοδος απεικόνισης είναι η μαγνητική, η οποία όμως εφαρμόζεται σε συγκεκριμένες περιπτώσεις όπως για παράδειγμα σε γυναίκες με BRCA-σχετιζόμενο κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού (3). Τέλος ο γενετικός έλεγχος προτείνεται σε γυναίκες με αυξημένες πιθανότητες εκδήλωσης της νόσου και βασίζεται στην εφαρμογή μεθόδων μοριακής βιολογίας για την ανίχνευση γνωστών ενοχοποιητικών μεταλλάξεων στα γονίδια *BRCA1* και 2.

1.2.6 Πρόγνωση του καρκίνου του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια τόσο στην κλινική εκδήλωση όσο και στην εξέλιξή της. Η αναγνώριση αυτής της ετερογένειας ανέδειξε την ανάγκη αναγνώρισης και ταυτόχρονης αξιολόγησης πολλών προγνωστικών δεικτών, έτσι ώστε να περιγραφεί επαρκώς η νόσος και συνεπώς να προβλεφθεί με μεγαλύτερη εγκυρότητα η εξέλιξή της. Στους καθιερωμένους και ευρέως χρησιμοποιούμενους μορφολογικούς-ιστοπαθολογικούς προγνωστικούς παράγοντες περιλαμβάνονται ο αριθμός των διηθημένων λεμφαδένων, το μέγεθος του όγκου, ο βαθμός κακοήθειας και τα στάδια της νόσου. Επιπλέον αξιολογούνται ο δείκτης Nottingham, ο μοριακός υπότυπος και οι «γονιδιακές υπογραφές» του όγκου (παράγραφος 1.2.9) (28).

Ο αριθμός των διηθημένων λεμφαδένων είναι ο πιο σημαντικός προγνωστικός παράγοντας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα επιδημιολογικών μελετών, η πρόγνωση της νόσου είναι χειρότερη όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των διηθημένων λεμφαδένων. Σημαντικής προγνωστικής σημασίας είναι ακόμα η διήθηση λεμφαγγείων ή αιμοφόρων αγγείων στην περιφέρεια του όγκου, αλλά και η διήθηση της θηλής ή/και του δέρματος (29). Ο δεύτερος πιο σημαντικός προγνωστικός παράγοντας για τον καρκίνο του μαστού είναι το μέγεθος του όγκου. Πιο αναλυτικά ασθενείς με μικρούς όγκους έχουν καλύτερη πρόγνωση και η μείωση της επιβίωσης είναι αντιστρόφως ανάλογη με την αύξηση του μεγέθους του όγκου ανεξάρτητα από την παρουσία ή την απουσία διηθημένων λεμφαδένων (30). Ένας ακόμα σημαντικός προγνωστικός δείκτης στον καρκίνο του μαστού είναι ο βαθμός κακοήθειας (Grade) των καρκινικών κυττάρων. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι ασθενείς με

όγκους με βαθμό κακοήθειας I έχουν 85% πιθανότητα δεκαετούς επιβίωσης σε αντίθεση με γυναίκες με βαθμό κακοήθειας III, στις οποίες το αντίστοιχο ποσοστό μειώνεται στο 45%. Σήμερα η βαθμοποίηση του καρκίνου του μαστού γίνεται με βάση την τροποποιημένη κατά Elston & Ellis μέθοδο Nottingham του αρχικού κατά Bloom & Richardson συστήματος (31). Τέλος, η σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού είναι ένα βασικό εργαλείο στα χέρια των κλινικών ογκολόγων τόσο για την πρόβλεψη της κλινικής πορείας της ασθένειας όσο και για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας. Σήμερα, η αποδεκτή σταδιοποίηση για τον καρκίνο του μαστού, σύμφωνα με την Αμερικάνικη Επιτροπή Σταδιοποίησης του Καρκίνου (AJCC), είναι το τροποποιημένο σύστημα TNM (Tumor-Nodes-Metastasis) όπου συνεκτιμώνται το μέγεθος του όγκου (T), η ύπαρξη λεμφαδενικών (N) ή απομακρυσμένων (M) μεταστάσεων (Πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1 Σταδιοποίηση καρκίνου του μαστού-Σύστημα TNM

Κλινική σταδιοποίηση του πρωτοπαθούς όγκου (T)	
Tx	Ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί
T0	Κανένα στοιχείο για το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου
Tis	Μη διηθητικό πορογενές ή λοβιακό καρκίνωμα (DCIS – LCIS) ή νόσος Paget της θηλής χωρίς βλάβη στο μαζικό παρέγχυμα
T1	Όγκος με μέγιστη διάμετρο ≤ 2.0 cm
T2	Όγκος >2.0 και ≤ 5.0 cm στη μέγιστη διάμετρο
T3	Όγκος >5.0 cm στη μέγιστη διάμετρο
T4	Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους με άμεση επέκταση (α) στο θωρακικό τοίχωμα ή (β) στο δέρμα, όπως περιγράφεται παρακάτω:
	○ T4a: Επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα
	○ T4b: Επέκταση στο δέρμα και οίδημα
	○ T4c: T4a και T4b ταυτοχρόνως

	○ T4d: Φλεγμονώδες καρκίνωμα
Σταδιοποίηση των περιοχικών λεμφαδένων (N)	
Nx	Οι περιοχικοί λεμφαδένες δεν είναι δυνατόν να εκτιμηθούν
N0	Καμία μετάσταση στους περιοχικούς λεμφαδένες
N1	Μετάσταση σε ευκίνητο λεμφαδένα της σύστοιχης μασχάλης
N2	Ομόπλευροι μασχαλιαίοι λεμφαδένες με μεταστάσεις συμφύομενοι μεταξύ τους ή σε άλλες δομές
N3	Εμφανής ομόπλευρη διήθηση των έσω μαστικών λεμφαδένων ή μετάσταση σε υποκλείδιους λεμφαδένες.
Απομακρυσμένη Μετάσταση (M)	
MX	Η παρουσία απομακρυσμένης μετάστασης δεν μπορεί να αξιολογηθεί
M0	Καμία απομακρυσμένη μετάσταση
M1	Ύπαρξη απομακρυσμένης μετάστασης

1.2.7 Θεραπεία του καρκίνου του μαστού

Οι θεραπευτικές επιλογές για τις ασθενείς με καρκίνο του μαστού περιλαμβάνουν:

1. την τοπική θεραπεία η οποία βασίζεται στη χειρουργική εκτομή του όγκου και την ακτινοθεραπεία, και
2. τη συστηματική επικουρική θεραπεία που συνίσταται στη χρήση ενδοκρινικής θεραπείας, χημειοθεραπευτικών παραγόντων και μοριακά στοχευμένης θεραπείας (π.χ. μονοκλωνικά αντισώματα).

Η σύνθεση μη στεροειδών ουσιών που έχουν την ικανότητα να ανταγωνίζονται την δράση των οιστρογόνων, έφερε πραγματική επανάσταση στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού καθώς αυτά τα σκευάσματα χρησιμοποιούνται ευρέως στα πλαίσια της ενδοκρινικής θεραπείας σε όλες τις ασθενείς με όγκους Luminal A και B. Ο σπουδαιότερος εκπρόσωπος αυτής της κατηγορίας φαρμάκων είναι η ταμοξιφαίνη, η οποία παραμένει η ορμονοθεραπεία

πρώτης επιλογής σε προ-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες (3). Η χημειοθεραπεία εφαρμόζεται κατά κύριο λόγο στις γυναίκες με τριπλά αρνητικούς ή HER-2 θετικούς όγκους. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες είναι οι ανθρακυκλίνες ή/και οι ταξάνες, και η χρήση τους έχει συμβάλλει σημαντικά στη μείωση της θνησιμότητας των ασθενών με τη συγκεκριμένη νόσο (3). Τα τελευταία χρόνια ευρεία εφαρμογή βρίσκει επίσης η, πιο εκλεπτυσμένη, αντι-HER-2 θεραπεία. Χορηγείται σε ασθενείς με HER-2 θετικούς όγκους και βασίζεται στη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων. Κλασικοί εκπρόσωποι αυτής της κατηγορίας είναι το Trastuzumab, το πρώτο μονοκλωνικό αντίσωμα με ευρεία εφαρμογή στην κλινική πράξη, και τα πρόσφατα εγκεκριμένα από τον οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων των Η.Π.Α (U.S. Food and Drug Administration / FDA), Ado-Trastuzumab emtansine και Pertuzumab (3).

Ο προσδιορισμός της έκφρασης ER/PR/HER-2 υποδοχέων με σκοπό την εξατομικευμένη χορήγηση θεραπείας αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα επιτυχημένης μετάφρασης πειραματικών δεδομένων στην κλινική πράξη. Σήμερα ο τομέας της εξατομικευμένης θεραπείας του καρκίνου του μαστού έχει εξελιχθεί περαιτέρω και πλέον σε περιστατικά όπου η επιλογή της κατάλληλης θεραπείας δεν είναι σαφής, οι «γονιδιακές υπογραφές», που προκύπτουν από εμπορικά διαθέσιμα εργαστηριακά τεστ (π.χ. Oncotype DX, EndoPredict, MammaPrint κ.α.) (παράγραφος 1.2.9), κατευθύνουν τη χορήγηση της καταλληλότερης θεραπείας (3).

1.2.8 Μοριακοί δείκτες στον καρκίνο του μαστού

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω ένα σημαντικό τροχοπέδη στην επιτυχή αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού είναι η μοριακή ετερογένεια της ασθένειας η οποία αντικατοπτρίζεται και στο κλινικό επίπεδο καθώς φαίνεται ότι κάθε ασθενής αποτελεί μια ξεχωριστή περίπτωση η οποία χρήζει εξατομικευμένης αντιμετώπισης. Οι παραδοσιακές μέθοδοι για την πρόγνωση της νόσου και την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού συχνά αποδεικνύονται ανεπαρκείς καθώς δε μπορούν να συμβαδίσουν και να αποτυπώσουν τη μεγάλη ετερογένεια της νόσου η οποία είναι εμφανής τόσο σε μοριακό όσο και σε κλινικό επίπεδο. Η ευρεία εφαρμογή των μεθόδων μοριακής βιολογίας της γονιδιωματικής έχει αποκωδικοποιήσει πολλές πτυχές της μοριακής βάσης του καρκίνου του μαστού γεγονός που συνεπάγεται την αποκάλυψη μίας πληθώρας εν δυνάμει μοριακών βιοδεικτών για την πρόβλεψη της κλινικής πορείας της νόσου (προγνωστικοί δείκτες) αλλά και την αναγνώριση των ασθενών που θα ανταποκριθούν σε μία συγκεκριμένη θεραπεία (προβλεπτικοί δείκτες). Ωστόσο, σήμερα μόνο οι ER/PR υποδοχείς, το *HER-2* και ο

αντίστοιχος υποδοχέας ανταποκρίνονται στα κριτήρια χρησιμότητας των νέων καρκινικών δεικτών της Αμερικάνικης εταιρείας κλινικής ογκολογίας (American society of clinical oncology's tumor marker utility grading system) και αποτελούν κλινικά χρήσιμους μοριακούς δείκτες για την συγκεκριμένη κακοήθεια (32).

Οι ER/PR υποδοχείς είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι δείκτες πρόβλεψης της ανταπόκρισης στη θεραπεία και αναμφισβήτητα αποτελούν ένα χρήσιμο όπλο στη φαρέτρα των ογκολόγων για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες (2007) της ASCO, ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των ER και PR είναι αναγκαίος όχι μόνο στον πρωτογενή αλλά και στον μεταστατικό καρκίνο του μαστού κυρίως για την αναγνώριση των ασθενών που έχουν περισσότερες πιθανότητες να ανταποκριθούν στην ενδοκρινική θεραπεία (32). Ωστόσο θα πρέπει να τονιστεί ότι μόνο ο προσδιορισμός των ER/PR υποδοχέων δεν αρκεί για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας και η ευαισθησία αυξάνεται σημαντικά όταν συνδυάζεται με επιπρόσθετους προγνωστικούς παράγοντες.

Σε ότι αφορά το ογκογονίδιο *HER-2*, σύμφωνα με την ASCO η κύρια κλινική και η μόνη υποχρεωτική χρήση του ποσοτικού προσδιορισμού του υποδοχέα ή/και του αντίστοιχου γονιδίου σε όλες τις ασθενείς με διηθητικό καρκίνο μαστού είναι η αναγνώριση αυτών που θα ωφεληθούν από μία αντι-*HER-2* θεραπεία (π.χ. Trastuzumab). Σύμφωνα με τις ίδιες οδηγίες η έκφραση του *HER-2*, μπορεί να χρησιμοποιηθεί επίσης για την αναγνώριση των γυναικών που μπορεί να ανταποκριθούν σε ένα θεραπευτικό σχήμα βασιζόμενο στις ανθρακυκλίνες, αν και υπογραμμίζεται ότι η κλινική αξία του σε αυτή την περίπτωση είναι πολύ κατώτερη (32).

Η έρευνα για τον καρκίνο του μαστού έχει αποκαλύψει νέους μοριακούς δείκτες για τη συγκεκριμένη κακοήθεια οι οποίοι σχετίζονται με τη μετάσταση και τον μηχανισμό EMT (π.χ. uPA και PAI-1, SNAI1 κ.α.), με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (π.χ. Ki67, Τοποϊσομεράση IIα, κυκλίνη D1 και E, BCL-2), τη γενωμική αστάθεια (*p53*) κ.α. Δείκτες όπως uPA και PAI-1, Ki67, CA 15-3 και CA 27.29, CEA φαίνεται ότι μπορούν να εφαρμοστούν στην κλινική ρουτίνα αλλά για συγκεκριμένους σκοπούς και υπό προϋποθέσεις (32–34).

1.2.9 Γονιδιακές Υπογραφές

Είναι αναμφισβήτητο το γεγονός ότι η θνησιμότητα λόγω του καρκίνου του μαστού παραμένει σε υψηλά επίπεδα παρά τη μεγάλη πρόοδο στην κατανόηση της μοριακής βάσης της ασθένειας και της βελτίωσης των θεραπευτικών επιλογών και των προγνωστικών

δεικτών. Η παραδοξότητα αυτή αποδίδεται εν πολλοίς στην αδυναμία των τρεχόντων προγνωστικών και προβλεπτικών δεικτών να προβλέψουν την κλινική έκβαση της νόσου και να υποδείξουν την επιλογή της καταλληλότερης θεραπείας αντίστοιχα. Σήμερα είναι πλέον αποδεκτό ότι η αξιολόγηση του γονιδιακού προφίλ του κάθε όγκου αποσαφηνίζει την πολυπλοκότητα της νόσου, καλύπτει τα κενά των ιστοπαθολογικών παραγόντων πρόγνωσης και μειώνει τα ποσοστά της υπερ-θεραπείας. Στις μέρες μας υπάρχουν 2 πολυγονιδιακές υπογραφές πρόγνωσης, τα MammaPrint και PAM50, που έχουν εγκριθεί από τον FDA και 6 (MammaPrint, PAM50, Oncotype DX, EndoPredict, Genomic grade index και Breast cancer index) οι οποίες είναι εμπορικά διαθέσιμες και εφαρμόζονται στην κλινική πράξη.

Αυτοί οι εργαστηριακοί έλεγχοι βασίζονται στον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης πολλών σχετιζόμενων με τον καρκίνο του μαστού γονιδίων. Στη συνέχεια με τη χρήση ειδικών αλγορίθμων υπολογίζεται η πιθανότητα υποτροπής, βάσει της οποίας οι ασθενείς κατηγοριοποιούνται σε ομάδες υψηλού ή χαμηλού κινδύνου. Επιπλέον οι γονιδιακές υπογραφές παρέχουν πληροφορίες για την αναγνώριση των ασθενών που δε θα ωφεληθούν από τη χορήγηση χημειοθεραπείας (35,36). Ωστόσο, όπως αναφέρεται και στις κατευθυντήριες οδηγίες των European Society of Medical Oncology, ASCO και St Gallen, οι υπάρχουσες πολυγονιδιακές υπογραφές είναι χρήσιμες μέχρι στιγμής μόνο για τις ασθενείς με ER-θετικούς όγκους αρχικών σταδίων (3,32).

1.3 ΜίκροRNA (microRNAs, miRNAs)

1.3.1 Γενικά

Τα miRNAs είναι μία ομάδα μη κωδικών μορίων RNA το μέγεθος των οποίων κυμαίνεται μεταξύ 18-25 νουκλεοτιδίων. Τα τελευταία χρόνια τα miRNAs βρίσκονται στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος της επιστημονικής κοινότητας λόγω της ικανότητας τους να ρυθμίζουν ένα μεγάλο εύρος βιολογικών διεργασιών, γεγονός που τοποθετεί τα συγκεκριμένα μόρια στον πυρήνα πολλών ασθενειών μεταξύ των οποίων βρίσκεται φυσικά και ο καρκίνος. Σύμφωνα με την πιο πρόσφατη αναθεώρηση ([Release 22.1](#): October 2018) της miRBase database (<http://www.mirbase.org/>), έχουν καταγραφεί στον άνθρωπο 1917 πρόδρομα μόρια, από τα οποία προκύπτουν περίπου 3588 ώριμα miRNA μόρια, ενώ οι λειτουργίες πολλών από αυτών είναι ακόμα αδιευκρίνιστες.

Τα miRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση μέσω αλληλεπίδρασης τους με το mRNA-στόχο (37), η οποία καθορίζεται από τη συμπληρωματικότητα των δύο αλληλοεπιδρόντων μορίων RNA (38). Η συμπληρωματικότητα αυτή μπορεί να είναι μερική, οπότε προκαλείται αναστολή της μετάφρασης του mRNA, είτε απόλυτη οπότε ακολουθεί αποικοδόμηση του στόχου (39). Κάθε miRNA μπορεί να στοχεύει ένα ή περισσότερα διαφορετικά mRNAs με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται η ρύθμιση της έκφρασης πολλών πρωτεϊνών και αντίστροφα ένα μόριο mRNA μπορεί να στοχεύεται από διαφορετικά miRNAs (40).

1.3.2 Ρόλος των miRNAs στον καρκίνο

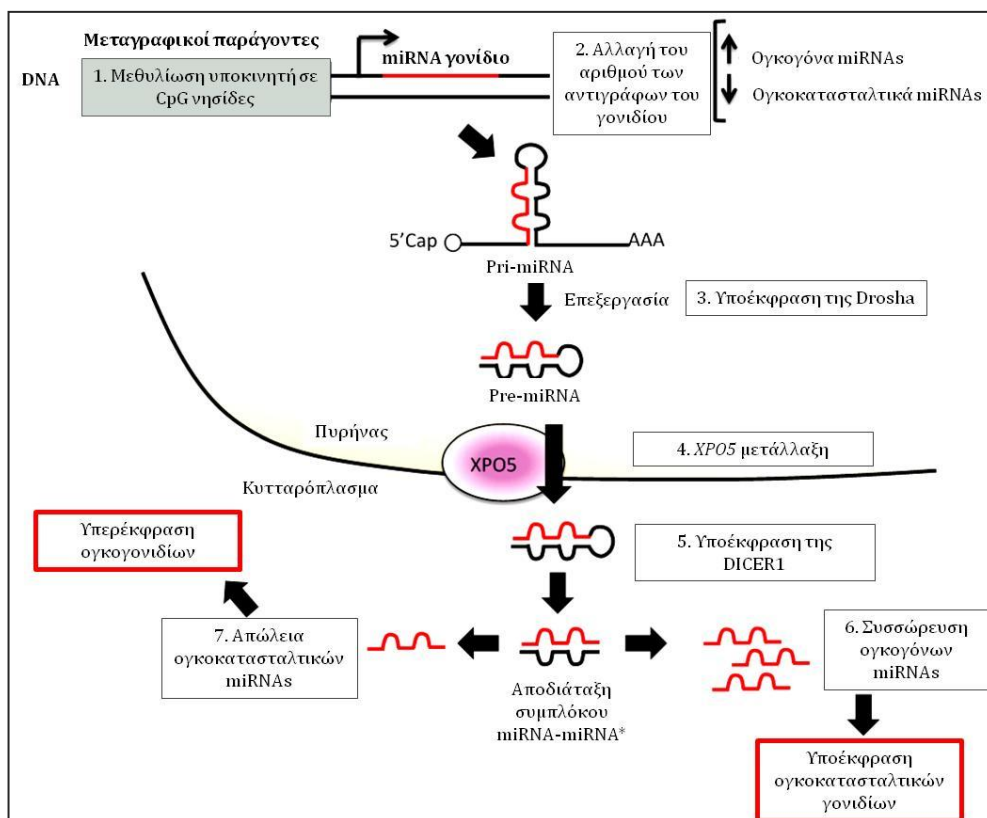
Η πρώτη αναφορά εμπλοκής των miRNA στον καρκίνο ήταν το 2002 μετά την ανακάλυψη ότι στη χρωμοσωμική περιοχή 13q14, που συχνά υφίσταται απαλοιφή στη χρόνια λεμφογενή λευχαιμία, εδράζονται τα γονίδια που κωδικοποιούν τα miR-15a και miR-16-1 (41). Αργότερα βρέθηκε ότι τα τα miR-15a και miR-16-1 δρουν ογκοκατασταλτικά όχι μόνο στη λευχαιμία αλλά και σε άλλες νεοπλασίες (42). Η ανακάλυψη αυτή οδήγησε στην ομαδοποίηση των miRNAs σε ογκογόνα και ογκοκατασταλτικά, με τα πρώτα να στοχεύουν και να εμποδίζουν τη δράση ογκοκατασταλτικών γονιδίων και να ενεργοποιούν ογκογόνους μεταγραφικούς παράγοντες και τα δεύτερα να αναστέλλουν τη λειτουργία των ογκογονιδίων.

Από το 2002, που έγινε η πρώτη αναφορά του ρόλου των miRNAs στον καρκίνο, μέχρι σήμερα τα συγκεκριμένα μόρια αποτελούν αντικείμενο εντατικής μελέτης για τη

διαλεύκανση του μηχανιστικού τους ρόλου στον καρκίνο αλλά και για την πιθανή αξιοποίησή τους στην κλινική πράξη υπό τη μορφή νέων μοριακών δεικτών αλλά και θεραπευτικών στόχων. Έτσι σήμερα είναι διαθέσιμος ένας μεγάλος αριθμός πειραματικών δεδομένων τα οποία υποστηρίζουν την απορρυθμισμένη έκφραση (και κατ' επέκταση ελαττωματική λειτουργία) των miRNAs στον καρκίνο, η οποία μπορεί να οφείλεται σε:

1. Ενίσχυση ή απαλοιφή γονιδίων που κωδικοποιούν miRNAs,
2. Ενεργοποίηση ογκογόνων μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. c-Myc, και p53),
3. Επιγενετικές αλλαγές των γονιδίων που κωδικοποιούν miRNAs και
4. Ελαττωματική λειτουργία του μηχανισμού βιογένεσης και επεξεργασίας των miRNAs.

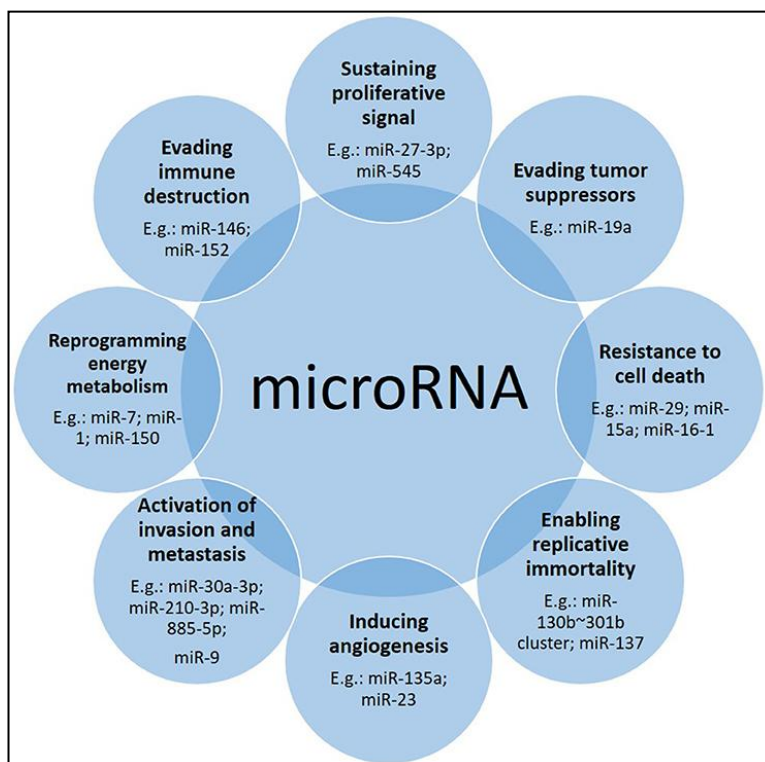
Συμπληρωματικό ρόλο παίζουν οι αλλαγές στη δευτεροταγή δομή των pre-miRNAs λόγω μεταλλάξεων, SNPs, απαλοιφών και ενισχύσεων, οι οποίες τελικά εμποδίζουν την αποτελεσματική επεξεργασία και εξαγωγή των μορίων από τον πυρήνα καθώς και την miRNA-mRNA αλληλεπίδραση (43) (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4 Μηχανισμοί τροποποίησης της έκφρασης των miRNAs κατά την καρκινογένεση

Η απορρυθμισμένη έκφραση των miRNAs επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στον καρκινικό μετασχηματισμό των κυττάρων και συμβάλλουν στην εγκαθίδρυση των βασικών χαρακτηριστικών του καρκίνου, δηλαδή στην

αύξηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων, την αποφυγή της απόπτωσης, την ενεργοποίηση της διήθησης και της μετάστασης και την αγγειογένεση (44) (Εικόνα 1.5)



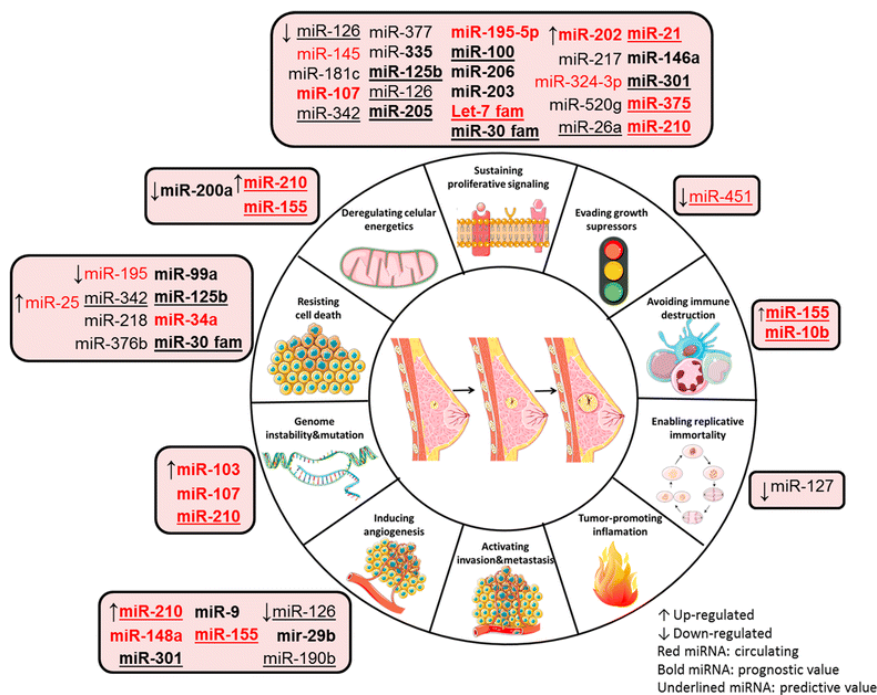
Εικόνα 1.5 Ρόλος των miRNAs στις διεργασίες που εμπλέκονται στην καρκινική εξάλλαγή των κυττάρων

Η κατανόηση του ρόλου των miRNAs στις καρκινογενετικές διαδικασίες αποτελεί σημαντικό βήμα στην αναγνώριση νέων καρκινικών δεικτών, οι οποίοι σε συνδυασμό με υπάρχοντες ή/και νέους θα παρέχουν πιο ακριβείς κλινικές πληροφορίες. Πράγματι πολλοί ερευνητές υποστηρίζουν την καταλληλότητα των συγκεκριμένων μορίων ως καρκινικούς δείκτες αφού παραμένουν σταθερά σε εύκολα προσβάσιμα βιολογικά υλικά όπως είναι το αίμα και τα ούρα, μπορούν να ανιχνευθούν και να ποσοτικοποιηθούν με σύγχρονες και ευαίσθητες μεθόδους (π.χ. qRT-PCR, μικροσυστοιχίες) και συχνά τα επίπεδα έκφρασης τους διαφοροποιούνται καθώς εξελίσσεται η ασθένεια. Έτσι, πρόσφατες μελέτες έχουν οδηγήσει στη δημιουργία miRNA υπογραφών διάγνωσης, πρόγνωσης και κατηγοριοποίησης διάφορων καρκίνων, η χρησιμότητα των οποίων ελέγχεται ήδη σε κλινικές μελέτες (43). Ένας ακόμα τομέας όπου φαίνεται να είναι χρήσιμα τα συγκεκριμένα μόρια είναι η θεραπεία του καρκίνου καθώς σύγχρονα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι τα συγκεκριμένα μόρια μπορούν να αξιοποιηθούν είτε ως δείκτες ανταπόκρισης στη χορηγούμενη θεραπεία είτε ως θεραπευτικοί παράγοντες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα του τελευταίου αποτελεί το MRX34,

ένα συνθετικό ανάλογο του miR-34a, το οποίο ήδη δοκιμάζεται σε ασθενείς με πρωτογενή ή μεταστικό καρκίνο ήπατος (45) και με καρκίνο του πνεύμονα (46). Επιπλέον, πρόσφατα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν επίσης ότι ο προσδιορισμός SNPs, που μπορεί να εντοπίζονται στην περιοχή σύνδεσης του mRNA-miRNA ή κατά μήκος της αλληλουχίας του miRNA, παρουσιάζει κλινικό ενδιαφέρον καθώς οι πολυμορφισμοί αυτοί φαίνεται να συνδέονται με την προδιάθεση εμφάνισης καρκίνου (47).

1.3.3 Ρόλος των miRNAs στον καρκίνο του μαστού

Η συμμετοχή των miRNAs στην έναρξη αλλά και την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού είναι αδιαμφισβήτητη σύμφωνα με πληθώρα σύγχρονων πειραματικών δεδομένων (Εικόνα 1.6). Το γεγονός αυτό συνεπάγεται με τη σειρά του την αναγνώριση των miRNAs σαν μία νέα και πολλά υποσχόμενη πηγή νέων μοριακών διαγνωστικών, προγνωστικών και προβλεπτικών δεικτών για τον καρκίνο του μαστού.



Εικόνα 1.6 Τα miRNAs ως βιοδείκτες και ως ογκογόνα ή ογκοκατασταλτικά μόρια στην καρκινογενετική διαδικασία στον μαστό (48).

Το 2005 οι Iorio et. al ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν την απορρυθμισμένη έκφραση πολλών miRNAs στον καρκίνο του μαστού, αναδεικνύοντας έτσι την μέχρι τότε ανεξερεύνητη σημασία αυτών των μικρών μορίων και ανοίγοντας ουσιαστικά τον δρόμο για

την περαιτέρω έρευνα του μηχανιστικού αλλά και κλινικού ρόλου των miRNAs στον καρκίνο του μαστού (49). Πράγματι μέχρι σήμερα ο κατάλογος των μελετών που υποστηρίζει το ευρύ φάσμα δράσεων των συγκεκριμένων μορίων στην καρκινική εξαλλαγή κυττάρων του μαστού είναι εκτενής. Πιο αναλυτικά, τα miRNAs μπορούν να δρουν είτε σαν ογκογόνα (oncomirs) είτε σαν ογκοκατασταλτικά μόρια και να επηρεάζουν την έναρξη/εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση, την ER και HER-2 σηματοδότηση, το φαινόμενο EMT, τη μετάσταση και την αγγειογένεση, τη διαφοροποίηση και αυτό-ανανέωση των βλαστικών καρκινικών κυττάρων του μαστού και την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στη θεραπεία. Παρακάτω ακολουθεί μια σύντομη περιγραφή μερικών μόνο ογκογόνων και ογκοκατασταλτικών miRNAs, καθώς ο κατάλογος των απορρυθμισμένων miRNAs και των μορίων/μονοπατιών που επιδρούν στον καρκίνο του μαστού είναι αρκετά εκτενής.

Ένα από τα σημαντικότερα και πιο μελετημένα oncomirs στον καρκίνο του μαστού είναι το miR-21, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο σε όλα τα στάδια εξέλιξης της ασθένειας. Αναλυτικότερα, το miR-21 ρυθμίζει την έκφραση πολλών ογκοκατασταλτικών γονιδίων (π.χ. *TPM1*, *PDCD4*, *PTEN*, *BCL-2* κ.α.) αναστέλλοντας έτσι την απόπτωση και προωθώντας παράλληλα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διήθηση, το φαινόμενο EMT και την μετάσταση (50,51). Τα miR-10b και miR-373/520c συγκαταλέγονται στα προ-μεταστατικά miRNAs ή αλλιώς metastamiRs, καθώς μέσω των αλληλεπιδράσεων τους με το *HOXD10* (52,53) και το *CD44* (54,55) αντίστοιχα προωθούν την κυτταρική μετανάστευση και διήθηση και τελικά την μετάσταση.

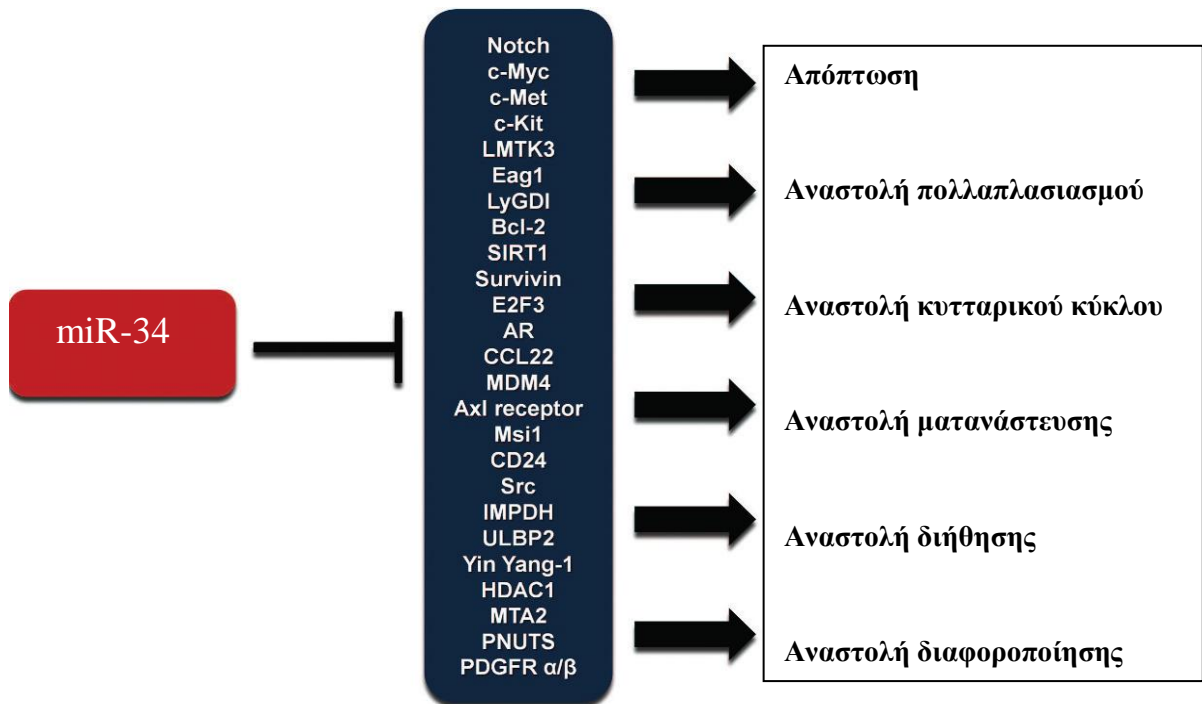
Στον αντίποδα βρίσκονται τα ογκοκατασταλτικά miRNAs, όπως τα miR-125, miR-200, miR-205, miR-206 και τα μέλη της οικογένειας let-7, τα οποία παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης κατά την καρκινική εξαλλαγή του αδένα, με αποτέλεσμα να παρατηρείται απώλεια των ογκοκατασταλτικών ιδιοτήτων τους και έτσι να επέρχεται απορρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της μετάστασης. Τα μέλη της οικογένειας let-7 μέσω της αλληλεπίδρασης τους με γονίδια όπως τα τον *MYC* και *HRAS* εμπλέκονται στη ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης, της απόπτωσης και της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου (56). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι το miR-206 αναστέλλει την έκφραση των κυκλινών D1 και D2 (57) και του ER-α (58) προκαλώντας μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και παρεμπόδιση της ER σηματοδότησης αντίστοιχα. Τέλος, το miR-200 μειώνει την αύξηση του όγκου και αναστέλλει το φαινόμενο EMT και την μετάσταση στοχεύοντας τα mRNAs των γονιδίων που κωδικοποιούν τους μεταγραφικούς παράγοντες ZEB1/ZEB2 και SNAI1/2 (51).

Σε ό,τι αφορά τον ρόλο των miRNAs στην κλινική διαχείριση των ασθενών με καρκίνο του μαστού τα πιο αισιόδοξα αποτελέσματα αφορούν τα miR-21 και miR-155, η διαγνωστική αξία των οποίων έχει επιβεβαιωθεί από πολλές ανεξάρτητες μελέτες και σε διαφορετικά βιολογικά υλικά (ιστός, πλάσμα, ορός FFRE). Το miR-21 έχει επίσης μελετηθεί και σαν πιθανός προγνωστικός δείκτης και έχει συσχετιστεί επανειλημμένως, με δυσμενή πρόγνωση της νόσου αφού η υπερέκφραση του σχετίζεται με μειωμένα διαστήματα επιβίωσης ελευθέρως νόσου και ολικής επιβίωσης (59–61). Αντίθετα τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης των let-7b, miR-205, miR-30a, miR-342-5p και miR-497 συνδέονται με αυξημένα διαστήματα επιβίωσης αποτελώντας έτσι δείκτες ευμενούς πρόγνωσης (50). Αξίζει να αναφερθεί ότι τα τελευταία χρόνια έχουν δημιουργηθεί miRNA-υπογραφές οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη του κινδύνου εμφάνισης της νόσου (62), τη διάκριση μεταξύ ασθενών με νόσο αρχικών σταδίων και υγιών γυναικών (63–66) και για την κατάταξη των ασθενών στους τέσσερις μοριακούς υπότυπους (67–69) ή στους διάφορους ιστολογικούς τύπους του καρκίνου του μαστού (70–73). Τέλος, πολλά miRNAs έχουν μελετηθεί για την αξία τους σαν δείκτες πρόβλεψης στην ανταπόκριση στη θεραπεία και τα μέχρι τώρα αποτελέσματα είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά. Χαρακτηριστικά αναφέρονται το miR-10b το οποίο έχει συσχετισθεί με ανθεκτικότητα στην ταμοξιφαίνη σε ασθενής με θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς (74), το miR-200c το οποίο συνδέεται με αυξημένη ανταπόκριση στη δοξορουβικίνη (75), και το miR-155 η αυξημένη έκφραση του οποίου σχετίζεται με την ευαισθητοποίηση των καρκινικών κυττάρων στην ακτινοθεραπεία (76).

1.3.4 Ρόλος του miR-34 στον καρκίνο

Η οικογένεια miR-34 αποτελείται από τρία μέλη, miR-34a, miR-34b και miR-34c, τα δύο εκ των οποίων (miR-34b και miR-34c) κωδικοποιούνται από το ίδιο μετάγραφο σε αντίθεση με το miR-34a που κωδικοποιείται από διαφορετικό μετάγραφο. Στον άνθρωπο το miR-34a εδράζεται στο χρωμόσωμα 1p36.22 και αξίζει να αναφερθεί ότι απαλοιφές στην χρωμοσωμική περιοχή 1p36 είναι ένα συχνό φαινόμενο σε πολλούς τύπους καρκίνου μεταξύ των οποίων ο καρκίνος του μαστού, του παχέος εντέρου και του πνεύμονα. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τα miR-34b και miR-34c εδράζεται στο χρωμόσωμα 11q23.1, μία περιοχή που επίσης υφίσταται απαλοιφές στον καρκίνο του μαστού, του προστάτη, της μήτρας και του πνεύμονα (77). Τα τρία μέλη της συγκεκριμένης οικογένειας φαίνεται να έχουν ιστοειδική έκφραση καθώς αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-34a παρατηρούνται στον εγκέφαλο, ενώ των miR-34b και miR-34c στον πνεύμονα. Το miR34 ανήκει στα ογκοκατασταλτικά

miRNA, καθώς πολλά από τα 700 και πλέον πειραματικά επιβεβαιωμένα γονίδια-στόχοι του εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (κυκλίνες, κινάσες εξαρτώμενες από τις κυκλίνες, *MYCN*, *NOTCH1*, *MDMX*), της απόπτωσης (*BCL2*, *SIRT1* και *BIRC5*), της κυτταρικής γήρανσης (*E2F3*), της κυτταρικής κινητικότητας (*SNAI1*, *MET* και *AXIN2*) και της διαφυγής από τον ανοσολογικό έλεγχο (*PD-L1*, *DGKζ*). Συνεπώς το miR-34 έχει ένα ευρύ φάσμα επιδράσεων που συμβάλλουν στην εξέλιξη του καρκίνου και τη μετάσταση (78) (Εικόνα 1.7, Πίνακας 1.2).



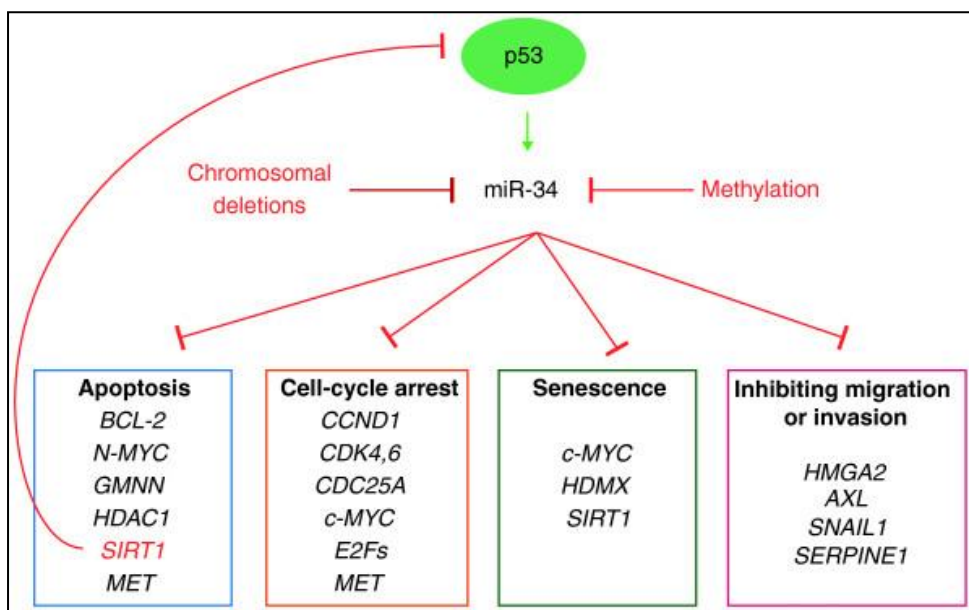
Εικόνα 1.7 Τα βασικά γονίδια-στόχοι του miR-34 και οι βιολογικές επιπτώσεις από την αναστολή τους.

Πίνακας 1.2 Γονίδια-στόχοι του miR-34 (77)

Γονίδιο στόχος	miR-34 μέλος	Βιολογικό αποτέλεσμα
CDK4	miR-34a,b,c	Αναστολή κυτταρικού κύκλου
CDK6	miR-34a,b	
CCNE2	miR-34a,b,c	
CCND1	miR-34a	
c-MYC	miR-34b,c	
N-MYC	miR-34a	
E2F5	miR-34a	
CREB	miR-34b	Αναστολή κυτταρικού πολλαπλασιασμού
E2F3	miR-34a,c	
DLL1	miR-34a	
Notch-2	miR-34a	Αναστολή κυτταρικής αύξησης
YY1	miR-34a	
PDGFRA	miR-34a	
BCL2	miR-34a	Απόπτωση
SIRT1	miR-34a	
Survivin	miR-34a	
AXIN2	miR-34a	Αναστολή EMT
MET	miR-34a,b,c	Αναστολή διήθησης
AXL	miR-34a	
Fra-1	miR-34a/c	
SNAIL	miR-34a,b,c	Ρύθμιση EMT
CD44	miR-34a	Αναστολή μετάστασης
ARHGAP1	miR-34a	Αναστολή διήθησης
WNT1	miR-34a,b,c	Αναστολή του σηματοδοτικού
WNT3	miR-34a,b,c	

LRP6	miR-34a,b,c	μονοπατιού Wnt
B-Catenin	miR-34a,b,c	
LEF1	miR-34a	
MTA2	miR-34a	Ρύθμιση της p53 δραστηριότητας

Η συμμετοχή του miR-34 στον καρκίνο επιβεβαιώνεται επίσης από το γεγονός ότι η έκφραση του συγκεκριμένου miRNA ρυθμίζεται από το ογκοκατασταλτικό μόριο-κλειδί p53. Ο ρόλος του τελευταίου είναι η παρεμπόδιση του ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε περιπτώσεις όπου το DNA έχει υποστεί βλάβες εξηγώντας έτσι το γεγονός ότι η πρωτεΐνη p53 είναι μία από τις πιο συχνά απενεργοποιημένες πρωτεΐνες στον καρκίνο. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, σε περιπτώσεις βλάβης του DNA η p53 ενεργοποιεί τη μεταγραφή και σύνθεση του miR-34, το οποίο με τη σειρά του, μέσω της αλληλεπίδρασης του με τα γονίδια-στόχους προκαλεί την ενεργοποίηση της απόπτωσης και την αναστολή του κυτταρικού κύκλου, της κυτταρικής μετανάστευσης και διήθησης. Στον καρκίνο, η απώλεια της πρωτεΐνης p53, έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης του miR-34 και συνεπώς την απώλεια των ογκοκατασταλτικών επιδράσεων του (79) (Εικόνα 1.8). Ωστόσο θα πρέπει να αναφερθεί ότι αν και η p53 έχει άμεση επιδράση στην μεταγραφή του miR-34, σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως ο καρκίνος του παχέως εντέρου, του στομάχου, του μαστού, των ωοθηκών, του παγκρέατος, του προστάτη και του πνεύμονα έχει αναφερθεί υπερμεθυλίωση και συνεπώς αποσιώπηση του miR-34. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται ακόμα και σε περιπτώσεις όπου η πρωτεΐνη p53 είναι πλήρως λειτουργική και φυσικά έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια των ογκοκατασταλτικών δράσεων του miR-34 (80).



Εικόνα 1.8 Ρύθμιση της έκφρασης του miR-34 από το p53

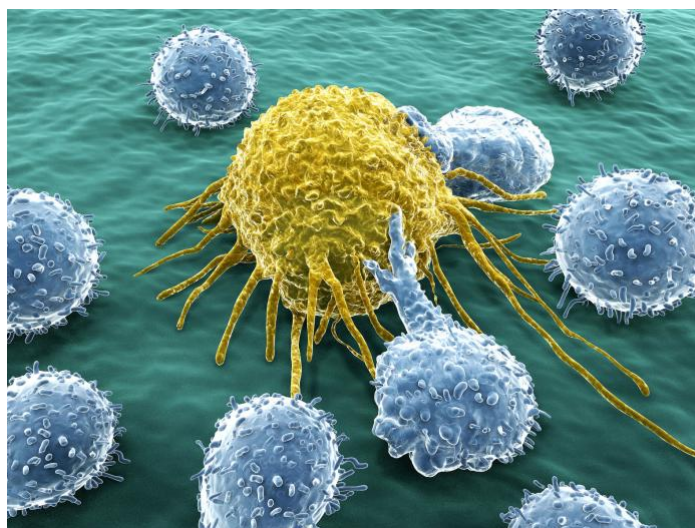
Η συγκεκριμένη οικογένεια miRNAs έχει μελετηθεί εκτενώς σε διάφορους τύπους καρκίνου και έχει βρεθεί υποέκφραση του miR-34a στο νευροβλάστωμα και γλοιοβλάστωμα καθώς και στον καρκίνο του παγκρέατος. Επιπλέον στον καρκίνο του προστάτη, του παγκρέατος, του παχέος εντέρου, των ωθηκών και στο μελανώμα έχει παρατηρηθεί μεθυλίωση των CpG νησίδων στην περιοχή του υποκινητή, γεγονός που οδηγεί στην αναστολή της έκφρασης του συγκεκριμένου miRNA. Ίδιος μηχανισμός αποσιώπησης έχει παρατηρηθεί και για τα miR-34b/c στον καρκίνο του παχέος εντέρου (77).

Σε ό,τι αφορά την κλινική αξία του miR-34 έχει βρεθεί ότι η μειωμένη έκφραση του miR-34a/b σχετίζεται με μειωμένη επιβίωση των ασθενών με καρκίνο του μαστού ενώ αντίθετη είναι η εικόνα στον καρκίνο του ήπατος και των ωθηκών όπου η υποέκφραση των συγκεκριμένων miRNAs είναι δείκτης ευμενούς πρόγνωσης αυτών των ασθενών. Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι το miR-34 αποτελεί το πρώτο miRNA που μελετάται σε επίπεδο κλινικών μελετών φάσης 1 για την πιθανή του χρήση σαν θεραπευτικός παράγοντας στον καρκίνο του ήπατος (77).

1.4 Ανοσοθεραπεία και αναστολείς ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος

1.4.1 Γενικά Στοιχεία

Η ανάπτυξη θεραπευτικών στόχων που ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό σύστημα έχει φέρει επανάσταση στη θεραπεία του καρκίνου τα τελευταία χρόνια. Εστιάζοντας στο ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή και όχι στον όγκο έχει αποδειχθεί μια αποτελεσματική στρατηγική σε αρκετές περιπτώσεις καρκίνου (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9 Η ανοσοθεραπεία στον καρκίνο (81)

Ωστόσο, αυτή η προσέγγιση δεν αποτελεί μια καινούρια καινοτομία. Στα τέλη του 19ου αιώνα, ο Γουίλιαμ Κόουλι παρατήρησε ότι ασθενείς που έπασχαν από σάρκωμα μετά την έγχυση τοπικά τοξίνων που προέρχονται από βακτήρια, εμφάνιζαν απόκριση όγκου (82). Τη δεκαετία του '70 η ενστάλαξη του ενδοκοιλιακού *Bacillus CalmetteGuerin* (BCG) για τη θεραπεία επιφανειακών όγκων της ουροδόχου κύστης βρέθηκε να είναι αποτελεσματική θεραπεία και μολονότι ο μηχανισμός δράσης της δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός, είναι μια θεραπεία που χρησιμοποιείται ακόμα σήμερα (83). Λίγα χρόνια αργότερα, οι πρώτες μελέτες σχετικά με τη δράση των κυτοκίνων επιβεβαίωσαν τα οφέλη του ενεργοποιημένου ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή στη νόσο του καρκίνου. Έτσι, η ιντερλευκίνη 2 (IL2) ή η ιντερφερόνη άλφα (IFN α) χρησιμοποιούνται εδώ και δεκαετίες για τη θεραπεία του καρκίνου του νεφρού ή του μελανώματος (84,85).

1.4.2 Αναστολείς ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος

1.4.2.1 Σύνοψη των αναστολέων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος

Μια σημαντική ανακάλυψη στη θεραπεία του καρκίνου υπήρξε η ανάπτυξη αντισωμάτων ικανών να παρεμποδίσουν τα βασικά ανοσοποιητικά σημεία ελέγχου και να ενεργοποιήσουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Η πραγματοποίηση μακροπρόθεσμων ανθεκτικών αποκρίσεων σε ένα υποσύνολο ασθενών αποτελεί ένα μετασχηματιστικό γεγονός. Το αντι-κυτταροτοξικό αντίσωμα αντιγόνου T-λεμφοκυττάρου 4 (CTLA-4) ipilimumab για τη θεραπεία του προχωρημένου μελανώματος, αποτελεί μία από τις πρώτες θεραπείες αναστολέων των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος, το οποίο έχει πάρει και έγκριση από το Διεθνή Οργανισμό Φαρμάκων και Τροφών (FDA).

Μέχρι σήμερα 5 πρόσθετες θεραπείες που στοχεύουν τον άξονα PD-1 / PD-L1, έχουν εγκριθεί για τη θεραπεία διαφορετικών καρκίνων. Επιπλέον, η συνδυαστική θεραπεία ipilimumab με nivolumab (αντι-PD-1) έχει εγκριθεί για τη θεραπεία του προχωρημένου μελανώματος με καλύτερη ολική επιβίωση σε σχέση με τη χορήγηση μονοθεραπείας (86). Ο Πίνακας 1.3 συνοψίζει όλες τους αναστολείς των ανοσολογικών σημείων ελέγχου που έχουν εγκριθεί από το Διεθνή Οργανισμό Φαρμάκων και Τροφών (FDA) για τη θεραπεία του καρκίνου (87).

Πίνακας 1.3 Σύνοψη των εγκεκριμένων αναστολέων των ανοσολογικών σημείων ελέγχου στον καρκίνο από τον FDA.

Θεραπεία	Στόχος	Κλινική δοκιμή	Ενδείξεις φαρμάκου
Ipilimumab b (Yervoy®)	CTLA-4	NCT00094653	Μη χειρουργήσιμο ή μεταστατικό μελάνωμα
		EORTC 18071	Επικουρική θεραπεία για το δερματικό μελάνωμα με παθολογική εμπλοκή τοπικών λεμφαδένων >1 mm μετά την πλήρη εκτομή, συμπεριλαμβανομένης της ολικής λεμφαδενοεκτομής
		NCT01445379, NCT01696045	Επέκταση της έγκρισης για μη χειρουργήσιμο ή μεταστατικό μελάνωμα σε παιδιά ασθενείς ηλικίας > 12 ετών
Nivolumab (Opdivo®)	PD-1	CheckMate-037 (NCT01721746)	Μη χειρουργήσιμο ή μεταστατικό μελάνωμα που έχει προχωρήσει μετά από θεραπεία με ipilimumab και, εάν η μετάλλαξη BRAF V600 είναι θετική, αναστολέα BRAF
		CheckMate-017 (NCT01642004)	Μεταστατικό πλακώδες NSCLC που έχει προχωρήσει μετά τη λήψη χημειοθεραπείας με βάση την πλατίνα
		CheckMate-057 (NCT01673867)	Μη-πλακώδες NSCLC που έχει προχωρήσει σε χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα; ασθενείς με EGFR ή ALK γονιδιακές αλλοιώσεις θα πρέπει να έχουν προχωρήσει σε πρόοδο νόσου με θεραπεία εγκεκριμένη από τον FDA για αυτές τις αλλοιώσεις
		CheckMate-025 (NCT01668784)	Προχωρημένο καρκίνωμα νεφρικών κυττάρων μετά από προηγούμενη θεραπεία με αντι-αγγειογόνο θεραπεία
		CheckMate-066 (NCT01721772)	Μη χειρουργήσιμο ή μεταστατικό μελανώμα άγριου τύπου BRAF V600
		CheckMate-039 (NCT01592370) , CheckMate-	Κλασσικό λέμφωμα Hodgkin που έχει υποτροπιάσει ή προχωρήσει μετά από μεταμόσχευση αυτόλογων

		205 (NCT02181738)	αιματοποιητικών αρχέγονων κυττάρων και brentuximab βαζοτίνη (Adcetris)
		CheckMate-141 (NCT02105636)	Υποτροπιάζων ή μεταστατικό SCCHN που έχει προχωρήσει σε / μετά από θεραπεία με βάση την πλατίνα
		CheckMate-275 (NCT02387996)	Τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα που έχει προχωρήσει κατά τη διάρκεια ή μετά από χημειοθεραπεία που περιέχει πλατίνα ή εντός 12 μηνών κατά τη χορήγηση νεοεπικουρικής ή επικουρικής θεραπεία με χημειοθεραπεία που περιέχει πλατίνα
		CheckMate-142 (NCT02060188)	Ανεπαρκής επιδιόρθωση DNA και υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια μεταστατικού καρκίνου παχέος εντέρου που έχει προχωρήσει μετά από θεραπεία με φθοροπυριμιδίνη, οξαλιπλατίνα και irinotecan σε ασθενείς ηλικίας ≥ 12 ετών
		CheckMate-040 (NCT01658878)	Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα που έχει προηγουμένως λάβει θεραπεία με sorafenib
		CheckMate-238 (NCT02388906)	Επικουρική θεραπεία για ασθενείς με μελάνωμα με θετικούς λεμφαδένες ή ασθενών με μεταστατική νόσο που έχουν υποβληθεί σε πλήρη εκτομή
Ipilimumab+nivolumab	CTLA-4+PD-1	CheckMate-069 (NCT01927419)	BRAF V600 άγριου τύπου, μη χειρουργήσιμο ή μεταστατικό μελάνωμα
		CheckMate-067 (NCT01844505)	Μη χειρουργήσιμο ή μεταστατικό μελάνωμα, ανεξάρτητα από την κατάσταση μετάλλαξης BRAF V600
		CheckMate-214 (NCT02231749)	Ενδιάμεσου ή χαμηλού ρίσκου, σε ασθενείς μεκαρκίνωμα νεφρικών κυττάρων που δεν έχουν λάβει θεραπεία
		KEYNOTE-006 (NCT01866319) , KEYNOTE-002	Διευρυμένη έγκριση ως θεραπεία πρώτης γραμμής για μη χειρουργήσιμο ή μεταστατικό μελάνωμα

		(NCT01704287	
		KEYNOTE-012 (NCT01848834)	Υποτροπιάζων ή μεταστατικό HNSCC που έχει προχωρήσει μετά από τη χορήγηση χημειοθεραπείας με βάση την πλατίνα
		KEYNOTE-010 (NCT01905657) , KEYNOTE-024 (NCT02142738)	Θεραπεία πρώτης γραμμής για μεταστατικό NSCLC στην οποία οι όγκοι έχουν υψηλή έκφραση PD-L1 (TPS \geq 50%) όπως προσδιορίζεται με δοκιμή εγκεκριμένη από το FDA, χωρίς EGFR ή ALK γονιδιακές αλλοιώσεις και καμία προηγούμενη συστηματική χημειοθεραπεία για μεταστατικό NSCLC; διευρυμένη θεραπεία 2ης γραμμής για μεταστατικούς όγκους NSCLC με οποιοδήποτε επίπεδο PD-L1 (TPS \geq 1%) όπως προσδιορίζεται με δοκιμή εγκεκριμένη από το FDA, με εξέλιξη της νόσου μετά τη λήψη χημειοθεραπείας που περιέχει πλατίνα (ασθενείς με EGFR ή ALK γονιδιακές αλλοιώσεις θα πρέπει να έχει πρόοδο της νόσου με τη λήψη εγκεκριμένων FDA-θεραπειών για αυτές τις αλλοιώσεις)
Pembrolizumab (Keytruda®)	PD-1	KEYNOTE-087 (NCT02453594)	Παιδιατρικό ανθεκτικό κλασικό λέμφωμα Hodgkin ενηλίκων ή ενηλίκων / παιδιατρικό κλασικό Hodgkin λέμφωμα που έχει υποτροπιάσει μετά από 3 ή περισσότερες γραμμές θεραπείας
		KEYNOTE-021 (NCT02039674)	Συνδυασμός πεμετρεξίδης και καρβοπλατίνας για μη πλακώδες NSCLC χωρίς προηγούμενη λήψη θεραπείας
		KEYNOTE-045 (NCT02256436)	Τοπικά προχωρημένος ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα που έχει προχωρήσει κατά τη διάρκεια ή μετά από χημειοθεραπεία που περιέχει πλατίνα ή εντός 12 μηνών από νεοεπικουρική ή επικουρική θεραπεία με χημειοθεραπεία που περιέχει πλατίνα; τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό

			ουροθηλιακό καρκίνωμα σε ασθενείς που δεν είναι επιλέξιμοι για τη λήψη χημειοθεραπείας cisplatin
		KEYNOTE-016 (NCT01876511), KEYNOTE-164 (NCT02460198), KEYNOTE-012 (NCT01848834), KEYNOTE-028 (NCT02054806), KEYNOTE-158 (NCT02628067)	Ενήλικα / παιδιατρικό μη χειρουργήσιμο ή μεταστατικό, υψηλής μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI-H) ή ανεπάρκεια επιδιόρθωσης DNA (dMMR) σε συμπαγείς όγκους που έχουν προχωρήσει μετά από λήψη προηγούμενης θεραπείας και για τις οποίες δεν υπάρχουν ικανοποιητικές εναλλακτικές επιλογές θεραπείας ; MSI-H ή dMMR καρκίνου του παχέος εντέρου που έχει προχωρήσει μετά από λήψη θεραπείας με φθοροπυριμιδίνη, οξαλιπλατίνη και ιρινοτεκάνη
		KEYNOTE-059 (NCT02335411)	Τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό γαστρικό ή αδενοκαρκίνωμα του γαστροοισοφαγικού συνδέσμου στο οποίο οι όγκοι εκφράζουν PD-L1 με δοκιμή εγκεκριμένη από την FDA; οι ασθενείς πρέπει να έχουν εξέλιξη της νόσου μετά τη λήψη δύο ή περισσότερων προηγούμενων συστηματικών θεραπειών, συμπεριλαμβανομένων των φθοροπυριμιδίνη και χημειοθεραπεία που περιέχει πλατίνα και, εάν είναι κατάλληλο, HER2 / στοχευόμενων θεραπειών
Atezolizumab (Tecentriq®)	PD-L1	IMvigor210 (NCT02108652)	Τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα που έχει προχωρήσει κατά τη διάρκεια ή μετά από χημειοθεραπεία που περιέχει πλατίνα ή εντός 12 μηνών από νεοεπικουρική ή επικουρική θεραπεία με χημειοθεραπεία που περιέχει πλατίνα
		POPLAR (NCT01903993)	Μεταστατικό NSCLC που έχει προχωρήσει κατά τη διάρκεια ή μετά από

		OAK (NCT02008227)	τη χρήση Χημειοθεραπείας με πλατίνα; οι ασθενείς με EGFR ή ALK γονιδιακές ανωμαλίες θα πρέπει να έχουν πρόοδο νόσου με τη λήψη εγκεκριμένων FDA-θεραπειών για αυτές τις αλλοιώσεις
		IMvigor210 (NCT02108652)	Θεραπεία πρώτης γραμμής για τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα σε ασθενείς που είναι καταλλήλτοι για τη χορήγηση cisplatin
avelumab (Bavencio®)	PD-L1	JAVELIN Merkel 200 (NCT02155647)	Μεταστατικό καρκίνωμα κυττάρων Merkel σε ασθενείς > 12 ετών
		JAVELIN Solid Tumor (NCT01772004)	Τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα που έχει προχωρήσει κατά τη διάρκεια ή μετά από χημειοθεραπεία που περιέχει πλατίνα ή εντός 12 μηνών με τη λήψη νεοεπικουρικής ή επικουρικής θεραπείας με χημειοθεραπεία που περιέχει πλατίνα
Durvalumab (Imfinzi®)	PD-L1	Study 1108 (NCT01693562)	Τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα που έχει προχωρήσει κατά τη διάρκεια ή μετά από χημειοθεραπεία που περιέχει πλατίνα ή εντός 12 μηνών με τη λήψη νεοεπικουρικής ή επικουρικής θεραπείας με χημειοθεραπεία που περιέχει πλατίνα
		PACIFIC (NCT02125461)	Μη χειρουργήσιμο NSCLC σταδίου III που δεν έχει προχωρήσει μετά από ταυτόχρονη λήψη χημειοθεραπείας με πλατίνα και ακτινοθεραπεία

Ο αποκλεισμός των ανοσοποιητικών σημείων ελέγχου αφαιρεί τα ανασταλτικά σήματα της ενεργοποίησης των T-κυττάρων και επιτρέπει στα T-λεμφοκυττάρων να υπερισχύσουν ώστε να εφαρμοστεί αποτελεσματική ανοσολογική απάντηση στον όγκο. Αυτοί οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί φυσιολογικά διατηρούν τις ανοσολογικές αποκρίσεις μέσα σε ένα επιθυμητό φυσιολογικό ρυθμό και προστατεύουν τον ξενιστή από την αυτοανοσία. Η ανοσολογική ανοχή επιτυγχάνεται μέσω πολλαπλών διαφορετικών μηχανισμών και

διακρίνεται σε κεντρική και περιφερική. Η κεντρική ανοχή δρα μέσω της κλωνικής διαγραφής αυτοαντιδραστικών κλώνων υψηλής συγγένειας κατά τη διάρκεια της αρνητικής επιλογής στον θύμο αδένα. Ωστόσο, επειδή η αυτοαντιδραστικότητα επιλέγεται κατά την διάρκεια θετικής επιλογής στον θύμο αδένα, απαιτούνται πρόσθετοι μηχανισμοί για να περιοριστεί η αυτοδραστικότητα. Η περιφερειακή ανοχή δρα μέσω ποικίλων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένου των ρυθμιστικών Τ κυττάρων (Treg), την ανεργία των Τ-κυττάρων, τα κυτταρο-εξωγενή σήματα ανοχής, και τη διαγραφή των περιφερειακών κλώνων. Το ανοσοποιητικό σύστημα ασκεί μια ισχυρή επιλεκτική πίεση καθ' όλη την εξέλιξη του όγκου, οδηγώντας σε ανοσολογική αλλαγή του όγκου. Ως αποτέλεσμα, οι κακόηθεις όγκοι συχνά συν-επιλέγουν ανοσοκατασταλτικούς και μηχανισμούς ανοχής για την αποφυγή της άνοσης καταστροφής. Ο αποκλεισμός των ανοσοποιητικών σημείων ελέγχου αναστέλλει την συνδιέγερση των Τ κυττάρων προκειμένου να απελευθερωθούν οι αντι-καρκινικές αποκρίσεις των Τ-κυττάρων που αναγνωρίζουν τα αντιγόνα του όγκου. Είναι σημαντικό, η ανάπτυξη θεραπειών του αποκλεισμού των ανοσοποιητικών σημείων ελέγχου να βασίζεται στην κατανόηση των βασικών ρυθμιστικών μηχανισμών της ενεργοποίησης των Τ-κυττάρων (88).

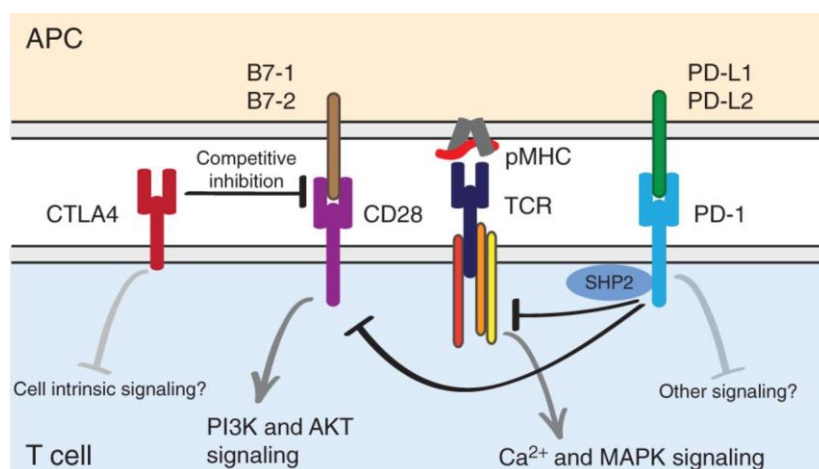
1.4.2.2 Το ανοσοποιητικό σημείο ελέγχου CTLA-4

Ο πρώτος αρνητικός ρυθμιστής της ενεργοποίησης των Τ κυττάρων είναι ο CTLA-4, ένας συν-ανασταλτικός υποδοχέας που ρυθμίζεται νωρίς κατά την διάρκεια της ενεργοποίησης των Τ κυττάρων (89). Το CTLA-4 όταν δεσμεύεται από τους ίδιους προσδέτες (CD80 / CD86) που παρέχουν συν-διεγερτικά σήματα μέσω των CD28 στα Τ λεμφοκύτταρα, παρεμποδίζει αντίστροφα την λειτουργία των δραστικών Τ κυττάρων 1) προκαλώντας δια-ενδοκυττάρωση και αποικοδόμηση των προσδετών που απαιτείται για την συν-διέγερση και 2) με την παροχή ανασταλτικών σημάτων που αποκλείει τον πολλαπλασιασμό των Τ κυττάρων και την έκκριση της IL-2 (90), οδηγώντας σε ανοχή των Τ κυττάρων μέσω της επαγωγής της ανεργίας. Παρ'ότι εκφράζεται τόσο σε CD4 + όσο και CD8 + Τ λεμφοκύτταρα, το CTLA-4 ρυθμίζει αρνητικά αυτά τα κύτταρα με διαφορετικούς τρόπους. Το CTLA-4 αναστέλλει τις αποκρίσεις των δραστικών CD4 + Τ κυττάρων που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια ανοσιακών αποκρίσεων μνήμης παρά κατά τη διάρκεια πρωτογενών ανοσιακών αποκρίσεων, σε αντίθεση με τα CD8 + Τ κύτταρα που είναι τα περισσότερα ευαίσθητα στην ρύθμιση του CTLA-4 (91). Επιπλέον, το CTLA-4 είναι συστατικό που εκφράζεται από τα CD4 + FOXP3 + ρυθμιστικά Τ κύτταρα (Tregs) και είναι κρίσιμο για την ανοσοκατασταλτική λειτουργία τους (92). Ως εκ τούτου, η δέσμευση του

CTLA-4 σε πολλούς πληθυσμούς T λεμφοκυττάρων δρα ως θεμελιώδες ανοσοποιητικό σημείο ελέγχου, μέσω των άμεσων και έμμεσων μηχανισμών, όπου τελικά επιβραδύνει την δραστική λειτουργία των CD8 + T κυττάρων κατά τη διάρκεια πρωτογενών και ανοσιακών αποκρίσεων μνήμης.

1.4.2.3 Ρυμιστικοί μηχανισμοί της αρνητικής συν-διέγερσης μέσω του CTLA-4

Η έκφραση και η λειτουργία CTLA-4 είναι εγγενώς συνδεδεμένη με την ενεργοποίηση των T-κυττάρων. Το CTLA-4 ρυθμίζεται άμεσα μετά τη δέσμευση του υποδοχέα των T-κυττάρων (TCR) (σήμα 1), με την έκφρασή του να είναι μέγιστη 2 έως 3 ημέρες μετά την ενεργοποίηση. Το CTLA-4 καταστέλλει την σηματοδότηση του TCR μέσω ανταγωνισμού με το συνδιεγερτικό μόριο CD28 για τους B7 προσδέτες B7-1 (CD80) και B7-2 (CD86), για την οποία το CTLA-4 έχει υψηλότερη συγγένεια (93) (Εικόνα 1.10). Επειδή και οι δύο προσδέτες B7-1 και B7-2 παρέχουν θετικά συνδιεγερτικά σήματα μέσω των CD28 (σήμα 2), η ανταγωνιστική αναστολή και των δύο μορίων από το CTLA-4 είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική εξασθένιση της ενεργοποίησης των T-κυττάρων.



Εικόνα 1.10 Μοριακοί μηχανισμοί εξασθένησης ενεργοποίηση των T-κυττάρων από τα CTLA4 και PD-1.

Τα CD28 και CTLA-4 επίσης παρουσιάζουν ταχεία κινητική δέσμευσης με το B7-1, το οποίο, σε συνδυασμό με τη διαφορά στη δύναμη δέσμευσης, επιτρέπει την ταχεία ανταγωνιστική αναστολή από τον CTLA-4. Εκτός από την επαναρύθμιση της έκφρασης του CTLA-4 μετά την ενεργοποίηση των T-κυττάρων, το CTLA-4 που περιέχεται στα ενδοκυτταρικά κυστίδια μετακινείται ταχέως στην ανοσολογική συνάψη (94). Ο βαθμός στρατολόγησης του CTLA4 στην ανοσολογική συνάψη συσχετίζεται άμεσα με την ισχύ του

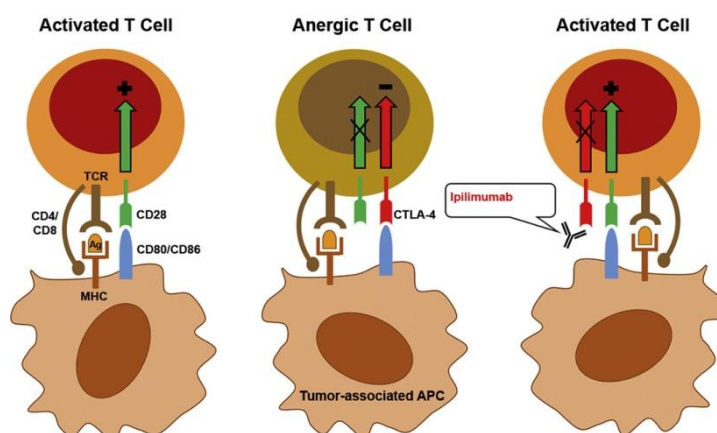
σήματος του TCR. Μόλις μετακινηθεί στην ανοσολογική σύναψη, το CTLA-4 σταθεροποιείται με τη δέσμευση του προσδέτη B7, επιτρέποντάς του να συσσωρευτεί και αποτελεσματικά να υπερέχει του CD28. Μέσω αυτού του μηχανισμού, το CTLA-4 εξασθενεί τη θετική συνδιέγερση από το CD28 και έτσι περιορίζει την μελλοντική σηματοδότηση του CD28, μέσω των PI3K και AKT (95). Αυτό οδηγεί σε αυστηρή ρύθμιση του εύρους του σήματος TCR και, συνεπώς, της δραστηριότητας των T-κυττάρων. Επειδή η CTLA-4 αρνητική συνδιέγερση είναι εγγενώς συνδεδεμένη με την έκφραση των προσδετών B7 και της μεσολαβούμενης από CD28 θετικής συνδιέγερσης, το CTLA4 κατά κύριο λόγο λειτουργεί για να ρυθμίζει τη δραστηριότητα των T-κυττάρων σε θέσεις προετοιμασίας των T-κυττάρων (π.χ. δευτερογενή λεμφοειδή όργανα). Επιπλέον το CTLA4 επίσης εξασθενεί την ενεργοποίηση των T-κυττάρων σε περιφερειακούς ιστούς δεδομένου ότι οι προσδέτες B7 είναι συστατικά που εκφράζονται σε ποικίλους βαθμούς από κύτταρα που παρουσιάζουν αντιγόνο (APC) αλλά μπορεί επίσης να εκφραστεί και από τα ενεργοποιημένα T κύτταρα. Εξαιτίας αυτού του κεντρικού ρόλου στη ρύθμιση της ενεργοποίησης των T-κυττάρων, η αρνητική συνδιέγερση από το CTLA4 είναι κρίσιμη για την ανοχή (91).

Εκτός από τις εσωτερικές κυτταρικές λειτουργίες μέσω των οποίων το CTLA-4 κυρίως εξασθενεί τη δραστηριότητα των T-κυττάρων, το CTLA-4 μπορεί να ρυθμίσει την ενεργοποίηση των T-κυττάρων μέσω διαφόρων εξωτερικών κυτταρικών μηχανισμών. Ενδεικτικό των εξωτερικών κυτταρικών μηχανισμών, είναι το γεγονός ότι η παρουσία CTLA-4 κατάλληλων T κυττάρων είναι επαρκής να αποτρέψει θανατηφόρο λεμφικό πολλαπλασιασμό λόγω γενετικής διαγραφής του CTLA-4 (96). Η πλειονότητα της κυτταρικής-εξωγενής κατασταλτικής λειτουργίας του CTLA-4 διαμεσολαβείται μέσω των Tregs. Η απώλεια του CTLA-4 στα Tregs είναι επαρκής για να προκαλέσει την ανώμαλη ενεργοποίηση των T-κυττάρων που θα προκαλέσει αυτοανοσία (97). Αυτό δείχνει ότι το CTLA-4 που προέρχεται από τα Treg είναι απαραίτητο για να διατηρηθεί η ανοσολογική ανοχή, αν και είναι απίθανο το CTLA-4 που προέρχεται από τα Treg να είναι επαρκές για να διατηρηθεί η ανοχή με τη μεσολάβηση T κυττάρων. Οπότε, το CTLA-4 από τα Treg κύτταρα μπορεί να εξασθενήσει την ενεργοποίηση των T-κυττάρων σε ένα εξωγενές κύτταρο με τον περιορισμό της διαθεσιμότητας των B7 προσδετών B7-1/B7-2 για τη μεσολαβούμενη από το CD28 θετική συνδιέγερση των κοντινών δραστικών T κύτταρων.

1.4.2.4 Ανοσοποιητικοί αναστολείς σημείων ελέγχου που στοχεύουν το CTLA-4

Με βάση το ρόλο του CTLA-4 ως αρνητικού ρυθμιστή της ενεργοποίησης των κυττάρων T, αυτό το συν-ανασταλτικό μόριο έχει γίνει ένας ελκυστικός στόχος για

θεραπείες με στόχο την ενίσχυση της δραστηκής δράσης των T λεμφοκυττάρων (Εικόνα 1.11).



Εικόνα 1.11 Μηχανισμός δράσης των εγκεκριμένων από τον FDA αναστολέων του ανοσολογικού σημείου ελέγχου CTLA-4 στη θεραπεία του καρκίνου

Στο πλαίσιο της αντικαρκινικής ανοσίας, μελέτες τόσο σε ποντίκια όσο και σε ασθενείς με καρκίνο απέδειξαν ότι ο αποκλεισμός του CTLA-4 που βασίζεται σε μονοκλωνικά αντισώματα αναστέλλει την ανοσοκαταστολή που σχετίζεται με τα Treg και προάγει τη λειτουργία των ενεργών CD4 + και CD8 + κυττάρων (98). Επίσης, το αποτέλεσμα μιας κλινικής δοκιμής αποδεικνύει ότι οι ασθενείς με μη αναστρέψιμο μελάνωμα σταδίου III / IV παρουσίασαν βελτιωμένη επιβίωση μετά από θεραπεία με ένα ανθρώπινο IgG1κ αντι-CTLA-4 μονοκλωνικό αντίσωμα (99), το ipilimumab όπου είναι ο πρώτος αναστολέας που εγκρίθηκε για τη θεραπεία του καρκίνου από τον FDA των ΗΠΑ το 2011. Μια μετα-ανάλυση έχει δείξει τη μακροπρόθεσμη επιβίωση των ασθενών με προχωρημένο μελάνωμα σε 3 χρόνια στο 22% των ασθενών που έλαβαν θεραπεία με Ipilimumab, ενώ ένα υποσύνολο των ασθενών επιβίωσαν 10 χρόνια (100). Παρόλο που σήμερα έχει εγκριθεί για τη θεραπεία του μελανώματος το ipilimumab ως μονοθεραπεία, εξετάζεται η εφαρμογή του και σε άλλους τύπους καρκίνου όπως είναι το νεφροκυτταρικό καρκινώμα (RCC), ο μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC), ο καρκίνο του προστάτη και άλλα.

1.4.2.5 Το ανοσοποιητικό σημείο ελέγχου PD-1

Αν και αρχικά ανακαλύφθηκε πριν από το CTLA-4 το 1992 ως ένα μόριο που σχετίζεται με τον προγραμματισμένο θάνατο των T κυττάρων, το PD-1 δεν εκτιμήθηκε ως

συν-ανασταλτικός υποδοχέας που ρυθμίζει αρνητικά τη δραστική λειτουργία των T κυττάρων μέχρι αρκετά χρόνια αργότερα, όταν παρατηρήθηκε αυτοάνοση ασθένεια σε διαγονιδιακά ποντίκια που φέρουν PD-1 (+) T κύτταρα (101). Την ίδια στιγμή, το PDL1 και PD-L2 ανακαλύφθηκαν ως διπλοί προσδέτες για το PD-1 που αναστέλλουν την ενεργότητα της δραστικότητας των T κυττάρων μετά από τη δέσμευση τους με το PD-1 (102). Αν και υπάρχουν ενδείξεις ότι η σηματοδότηση του PD-1, όπως η σηματοδότηση του CTLA-4, μπορεί να αναστείλει την ενεργή διαφοροποίηση νωρίς κατά την διάρκεια της φάση επαγωγής της απόκρισης των T κυττάρων (103) και επίσης να προωθήσει την ανάπτυξη και την κατασταλτική λειτουργία των επαγωγίμων Tregs (104), η πλειονότητα των δεδομένων υποστηρίζει ότι το PD-1 έχει ρόλο στην καταστολή των ήδη διαφοροποιημένων effector στους περιφερικούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των όγκων, όπου η δέσμευση αυτού του συν-ανασταλτικού υποδοχέα προάγει την εξασθένηση των T κυττάρων (105). Πράγματι, ενώ η παροδική έκφραση του PD-1 λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της αρχικής ενεργοποίηση των T κυττάρων, η επαναρύθμιση και η διατήρηση της έκφρασης του PD-1 στα T κύτταρα συμβαίνει μετά από παρατεταμένη έκθεση σε αντιγόνα, όπως συμβαίνει κατά τη διάρκεια της χρόνιας ιογενούς λοίμωξης και στο πλαίσιο της προόδου των όγκων (105). Η έκφραση των προσδετών του PD-1 ενισχύεται επίσης από φλεγμονώδη ερεθίσματα και από τα δίκτυα σηματοδότησης που συχνά δραστηριοποιούνται στο μικροπεριβάλλον του όγκου, οδηγώντας σε υπερέκφραση τόσο του PD-L1 και όσο και του PD-L2 (106). Καθώς αυτά τα πρότυπα έκφρασης θέτουν την καταστολή των PD-1 + λεμφοκυττάρων διείσδυσης όγκων (TIL), το μονοπάτι του ανοσοποιητικού σημείου ελέγχου PD-1 αποτελεί ένα ιδανικό στόχο για τις ανοσοθεραπείες που στοχεύουν να διατηρήσουν ή να αποκαταστήσουν τη δραστικότητα των αντικαρκινικών T κυττάρων.

1.4.2.6 Ρυθμιστικοί μηχανισμοί της αρνητικής συν-διέγερσης μέσω του PD-1

Οι κύριες βιολογικές λειτουργίες του PD-1 είναι να διατηρήσει την περιφερική ανοχή και τις αποκρίσεις των T-κυττάρων σε ένα επιθυμητό φυσιολογικό εύρος. Επειδή το PD-1 / PD-L1 ρυθμιστικό σύστημα προκαλείται από ανοσοαποκρίσεις, δημιουργεί έναν αρνητικό βρόχο ανατροφοδότησης για την εξασθένηση τις τοπικής απόκρισης των T-κυττάρων και ελαχιστοποιεί την ιστική βλάβη. Το PD-1 ρυθμίζει την ενεργοποίηση των T-κυττάρων μέσω αλληλεπίδρασης με το PD-L1 και PD-L2 (102), (*Εικόνα 1.10*). Το PD-1 εκφράζεται κατά την ενεργοποίηση των T και B λεμφοκυττάρων. Λόγω της έκφρασης των προσδετών του, οι οποίοι εκφράζονται ευρέως σε μη-λεμφοματώδης ιστούς, το PD-1 δρα κυρίως για την μείωση της ενεργοποίησης των T-κυττάρων στην περιφέρεια. Η έκφραση του PD-L1 και σε

μικρότερο βαθμό η έκφραση του PD-L2, προκαλείται ως απάντηση στις φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η IFN γ (102). Έτσι, η ρύθμιση της δραστηριότητας των T-κυττάρων από το PD-1 συμβαίνει σε απόκριση στην κυτταρολυτική και δραστική λειτουργία των T-κυττάρων (π.χ. CD8 κυτταροτοξικό T λεμφοκύτταρο και τύπου 1 βοηθητικά (Th1) CD4 T κύτταρα) με ένα επαγωγίμο τρόπο. Τα PD-L1 και PD-L2, PD-1 μεταδίδουν κυρίως ένα αρνητικό συνδιεγερτικό σήμα μέσω της φωσφατάσης της τυροσίνης SHP2 για να εξασθενήσει την ενεργοποίηση των T-κυττάρων. Η στρατολόγηση της SHP2 εξασθενεί τη σηματοδότηση του TCR μέσω της αποφωσφορυλίωσης των εγγύς σηματοδοτικών στοιχείων (107). Αυτός ο μοριακός μηχανισμός αντικατοπτρίζει μια διχοτομία όσον αφορά τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς του CTLA-4 και PD-1. Έτσι, αντίθετα από το CTLA-4, η PD-1 ρυθμίζει άμεσα την TCR σηματοδότηση για την εξασθένηση της δραστηριότητας T-κυττάρων. Ωστόσο, πρόσφατη μελέτη δείχνει ότι το CD28 είναι ένας πρωταρχικός στόχος για την PD-1-επαγόμενη εξασθένηση της σηματοδότησης των T κυττάρων (108). Αυτό υποδηλώνει ότι τόσο το CTLA-4 όσο και το PD-1, τουλάχιστον εν μέρει, ενεργούν μέσω ενός παρόμοιου μοριακού μηχανισμού εξασθένησης όπου μεσολαβεί η CD28- συνδιέγερση (Εικόνα 1.10). Έτσι, η διαμόρφωση της σηματοδότησης του CD28 θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει ένα λειτουργικό σημείο σύγκλισης της CTLA-4 και PD-1-μεσολαβούμενης ρύθμισης. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το SHP2 δεν είναι απαραίτητο για αποκρίσεις σε θεραπεία με αντι-PD-1 σε εισαγωγή εξασθενημένων T-κυττάρων *in vivo* (109). Είναι κρίσιμο να ταυτοποιήθουν τα σηματοδοτικά γεγονότα των CTLA-4 και PD-1 για να καθοριστούν οι κοινοί και διακριτοί μοριακοί μηχανισμοί των ρυθμιστικών μονοπατιών των T-κυττάρων.

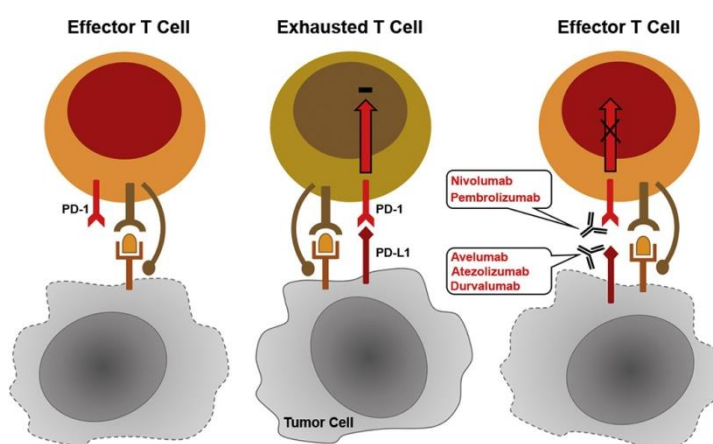
Η εξάντληση των T-κυττάρων είναι ένας σημαντικός μηχανισμός που περιορίζει τη δραστηριότητα των T-κυττάρων παρουσία της χρόνιας διέγερσης αντιγόνου και δρα για τη διατήρηση των κλώνων T-κυττάρων που διαφορετικά θα είχαν καταστραφεί υπό αυτές τις συνθήκες λόγω της επαγόμενης διέγερσης του κυτταρικού θανάτου. Σύμφωνα με αυτό, η σηματοδότηση του PD-1 προκαλεί μεταβολικό περιορισμό, που αποτελεί λειτουργικό οδηγό για την εξασθένηση των T-κυττάρων. Κατά τη σύνδεση, το PD-1 εξασθενεί τη γλυκόλυση αλλά ταυτόχρονα προάγει την οξείδωση των λιπαρών οξέων και τον καταβολισμό των λιπιδίων, προκαλώντας έτσι μια αλλαγή στην παραγωγή ενέργειας (110). Αντίθετα, η πρόσδεση του CTLA-4 εξασθενεί τη γλυκόλυση ανεξάρτητα από τη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπιδίων. Είναι ενδιαφέρον, ότι αυτός ο μεταβολικός διακόπτης εμπλέκεται στον προσδιορισμό της επίδρασης των T κυττάρων και οδηγείται εν μέρει από τη μιτοχονδριακή ρύθμιση (111). Τέτοιες αλλαγές είναι πιθανόν να οφείλονται στις αλλαγές της γονιδιακή έκφρασης και την επιγενετική ρύθμιση που προκαλούνται με τη συνεχή δέσμευση

του PD-1. Πράγματι, η διέγερση του χρόνιου αντιγόνου σε ιικά συστήματα οδηγεί σε δραματικές αλλαγές στη γονιδιακή ρύθμιση και τον σταθερό επιγενετικό επαναπρογραμματισμό των T κυττάρων (112,113). Οι μεταγραφικές, επιγενετικές και μεταβολικές αλλαγές ορίζουν την κατάσταση των εξασθενημένων T κυττάρων. Πρόσφατα δεδομένα έχουν δείξει ότι τέτοιες επιγενετικές αλλαγές μπορούν να αποτρέψουν την αποτελεσματικότητα του αποκλεισμού των σημείων ελέγχου με επακόλουθο να μειωθούν οι αποκρίσεις του όγκου στη θεραπεία.

Πρόσφατες μελέτες έχουν επίσης ταυτοποιήσει νέους λειτουργικούς ρόλους για τον άξονα σηματοδότησης PD-1 / PD-L1. Για παράδειγμα, η έκφραση του PD-L1 σε μακροφάγα μπορεί να οδηγήσει σε ενεργό έξωση των T κυττάρων από το μικροπεριβάλλον του όγκου (114). Αυτό υποδηλώνει ότι εκτός από τη ρύθμιση της ενεργοποίησης των T-κυττάρων και την κυτταρολυτική ικανότητα, η σηματοδότηση του PD-1 μπορεί επίσης να ρυθμίζει τη μεταφορά και μετανάστευση των T-κυττάρων. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι το PD-1 μπορεί επίσης να έχει ενδογενή κυτταρική λειτουργία στον όγκο (115). Μελλοντικές μελέτες είναι απαραίτητες για τον προσδιορισμό του βαθμού στην οποία συμβάλλουν αυτοί οι "μη-κανονικοί" μηχανισμοί στη θεραπευτική αποτελεσματικότητα.

1.4.2.7 Ανοσοποιητικοί αναστολείς σημείων ελέγχου που στοχεύουν το PD-1

Ο αποκλεισμός του PD-1 μονοπατιού μπορεί να ενισχύσει την αντι-καρκινική δραστηριότητα των T κυττάρων και προωθεί την ανάπτυξη θεραπειών αναστολής των σημείων ελέγχου στοχεύοντας το PD-1 σε ασθενείς με καρκίνο (Εικόνα 1.12).



Εικόνα 1.12 Μηχανισμός δράσης των εγκεκριμένων από τον FDA αναστολέων του ανοσολογικού σημείων ελέγχου PD-1 στη θεραπεία του καρκίνου

Το 2014, ο FDA ενέκρινε το ανθρώπινο IgG4κ μονοκλωνικό αντίσωμα, Nivolumab (Opdivo®, Bristol-Myers Squibb), ως την πρώτη θεραπεία αναστολής των σημείων ελέγχου στοχεύοντας το PD-1. Αυτή η έγκριση βασίστηκε στα αποτελέσματα της κλινικής δοκιμής CheckMate-037, η οποία απέδειξε βελτιωμένα ποσοστά αντικειμενικής ανταπόκρισης στο Nivolumab σε σχέση με τη χορήγηση χημειοθεραπείας σε ασθενείς με μη χειρουργήσιμο ή μεταστατικό μελάνωμα των οποίων οι καρκίνοι εμφάνισαν εξέλιξη νόσου μετά από τη θεραπεία με Ipilimumab ± έναν αναστολέα BRAF (Πίνακας 1.3), (116). Το Nivolumab έχει εγκριθεί από τότε ως θεραπεία πρώτης γραμμής για ασθενείς με μελάνωμα χωρίς μετάλλαξη BRAF και στους οποίους δεν έχει χορηγηθεί προηγούμενη θεραπεία μετά από δοκιμή φάσης III (117). Πρόσφατα, το Nivolumab επίσης εγκρίθηκε ως επικουρική θεραπεία για ασθενείς με μελάνωμα σταδίου III / IV που έχουν υποβληθεί σε πλήρη εκτομή, καθώς οι ασθενείς που έλαβαν Nivolumab σε σχέση με αυτούς που έλαβαν Ipilimumab είχαν μεγαλύτερο ελυθερο νόσου διάστημα (118). Ένας άλλος αναστολέας του ανοσοποιητικού σημείου ελέγχου έναντι του PD-1 που έχει λάβει σημαντική προσοχή τα τελευταία χρόνια είναι το Pembrolizumab, ένα εξανθρωπισμένο IgG4κ μονοκλωνικό αντίσωμα που διατίθεται από την Merck ως Keytruda®. Χορηγείται ως δεύτερη γραμμή θεραπείας σε ασθενείς με μη χειρουργήσιμο ή μεταστατικό μελάνωμα όπου η νόσος είχε προχωρήσει μετά τη χορήγηση Ipilimumab ± αναστολέα BRAF θεραπεία, όταν κλινικές δοκιμές επιβεβαίωσαν τα οφέλη της επιβίωσης μετά τη χορήγηση του (119). Επίσης το Pembrolizumab έχει εγκριθεί για τη θεραπεία του μεταστατικού NSCLC μετά από τις δοκιμές φάσης II / III στις οποίες αναφέρθηκε βελτιωμένη συνολική επιβίωση ασθενών με PD-L1 + όγκους οι οποίοι έλαβαν Pembrolizumab έναντι χημειοθεραπείας είτε δοσεταξέλης είτε πλατίνας (120).

1.4.2.8 Αναστολείς ανοσοποιητικού σημείου ελέγχου που στοχεύουν το PD-L1

Εκτός από τη διακοπή του PD-1 μονοπατιού μέσω αποκλεισμού των υποδοχέων PD-1 σε T λεμφοκύτταρα, η στόχευση του PDL1 με αναστολείς ανοσοποιητικών σημείων ελέγχου έχει επίσης αποδειχθεί χρήσιμη προσέγγιση για τη βελτίωση της δράσης των T κυττάρων (Εικόνα 1.12). Το 2016, το Atezolizumab (Tecentriq®) έγινε το πρώτο μονοκλωνικό αντι-PD-L1 αντίσωμα που εγκρίθηκε ως θεραπεία αποκλεισμού σημείων ελέγχου, σε τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα και στο NSCLC. Αν και πρόσφατα δεδομένα από μια τυχαίοποιημένη κλινική δοκιμή φάσης III δεν έδειξε κανένα όφελος επιβίωσης μετά τη χορήγηση Atezolizumab ως δεύτερης γραμμής θεραπείας σε σχέση με τη χορήγηση χημειοθεραπείας σε ασθενείς με προχωρημένο ουροθηλιακό καρκίνωμα, ωστόσο προκαλεί λιγότερες και λιγότερο σοβαρές παρενέργειες σε σχέση με τη

χημειοθεραπεία σε αυτούς τους ασθενείς (121). Στην περίπτωση ασθενών με NSCLC που έχουν ήδη υποβληθεί σε θεραπεία, το Atezolizumab έχει αποδειχθεί ανώτερη θεραπεία σε σχέση με τη χημειοθεραπεία, με αποτέλεσμα υψηλότερα συνολικά ποσοστά επιβίωσης από αυτά που επιτεύχθηκαν με τη χορήγηση δοσεταζάλης (122). Δύο άλλοι αναστολείς PD-L1, το Avelumab (Bavencio®, EMD Sorono, Inc. / Pfizer) και το Durvalumab (Imfinzi®, AstraZeneca / MedImmune) έχουν επίσης εγκριθεί. Με βάση τα αποτελέσματα των κλινικών μελέτων φάσης I / II (123,124), το Avelumab έλαβε έγκριση για τη χορήγηση του στο μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα, το οποίο έχει εμφανίσει εξέλιξη νόσου μετά από προηγούμενη χημειοθεραπεία και αποτελεί την πρώτη εγκεκριμένη από τον FDA θεραπεία για το μεταστατικό καρκίνωμα Merkel. Παρομοίως, το Durvalumab έχει λάβει έγκριση ως θεραπεία δεύτερης γραμμής για τον προχωρημένο μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνο, και η επίδρασή του στην καλύτερη επιβίωση ασθενών με NSCLC στη δοκιμή PACIFIC φάσης III (125) οδήγησε στην πλήρη έγκριση του για τη θεραπεία NSCLC σταδίου III, το οποίο δεν έχει εμφανίσει εξέλιξη νόσου μετά από ταυτόχρονη χημειοακτινοθεραπεία.

1.4.3 Το ανοσοποιητικό σύστημα στους τριπλά αρνητικούς ασθενείς με καρκίνο μαστού

Η υψηλότερη γονιδιακή αστάθεια και το σύνολο των μεταλλάξεων στους TNBC ασθενείς προκαλεί τη δημιουργία νεοαντιγόνων, τα οποία μπορούν να αναγνωριστούν ως «μη-εαυτοί» από το ανοσοποιητικό σύστημα. Συνεπώς, οι TNBCs ασθενείς έχουν υψηλότερη ποσότητα λεμφοκυττάρων που διεισδύουν στον όγκο(TILs)και περισσότερη PD-L1 πρωτεΐνη ή έκφραση του mRNA σε σύγκριση με άλλους υποτύπους καρκίνου του μαστού. Ο προσδέτης PD-L1 και το PD-1, εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανοσολογικής ανοχής. Η έκφραση του PD-L1 σχετίζεται σημαντικά με τη παρουσία των TILs (126), η οποία δείχνει ότι ο πιο κοινός μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης PD-L1 στους TNBC ασθενείς είναι η ρυθμιστική ανατροφοδότηση (επικήτητη αντίσταση) της ανοσολογικής δέσμευσης. Μια σημαντική συσχέτιση έχει επίσης βρεθεί μεταξύ της έκφρασης PD-L1-mRNA και της παρουσία του αριθμού αντιγράφων των PD-L1 αλλοιώσεων, όπου ο BLBC υπότυπος φαίνεται να έχει την υψηλότερη συχνότητα σε αυξήσεις /απαλοιφές του PD-L1 (17%)(127). Επιπλέον, η απώλεια της έκφρασης του PTEN στα TNBCs σχετίζεται με την υπερέκφραση του PD-L1, επιβεβαιώνοντας τη συσχέτιση μεταξύ της αυξημένης σηματοδότησης του PI3K και της παρουσίας του PD-L1 (128).

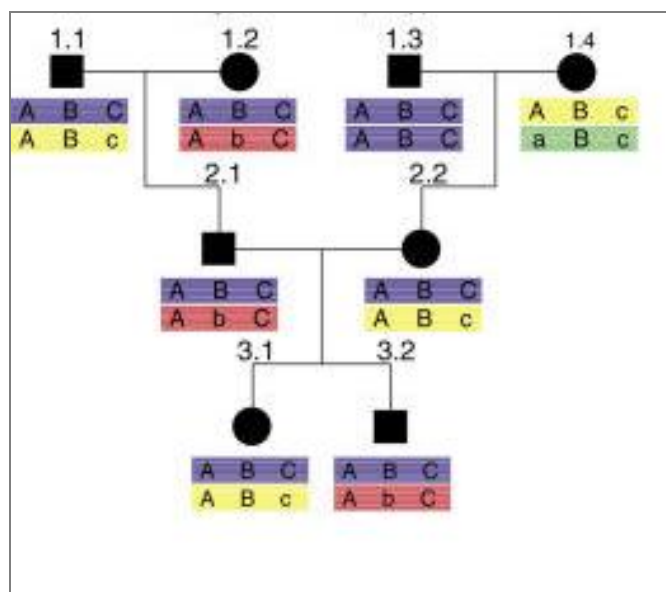
1.4.4 Η ανοσοθεραπεία στους τριπλά αρνητικούς ασθενείς με καρκίνο μαστού

Το γεγονός ότι οι TNBC καρκίνοι είναι ανοσογονικοί και εξαρτώμενοι από το ανοσοποιητικό σύστημα δείχνει ότι οι ανοσοθεραπείες θα μπορούσαν να ελεγχθούν σε αυτή την ομάδα των ασθενών. Δύο δοκιμές φάσης I με αναστολείς ανοσολογικών σημείων ελέγχου σε ασθενείς με προχωρημένο στάδιο TNBC έχουν αναφερθεί (129,130), όπου οι ασθενείς όπου βρέθηκαν να είναι θετικά στην έκφραση PD-L1 έλαβαν την Pembrolizumab με ποσοστό ανταπόκρισης 18,5% (πέντε από τις 27 ασθενείς).

Μέχρι στιγμής, διαφορετικές κλινικές δοκιμές είναι σε εξέλιξη για τον καθορισμό του ρόλου των αναστολέων των ανοσοποιητικών σημείων ελέγχου μόνες ή και σε συνδυασμό. Τρεις κλινικές δοκιμές σε TNBC ασθενείς σταδίου I-III βρίσκονται σε εξέλιξη για την αξιολόγηση της συνδυαστικής χορήγησης αναστολέων των ανοσοποιητικών σημείων ελέγχου με neo-adjuvant χημειοθεραπεία. Στη δοκιμή NeoTRIPaPDL1 (NCT02620280) φάσης III, ασθενείς με τοπικά προχωρημένο TNBC θα λάβουν τυχαία nab-paclitaxel και καρβοπλατίνη με ή χωρίς τον PD-L1 αναστολέα (Atezolizumab). Επίσης σε μια δοκιμή φάσης II θα αξιολογηθεί το Atezolizumab σε συνδυασμό με nab-paclitaxel (NCT02530489), ενώ σε μια δοκιμή φάσης I / II θα ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα του Durvalumab σε συνδυασμό με εβδομαδιαία χορήγηση του nab-paclitaxel ακολουθούμενη από μεγάλη δόση χημειοθεραπείας που περιέχει κυκλοφωσφαμίδη και δοξορουβικίνη (NCT02489448).

πολυμορφισμού ενός νουκλεοτιδίου προσδιορίζονται από: (1) το χρονικό διάστημα από την εμφάνιση της μετάλλαξης, (2) την εξελικτική πίεση σε βιολογικά σημαντικές παραλλαγές και εκείνες που συνδέονται με τη λειτουργική παραλλαγή, (3) την τυχαία γενετική μετατόπιση και (4) τα συμβάντα συμφόρησης.

Οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου στην ίδια χρωμοσωμική περιοχή δεν κληρονομούνται τυχαία, αλλά ως συνδυασμοί αλληλόμορφων, που σχηματίζουν μοτίβα απλότυπου. Φαίνεται ότι το γονιδίωμα είναι οργανωμένο σε διακριτά τμήματα διαταραχής ισορροπίας σύνδεσης (LD), που παρεμποδίζονται από περιοχές όπου η LD διασπάται γρήγορα (135). Έτσι, η πολυπλοκότητα της ανάλυσης των SNP σε ένα γονίδιο ή τόπο μπορεί να μειωθεί με την ανάλυση των δεικτών που κληρονομούνται από έναν απλότυπο. Πρακτικά, οι απλότυποι μπορούν να προκύπτουν από την LD ανάλυση μιας περιοχής σε μη σχετιζόμενα άτομα ή να χαρακτηριστούν μοριακά σε γενεαλογικά δέντρα (Εικόνα 1.14). Είναι αξιοσημείωτο ότι τόσο η συχνότητα των SNP όσο και η έκταση της LD μπορεί να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των πληθυσμών. Επιπλέον, υπάρχουν πολλές ιδιωτικές παραλλαγές του κάθε πληθυσμού (134).



Εικόνα 1.14 Καθορισμός απλοτύπων σε ένα γενεαλογικό δέντρο (136)

1.5.2 Οι πολυμορφισμοί στον καρκίνο

Οι μελέτες γενετικής συσχέτισης των πολυμορφισμών με τον καρκίνο μπορούν να χωριστούν σε δύο ευρείες κατηγορίες αφενός τη διερεύνηση της ευαισθησίας και αφετέρου τη διερεύνηση των αποτελεσμάτων με στόχο να καθοριστούν οι προγνωστικές πληροφορίες που μπορούν να ληφθούν σχετικά με την επιβίωση, τις επιπλοκές ή την ανταπόκριση στη φαρμακολογική παρέμβαση (Φαρμακογονιδιωματική). Μέχρι σήμερα, σχεδόν όλες οι

δημοσιευμένες μελέτες έχουν εξετάσει μόνο μερικά SNPs ή γονίδια και σε σπάνιες περιπτώσεις παραλλαγές εντός γονιδίων ενός βιολογικού μονοπατιού ή της σχετικής βιολογικής διεργασίας, όπως είναι τα γονίδια μεταβολισμού του DNA (π.χ. XRCC1 και XRCC3) ή του ξενοβιοτικού μεταβολισμού (π.χ. NAT1 και NAT2). Οι νεώτερες τεχνικές και οι εξελίξεις στην βιοπληροφορική έρευνα καθιστά δυνατή τη δραματική αύξηση του αριθμού των γονιδίων που εξετάζονται σε μια μελέτη (136).

1.5.2.1 Ευαισθησία των πολυμορφισμών στον καρκίνο

Η αιτιολογία ενός συγκεκριμένου καρκίνου πιθανώς συνδέεται με ένα σύνολο γενετικών παραλλαγών, πολλές από τις οποίες θα μπορούσαν να αλληλεπιδρούν δυσμενώς με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Μελέτες στον καρκίνο του πνεύμονα έχουν διερευνήσει γονίδια σημαντικά για τον μεταβολισμό του καπνού και τον εθισμό στη νικοτίνη. Η προσέγγιση αυτή επικεντρώνεται στην αλληλεπίδραση ενός ισχυρού καρκινογόνου περιβάλλοντος και έχει σαν σκοπό να εντοπιστούν γενετικές παραλλαγές που προσδίδουν ευαισθησία ή προστασία από τον καπνό του τσιγάρου. Από την άποψη αυτή, η αλληλεπίδραση γονιδίου-περιβάλλοντος αντιπροσωπεύει ένα άγχος στον ξενιστή και ίσως εντείνει το φαινοτυπικό αποτέλεσμα του «αιτιατού» SNP. Επίσης σε μία μελέτη έχει δείχτει ότι τα άτομα που είναι ομόζυγα για το αλληλόμορφο A του γονιδίου της μυελοϋπεροξειδάσης, MPO, έχουν σημαντικά μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα σε σύγκριση με άτομα με δύο αλληλόμορφα G (137).

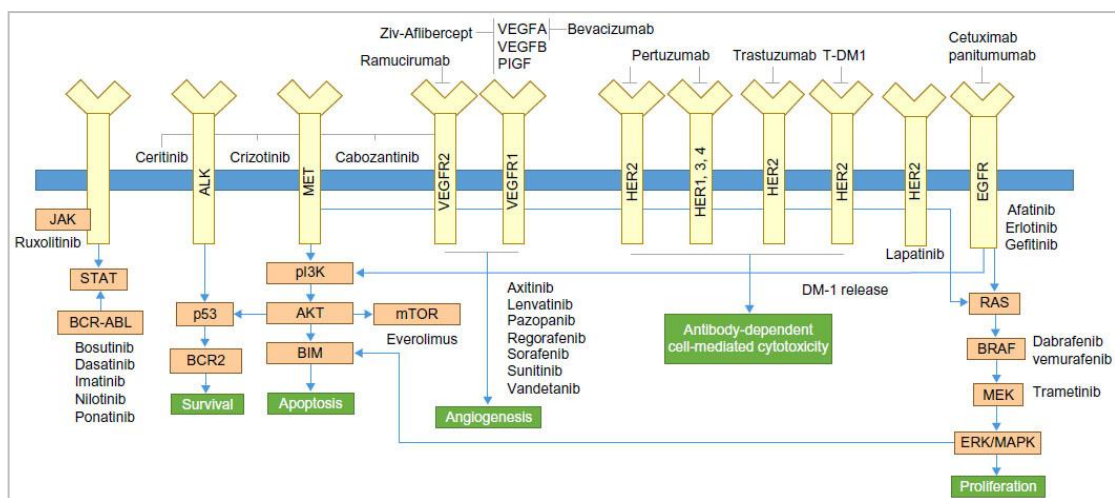
Είναι αξιοσημείωτο ότι, σε ένα πλαίσιο, ο πολυμορφισμός ή ο απλότυπος μπορεί να είναι προστατευτικός, ενώ σε ένα άλλο, προσδίδει αυξημένη ευαισθησία, όπως είναι η σύνδεση των πολυμορφισμών της N-ακετυλοτρανσφεράσης 2 (NAT2) με τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης και του παχέος εντέρου. Τα γονίδια NAT1 και NAT2 κωδικοποιούν τα ένζυμα που είναι σημαντικά για τη βιομετατροπή αρωματικών και ετεροκυκλικών αμινών, που ονομάζονται καρκινογόνα. Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου της ουροδόχου κύστης είναι ιδιαίτερα υψηλός στον βραδύτερο φαινότυπο του ακετυλιωτή NAT2 και επιδεινώνεται από το ιστορικό του καπνίσματος. Από την άλλη πλευρά, για τον καρκίνο του παχέος εντέρου που σχετίζεται με ετεροκυκλική αμίνη, ο φαινότυπος ταχείας ακετυλίωσης NAT2 προσδίδει υψηλότερο κίνδυνο (138).

1.5.2.2 Τα αποτελέσματα των πολυμορφισμών στον καρκίνο

Η αύξηση κινδύνου για μεταστατικό ή επιθετικό όγκο μπορεί να συσχετιστεί με συγκεκριμένα αλληλόμορφα. Μέχρι σήμερα, διάφορες μελέτες έχουν δείξει τη σημασία των

γενετικών παραλλαγών ως προγνωστικοί δείκτες. Οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο CYP3A4 σχετίζονται με τη μακροχρόνια έκβαση στον καρκίνο του προστάτη. Συγκεκριμένα, ο πολυμορφισμός A-290G στον υποκινητή SNP στο CYP3A4, ένα γονίδιο που εμπλέκεται στην οξείδωση της τεστοστερόνης σε 2B-, 6B ή 15B-υδροξυτεστοστερόνη, φαίνεται να συνδέεται με τη σοβαρότητα της νόσου, σύμφωνα με το στάδιο TNM και το Gleason βαθμό. Η επίδραση αυτή είναι ισχυρότερη στους ηλικιωμένους άνδρες χωρίς οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του προστάτη (139).

Η φαρμακογονιδιωματική είναι η μελέτη της κληρονομικής βάσης των διαφορών μεταξύ διαφορετικών ατόμων, στην απόκριση των φαρμάκων (Εικόνα 1.14). Έχει εκτιμηθεί ότι οι κληρονομικές διαφορές συνιστούν την ατομική διακύμανση που παρατηρείται στην απόκριση του φαρμάκου (140). Έχουν υπάρξει δύο παράλληλες προσεγγίσεις στη φαρμακογονιδιωματική. Μια προσέγγιση είναι η αναζήτηση γενετικών παραλλαγών που σχετίζονται με σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες, οι οποίες, με τη σειρά τους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εξέταση ατόμων που δεν πρέπει να λαμβάνουν το εν λόγω φάρμακο. Η δεύτερη προσέγγιση εστιάζεται στην αναγνώριση των δεικτών που προβλέπουν την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Η φαρμακογονιδιωματική μπορεί να οδηγήσει στην «εξατομικευμένη ιατρική». Η επιλογή του φαρμάκου του κάθε ατόμου θα πρέπει να γίνεται με βάση συμπεράσματα που έχουν εξαχθεί από μεγάλες πληθυσμιακές μελέτες. Η κλινική έρευνα έχει κυρίως επικεντρωθεί στον μεταβολισμό των φαρμάκων, δηλαδή στην πρόσληψη, την ενεργοποίηση, την αποικοδόμηση και την απέκκριση, για τον εντοπισμό των πολυμορφισμών που σχετίζονται με απειλητικές για τη ζωή ανεπιθύμητες αντιδράσεις.



Εικόνα 1.14 Ανασκόπηση σωματικών καρκινικών βιοδεικτών και στοχευόμενες θεραπείες (141).

1.5.3 Η σημασία των πολυμορφισμών στον καρκίνο του μαστού

Πολλές μελέτες έχουν διεξαχθεί σε ομοιογενείς πληθυσμούς όσον αφορά τη συσχέτιση των πολυμορφισμών με τις μεταλλάξεις των γονιδίων BRCA1 και BRCA2 καθώς και διάφορους υποτύπους καρκίνου του μαστού, όπως είναι ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (TNBC).

Το 2007, δημιουργήθηκε η κοινοπραξία CIMBA με στόχο τη διερεύνηση των γενετικών τροποποιητών του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου στους φορείς μεταλλάξεων στα BRCA1 και BRCA2 γονίδια (142). Χρησιμοποιώντας έως και 30.000 BRCA1 και BRCA2 φορείς μεταλλάξεων με καρκίνο μαστού ή ωοθηκών ή και απουσία νόσου, το CIMBA αξιολογήσε τα SNP που ανακαλύφθηκαν σε προηγούμενες υποψήφιες μελέτες στα γονίδια FGFR2, TNRC9, RAD51, TP53, ERCC4, CASP8, ZRCC1, IRS1, και σε μια περιοχή στο χρωμόσωμα 6p22 (143). Οι συσχετίσεις των SNP δεν ήταν πάντα συναφείς ανάμεσα στους φορείς των μεταλλάξεων BRCA1 και BRCA2. Για παράδειγμα, ο τόπος FGFR2 βρέθηκε να σχετίζεται με καρκίνο μαστού μόνο σε φορείς της μετάλλαξης BRCA2, ενώ ο TNRC9 συσχετίστηκε τόσο με τον BRCA1 όσο και με τον BRCA2 (144).

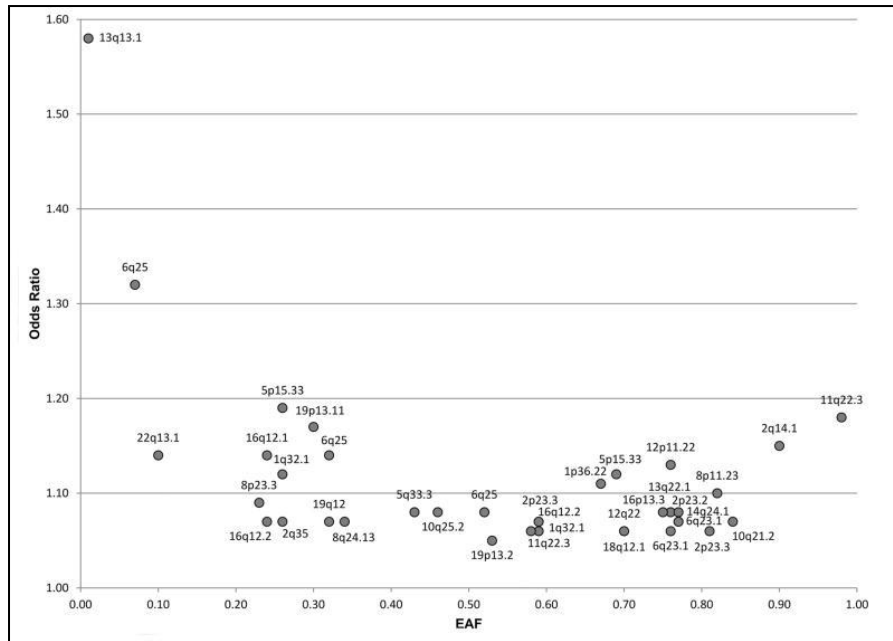
Σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2010 σε γυναίκες που έχουν διαγνωστεί με καρκίνο του μαστού ηλικίας κάτω των 40 ετών έδειξε ότι πολλαπλά SNP σχετίζονται με δύο ανεξάρτητα σήματα στο 19p13 τα οποία έχουν ταυτοποιηθεί μεταξύ των φορέων μετάλλαξης BRCA1 αλλά όχι του BRCA2 (145). Αυτά τα SNP βρέθηκαν να σχετίζονται με τον τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού (146). Αυτά τα αποτελέσματα αργότερα επαναλήφθηκαν από τον Couch et.al. σε μια μελέτη που είχε στόχο να διερευνήσει τις συσχετίσεις μεταξύ των SNPs στα 19p13.1 και στο ZNF365 σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού και ωοθηκών (147). SNPs στην περιοχή 19p13.1 βρέθηκε να συσχετίζεται με τον ER-αρνητικό καρκίνο του μαστού για φορείς μεταλλάξεων στα BRCA1 και BRCA2 γονίδια και με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου ωοθηκών.

Η γενετική προδιάθεση στον καρκίνο του μαστού σε BRCA1 και BRCA2 φορείς μεταλλάξεων, έχει δείξει ότι ο κίνδυνος καρκίνου του μαστού για τους φορείς μεταλλάξεων BRCA1 και BRCA2 μπορεί να επηρεαστεί από διαφορετικούς τόπους. Τα SNPs που σχετίζονται με τον συνολικό κίνδυνο καρκίνου του μαστού στο γενικό πληθυσμό έχουν συσχετιστεί με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε BRCA2 φορείς μετάλλαξης, ενώ τα SNPs που σχετίζονται με ER-αρνητικό καρκίνο του μαστού στον γενικό πληθυσμό συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου μαστού σε φορείς μετάλλαξης BRCA1. Αυτά

τα ευρήματα είναι σύμφωνα με το γεγονός ότι οι φορείς των BRCA2 μεταλλάξεων είναι είναι πολύ πιθανότερο να υπάρχουν σε ER-θετική νόσο από ότι οι φορείς της BRCA1 μετάλλαξης (148).

Παρόμοια με τον γενικό πληθυσμό, η CIMBA έδειξε ισχυρή συσχέτιση σε ER θετικό καρκίνο μαστού για έντεκα διαφορετικούς τόπους προδιάθεσης σε 11.421 BRCA1 και 7.080 BRCA2 φορείς μετάλλαξης (149). Σε φορείς μετάλλαξεων BRCA1, υπήρχαν σημαντικά ισχυρότερες συσχετίσεις με την εμφάνιση ER-αρνητικού καρκίνου όσον αφορά τα SNPs στα FGFR2 και SLC4A7 /NEK10. Επιπλέον, ένα SNP στο TOX3 / TNRC9 συσχετίζεται με ER-θετική νόσο, αλλά όχι ER-αρνητική, και ένα SNP στο LSP1 συσχετίζεται με ER-αρνητική αλλά όχι με ER-θετική νόσο. Στους φορείς μετάλλαξεων στο BRCA2 γονίδιο, έχουν βρεθεί SNP κοντά στο ESR1 ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή όχι οιστρογονικού υποδοχέα. Ο Kuchenbaecker et.al αξιολόγησαν 74 γνωστές θέσεις προδιάθεσης στον καρκίνο μαστού σε 15.252 διαφορετικούς φορείς μετάλλαξης BRCA1 και 8.211 φορείς μετάλλαξης BRCA2 (150). Αυτή η μελέτη επιβεβαίωσε 4 σημαντικά SNPs σε τρεις διαφορετικούς τόπους του BRCA1: 19p13, 6q25.1 και 12p11. Επιπλέον, 15 και 8 τόποι προδιάθεσης συσχετίστηκαν ($P < 0,05$) με αυξημένο κίνδυνο ER-αρνητικό καρκίνο σε φορείς μετάλλαξης BRCA1 και BRCA2, αντίστοιχα. Όσον αφορά την ER-θετική νόσο, 10 SNPs συσχετίστηκαν ($P < 0,05$) με κίνδυνο σε φορείς BRCA1 και 14 SNP σχετίζονταν με κίνδυνο σε φορείς BRCA2.

Η Milne et.al πρόσφατα αξιολόγησαν περίπου 11,5 εκατομμυρίων SNPs με τη χρήση δεδομένων της πλατφόρμας OncoArray από 21,468 ER αρνητικές περιπτώσεις καρκίνου του μαστού και 100.594 μάρτυρες (151). Σε αυτή τη μελέτη ταυτοποιήθηκαν 10 νέα γενετικά σημαντικά SNPs με εμφανή προδιάθεση σε ER-αρνητικό όγκο (Εικόνα 1.15). Πέντε SNPs βρέθηκαν επίσης να σχετίζονται με τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού. Επιπλέον, 105 επιπλέον SNPs που προηγουμένως έχει βρεθεί ότι συσχετίζονται με τον συνολικό κίνδυνο καρκίνου του μαστού βρέθηκε επίσης ότι συσχετίζονται με ER-αρνητικό καρκίνο του μαστού ($P < 0,05$), αυξάνοντας τον συνολικό αριθμό των SNPs σε 125 σε ER-αρνητικό όγκο. Αυτά τα SNPs αντιπροσωπεύουν περίπου το 14% του συνολικού κινδύνου για οικογενή ER αρνητικό καρκίνο μαστού. Από τα SNP που σχετίζονται με τον συνολικό κίνδυνο καρκίνου του μαστού, 24 σχετίζονται επίσης με κίνδυνο καρκίνου του μαστού σε φορείς μετάλλαξης BRCA1 (151).



Εικόνα 1.15 SNPs που σχετίζονται με ER-αρνητικό καρκίνο του μαστού (151).

1.5.4 Συσχέτιση του πολυμορφισμού rs4143815-PDL1 με τον κίνδυνο καρκίνου

Το ανθρώπινο γονίδιο *PD-L1* (Gene ID: 29,126), που κωδικοποιεί διαμεμβρανική πρωτεΐνη μεγέθους 40 kDa, βρίσκεται στο χρωμόσωμα 9p24.2. Λαμβάνοντας υπόψη το ρόλο του *PD-L1* στην ανοσολογική διαφυγή κατά την ανάπτυξη του καρκίνου, τα γονιδιακά μετάγραφα του *PD-L1* μπορεί να σχετίζονται στενά με τον κίνδυνο του καρκίνου. Η 3'-μη μεταφραζόμενη περιοχή (3'-UTR) του αγγελιοφόρου RNA είναι μία από τις πιο σημαντικές περιοχές όσο αφορά τη ρύθμιση της μετα-μεταγραφικής έκφρασης του *PD-L1* επειδή μπορεί να αποτελεί στόχο microRNAs (miRNA), η οποία κανονικά μεσολαβεί στην καταστολή της γονιδιακής μετάφρασης. Δομικές μεταβολές στο 3'-UTR του *PD-L1*, συμπεριλαμβανομένων διαγραφών, επαναλήψεων και μετατοπίσεων, οδηγούν σε αποκλίνουσα έκφραση του *PD-L1* σε αρκετούς καρκίνους (152), υποστηρίζοντας την υπόθεση ότι οι γονιδιακές παραλλαγές στο 3'-UTR του *PD-L1* μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χρήσιμοι γενετικοί δείκτες για την εκτίμηση της προδιάθεσης στον καρκίνο.

Ωστόσο, κατά πόσο οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο *PD-L1* σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για τον καρκίνο δεν έχει καθοριστεί. Ο rs4143815 C> G, ένας κοινός μοναδικός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (SNP) και μια θέση δέσμευσης του miR-570 που βρίσκεται στο 3'-UTR του *PD-L1*, όπου μπορεί να εξασθενήσει την αποικοδόμηση του mRNA με τη μεσολάβηση του miRNA και να οδηγήσει σε επαναρύθμιση της έκφρασης *PD-L1* (153). Αρκετές μελέτες έχουν γίνει για να διερευνηθεί η σύνδεση του rs4143815 C> G με τον

κίνδυνο για καρκίνο, αλλά έχουν προκύψει αντικρουόμενα αποτελέσματα. Μερικοί μελέτες έχουν δείξει ότι το rs4143815 C> G αυξάνει τον κίνδυνο για καρκίνο, ενώ άλλες μελέτες δεν έχουν διαπιστώσει οποιαδήποτε συσχέτιση μεταξύ αυτού του SNP και του κινδύνου καρκίνου (154,155). Πρόσφατα μία μετα-ανάλυση αξιολόγησε τη σχέση μεταξύ rs4143815 C> G και προδιάθεση στον καρκίνο. Για αυτό το λόγο διεξήχθη συστηματική βιβλιογραφική αναζήτηση για την επιλογή των μελετών και του (OR) με 95% διάστημα εμπιστοσύνης (CI) για να αξιολογηθεί η ισχύς της συσχέτισης. Έντεκα επιλέξιμες μελέτες που περιείχαν 3711 περιπτώσεις και 3704 μάρτυρες καταχωρήθηκαν στη μετα-ανάλυση. Τα αποτελέσματα πρότειναν ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του rs4143815 C> G και των κινδύνων για καρκίνο (G vs. C: OR = 1.386, 95% CI: 1.132-1.696, $\rho = 0.002$. GG έναντι CG + CC: OR = 1,843 95% CI: 1,300-2,613, $\rho = 0,002$. GG + CG έναντι CC: OR = 1.280, 95% CI: 1.040-1.576, $\rho = 0.020$). Η ανάλυση υποομάδων με βάση τον τύπο του καρκίνου έδειξε ότι το *PD-L1* rs4143815 C> G μπορεί να αυξήσει την ευαισθησία στον καρκίνο του στομάχου (G vs. C: OR = 1.842, 95% CI: 1.403-2.418, $\rho < 0.001$) και καρκίνο ουροδόχου κύστεως (G έναντι C: OR = 2.015, 95% CI: 1.556-2.608, $\rho < 0.001$) και οι φορείς GG του γονότυπου του *PD-L1* rs4143815 C> G μπορεί να έχουν υψηλότερους κινδύνους HCC (GG έναντι CG + CC: OR = 2.226 95% CI: 1.562-3.172, $\rho < 0.001$) (156). Το *PD-L1* rs4143815 C> G μπορεί να προκαλέσει αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο, υποδεικνύοντας ότι αυτό το SNP μπορεί να συμβάλει στην παθογένεση του καρκίνου και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πιθανός βιοδείκτης που να προβλέπει την προδιάθεση στον καρκίνο.

Σε μία αναδρομική μελέτη, όπου είχε ως στόχο την ταυτοποίηση ανοσογενετικών βιοδεικτών, συμμετείχαν 549 καυκάσιοι ασθενείς με τοπικά προχωρημένο καρκίνο προστάτη και στους οποίους εφαρμόστηκε αγωγή με ραδιοθεραπεία (RT). Στη μελέτη αυτή, έγιναν συσχετίσεις μεταξύ 447 SNP σε 77 γονίδια του ανοσοποιητικού συστήματος και της κλινικής έκβασης των ασθενών αυτών μετά από 5-10 έτη παρακολούθησης. Ο πολυμορφισμός rs4143815 στο γονίδιο *PD-L1* αποτέλεσε τη μοναδική γενετική παραλλαγή που βρέθηκε να συσχετίζεται με την επανεμφάνιση της νόσου. Οπότε ο rs4143815-PDL1 πολυμορφισμός αποτελεί ένα νέο ανοσογενετικό βιοδείκτη στον καρκίνο προστάτη, δίνοντας νέες ιδέες στην αλληλεπίδραση της ακτινοθεραπείας και του ανοσοποιητικού συστήματος (157).

Πρόσφατα, μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα της ανοσοθεραπείας με τη χορήγηση του φαρμάκου Nivolumab, σε σχέση με τα SNPs των *PD-1* / *PD-L1* σε ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC). Ο αντικειμενικός ρυθμός ανταπόκρισης (ORR) ήταν 25%, 15% και 0% για τους γονότυπους G / G, G / T και T/T του *PD-L1*

rs2282055. Το αλληλόμορφο G του *PD-L1* rs2282055 συσχετίστηκε σημαντικά με καλύτερη κλινική ανταπόκριση σε σύγκριση με το αλληλόμορφο T ($P = 0,0339$ [δοκιμή τάσης Cochran-Armitage]). Ο διάμεσος χρόνος PFS ήταν 2,6 μήνες (95% διάστημα εμπιστοσύνης [CI], 1,8 μήνες έως 4,3 μήνες) για τους γονότυπους G / G και G / T και 1,8 μήνες (διάστημα εμπιστοσύνης 95%, 0,4 μήνες έως 2,2 μήνες) για τον γονότυπο T / T ($P = 0.0163$). Επιπλέον, οι γονότυποι C / C και C / G του *PD-L1* rs4143815 συσχετίστηκαν σημαντικά με τον καλύτερο αντικειμενικό ρυθμό ανταπόκρισης (ORR) και ελεύθερο νόσου διάστημα (PFS) σε ασθενείς με NSCLC που έλαβαν θεραπεία με Nivolumab. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα rs2282055 και rs4143815 μπορεί να αποτελούν βιοδείκτες για την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου Nivolumab (158).

1.5.5 Συσχέτιση του πολυμορφισμού rs4938723-miR-34 με τον κίνδυνο καρκίνου

Οι πολυμορφισμοί (SNPs) στα miRNA και στις θέσεις στόχους αντιπροσωπεύουν μια πρόσφατα αναγνωρισμένη πτυχή της έρευνας σχετικά με τον καρκίνο που σχετίζεται με το miRNA και αναμένεται να ρίξει φως στη μηχανιστική συμβολή των miRNAs στην καρκινογένεση και να προσφέρει ευκαιρίες για την εκμετάλλευσή τους στην καθημερινή κλινική πράξη (159,160). Τα SNP σε γονίδια miRNA και / ή σε θέσεις δέσμευσης miRNA γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες φαίνεται να ενισχύουν τον ήδη πολύπλευρο ρόλο των miRNAs στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (161,162). Μέχρι σήμερα υπάρχουν αρκετές μελέτες σχετικά με την πιθανή χρήση των πολυμορφισμών που σχετίζονται με τα miRNA σαν βιοδείκτες στον καρκίνο του μαστού, που δείχνουν ότι αυτά τα SNPs μπορεί να είναι χρήσιμα εργαλεία για τον εντοπισμό των γυναικών που διατρέχουν υψηλό κίνδυνο ανάπτυξης αυτής της κακοήθειας (163–165).

Η οικογένεια των miR-34 περιλαμβάνει τα miR-34a, miR-34b και miR-34c. Τα miR-34b και miR-34c κωδικοποιούνται από ένα κοινό πρωτεύον αντίγραφο (pri-miR-34b / c) (166), ο υποκινητής του οποίου περιέχει θέσεις δέσμευσης του p53. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η παραλλαγή C>T της rs4938723 στην περιοχή του υποκινητή του pri-miR-34b / c μπορεί να επηρεάσει τη σύνδεση του μεταγραφικού παράγοντα GATA-X και κατά συνέπεια την έκφραση του pri-miR-34b / c (167). Ο rs4938723 T>C πολυμορφισμός έχει βρεθεί ότι συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ηπατοκυτταρικού καρκίνου (168), καρκίνου του προστάτη (169), καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (170) και καρκίνου του παχέος εντέρου (171).

Ο πολυμορφισμός rs4938723 έχει βρεθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας. Συγκεκριμένα η εμφάνιση του ετερόζυγου TC έναντι

του υπερ-δεσπόζοντος TT (overdominant) πολυμορφισμού rs4938723 έχει βρεθεί να μειώνει τον κίνδυνο της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας. Η εμφάνιση του αλληλόμορφου TC μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο παιδικής οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας σε σύγκριση με το αλληλόμορφο TT (OR = 0,52, 95% CI = 0,33-0,83, p = 0,006) (169).

Ωστόσο η υπερέκφραση της οικογένειας miR-34 καταστέλλει τη γαστρική καρκινογένεση, ενώ η μείωση της ρύθμισης της οικογένειας miR-34 προάγει την ογκογένεση. Το p53 μπορεί να προσδεθεί στον υποκινητή του miR-34b / c, οδηγώντας σε αύξηση της έκφρασης miR-34b / c. Σε μία μελέτη εξεταστηκε ο ρόλος των πολυμορφισμών miR-34b / c rs4938723 και TP53 Arg72Pro στην προδιάθεση του γαστρικού καρκίνου. Συγκεκριμένα, αναλύθηκαν οι πολυμορφισμοί αυτοί σε 197 ασθενείς με γαστρικό καρκίνο και 289 φυσιολογικούς μάρτυρες. Βρέθηκε ότι οι γονότυποι CT και CT / CC του miR-34b / c rs4938723 συσχετίζονται με σημαντικά μειωμένο κίνδυνο καρκίνου του γαστρικού ιστού σε σύγκριση με τον γονότυπο TT (CT έναντι TT: αναλογία πιθανότητας [OR] = 0,66, εμπιστοσύνη 95% διάστημα [95% CI], 0,45-0,97 και CT / CC έναντι TT: OR = 0,67, 95% CI, 0,47-0,97, αντίστοιχα), υποδεικνύοντας ότι το miR-34b / c rs4938723 μπορεί να έχει προστατευτική επίδραση στον κίνδυνο γαστρικού καρκίνου (172).

Σκοπός

Σύμφωνα με στατιστικές μελέτες των τελευταίων χρόνων ο καρκίνος του μαστού βρίσκεται σταθερά στην πρώτη θέση των πιο συχνά απαντώμενων τύπων καρκίνου και είναι η δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο στον γυναικείο πληθυσμό. Τα υψηλά αυτά ποσοστά επιπολασμού και θνησιμότητας της συγκεκριμένης κακοήθειας δημιουργούν ερωτηματικά στην επιστημονική κοινότητα δεδομένης της μεγάλης προόδου τόσο στην διαλεύκανση μεγάλου μέρους της μοριακής βάσης της καρκινογένεσης του μαστού όσο και στην αντιμετώπιση σε κλινικό επίπεδο των ασθενών, λόγω της βελτίωσης των διαγνωστικών μεθόδων και της εφαρμογής στοχευμένων θεραπειών. Σήμερα η παραδοξότητα αυτή αποδίδεται εν πολλοίς στην μοριακή αλλά και κλινική ετερογένεια του καρκίνου του μαστού, η οποία καθιστά την συγκεκριμένη κακοήθεια ένα σύνολο ασθενειών με διαφορετική κλινική συμπεριφορά. Μία επιπλέον αιτία αυτού του παράδοξου φαινομένου είναι η ανεπάρκεια των προγνωστικών δεικτών που χρησιμοποιούνται σήμερα στην κλινική πράξη να προβλέψουν με ακρίβεια την πορεία της ασθένειας ή/και την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία.

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη και η κλινική αξιολόγηση των πολυμορφισμών μονήρους νουκλεοτιδίου του γονιδίου *PD-L1* rs4143815 C>G και miR-34 rs4938723 T>C ως νέων μοριακών δεικτών για την πρόγνωση του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού. Για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε συλλογή και επεξεργασία του καρκινικού ιστού 114 γυναικών με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού και αίμα 124 υγιών γυναικών. Ακολούθησε σχεδιασμός και εφαρμογή της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) για την ανίχνευση των εξεταζόμενων πολυμορφισμών στα υπό μελέτη δείγματα και εκτενής βιοστατική ανάλυση για την διερεύνηση της κλινικής αξίας των εν λόγω πολυμορφισμών.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Συλλογή βιολογικού υλικού και κλινικοπαθολογικών δεδομένων των ασθενών με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού

Για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης μελέτης συλλέχθηκαν κατόπιν τυχαίας επιλογής, μονιμοποιημένος και έγκλειστος σε παραφίνη καρκινικός ιστός από 114 ασθενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένο τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού, κατά την περίοδο 2000-2014. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στην Πανεπιστημιακή Γυναικολογική και Μαιευτική κλινική του νοσοκομείου Αλεξάνδρα ΓΝΑ που εντάσσεται στην Ιατρική Σχολή του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Κριτήρια αποκλεισμού για την παρούσα μελέτη αποτέλεσαν:

- Η ύπαρξη μεταστατικής νόσου κατά τη διάγνωση
- Το θετικό οικογενειακό ιστορικό για καρκίνο του μαστού (οριζόμενο ως ύπαρξη 1^{ου} βαθμού συγγενή με καρκίνο του μαστού ή/και γνωστές μεταλλάξεις στα γονίδια BRCA1 και BRCA2),
- Το ατομικό αναμνηστικό προηγούμενης κακοήθειας και
- Η απουσία υπογεγραμμένου εντύπου συγκατάθεσης.

Για τη σύγκριση των αποτελέσμων κρίθηκε απαραίτητη συλλογή δείγματος αίματος από 124 υγιείς γυναίκες ίδιας ηλικίας με τις ασθενείς (+/- 2 έτη) καθώς και της ίδιας εθνικότητας (το σύνολο των συμμετέχοντων ανήκε στην Καυκάσια φυλή και κατοικούσαν στην ίδια γεωγραφική περιοχή).

Παράλληλα για την διεξαγωγή της βιοστατικής ανάλυσης έγινε για όλες τις συμμετέχουσες λεπτομερής καταγραφή και καταχώρηση σε ηλεκτρονική βάση δεδομένων των παρακάτω στοιχείων (Πίνακας 2.1):

- Ιατρικό ιστορικό
- Δημογραφικά στοιχεία (π.χ. ηλικία),
- Κλινικοπαθολογικά και μοριακά χαρακτηριστικά του όγκου στα οποία περιλαμβάνονται το μέγεθος του όγκου, η ύπαρξη λεμφαδενικής διήθησης, το στάδιο κατά TNM, ο βαθμός διαφοροποίησης και το ποσοστό έκφρασης των *ki67* και *p53*
- Διάστημα ολικής και χωρίς υποτροπή επιβίωσης.

Όλες οι συμμετέχουσες στην μελέτη ενημερώθηκαν εκτενώς για τον σκοπό και τον τρόπο διεξαγωγής της παρούσας μελέτης και υπέγραψαν έντυπο συγκατάθεσης. Η παρούσα μελέτη ασθενών-μαρτύρων είναι σύμφωνη με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι και έχει λάβει

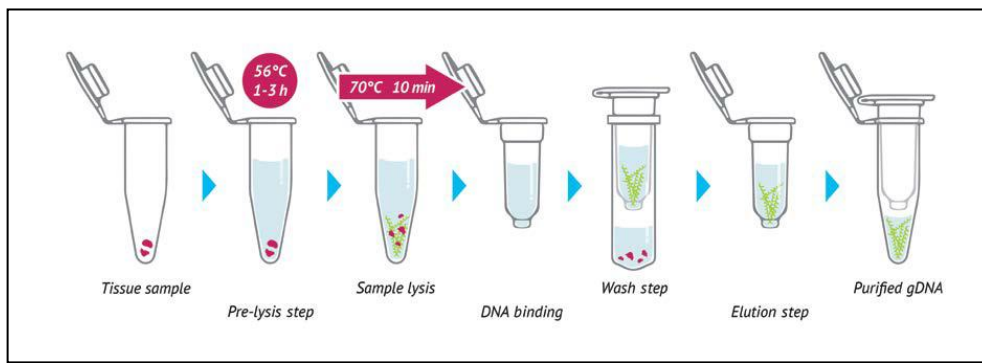
έγκριση από το Τοπικό Συμβούλιο Θεσμικής Ανασκόπησης (Επιστημονικό και Διοικητικό Συμβούλιο) του Νοσοκομείου Αλεξάνδρα ΓΝΑ.

Πίνακας 2.1 Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών (n=114)

Ποιοτική Μεταβλητή	Ποσοστό ασθενών	Ποιοτική Μεταβλητή	Ποσοστό ασθενών
Ηλικία		Ki-67	
≥57	57 (50.0%)	Θετικό	58 (50.9%)
<57	56 (49.1%)	Αρνητικό	17 (14.9%)
Άγνωστο	1(0.1%)	Άγνωστο	39 (34.2%)
Στάδιο όγκου		Βαθμός διαφοροποίησης	
I	27 (23.7 %)	1	3 (2.6%)
II	49 (43 %)	2	12 (10.5%)
III	32 (28.1 %)	3	92 (80.7)
Άγνωστο	6 (5.3 %)	Άγνωστο	7 (6.2)
Ιστολογικός τύπος		Αριθμός λεμφαδένων	
Πορώδες	85 (74.6 %)	N0	65 (57%)
Λοβιακό	10 (8.8 %)	N1	19 (16.7%)
Μυελικό	8 (7 %)	N2	10 (8.8%)
Άλλο	9 (7.9 %)	N3	12 (10.5%)
Άγνωστο	2 (1.70 %)	Άγνωστο	8 (7%)
Επανεμφάνιση νόσου		Θάνατος	
Ναι	11 (9.6 %)	Ναι	21(18.4 %)
Όχι	98 (86.0 %)	Όχι	88 (77.2 %)
Άγνωστο	5 (4.4 %)	Άγνωστο	5 (4.4 %)

2.2 Απομόνωση γενετικού υλικού από ασθενείς και υγιείς μάρτυρες

Η απομόνωση του γενετικού υλικού τόσο από τις ασθενείς για τις οποίες χρησιμοποιήθηκε καρκινικός ιστός, όσο και για τις υγιείς, για τις οποίες χρησιμοποιήθηκε δείγμα αίματος, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Nucleospin Tissue kit (Macherey Nigel, Germany) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1 Διαδικασία απομόνωσης γενετικού υλικού από καρκινικό ιστό και αίμα

2.3 Προσδιορισμός του γονότυπου για τους μονήρεις πολυμορφισμούς νουκλεοτιδίου του γονιδίου *PD-L1 rs4143815 C>G* και *miR-34 rs4938723 T>C*

Για την ανίχνευση και μελέτη των εξεταζόμενων πολυμορφισμών εφαρμόστηκε η μέθοδος της απλής PCR για τους μονήρεις πολυμορφισμούς νουκλεοτιδίου του γονιδίου *PD-L1 rs4143815 C>G* και PCR-RFLP (PCR Restriction Fragment Length Polymorphism) για τον πολυμορφισμό *miR-34 rs4938723 T>C* για την ενίσχυση των επιλεγμένων αλληλουχιών, με ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές. Τα προϊόντα πέψης συλλέχθηκαν μέσω RFLP και αναλύθηκαν για την ανίχνευση διαφορών μεταξύ ασθενών και υγιών-μαρτύρων.

Στην περίπτωση του πολυμορφισμού του *PD-L1 rs4143815 C>G* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές:

- 5'- ACTCTCAGTCATGCAGAAAAC -3' και 5'- ACTCTCAGTCATGCAGAAAAG -3', οι οποίοι σχεδιάστηκαν έτσι ώστε το τελευταίο νουκλεοτίδιο να είναι συμπληρωματικό με το εκάστοτε νουκλεοτίδιο που καθορίζει τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό (C ή G)
- ένας κοινός εκκινήτης με αλληλουχία 5'- AAGATGGAGTCAAACAGGG-3'. Ο συνδυασμός αυτών των εκκινήτων δίνει ένα PCR προϊόν μεγέθους 239bp.

Μετά την ολοκλήρωση της PCR αντίδρασης ακολούθησε ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης 2% w/v και παρατήρηση κάτω από λάμπα UV.

Για την ανάλυση του πολυμορφισμού *miR-34 rs4938723 T>C* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 5'-CTCACCTCCTCTGGGAACCTT-3' (πρόσθιος εκκινήτης) και 5'-AAGGCCATACCATTCAAGACAGTAT-3'(ανάστροφος εκκινήτης) οι οποίοι εξασφαλίζουν τη σύνθεση ενός προϊόντος μεγέθους 226bp. Ακολούθησε πέψη των PCR προϊόντων με το περιοριστικό ένζυμο *TasI* για τη διάκριση της παρουσίας των διαφορετικών αλληλομόρφων (168).

2.4 Βιοστατιστική ανάλυση

Οι συσχετίσεις του προφίλ έκφρασης των εξεταζόμενων πολυμορφισμών με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με καρκίνο του μαστού και με την επιβίωση εξετάστηκαν μέσω εκτενούς βιοστατιστικής ανάλυσης με τη χρήση του προγράμματος Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v.17.0 (IBM, Inc). Η διερεύνηση της σχέσης μεταξύ του προφίλ έκφρασης των πολυμορφισμών και των κλινικοπαθολογικών παραμέτρων (ποιοτικές μεταβλητές) πραγματοποιήθηκε με χρήση του στατιστικού ελέγχου chi-square. Οι διαφορές που ανιχνεύτηκαν σε επίπεδο σημαντικότητας $p \text{ value} < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές.

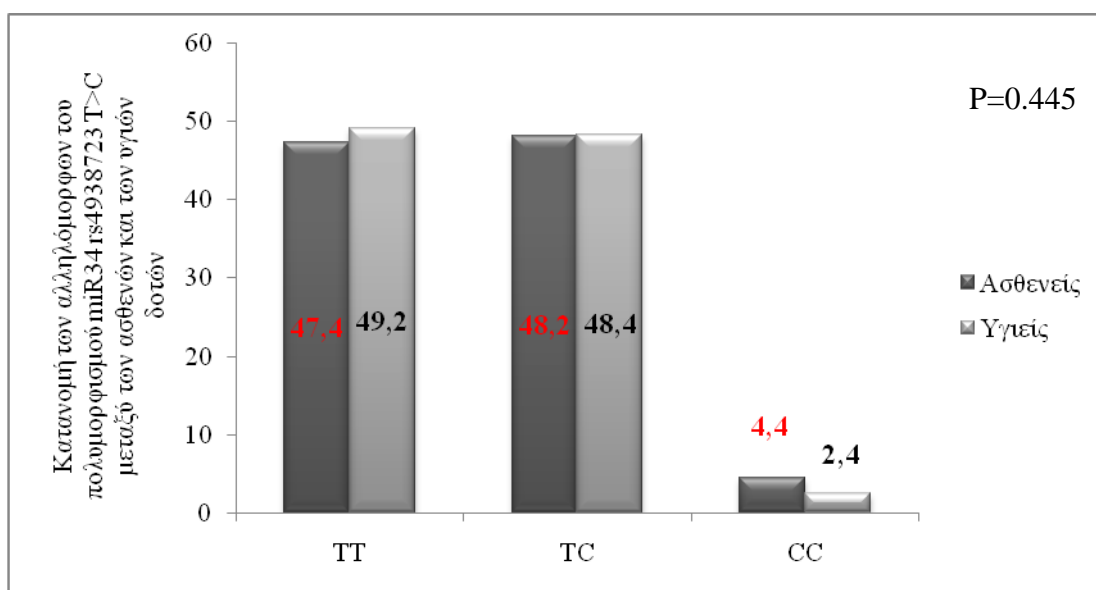
Η αξιολόγηση της προγνωστικής αξίας των εξεταζόμενων πολυμορφισμών πραγματοποιήθηκε με:

- Ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan–Meier, η οποία επιτρέπει τον υπολογισμό της πιθανότητας της επιβίωσης των ασθενών που έχουν λάβει συγκεκριμένη θεραπεία (χειρουργική ή φαρμακευτική) από το χρονικό σημείο έναρξης της θεραπείας μέχρι ενός ορισμένου χρονικού διαστήματος παρακολούθησης. Στη συγκεκριμένη διατριβή καταληκτική ημερομηνία παρακολούθησης τέθηκε η 31η Ιανουαρίου 2016. Οι διαφορές μεταξύ των καμπυλών εκτιμήθηκαν με τη στατιστική δοκιμασία log rank και το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε πάλι στο 0.05.
- Ανάπτυξη μοντέλων μονομεταβλητής παλινδρόμησης αναλογικού κινδύνου κατά Cox, για να εκτιμηθεί η σχέση του προφίλ έκφρασης των πολυμορφισμών και του σχετικού κινδύνου εμφάνισης υποτροπής ή θανάτου των ασθενών. Όμοια με προηγούμενα τα αποτελέσματα με $p \text{ value} < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά.

3. Αποτελέσματα

3.1 Διαφορική κατανομή του πολυμορφισμού miR34 rs4938723 T>C μεταξύ των ασθενών με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού και των υγιών μαρτύρων

Η ανίχνευση του πολυμορφισμού miR34 rs4938723 T>C πραγματοποιήθηκε σε 114 ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού και 124 υγιείς μάρτυρες. Σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση που εφαρμόστηκε τα αλληλόμορφα TT και TC παρουσίασαν ίδια κατανομή όχι μόνο στην ομάδα των ασθενών αλλά και των υγιών γυναικών. Πιο αναλυτικά από τις 124 υγιείς συμμετέχουσες οι 61 (49.2%) έφεραν το αλληλόμορφο TT, οι 60 (48.4%) το αλληλόμορφο TC ενώ τέλος μόνο 3 (2.4%) υγιείς δότες είχαν τον γονότυπο CC. Στην ομάδα των ασθενών τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν για το αλληλόμορφο TT 47.4% (54 ασθενείς από το σύνολο των 114), για το αλληλόμορφο TC 48.2% (55 ασθενείς από το σύνολο των 114) και για το αλληλόμορφο CC 4.4% (5 ασθενείς από το σύνολο των 114) (Εικόνα 3.1, Πίνακας 3.1). Η κατανομή των διαφορετικών αλληλόμορφων του πολυμορφισμού miR34 rs4938723 T>C μεταξύ των ασθενών και των υγιών δοτών δεν ήταν στατιστικά σημαντική (chi-square; P=0.445).



Εικόνα 3.1 Κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού miR34 rs4938723 T>C μεταξύ των ασθενών και των υγιών δοτών

Πίνακας 3.1 Κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού *miR34 rs4938723 T>C* μεταξύ των ασθενών και των υγιών δοτών

Μεταβλητή	Σύνολο	miR-34 Πολυμορφισμός			P*
		TT	TC	CC	
Ασθενείς	114	54 (47.4%)	55 (48.2%)	5 (4.4%)	0.445
Υγιείς	124	61 (49.2%)	60 (48.4%)	3(2.4%)	

*Υπολογίστηκε με το τεστ *chi square*

3.2 Συσχέτιση του προφίλ έκφρασης των διαφορετικών αλληλομόρφων του πολυμορφισμού *miR34 rs4938723 T>C* με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών

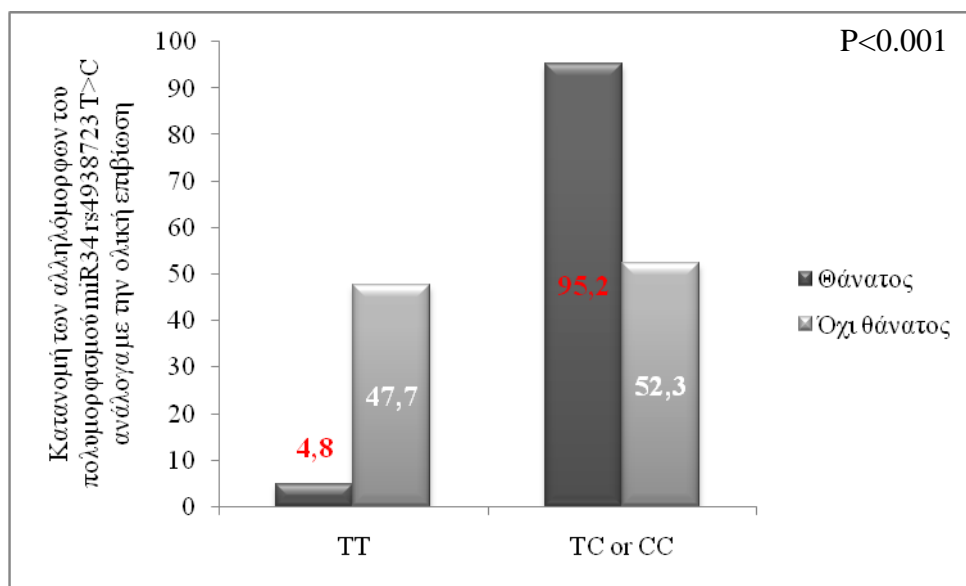
Εφαρμόζοντας τον στατιστικό έλεγχο *chi-square test* βρέθηκε ότι δεν υπάρχει κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα διαφορετικά αλληλόμορφα του πολυμορφισμού *miR34 rs4938723 T>C* με τις κλινικοπαθολογικές μεταβλητές των ασθενών (Πίνακας 3.2). Ωστόσο μετά από διχοτόμηση των ασθενών στις εξής ομάδες: α) ασθενείς που φέρουν τον γονότυπο TT, β) ασθενείς που φέρουν τον γονότυπο TC ή CC βρέθηκε ότι η επιβίωση των ασθενών σχετίζεται με την ύπαρξη των αλληλόμορφων TC ή CC (*chi-square*; $P<0.001$, Εικόνα 3.2, Πίνακας 3.3). Επιπλέον βρέθηκε ότι τα συγκεκριμένα αλληλόμορφα ανιχνεύονται πιο συχνά σε ασθενείς με πορογενή καρκινώματα (*chi-square*; $P=0.020$, Εικόνα 3.3, Πίνακας 3.3).

Πίνακας 3.2 Συσχέτιση του πολυμορφισμού miR34 rs4938723 T>C με τις κλινικοπαθολογικές μεταβλητές των ασθενών

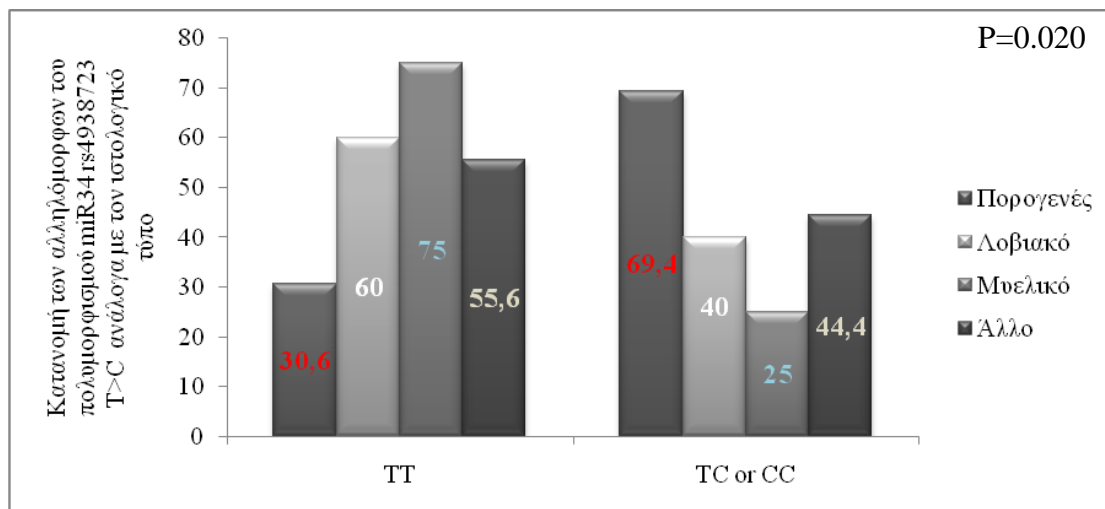
Μεταβλητή	Σύνολο	miR-34 Πολυμορφισμός			P*
		TT	TC	CC	
Ηλικία					
≥57	57	25 (43.9%)	28 (49.1%)	4 (7.0%)	0.76
<57	56	29 (51.8%)	26 (46.4%)	1 (1.8%)	
Άγνωστο	1				
Διήθηση λεμφαδένων					
N0	65	28 (43.1%)	34 (52.3%)	3 (4.6%)	0.551
N1	19	12 (63.2%)	6 (31.6%)	1 (5.2%)	
N2	10	7(70%)	3 (30%)	0 (0%)	
N3	12	6 (50%)	5 (41.7%)	1 (8.3%)	
Άγνωστο	8				
Ιστολογικός τύπος					
Πορώδες	85	41 (48.2%)	41 (48.2%)	3 (3.6%)	0.304
Λοβιακό	10	5 (50%)	3 (30%)	2 (20%)	
Μυελικό	8	4 (50%)	4 (50%)	0 (0%)	
Άλλο	9	4 (44.4%)	5 (55.6%)	0 (0%)	
Άγνωστο	2				
Βαθμός κακοήθειας					
I	3	2 (66.7%)	1 (33.3%)	0 (0%)	0.719
II	12	4 (33.3%)	7 (58.3%)	1 (8.4%)	
III	92	46 (50%)	43 (46.7%)	3 (3.3%)	
Άγνωστο	7				
Ki-67 Index					
Θετικό	58	28 (48.3%)	28 (48.3%)	2 (3.4%)	0.855
Αρνητικό	15	7 (46.7%)	7 (46.7%)	1 (6.6%)	
Στάδιο νόσου					
I	27	13 (48.2%)	13 (48.2%)	1 (3.6%)	0.909
II	49	25 (51.0%)	23 (46.9%)	1 (2.1%)	
III	32	15 (46.9%)	15 (46.9%)	2 (6.2%)	

DFS					
Υποτροπή	11	4 (36.4%)	7 (63.6%)	0 (0%)	0.445
Απουσία υποτροπής	98	50 (51%)	44 (44.9%)	4 (4.1%)	
Άγνωστο	5				
OS					
Θάνατος	21	13 (61.9%)	7 (33.3%)	1 (4.8%)	0.388
Όχι θάνατος	88	41 (46.6%)	44 (50%)	3 (3.4%)	
Άγνωστο	5				

*Υπολογίστηκε με το τεστ *chi square*



Εικόνα 3.2 Κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού *miR34 rs4938723 T>C* ανάλογα με την ολική επιβίωση



Εικόνα 3.3 Κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού *miR34 rs4938723 T>C* ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο

Πίνακας 3.3 Συσχέτιση των αλληλόμορφων TT και TC/CC του πολυμορφισμού miR34 rs4938723 T>C με τις κλινικοπαθολογικές μεταβλητές των ασθενών

Μεταβλητή	Σύνολο	miR-34 Πολυμορφισμός		P*
		TT	TC or CC	
DFS				
Υποτροπή	11	2 (18.2%)	9 (81.8%)	0.195
Απουσία υποτροπής	98	41 (41.8%)	57 (58.2%)	
Άγνωστο	15			
OS				
Θάνατος	21	1 (4.8%)	20 (95.2%)	<0.001
Όχι θάνατος	88	42 (47.7%)	46 (52.3%)	
Άγνωστο	15			
Ιστολογικός τύπος				
Πορώδες	85	26 (30.6%)	59 (69.4%)	0.020
Λοβιακό	10	6 (60.0%)	4 (40.0%)	
Μυελικό	8	6 (75.0%)	2 (25%)	
Άλλο	9	5 (55.6%)	4 (44.4%)	
Άγνωστο	12			

*Υπολογίστηκε με το τεστ *chi square*

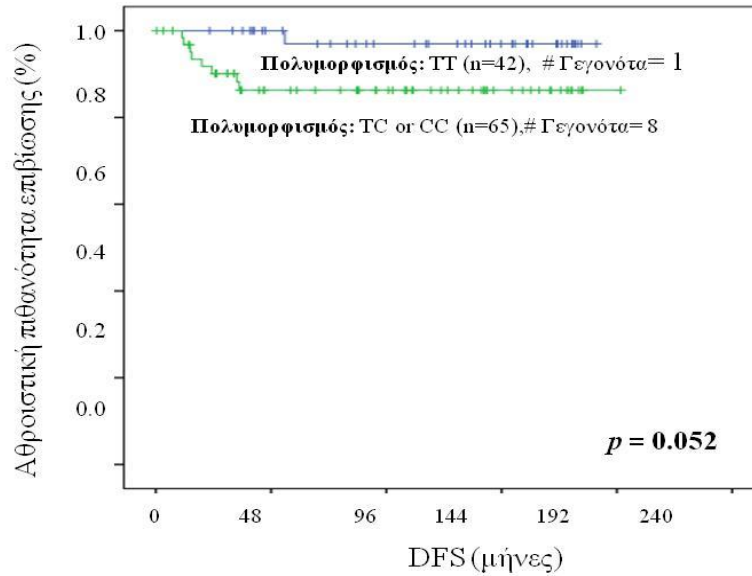
3.3 Ανάλυση επιβίωσης και αξιολόγηση της προγνωστικής αξίας του πολυμορφισμού miR34 rs4938723 T>C σε ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού

Από το σύνολο των ασθενών υπήρχαν πληροφορίες για την ολική και χωρίς υποτροπή επιβίωση για τους 109 ασθενείς. Στο σύνολο των 109 ασθενών, οι 11 (10.1%) εμφάνισαν υποτροπή και 21 απεβίωσαν (20.0%). Από τις 11 ασθενείς που υποτροπίασαν οι 4 (36.4%) έφεραν το αλληλόμορφο TT, οι 7 (63.6%) το αλληλόμορφο TC και καμία (0.0%) το αλληλόμορφο CC. Επίσης, από τις 21 ασθενείς που απεβίωσαν οι 13 (61.9%) έφεραν το TT αλληλόμορφο, ενώ 7 (33.3%) και 1 (4.8%) τα αλληλόμορφα TC και CC αντίστοιχα (Πίνακας 3.2).

Για την ανάλυση επιβίωσης πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Kaplan-Meier και ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox. Αρχικά η ανάλυση κατά Kaplan-Meier εφαρμόστηκε στο σύνολο των ασθενών, χωρίς ωστόσο να αποκαλυφθεί κάποιο στατιστικά σημαντικό

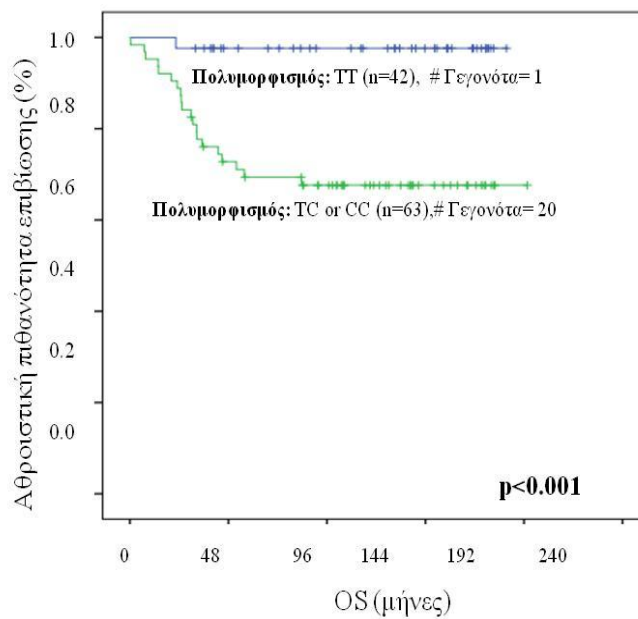
αποτελεσμα για την ολική αλλά και την χωρίς υποτροπή επιβίωση. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η ανάλυση κατά Kaplan-Meier μετά τη διχοτόμηση των ασθενών σε δύο ομάδες: α) ασθενείς που φέρουν το αλληλόμορφο TT και β) ασθενείς που φέρουν το αλληλόμορφο TC ή CC. Έτσι βρέθηκε ότι οι γυναίκες με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού και γονότυπο TC ή CC χαρακτηρίζονται από μικρότερα διαστήματα επιβίωσης χωρίς υποτροπές (long rank test; $P=0.05$) (Εικόνα 3.4). Ωστόσο τα συγκεκριμένα αποτελέσματα δεν επιβεβαιώθηκαν από την μονομεταβλητή ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox (Πίνακας 3.4). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε η κατασκευή καμπυλών Kaplan-Meier μετά από κατηγοριοποίηση των ασθενών στις εξής ομάδες: α) Ασθενείς με πορογενές καρκίνωμα και CC ή TC γονότυπο και β) ασθενείς με λοβιακό ή μυελικό καρκίνωμα και TT γονότυπο. Ωστόσο η συγκεκριμένη ανάλυση δεν αποκάλυψε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην επιβίωση χωρίς υποτροπές και το γονότυπο των ασθενών.

Αναφορικά με την ολική επιβίωση η ανάλυση κατά Kaplan-Meier έδειξε ότι δεν υπάρχει κάποια διαφοροποίηση στην πιθανότητα ολικής επιβίωσης ανάμεσα στους τρεις εξεταζόμενους γονότυπους του πολυμορφισμού miR34 rs4938723 T>C (long rank test; $P>0.05$). Ωστόσο, η εφαρμογή της ανάλυσης κατά Kaplan-Meier στις προαναφερόμενες κατηγορίες (ασθενείς που φέρουν το αλληλόμορφο TT και ασθενείς που φέρουν το αλληλόμορφο TC ή CC) αποκάλυψε ότι οι γυναίκες με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού και TC ή CC γονότυπο χαρακτηρίζονται από μικρότερα διαστήματα ολικής επιβίωσης (long rank test; $P<0.001$) (Εικόνα 3.5). Η μονομεταβλητή ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox επιβεβαίωσε ότι αυτές οι ασθενείς χαρακτηρίζονται από χειρότερη πρόγνωση ($HR=3.2$, %95 $CI=2.0-5.5$, $P=0.008$) (Πίνακας 3.4). Επιπλέον η εφαρμογή της ανάλυσης κατά Kaplan-Meier στις ομάδες ασθενών με: α) πορογενές καρκίνωμα και CC ή TC γονότυπο και β) ασθενείς με λοβιακό ή μυελικό καρκίνωμα και TT γονότυπο έδειξε ότι οι γυναίκες που ανήκουν στην πρώτη κατηγορία χαρακτηρίζονται από στατιστικά σημαντικά μικρότερη επιβίωση (long rank test; $P<0.001$) (Εικόνα 3.6). Η μονομεταβλητή ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox επιβεβαίωσε τα παραπάνω αποτελέσματα καθώς αποκάλυψε ότι οι τα πορογενή καρκινώματα που φέρουν τα αλληλόμορφα TC ή CC είναι χειρότερης πρόγνωσης ($HR=2.35$, %95 $CI=2.1-4.65$, $P=0.003$) (Πίνακας 3.4).



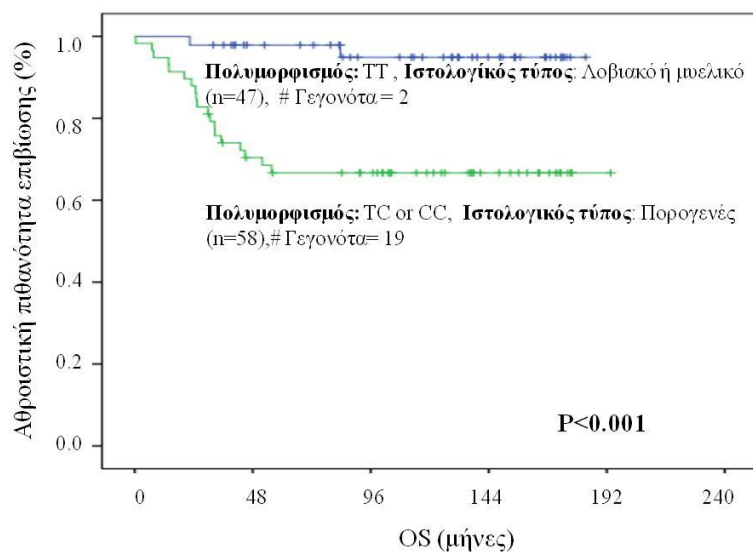
	Αριθμός ασθενών σε κίνδυνο					
TC or CC not detected	42	42	41	41	41	41
TC or CC detected	65	57	57	57	57	57

Εικόνα 3.4 Καμπύλες κατά Kaplan-Meier για την επιβίωση χωρίς υποτροπές



	Αριθμός ασθενών σε κίνδυνο					
TC or CC	42	42	41	41	41	41
TC or CC	63	48	44	43	43	43

Εικόνα 3.5 Καμπύλες κατά Kaplan-Meier για την ολική επιβίωση



TT και Λοβιακό ή μυελικό	47	46	46	45	45	45
TC ή CC και πορογενές	58	43	39	39	39	39

Εικόνα 3.6 Καμπύλες κατά Kaplan-Meier για την ολική επιβίωση μετά από κατηγοριοποίηση των ασθενών ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο

Πίνακας 3.4 Μονομεταβλητή ανάλυση για το ελεύθερο νόσου διάστημα και την ολική επιβίωση

Μεταβλητή	Ελεύθερο νόσου διάστημα (DFS) (n=103)			Ολική επιβίωση (OS) (n=105)		
	HR ^a	95% CI ^b	P	HR ^a	95% CI ^b	P
miR-34 Πολυμορφισμοί (TT vs TC or CC)	3.3	0.76-2.2	0.088	3.2	2.0-5.5	0.008
miR-34 /Ιστολογία						
TT and Λοβιακό ή μυελικό	1.00	0.44-7.13	>0.05	1.00	2.1-4.65	0.003
TC or CC και Πορογενές	1.78			2.35		

^a Αναλογία κινδύνου

^b Διάστημα εμπιστοσύνης.

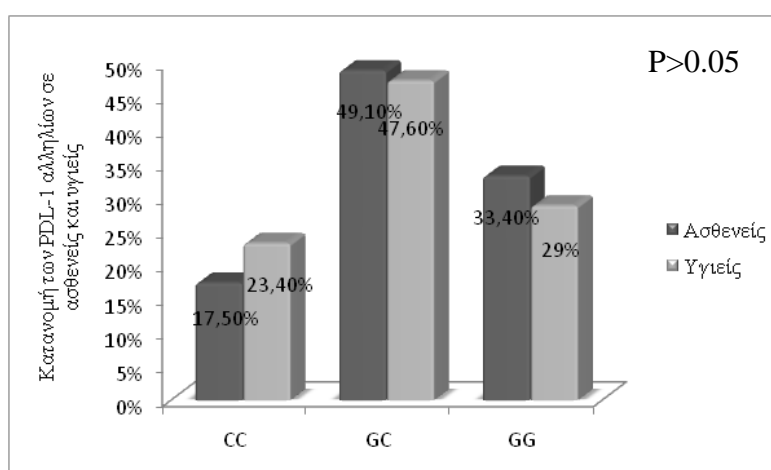
3.4 Διαφορική κατανομή του PD-L1 rs4143815 C> G μεταξύ ασθενών με τριπλά αρνητικό καρκίνου μαστού (TNBC) και υγιείς μάρτυρες

Η ανίχνευση του πολυμορφισμού rs4143815 του γονιδίου PDL-1 πραγματοποιήθηκε σε 114 ασθενείς με τριπλά αρνητικά καρκίνου μαστού (TNBC) και σε 124 υγιείς μάρτυρες. Σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση, το αλληλόμορφο GC βρέθηκε ότι είναι το πιο άφθονο όχι μόνο σε ασθενείς με TNBC αλλά και στην ομάδα ελέγχου. Συγκεκριμένα, από τους 114 ασθενείς με TNBC, ο γονότυπος CC βρέθηκε σε 20 ασθενείς (17,5%), ο γονότυπος GC παρατηρήθηκε σε 56 γυναίκες (49,1%) και ο GG γονότυπος βρέθηκε σε 38 ασθενείς (33,4%). Επιπλέον, από τους 124 υγιείς δότες, ανιχνεύθηκε το αλληλόμορφο CC σε 29 υγιείς δότες (23,4%), ο γονότυπος GC βρέθηκε σε 59 (47,6%) και ο γονότυπος GG σε 36 (29%) (Πίνακας 3.5, Εικόνα 3.7). Η κατανομή του PD-L1 rs4143815 C> G μεταξύ των ασθενών με TNBC και των περιπτώσεων ελέγχου δεν είναι σημαντικά διαφορετική (chi-square, P = 0,72).

Πίνακας 3.5 Κατανομή των CC/GC/GG αλληλομόρφων σε ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού και υγιείς μάρτυρες

Μεταβλητή	Σύνολο	PD-L1 Πολυμορφισμός			P *
		CC	GC	GG	
Ασθενείς	114	20 (17.5%)	56	38	0.72
Υγιείς	124	29 (23.4%)	59	36	

*Υπολογίστηκε με το τεστ chi square



Εικόνα 3.7 Κατανομή των CC/GC/GG αλληλομόρφων σε ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού και υγιείς αιμοδότες

3.5 Συσχέτιση του PD-L1 rs4143815 C> G με τις κλινικές μεταβλητές των ασθενών

Με την χρήση του στατιστικού test chi-square βρέθηκε ισχυρή συσχέτιση του PD-L1 rs4143815 C> G με το στάδιο της ασθένειας (chi-square, P = 0.015, Πίνακας 3.6)

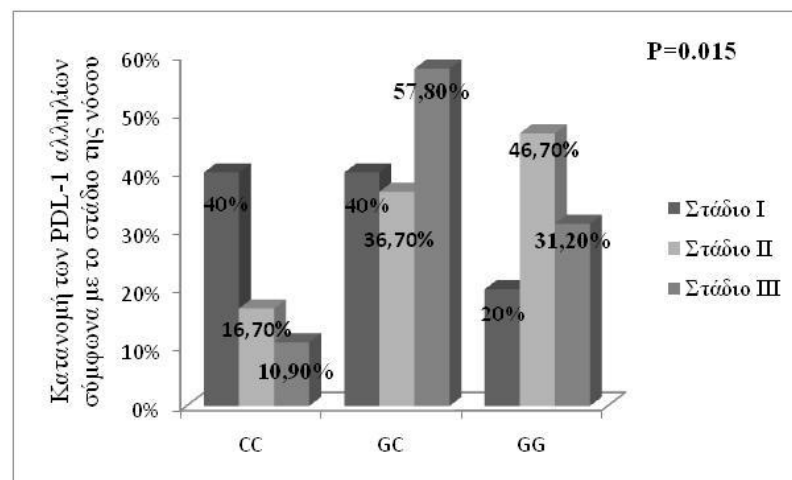
Πίνακας 3.6 Συσχέτιση του πολυμορφισμού rs4143815 C> G με τις κλινικές μεταβλητές των ασθενών

Μεταβλητή	Σύνολο	rs4143815 Πολυμορφισμός			P *
		CC	GC	GG	
Αριθμός λεμφαδένων					
N0	65	11 (16.9%)	32 (49.2%)	22 (33.8%)	0.73
N1	18	3 (16.7%)	8 (44.4%)	7 (38.9%)	
N2	10	1(10%)	7 (70%)	2 (20%)	
N3	13	4 (30.8%)	5 (38.5%)	4 (30.8%)	
Άγνωστο	8				
Ιστολογικός τύπος					
Πορώδες	85	17 (20%)	39 (45.9%)	29 (34.1%)	0.90
Λοβιακό	10	1 (10%)	5 (50%)	4 (40%)	
Μυελικό	8	1 (12.5%)	4 (50%)	3 (37.5%)	
Άλλο	9	1 (11.1%)	6 (33.3%)	2 (22.2%)	
Άγνωστο	2				
Βαθμός διαφοροποίησης					
I	3	1 (33.3%)	2 (66.7%)	0 (0%)	0.58
II	12	2 (16.7%)	4 (33.3%)	6 (50.0%)	
III	92	17 (18.5%)	43 (46.7%)	32 (34.8%)	
Άγνωστο	7				
Ki-67	58	11 (19%)	28 (48.3%)	19 (32.8%)	0.32

Θετικό					
Αρνητικό	15	4 (26.7%)	4 (26.7%)	7 (46.7%)	
Στάδιο όγκου					
I	20	8 (40%)	8 (40%)	4 (20%)	0.015
II	30	5 (16.7%)	11 (36.7%)	14 (46.7%)	
III	64	7 (10.9%)	37 (57.8%)	20 (31.2%)	
Επανεμφάνιση νόσου					
Επανεμφάνιση νόσου	11	0 (0%)	9 (81.8%)	2 (18.2%)	0.048
Ελεύθερο νόσου	98	19 (19.4%)	43 (43.9%)	36 (36.7%)	
Άγνωστο	5				
Ολική επιβίωση					
Θάνατος	21	3 (14.3%)	10 (47.6%)	8 (38.1%)	0.89
Ζωντανή	88	16 (18.2%)	42 (47.7%)	30 (34.1%)	
Άγνωστο	5				

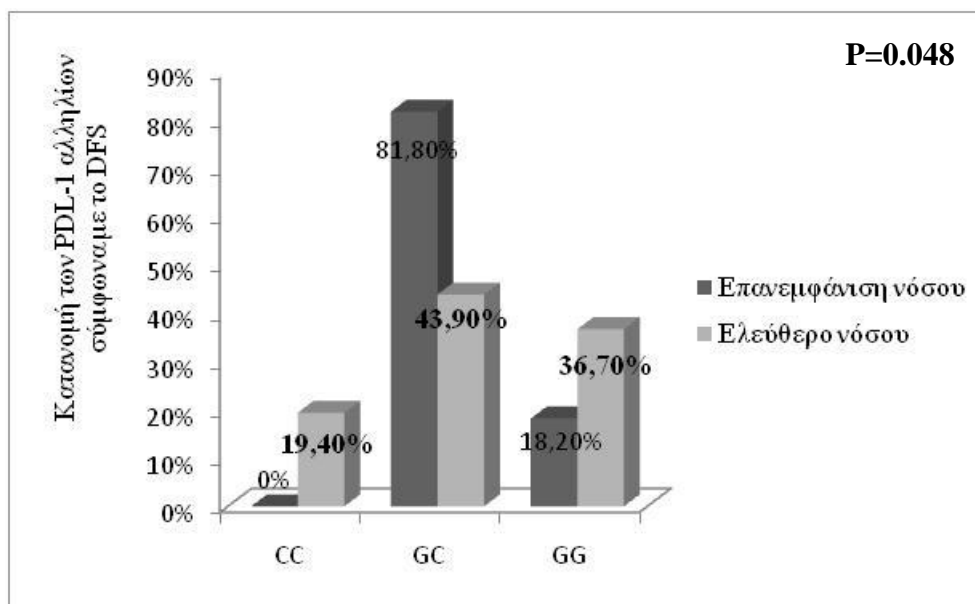
* Υπολογίστηκε με το τεστ *chi square*

Η πλειονότητα των ασθενών είχαν γονότυπο GC σταδίου III (57,8%) ακολουθούμενος από το GG γονότυπο (31,2%), ενώ το αλληλόμορφο CC είχε το χαμηλότερο ποσοστό (10,9%) (Εικόνα 3.8).



Εικόνα 3.8. Κατανομή των CC/GC/GG αλληλομόρφων σε ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού σύμφωνα με το στάδιο της νόσου

Επιπλέον, η επανεμφάνιση της ασθένειας του καρκίνου του μαστού συσχετίστηκε σημαντικά με την κατάσταση του πολυμορφισμού PD-L1 (chi-square, $P = 0.048$, Πίνακας 3.6), καθώς μεταξύ των ασθενών με υποτροπή καρκίνου του μαστού το πιο συχνό αλληλόμορφο ήταν το GC (81,8%) (Εικόνα 3.9).



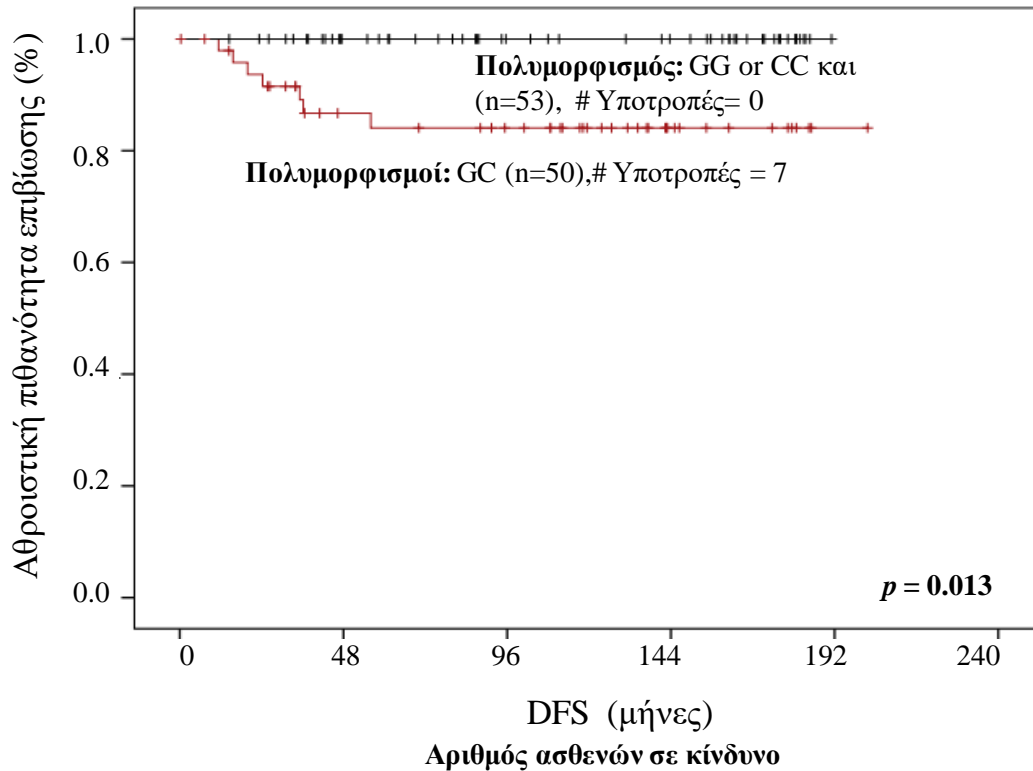
Εικόνα 3.9 Κατανομή των CC/GC/GG αλληλομόρφων σε ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού σύμφωνα με το DFS.

3.6 Ανάλυση επιβίωσης και προγνωστική σημασία του PD-L1 rs4143815 C> G σε ασθενείς με τριπλά αρνητικά καρκίνου μαστού (TNBC)

Δεδομένα σχετικά με το ελεύθερο νόσου και την ολική επιβίωση (DFS και OS) των ασθενών ήταν διαθέσιμες για 109 ασθενείς με τριπλά αρνητικά καρκίνου μαστού (TNBC). Το DFS ορίστηκε ως το χρονικό διάστημα μεταξύ της χειρουργικής εκτομής του όγκου και της ημερομηνίας του πρώτου τεκμηριωμένου περιστατικού τοπικής ή περιφερειακής υποτροπής. Κατά συνέπεια, το OS ορίστηκε ως η περίοδος μεταξύ της εκτομής του όγκου και του θανάτου που σχετίζεται με τη νόσο. Συνολικά από τους 109 ασθενείς με TNBC, 11 ασθενείς υποτροπίασαν (10,1%) και 21 ασθενείς πέθαναν (20,0%). Εννέα (81,8%) και δύο (18,2%) ασθενείς από τους έντεκα που υπέστησαν υποτροπή, είχαν GC και GG γονότυπο αντίστοιχα (Πίνακας 3.6, Εικόνα 3.9). Όσον αφορά την ολική επιβίωση, 47,6%, 38,1% και 14,3% χαρακτηρίζονταν από τους γονότυπους GC, GG και CC, αντίστοιχα (Πίνακας 3.6).

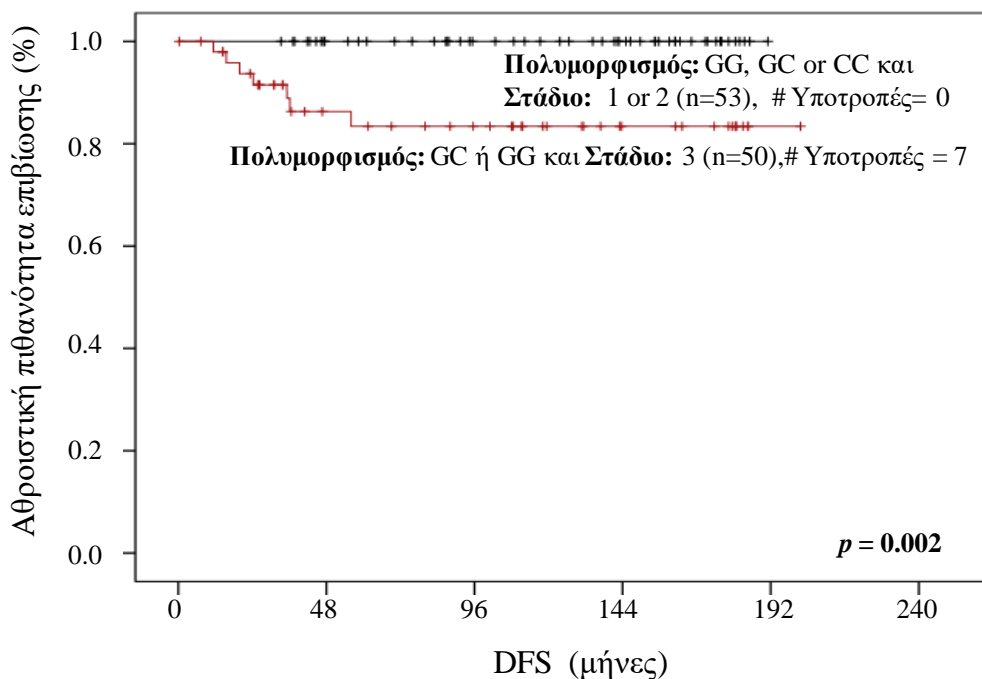
Η ανάλυση επιβίωσης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση καμπυλών Kaplan-Meier και από το μοντέλο παλινδρόμησης Cox. Η ανάλυση Kaplan-Meier, έδειξε ότι οι γυναίκες με

GC γονότυπο είχαν μικρότερο ελεύθερο νόσου διάστημα ($P = 0,013$) σε σχέση με το γονότυπο CC ή GG (Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.10 Ανάλυση Kaplan-Meier για το ελεύθερο νόσου διάστημα στους τριπλά αρνητικούς ασθενείς με καρκίνο μαστού

Επίσης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση Kaplan-Meier μετά από διχοτόμηση του πληθυσμού που μελετήθηκε στις ακόλουθες ομάδες: α) Στάδιο I / II και CC / GG / GC γονότυπος και β) Στάδιο III και GG / GC γονότυπος. Ως εκ τούτου, διαπιστώσαμε ότι οι γυναίκες σταδίου III και GC ή GG γονοτύπηση χαρακτηρίζονται από μικρότερο ελεύθερο νόσου διάστημα ($P = 0.002$) (Εικόνα 3.11).



Αριθμός ασθενών σε κίνδυνο

Στάδιο I/II CC, GG or GC	53	53	53	53	53	53
Στάδιο III GG or GC	50	44	43	43	43	43

Εικόνα 3.11 Ανάλυση Kaplan-Meier για το ελεύθερο νόσου διάστημα στους τριπλά αρνητικούς ασθενείς με καρκίνο μαστού μετά από διχοτόμηση του πληθυσμού σύμφωνα με το στάδιο της νόσου

Ωστόσο, η Cox μονοπαραμετρική ανάλυση, δεν έδειξε κανένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα (Πίνακας 3.7).

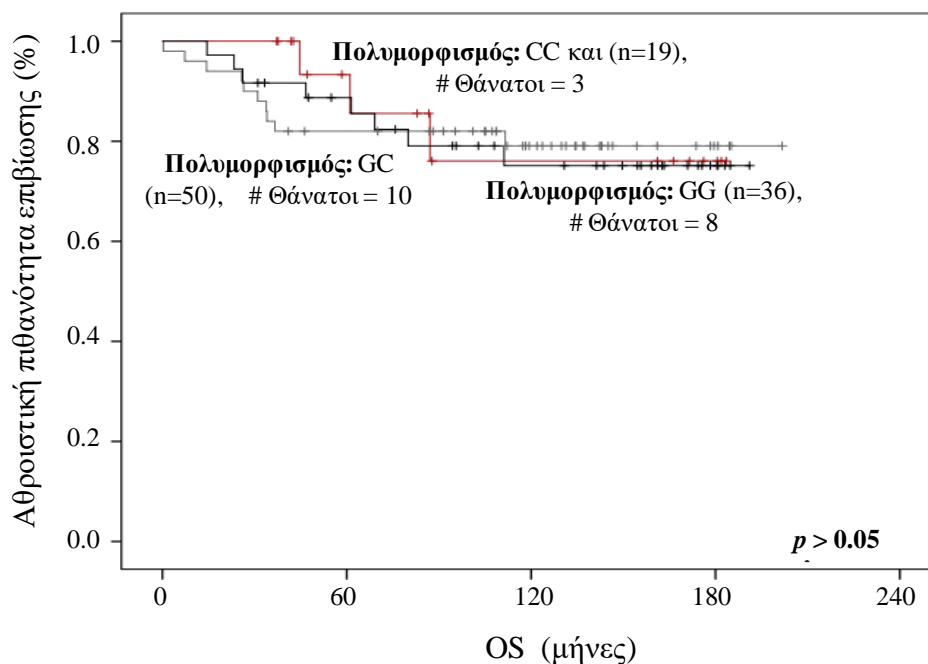
Πίνακας 3.7 Μονομεταβλητή ανάλυση για το ελεύθερο νόσου διάστημα και την ολική επιβίωση

Μεταβλητή	Ελεύθερο νόσου διάστημα (DFS) (n=103)			Ολική επιβίωση (OS) (n=105)		
	HR ^a	95% CI ^b	P	HR ^a	95% CI ^b	P
PDL-1 πολυμορφισμοί	0.74	0.27-2.03	>0.05	1.14	0.61-2.12	>0.05
PDL-1/Στάδιο νόσου						
CC or GG και Στάδιο 1or2	1.00	0.72-2.05	>0.05	1.00	0.21-5.82	<0.0001
GC και Στάδιο 3	1.15			7.28		

^a Αναλογία κινδύνου

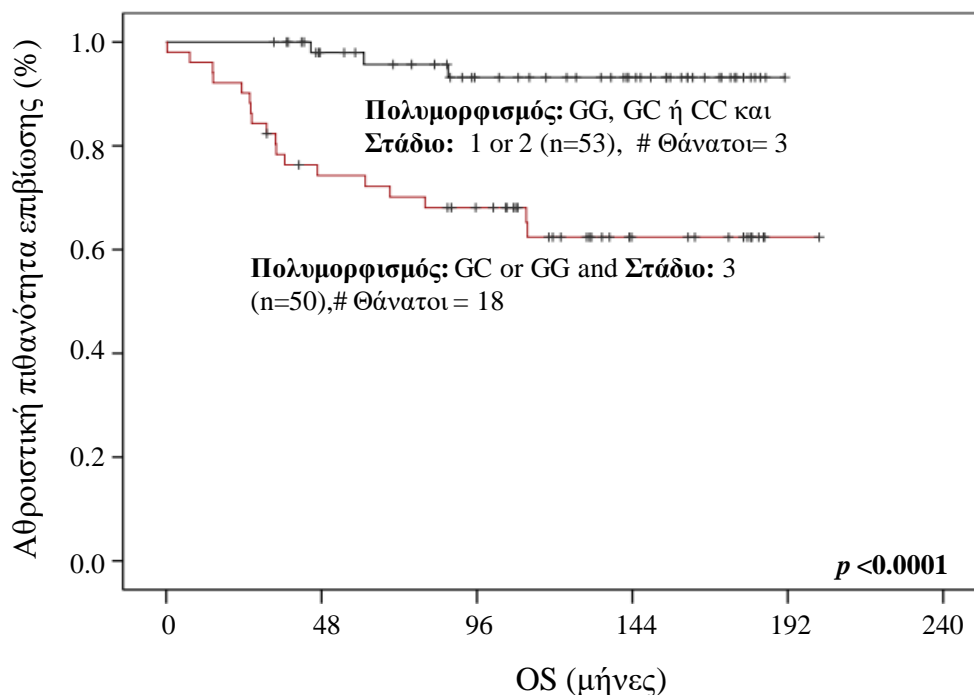
^b Διάστημα εμπιστοσύνης.

Όσον αφορά την ολική επιβίωση, η ανάλυση Kaplan-Meier αποκάλυψε ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση στην ολική επιβίωση μεταξύ των τριών γονότυπων (P> 0,05) (Εικόνα 3.12).



Εικόνα 3.12 Ανάλυση Kaplan-Meier για την ολική επιβίωση στους τριπλά αρνητικούς ασθενείς με καρκίνο μαστού

Εντούτοις, μετά την ανάλυση Kaplan-Meier στις παρακάτω αναφερόμενες ομάδες α) Στάδιο I / II και CC / GG / GC γονότυπος και β) Στάδιο III και GG / GC γονότυπο, διαπιστώσαμε ότι οι ασθενείς με τριπλά αρνητικά καρκίνου μαστού (TNBC) σταδίου III και GG / GC γονότυπο είχαν στατιστικά μικρότερη ολική επιβίωση ($P < 0.0001$) (Εικόνα 3.13).



Αριθμός ασθενών σε κίνδυνο

Στάδιο I/II CC, GG or GC	53	53	53	53	53	53
Στάδιο III GG or GC	50	37	34	32	32	32

Εικόνα 3.13 Ανάλυση Kaplan-Meier για την ολική επιβίωση στους τριπλά αρνητικούς ασθενείς με καρκίνο μαστού μετά από διχοτόμηση του πληθυσμού σύμφωνα με το στάδιο της νόσου

Η Cox μονοπαραμετρική ανάλυση παλινδρόμησης επιβεβαίωσε ότι αυτές οι γυναίκες χαρακτηρίζονται από χειρότερη πρόγνωση (HR = 7.28, % 95 CI = 0.21-5.82, $P < 0.0001$) (Πίνακας 3.7).

4. Συζήτηση

Ο σκοπός της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής ήταν η κλινική αξιολόγηση των πολυμορφισμών μονήρους νουκλεοτιδίου του γονιδίου *PD-L1* rs4143815 C>G και miR-34 rs4938723 ως πιθανών προγνωστικών δεικτών σε ασθενείς Καυκάσιας φυλής με τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού που έχουν λάβει θεραπεία, μέσα από την διεξαγωγή μιας μελέτης ασθενών-υγιών μαρτύρων.

Η έρευνα για την ταυτοποίηση νέων βιοδεικτών διευκολύνεται σημαντικά από τις γονιδιακές τεχνολογίες υψηλής απόδοσης που συνέβαλαν στον καλύτερο μοριακό χαρακτηρισμό του ανθρώπινου γονιδιώματος και στην αναγνώριση αρκετών γονιδιακών μεταλλάξεων ή SNPs που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικοί στόχοι και δείκτες πρόβλεψης (173–175). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι συστοιχίες SNP σε επίπεδο γονιδιώματος έχουν υπογραμμίσει το ρόλο των γαμετικών μεταλλάξεων στην τροποποίηση του καρκίνου και της θεραπευτικής έκβασης (176).

Το miR-34 έχει κεντρικό ρόλο στη p53 σηματοδότηση και έχει βρεθεί ότι υποεκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου (78,79,177). Ο πολυμορφισμός rs4938723 T>C του miR-34 εντοπίζεται σε μία CpG νησίδα του υποκινητή του γονιδίου και πιστεύεται ότι επηρεάζει την πρόσδεση ενός GATA-X μεταγραφικού παράγοντα, επηρεάζοντας έτσι την γονιδιακή έκφραση και την καρκινογένεση (166,167,178). Ο κλινικός ρόλος του πολυμορφισμού miR-34b/c rs4938723 στον καρκίνο του μαστού έχει μελετηθεί από δύο ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες, οι οποίες ωστόσο έχουν καταλήξει σε διαφορετικά συμπεράσματα (179,180). Συγκεκριμένα οι Sanaei et al. αναφέρουν ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δεν αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου του μαστού (180), ενώ οι Bensen et. al βρήκαν ότι η διαφορετική κατανομή των αλληλόμορφων του συγκεκριμένου πολυμορφισμού σχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης της νόσου και την επιβίωση των ασθενών (179).

Σε ό,τι αφορά τον πολυμορφισμό miR-34 rs4938723 αρχικά αναλύσαμε τη διαφορετική κατανομή των τριών διαφορετικών αλληλόμορφων ανάμεσα στις ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού και στις υγιείς μάρτυρες οπότε βρέθηκε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ αυτών των δύο ομάδων ($p = 0.445$). Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά των Bensen et. al, οι οποίοι επίσης αναφέρουν ότι η κατανομή των διαφορετικών αλληλομόρφων του πολυμορφισμού miR-34 rs4938723 μεταξύ ασθενών με καρκίνο του μαστού και υγιών γυναικών είναι ίδια (179).

Στην παρούσα διατριβή έγινε επίσης συσχετισμός του προφίλ έκφρασης των διαφορετικών αλληλομόρφων του πολυμορφισμού rs4938723 T>C με τα κλινικοπαθολογικά δεδομένα και την επιβίωση των 124 ασθενών με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού. Η στατιστική ανάλυση αποκάλυψε ότι οι ασθενείς με γονότυπο TC ή CC έχουν πιο συχνά πορογενή καρκινώματα (chi-square; P=0.020 αλλά και μειωμένη ολική επιβίωση (chi-square; P<0.001). Η ανάλυση επιβίωσης επιβεβαίωσε τα παραπάνω συμπεράσματα σε ό,τι αφορά την συσχέτιση πολυμορφισμού rs4938723 T>C με την ολική επιβίωση. Πιο αναλυτικά η ανάλυση κατά Kaplan-Meier αποκάλυψε ότι οι ασθενείς με TC/CC γονότυπο χαρακτηρίζονται από μικρότερα διαστήματα ολικής επιβίωσης (long rank test; P<0.001). Η μονομεταβλητή ανάλυση κατά Cox επιβεβαίωσε ότι αυτές οι ασθενείς έχουν χειρότερη πρόγνωση (HR= 15.02, %95 CI=2.0-112, P=0.008). Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα βρίσκονται σε αντίθεση με αυτά που αναφέρουν οι Bensen et. al, οι οποίοι έδειξαν ότι ο γενότυπος CC σχετίζεται με μεγαλύτερη ολική επιβίωση. Η διαφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί στο διαφορετικό σχεδιασμό των μελετών καθώς οι Bensen et. al μελέτησαν τον TT+TC γονότυπο έναντι του CC και στη μελέτη τους συμπεριλήφθησαν γυναίκες διαφορετικών εθνικοτήτων (Αμερικάνες, Αφρικανές και Καυκάσιες).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση επιβίωσης μετά από κατηγοριοποίηση των ασθενών στις παρακάτω ομάδες: α) Ασθενείς με πορογενές καρκίνωμα και CC ή TC γονότυπο και β) Ασθενείς με λοβιακό ή μυελικό καρκίνωμα και TT γονότυπο. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης ανάλυσης έδειξαν ότι οι γυναίκες της πρώτης κατηγορίας είχαν μικρότερα διαστήματα επιβίωσης (long rank test; P<0.001). Η μονομεταβλητή ανάλυση κατά Cox επιβεβαίωσε τα παραπάνω αποτελέσματα καθώς έδειξε ότι τα πορογενή καρκινώματα με TC ή CC γονότυπο είναι χειρότερης πρόγνωσης (HR= 8.88, %95 CI=2.1-38.22, P=0.003).

Στη συνέχεια προχωρήσαμε στην κλινική αξιολόγηση και μελέτη του πολυμορφισμού rs4143815 του γονιδίου *PD-L1* καθώς αρκετές μελέτες συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι τα SNPs του PD-L1 μπορούν να χρησιμεύσουν ως προγνωστικοί δείκτες. Έτσι αρχικά αναλύθηκε η διαφορετική κατανομή του πολυμορφισμού rs4143815 C> G μεταξύ ασθενών με TNBC και υγιών μαρτύρων και διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων (P = 0.72). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αυτά που αναφέρθηκαν από τους Du W et al που ανέφεραν ότι οι ασθενείς με NSCLC εμφανίζουν παρόμοιες κατανομές γονότυπου ή συχνότητες αλληλόμορφων με υγιείς μάρτυρες (181). Ωστόσο, μια άλλη ομάδα που έχει μελετήσει το ίδιο SNP στο γαστρικό αδενοκαρκίνωμα διαπίστωσε ότι η κατανομή του γονότυπου του πολυμορφισμού rs4143815

C> G είναι σημαντικά διαφορετική μεταξύ των περιστατικών και των μαρτύρων (153). Αυτή η φαινομενική διαφορά μεταξύ των προαναφερθέντων αποτελεσμάτων μπορεί να αποδοθεί στην αποκλίνουσα βιολογία κάθε τύπου καρκίνου.

Στη συνέχεια αναλύθηκε η συσχέτιση των τριών διαφορετικών γονότυπων (CC, CG και GG) με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με TNBCs και βρέθηκε ότι ο γονότυπος GC συνδέεται σημαντικά με το στάδιο της προχωρημένης νόσου (chi-square, $P = 0.015$) και την επανεμφάνιση του καρκίνου του μαστού (chi-square, $P = 0.048$). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το αλληλόμορφο GC σχετίζεται με δείκτες χειρότερης πρόγνωσης και συνιστά ένα ενδιαφέρον εύρημα, καθώς υπάρχει ακόμη ανάγκη για νέους βιοδείκτες, ικανούς να βελτιώσουν την ταξινόμηση και την πρόγνωση του καρκίνου του μαστού.

Σύμφωνα με την ανάλυση επιβίωσής μας, οι γυναίκες που χαρακτηρίζονται από τον γονότυπο GC είχαν μικρότερο ελεύθερο νόσου διάστημα σε σύγκριση με τις ασθενείς που είχαν το αλληλόμορφο CC ή GG ($P = 0.013$). Μετά τη διχοτόμηση της μελέτης στις ακόλουθες ομάδες: α) Γονότυπος CC / GG / GC και Στάδιο I / II και β) Γονότυπος GG / GC και Στάδιο III βρέθηκε ότι οι γυναίκες Σταδίου III και GC ή GG αλληλόμορφα είχαν μικρότερο DFS ($P = 0.002$) και OS ($P < 0.001$). Η μονοπαραμετρική ανάλυση παλινδρόμησης Cox έδειξε ότι οι γυναίκες με το αλληλόμορφο GC σταδίου III χαρακτηρίζονται από χειρότερη ολική επιβίωση (HR = 7.28, % 95 CI = 0.21-5.82, $P < 0.001$). Ο rs4143815 πολυμορφισμός του PD-L1 έχει επίσης συσχετιστεί με κακή έκβαση στον καρκίνο των ωοθηκών (155), το αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα (182) και τον NSCLC (183). Ωστόσο, στον πλακώδες καρκίνωμα του οισοφάγου το rs4143815 C / G SNP δεν βρέθηκε να σχετίζεται με την επιβίωση των ασθενών (184).

Συμπερασματικά, βρέθηκε ότι το αλληλόμορφο GC του πολυμορφισμού rs4143815 του *PD-L1* εκφράζεται διαφορετικά στους τριπλά αρνητικούς ασθενείς με καρκίνο μαστού (TNBCs) και αυτή η κατανομή συνδέεται με δείκτες δυσμενούς πρόγνωσης και με την επιβίωση των ασθενών. Επιπλέον τα αλληλόμορφα TC και CC του πολυμορφισμού rs4938723 T>C του miR-34 επίσης σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση των ασθενών με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού. Δεδομένου ότι ακόμα υπάρχουν δυσκολίες στην κλινική διαχείριση των συγκεκριμένων ασθενών, η αναγνώριση νέων βιοδεικτών ικανών να βελτιώσουν την πρόγνωση της συγκεκριμένης ασθένειας είναι αναγκαία και τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης διατριβής μπορεί να αποτελέσουν το εναρκτήριο βήμα για την περαιτέρω διερεύνηση της χρησιμότητας και αξιοποίησης των συγκεκριμένων πολυμορφισμών προς αυτή την κατεύθυνση.

5. Βιβλιογραφία

1. Sharma S. Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines. *Indian J Med Paediatr Oncol.* 2009 Jan;30(1):1–8.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016 Jan;66(1):7–30.
3. Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Thompson A, Zackrisson S, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2013 Oct 1;24 Suppl 6(suppl 6):vi7-23.
4. ROJAS K, STUCKEY A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clin Obstet Gynecol.* 2016 Dec;59(4):651–72.
5. Thull DL, Vogel VG. Recognition and Management of Hereditary Breast Cancer Syndromes. *Oncologist.* 2004 Feb 1;9(1):13–24.
6. Mullooly M, Yang HP, Falk RT, Nyante SJ, Cora R, Pfeiffer RM, et al. Relationship between crown-like structures and sex-steroid hormones in breast adipose tissue and serum among postmenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2017 Dec 19;19(1):8.
7. Group EH and BCC, Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam AW, Helzlsouer KJ, et al. Circulating sex hormones and breast cancer risk factors in postmenopausal women: reanalysis of 13 studies. *Br J Cancer.* 2011 Aug 19;105(5):709–22.
8. Πατσούρης Ε., Καβαντζάς Ν., Κορκολοπούλου Π. ΛΑ. Παθολογική Ανατομική Αθήνα, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2007. *Iatrikes Ekdoseis Paschalidēs;* 2007.
9. van de Vijver MJ. Genetic alterations in breast cancer. *Curr Diagnostic Pathol.* 2000 Dec 1;6(4):271–81.
10. Lee EYHP, Muller WJ. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Oct;2(10):a003236.
11. Walsh T, King M-C. Ten Genes for Inherited Breast Cancer. *Cancer Cell.* 2007 Feb;11(2):103–5.
12. Lalloo F, Evans DG. Familial Breast Cancer. *Clin Genet.* 2012 Aug;82(2):105–14.
13. Stamatakos M, Palla V, Karaiskos I, Xiromeritis K, Alexiou I, Pateras I, et al. Cell cyclins: triggering elements of cancer or not? *World J Surg Oncol.* 2010 Dec 22;8:111.
14. Chappell WH, Steelman LS, Long JM, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget.* 2011 Mar;2(3):135–64.
15. Xu J, Chen Y, Olopade OI. MYC and Breast Cancer. *Genes Cancer.* 2010

- Jun;1(6):629–40.
16. Buchholz TA, Wazer DE. Molecular biology and genetics of breast cancer development: A clinical perspective. *Semin Radiat Oncol*. 2002 Oct 1;12(4):285–95.
 17. Bieging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(5):359–70.
 18. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther*. 2010 Nov 15;10(10):955–60.
 19. BLOOM HJ, RICHARDSON WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*. 1957 Sep;11(3):359–77.
 20. Shawarby M, Al-Tamimi D, Ahmed A. Molecular classification of breast cancer: An overview with emphasis on ethnic variations and future perspectives. *Saudi J Med Med Sci*. 2013;1(1):14.
 21. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10869–74.
 22. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747–52.
 23. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2013 Sep;24(9):2206–23.
 24. Eroles P, Bosch A, Pérez-Fidalgo JA, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*. 2012 Oct;38(6):698–707.
 25. Lehmann BD, Pietenpol JA, Tan AR. Triple-Negative Breast Cancer: Molecular Subtypes and New Targets for Therapy. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2015;35:e31–9.
 26. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8418–23.
 27. Breast Cancer Facts & Figures | American Cancer Society [Internet]. [cited 2019 Jul 14]. Available from: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/breast-cancer-facts-figures.html>
 28. Turashvili G, Brogi E. Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. *Front Med*. 2017;4:227.
 29. Fujii T, Yajima R, Hirakata T, Miyamoto T, Fujisawa T, Tsutsumi S, et al. Impact of the prognostic value of vascular invasion, but not lymphatic invasion, of the primary tumor in patients with breast cancer. *Anticancer Res*. 2014 Mar;34(3):1255–9.

30. Narod SA. Tumour size predicts long-term survival among women with lymph node-positive breast cancer. *Curr Oncol*. 2012 Oct;19(5):249–53.
31. Lee AHS, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index for Invasive Carcinoma of the Breast. *Pathol Oncol Res*. 2008 Jun 10;14(2):113–5.
32. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Nov 20;25(33):5287–312.
33. Dai X, Xiang L, Li T, Bai Z. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. *J Cancer*. 2016;7(10):1281–94.
34. Dos Anjos Pultz B, da Luz FAC, de Faria PR, Oliveira APL, de Araújo RA, Silva MJB. Far beyond the usual biomarkers in breast cancer: a review. *J Cancer*. 2014;5(7):559–71.
35. Győrffy B, Hatzis C, Sanft T, Hofstatter E, Aktas B, Pusztai L. Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. *Breast Cancer Res*. 2015 Dec 27;17(1):11.
36. Zhao X, Rødland EA, Sørli T, Vollan HKM, Russnes HG, Kristensen VN, et al. Systematic assessment of prognostic gene signatures for breast cancer shows distinct influence of time and ER status. *BMC Cancer*. 2014 Mar 19;14(1):211.
37. He S, Chu J, Wu L-C, Mao H, Peng Y, Alvarez-Breckenridge CA, et al. MicroRNAs activate natural killer cells through Toll-like receptor signaling. *Blood*. 2013 Jun 6;121(23):4663–71.
38. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*. 2009 Jan 23;136(2):215–33.
39. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*. 2007 Dec 21;318(5858):1931–4.
40. Shukla GC, Singh J, Barik S. MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions. *Mol Cell Pharmacol*. 2011;3(3):83–92.
41. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15524–9.
42. Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M, et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Apr 1;105(13):5166–71.
43. Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med*. 2014 Aug;20(8):460–9.
44. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74.

45. Bader AG. miR-34 - a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. *Front Genet.* 2012;3:120.
46. Wiggins JF, Ruffino L, Kelnar K, Omotola M, Patrawala L, Brown D, et al. Development of a Lung Cancer Therapeutic Based on the Tumor Suppressor MicroRNA-34. *Cancer Res.* 2010 Jul 15;70(14):5923–30.
47. Ziebarth JD, Bhattacharya A, Cui Y. Integrative analysis of somatic mutations altering microRNA targeting in cancer genomes. Chellappan SP, editor. *PLoS One.* 2012 Oct 16;7(10):e47137.
48. Amorim M, Salta S, Henrique R, Jerónimo C. Decoding the usefulness of non-coding RNAs as breast cancer markers. *J Transl Med.* 2016 Dec 15;14(1):265.
49. Iorio M V., Ferracin M, Liu C-G, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. *Cancer Res.* 2005 Aug 15;65(16):7065–70.
50. van Schooneveld E, Wildiers H, Vergote I, Vermeulen PB, Dirix LY, Van Laere SJ. Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management. *Breast Cancer Res.* 2015 Feb 18;17(1):21.
51. Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics.* 2015;5(10):1122–43.
52. Tang J, Ahmad A, Sarkar FH. The role of microRNAs in breast cancer migration, invasion and metastasis. *Int J Mol Sci.* 2012 Oct 18;13(10):13414–37.
53. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature.* 2007 Oct 11;449(7163):682–8.
54. Yan G-R, Xu S-H, Tan Z-L, Liu L, He Q-Y. Global identification of miR-373-regulated genes in breast cancer by quantitative proteomics. *Proteomics.* 2011 Mar;11(5):912–20.
55. Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, le Sage C, Nagel R, Nair S, et al. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat Cell Biol.* 2008 Feb 13;10(2):202–10.
56. Li L, Xiao B, Tong H, Xie F, Zhang Z, Xiao GG. Regulation of breast cancer tumorigenesis and metastasis by miRNAs. *Expert Rev Proteomics.* 2012 Dec 9;9(6):615–25.
57. Elliman SJ, Howley B V, Mehta DS, Fearnhead HO, Kemp DM, Barkley LR. Selective repression of the oncogene cyclin D1 by the tumor suppressor miR-206 in cancers. *Oncogenesis.* 2014 Aug 11;3(8):e113.
58. Adams BD, Furneaux H, White BA. The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ERalpha) and represses ERalpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines. *Mol Endocrinol.*

- 2007 May 1;21(5):1132–47.
59. Lee JA, Lee HY, Lee ES, Kim I, Bae JW. Prognostic Implications of MicroRNA-21 Overexpression in Invasive Ductal Carcinomas of the Breast. *J Breast Cancer*. 2011 Dec;14(4):269–75.
 60. Markou A, Yousef GM, Stathopoulos E, Georgoulas V, Lianidou E. Prognostic Significance of Metastasis-Related MicroRNAs in Early Breast Cancer Patients with a Long Follow-up. *Clin Chem*. 2014 Jan 1;60(1):197–205.
 61. Yan L-X, Huang X-F, Shao Q, Huang M-Y, Deng L, Wu Q-L, et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA*. 2008 Nov 16;14(11):2348–60.
 62. Godfrey AC, Xu Z, Weinberg CR, Getts RC, Wade PA, DeRoo LA, et al. Serum microRNA expression as an early marker for breast cancer risk in prospectively collected samples from the Sister Study cohort. *Breast Cancer Res*. 2013 May 24;15(3):R42.
 63. Kodahl AR, Lyng MB, Binder H, Cold S, Gravgard K, Knoop AS, et al. Novel circulating microRNA signature as a potential non-invasive multi-marker test in ER-positive early-stage breast cancer: a case control study. *Mol Oncol*. 2014 Jul;8(5):874–83.
 64. Chan M, Liaw CS, Ji SM, Tan HH, Wong CY, Thike AA, et al. Identification of Circulating MicroRNA Signatures for Breast Cancer Detection. *Clin Cancer Res*. 2013 Aug 15;19(16):4477–87.
 65. Cuk K, Zucknick M, Heil J, Madhavan D, Schott S, Turchinovich A, et al. Circulating microRNAs in plasma as early detection markers for breast cancer. *Int J Cancer*. 2013 Apr 1;132(7):1602–12.
 66. Ng EKO, Li R, Shin VY, Jin HC, Leung CPH, Ma ESK, et al. Circulating microRNAs as Specific Biomarkers for Breast Cancer Detection. Srivastava RK, editor. *PLoS One*. 2013 Jan 3;8(1):e53141.
 67. Blenkiron C, Goldstein LD, Thorne NP, Spiteri I, Chin S-F, Dunning MJ, et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol*. 2007;8(10):R214.
 68. de Rinaldis E, Gazinska P, Mera A, Modrusan Z, Fedorowicz GM, Burford B, et al. Integrated genomic analysis of triple-negative breast cancers reveals novel microRNAs associated with clinical and molecular phenotypes and sheds light on the pathways they control. *BMC Genomics*. 2013 Sep 23;14(1):643.
 69. Lowery AJ, Miller N, Devaney A, McNeill RE, Davoren PA, Lemetre C, et al. MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neureceptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2009 Jun 11;11(3):R27.
 70. Volinia S, Galasso M, Sana ME, Wise TF, Palatini J, Huebner K, et al. Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA.

- Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Feb 21;109(8):3024–9.
71. Giricz O, Reynolds PA, Ramnauth A, Liu C, Wang T, Stead L, et al. Hsa-miR-375 is differentially expressed during breast lobular neoplasia and promotes loss of mammary acinar polarity. *J Pathol*. 2012 Jan;226(1):108–19.
 72. Van der Auwera I, Limame R, van Dam P, Vermeulen PB, Dirix LY, Van Laere SJ. Integrated miRNA and mRNA expression profiling of the inflammatory breast cancer subtype. *Br J Cancer*. 2010 Aug 10;103(4):532–41.
 73. Lerebours F, Cizeron-Clairac G, Susini A, Vacher S, Mouret-Fourme E, Belichard C, et al. miRNA expression profiling of inflammatory breast cancer identifies a 5-miRNA signature predictive of breast tumor aggressiveness. *Int J cancer*. 2013 Oct 1;133(7):1614–23.
 74. Ahmad A, Ginnebaugh KR, Yin S, Bollig-Fischer A, Reddy KB, Sarkar FH. Functional role of miR-10b in tamoxifen resistance of ER-positive breast cancer cells through down-regulation of HDAC4. *BMC Cancer*. 2015 Jul 24;15(1):540.
 75. Beji S, Milano G, Scopece A, Cicchillitti L, Cencioni C, Picozza M, et al. Doxorubicin upregulates CXCR4 via miR-200c/ZEB1-dependent mechanism in human cardiac mesenchymal progenitor cells. *Cell Death Dis*. 2017 Aug 24;8(8):e3020–e3020.
 76. Khalighfard S, Alizadeh AM, Irani S, Omranipour R. Plasma miR-21, miR-155, miR-10b, and Let-7a as the potential biomarkers for the monitoring of breast cancer patients. *Sci Rep*. 2018 Dec 19;8(1):17981.
 77. Agostini M, Knight RA. miR-34: from bench to bedside. *Oncotarget*. 2014 Feb 28;5(4):872–81.
 78. Slabáková E, Culig Z, Remšík J, Souček K. Alternative mechanisms of miR-34a regulation in cancer. *Cell Death Dis*. 2017 Oct 12;8(10):e3100.
 79. Misso G, Di Martino MT, De Rosa G, Farooqi AA, Lombardi A, Campani V, et al. Mir-34: a new weapon against cancer? *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014 Sep 23;3:e194.
 80. Maroof H, Salajegheh A, Smith RA, Lam AK-Y. Role of microRNA-34 family in cancer with particular reference to cancer angiogenesis. *Exp Mol Pathol*. 2014 Oct;97(2):298–304.
 81. Inside Perspectives: Will Immunotherapy Knock Out Cancer? - WuXi XPress: for WuXi news and R&D insights [Internet]. [cited 2019 Jul 21]. Available from: <http://wxpress.wuxiapptec.com/inside-perspectives-will-immunotherapy-knock-cancer/>
 82. NAUTS HC, SWIFT WE, COLEY BL. The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, M.D., reviewed in the light of modern research. *Cancer Res*. 1946 Apr;6:205–16.
 83. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-guerin in the Treatment of Superficial Bladder Tumors. *J Urol*. 1976 Aug;116(2):180–2.

84. Bindon C, Czerniecki M, Ruell P, Edwards A, McCarthy WH, Harris R, et al. Clearance rates and systemic effects of intravenously administered interleukin 2 (IL-2) containing preparations in human subjects. *Br J Cancer*. 1983 Jan;47(1):123–33.
85. Kirkwood JM, Ernstoff MS, Davis CA, Reiss M, Ferraresi R, Rudnick SA. Comparison of intramuscular and intravenous recombinant alpha-2 interferon in melanoma and other cancers. *Ann Intern Med*. 1985 Jul 1;103(1):32–6.
86. Farkona S, Diamandis EP, Blasutig IM. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Med*. 2016 Dec 5;14(1):73.
87. Hargadon KM, Johnson CE, Williams CJ. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. *Int Immunopharmacol*. 2018 Sep;62:29–39.
88. Wei SC, Duffy CR, Allison JP. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov*. 2018 Sep;8(9):1069–86.
89. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*. 1994 Aug;1(5):405–13.
90. Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med*. 1995 Aug 1;182(2):459–65.
91. Chambers CA, Cado D, Truong T, Allison JP. Thymocyte development is normal in CTLA-4-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci*. 1997 Aug 19;94(17):9296–301.
92. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 Control over Foxp3+ Regulatory T Cell Function. *Science* (80-). 2008 Oct 10;322(5899):271–5.
93. van der Merwe PA, Bodian DL, Daenke S, Linsley P, Davis SJ. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J Exp Med*. 1997 Feb 3;185(3):393–403.
94. Egen JG, Allison JP. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity*. 2002 Jan;16(1):23–35.
95. Kane LP, Andres PG, Howland KC, Abbas AK, Weiss A. Akt provides the CD28 costimulatory signal for up-regulation of IL-2 and IFN-gamma but not TH2 cytokines. *Nat Immunol*. 2001 Jan;2(1):37–44.
96. Bachmann MF, Köhler G, Ecabert B, Mak TW, Kopf M. Cutting edge: lymphoproliferative disease in the absence of CTLA-4 is not T cell autonomous. *J Immunol*. 1999 Aug 1;163(3):1128–31.
97. Jain N, Nguyen H, Chambers C, Kang J. Dual function of CTLA-4 in regulatory T cells and conventional T cells to prevent multiorgan autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 26;107(4):1524–8.

98. Wei SC, Levine JH, Cogdill AP, Zhao Y, Anang N-AAS, Andrews MC, et al. Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade. *Cell*. 2017 Sep;170(6):1120–1133.e17.
99. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med*. 2010 Aug 19;363(8):711–23.
100. Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, Weber JS, Margolin K, Hamid O, et al. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol*. 2015 Jun 10;33(17):1889–94.
101. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. 1999 Aug;11(2):141–51.
102. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2001 Mar;2(3):261–8.
103. Goldberg M V, Maris CH, Hipkiss EL, Flies AS, Zhen L, Tuder RM, et al. Role of PD-1 and its ligand, B7-H1, in early fate decisions of CD8 T cells. *Blood*. 2007 Jul 1;110(1):186–92.
104. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med*. 2009 Dec 21;206(13):3015–29.
105. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006 Feb 28;439(7077):682–7.
106. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002 Aug 24;8(8):793–800.
107. Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, Hashimoto-Tane A, Azuma M, Saito T. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J Exp Med*. 2012 Jun 4;209(6):1201–17.
108. Hui E, Cheung J, Zhu J, Su X, Taylor MJ, Wallweber HA, et al. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science*. 2017 Mar 31;355(6332):1428–33.
109. Rota G, Niogret C, Dang AT, Barros CR, Fonta NP, Alfei F, et al. Shp-2 Is Dispensable for Establishing T Cell Exhaustion and for PD-1 Signaling In Vivo. *Cell Rep*. 2018 Apr 3;23(1):39–49.
110. Patsoukis N, Bardhan K, Chatterjee P, Sari D, Liu B, Bell LN, et al. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty

- acid oxidation. *Nat Commun.* 2015 Mar 26;6(1):6692.
111. Buck MD, O’Sullivan D, Klein Geltink RI, Curtis JD, Chang C-H, Sanin DE, et al. Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming. *Cell.* 2016 Jun 30;166(1):63–76.
 112. Wherry EJ, Ha S-J, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, et al. Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection. *Immunity.* 2007 Oct;27(4):670–84.
 113. Pauken KE, Sammons MA, Odorizzi PM, Manne S, Godec J, Khan O, et al. Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science.* 2016 Dec 2;354(6316):1160–5.
 114. Kortlever RM, Sodir NM, Wilson CH, Burkhart DL, Pellegrinet L, Brown Swigart L, et al. Myc Cooperates with Ras by Programming Inflammation and Immune Suppression. *Cell.* 2017 Nov 30;171(6):1301–1315.e14.
 115. Kleffel S, Posch C, Barthel SR, Mueller H, Schlapbach C, Guenova E, et al. Melanoma Cell-Intrinsic PD-1 Receptor Functions Promote Tumor Growth. *Cell.* 2015 Sep 10;162(6):1242–56.
 116. Weber JS, D’Angelo SP, Minor D, Hodi FS, Gutzmer R, Neyns B, et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2015 Apr;16(4):375–84.
 117. Robert C, Long G V., Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without *BRAF* Mutation. *N Engl J Med.* 2015 Jan 22;372(4):320–30.
 118. Weber J, Mandala M, Del Vecchio M, Gogas HJ, Arance AM, Cowey CL, et al. Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. *N Engl J Med.* 2017 Nov 9;377(19):1824–35.
 119. Ribas A, Puzanov I, Dummer R, Schadendorf D, Hamid O, Robert C, et al. Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2015 Aug;16(8):908–18.
 120. Barlesi F, Garon EB, Kim D-W, Felip E, Han J-Y, Kim J-H, et al. Health-Related Quality of Life in KEYNOTE-010: a Phase II/III Study of Pembrolizumab Versus Docetaxel in Patients With Previously Treated Advanced, Programmed Death Ligand 1–Expressing NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2019 May;14(5):793–801.
 121. Powles T, Durán I, van der Heijden MS, Loriot Y, Vogelzang NJ, De Giorgi U, et al. Atezolizumab versus chemotherapy in patients with platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma (IMvigor211): a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet (London, England).* 2018 Feb 24;391(10122):748–57.
 122. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J, et al.

- Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet* (London, England). 2017 Jan 21;389(10066):255–65.
123. Patel MR, Ellerton J, Infante JR, Agrawal M, Gordon M, Aljumaily R, et al. Avelumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum failure (JAVELIN Solid Tumor): pooled results from two expansion cohorts of an open-label, phase 1 trial. *Lancet Oncol*. 2018 Jan;19(1):51–64.
 124. Kaufman HL, Russell J, Hamid O, Bhatia S, Terheyden P, D'Angelo SP, et al. Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma: a multicentre, single-group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2016 Oct;17(10):1374–85.
 125. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2017 Nov 16;377(20):1919–29.
 126. Wimberly H, Brown JR, Schalper K, Haack H, Silver MR, Nixon C, et al. PD-L1 Expression Correlates with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancer Immunol Res*. 2015 Apr 1;3(4):326–32.
 127. Sabatier R, Finetti P, Mamessier E, Adelaide J, Chaffanet M, Ali HR, et al. Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. *Oncotarget*. 2015 Mar 10;6(7):5449–64.
 128. Crane CA, Panner A, Murray JC, Wilson SP, Xu H, Chen L, et al. PI(3) kinase is associated with a mechanism of immunoresistance in breast and prostate cancer. *Oncogene*. 2009 Jan 15;28(2):306–12.
 129. Nanda R, Chow LQM, Dees EC, Berger R, Gupta S, Geva R, et al. Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. *J Clin Oncol*. 2016 Jul 20;34(21):2460–7.
 130. Emens LA, Braithe FS, Cassier P, Delord J-P, Eder JP, Fasso M, et al. Abstract 2859: Inhibition of PD-L1 by MPDL3280A leads to clinical activity in patients with metastatic triple-negative breast cancer (TNBC). In: *Immunology*. American Association for Cancer Research; 2015. p. 2859–2859.
 131. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):860–921.
 132. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet*. 2003 Mar;33 Suppl(S3):228–37.
 133. Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. *Nat Genet*. 2001 Mar;27(3):234–6.
 134. Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Smith JD, Kruglyak L, Nickerson DA. Additional

- SNPs and linkage-disequilibrium analyses are necessary for whole-genome association studies in humans. *Nat Genet.* 2003 Apr 24;33(4):518–21.
135. Bonnen PE, Wang PJ, Kimmel M, Chakraborty R, Nelson DL. Haplotype and linkage disequilibrium architecture for human cancer-associated genes. *Genome Res.* 2002 Dec 1;12(12):1846–53.
 136. Erichsen HC, Chanock SJ. SNPs in cancer research and treatment. *Br J Cancer.* 2004 Feb 23;90(4):747–51.
 137. Le Marchand L, Seifried A, Lum A, Wilkens LR. Association of the myeloperoxidase -463G-->a polymorphism with lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000 Feb;9(2):181–4.
 138. Hein DW. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat Res.* 2002 Sep 30;506–507:65–77.
 139. Paris PL, Kupelian PA, Hall JM, Williams TL, Levin H, Klein EA, et al. Association between a CYP3A4 genetic variant and clinical presentation in African-American prostate cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999 Oct;8(10):901–5.
 140. Kalow W, Tang BK, Endrenyi L. Hypothesis: comparisons of inter- and intra-individual variations can substitute for twin studies in drug research. *Pharmacogenetics.* 1998 Aug;8(4):283–9.
 141. Patel JN. Cancer pharmacogenomics, challenges in implementation, and patient-focused perspectives. *Pharmgenomics Pers Med.* 2016 Jul;9:65–77.
 142. Chenevix-Trench G, Milne RL, Antoniou AC, Couch FJ, Easton DF, Goldgar DE, et al. An international initiative to identify genetic modifiers of cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1 and BRCA2 (CIMBA). *Breast Cancer Res.* 2007 Dec 19;9(2):104.
 143. Lilyquist J, Ruddy KJ, Vachon CM, Couch FJ. Common Genetic Variation and Breast Cancer Risk-Past, Present, and Future. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2018 Apr;27(4):380–94.
 144. Antoniou AC, Spurdle AB, Sinilnikova OM, Healey S, Pooley KA, Schmutzler RK, et al. Common Breast Cancer-Predisposition Alleles Are Associated with Breast Cancer Risk in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *Am J Hum Genet.* 2008 Apr;82(4):937–48.
 145. Antoniou AC, Wang X, Fredericksen ZS, McGuffog L, Tarrell R, Sinilnikova OM, et al. A locus on 19p13 modifies risk of breast cancer in BRCA1 mutation carriers and is associated with hormone receptor-negative breast cancer in the general population. *Nat Genet.* 2010 Oct 19;42(10):885–92.
 146. Stevens KN, Fredericksen Z, Vachon CM, Wang X, Margolin S, Lindblom A, et al. 19p13.1 is a triple-negative-specific breast cancer susceptibility locus. *Cancer Res.* 2012 Apr 1;72(7):1795–803.
 147. Couch FJ, Wang X, McGuffog L, Lee A, Olswold C, Kuchenbaecker KB, et al.

- Genome-wide association study in BRCA1 mutation carriers identifies novel loci associated with breast and ovarian cancer risk. Hunter KW, editor. *PLoS Genet.* 2013 Mar 27;9(3):e1003212.
148. Mavaddat N, Barrowdale D, Andrulis IL, Domchek SM, Eccles D, Nevanlinna H, et al. Pathology of Breast and Ovarian Cancers among BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: Results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012 Jan 1;21(1):134–47.
 149. Mulligan AM, Couch FJ, Barrowdale D, Domchek SM, Eccles D, Nevanlinna H, et al. Common breast cancer susceptibility alleles are associated with tumour subtypes in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2. *Breast Cancer Res.* 2011 Dec 2;13(6):R110.
 150. Kuchenbaecker KB, Neuhausen SL, Robson M, Barrowdale D, McGuffog L, Mulligan AM, et al. Associations of common breast cancer susceptibility alleles with risk of breast cancer subtypes in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Res.* 2014 Dec 31;16(6):3416.
 151. Milne RL, Kuchenbaecker KB, Michailidou K, Beesley J, Kar S, Lindström S, et al. Identification of ten variants associated with risk of estrogen-receptor-negative breast cancer. *Nat Genet.* 2017 Dec 23;49(12):1767–78.
 152. Kataoka K, Shiraishi Y, Takeda Y, Sakata S, Matsumoto M, Nagano S, et al. Aberrant PD-L1 expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers. *Nature.* 2016 Jun 23;534(7607):402–6.
 153. Wang W, Li F, Mao Y, Zhou H, Sun J, Li R, et al. A miR-570 binding site polymorphism in the B7-H1 gene is associated with the risk of gastric adenocarcinoma. *Hum Genet.* 2013 Jun 21;132(6):641–8.
 154. Catalano C, da Silva Filho MI, Frank C, Jiraskova K, Vymetalkova V, Levy M, et al. Investigation of single and synergic effects of NLRC5 and PD-L1 variants on the risk of colorectal cancer. De Re V, editor. *PLoS One.* 2018 Feb 6;13(2):e0192385.
 155. Tan D, Sheng L, Yi Q-H. Correlation of PD-1/PD-L1 polymorphisms and expressions with clinicopathologic features and prognosis of ovarian cancer. *Cancer Biomark.* 2018 Feb 6;21(2):287–97.
 156. Zou J, Wu D, Li T, Wang X, Liu Y, Tan S. Association of PD-L1 gene rs4143815 C>G polymorphism and human cancer susceptibility: A systematic review and meta-analysis. *Pathol Res Pract.* 2019 Feb;215(2):229–34.
 157. Zanusso C, Dreussi E, Bortolus R, Romualdi C, Gagno S, De Mattia E, et al. rs4143815-PDL1, a New Potential Immunogenetic Biomarker of Biochemical Recurrence in Locally Advanced Prostate Cancer after Radiotherapy. *Int J Mol Sci.* 2019 Apr 27;20(9):2082.
 158. Nomizo T, Ozasa H, Tsuji T, Funazo T, Yasuda Y, Yoshida H, et al. Clinical Impact of Single Nucleotide Polymorphism in PD-L1 on Response to Nivolumab for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Patients. *Sci Rep.* 2017 Apr 23;7(1):45124.

159. Moszyńska A, Gebert M, Collawn JF, Bartoszewski R. SNPs in microRNA target sites and their potential role in human disease. *Open Biol.* 2017 Apr 5;7(4):170019.
160. Sun G, Yan J, Noltner K, Feng J, Li H, Sarkis DA, et al. SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. *RNA.* 2009 Sep 1;15(9):1640–51.
161. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature.* 2005 Feb 17;433(7027):769–73.
162. Seo J, Jin D, Choi C-H, Lee H. Integration of MicroRNA, mRNA, and Protein Expression Data for the Identification of Cancer-Related MicroRNAs. Unver T, editor. *PLoS One.* 2017 Jan 5;12(1):e0168412.
163. Dai Z-M, Kang H-F, Zhang W-G, Li H-B, Zhang S-Q, Ma X-B, et al. The Associations of Single Nucleotide Polymorphisms in miR196a2, miR-499, and miR-608 With Breast Cancer Susceptibility: A STROBE-Compliant Observational Study. *Medicine (Baltimore).* 2016 Feb;95(7):e2826.
164. Zhang J, Wei B, Hu H, Liu F, Tu Y, He F. The association between differentially expressed micro RNAs in breast cancer cell lines and the micro RNA-205 gene polymorphism in breast cancer tissue. *Oncol Lett.* 2018 Feb 8;15(2):2139–46.
165. Chen J, Jiang Y, Zhou J, Liu S, Qin N, Du J, et al. Evaluation of CpG-SNPs in miRNA promoters and risk of breast cancer. *Gene.* 2018 Apr 20;651:1–8.
166. Zhang S, Qian J, Cao Q, Li P, Wang M, Wang J, et al. A potentially functional polymorphism in the promoter region of miR-34b/c is associated with renal cell cancer risk in a Chinese population. *Mutagenesis.* 2014 Mar;29(2):149–54.
167. Chou J, Provot S, Werb Z. GATA3 in development and cancer differentiation: Cells GATA have it! *J Cell Physiol.* 2010 Jan;222(1):42–9.
168. Liu C-J, Ma X-W, Zhang X-J, Shen S-Q. pri-miR-34b/c rs4938723 polymorphism is associated with hepatocellular carcinoma risk: a case-control study in a Chinese population. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2017;8(1):1–7.
169. Hashemi M, Bahari G, Naderi M, Sadeghi-Bojd S, Taheri M. Pri-miR-34b/c rs4938723 polymorphism is associated with the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet.* 2016 Nov;209(11):493–6.
170. Yuan F, Sun R, Chen P, Liang Y, Ni S, Quan Y, et al. Combined analysis of pri-miR-34b/c rs4938723 and TP53 Arg72Pro with cervical cancer risk. *Tumour Biol.* 2016 May 30;37(5):6267–73.
171. Oh J, Kim JW, Lee BE, Jang MJ, Chong SY, Park PW, et al. Polymorphisms of the pri-miR-34b/c promoter and TP53 codon 72 are associated with risk of colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2014 Feb;31(2):995–1002.
172. Pan X-M, Sun R-F, Li Z-H, Guo X-M, Qin H-J, Gao L-B. Pri-miR-34b/c rs4938723 Polymorphism Is Associated with a Decreased Risk of Gastric Cancer. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2015 Apr;19(4):198–202.

173. Häberle L, Hein A, Rübner M, Schneider M, Ekici AB, Gass P, et al. Predicting Triple-Negative Breast Cancer Subtype Using Multiple Single Nucleotide Polymorphisms for Breast Cancer Risk and Several Variable Selection Methods. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 2017 Jun 28;77(6):667–78.
174. Stevens KN, Vachon CM, Couch FJ. Genetic Susceptibility to Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res.* 2013 Apr 1;73(7):2025–30.
175. Bareche Y, Venet D, Ignatiadis M, Aftimos P, Piccart M, Rothe F, et al. Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2018 Apr 1;29(4):895–902.
176. Findlay JM, Middleton MR, Tomlinson I. A systematic review and meta-analysis of somatic and germline DNA sequence biomarkers of esophageal cancer survival, therapy response and stage. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2015 Apr;26(4):624–44.
177. Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2010 Feb 22;17(2):193–9.
178. Bossard P, Zaret KS. GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation. *Development.* 1998 Dec;125(24):4909–17.
179. Bensen JT, Tse CK, Nyante SJ, Barnholtz-Sloan JS, Cole SR, Millikan RC. Association of germline microRNA SNPs in pre-miRNA flanking region and breast cancer risk and survival: the Carolina Breast Cancer Study. *Cancer Causes Control.* 2013 Jun 23;24(6):1099–109.
180. Sanaei S, Hashemi M, Rezaei M, Hashemi SM, Bahari G, Ghavami S. Evaluation of the pri-miR-34b/c rs4938723 polymorphism and its association with breast cancer risk. *Biomed reports.* 2016 Jul;5(1):125–9.
181. Du W, Zhu J, Chen Y, Zeng Y, Shen D, Zhang N, et al. Variant SNPs at the microRNA complementary site in the B7-H1 3'-untranslated region increase the risk of non-small cell lung cancer. *Mol Med Rep.* 2017 Sep;16(3):2682–90.
182. Yeo M-K, Choi S-Y, Seong I-O, Suh K-S, Kim JM, Kim K-H. Association of PD-L1 expression and PD-L1 gene polymorphism with poor prognosis in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Hum Pathol.* 2017 Oct;68:103–11.
183. Lee SY, Jung DK, Choi JE, Jin CC, Hong MJ, Do SK, et al. Functional polymorphisms in PD-L1 gene are associated with the prognosis of patients with early stage non-small cell lung cancer. *Gene.* 2017 Jan 30;599:28–35.
184. Zhou R-M, Li Y, Liu J-H, Wang N, Huang X, Cao S-R, et al. Programmed death-1 ligand-1 gene rs2890658 polymorphism associated with the risk of esophageal squamous cell carcinoma in smokers. *Cancer Biomark.* 2017 Dec 12;21(1):65–71.

Περίληψη

Ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (TNBC) αντιπροσωπεύει τον πιο επιθετικό υποτύπο του καρκίνου του μαστού, καθώς συνδέεται με υψηλό ποσοστό υποτροπής κατά τα πρώτα 3 χρόνια μετά τη διάγνωση και κακή κλινική έκβαση. Επιπλέον, αυτοί οι ασθενείς χαρακτηρίζονται συχνά από αντοχή σε θεραπείες ορμονών ή στοχευμένες θεραπείες, όπως η τραστοζουμάμπη, η οποία αποδίδεται κυρίως στην ετερογένεια και τη σύνθετη βιολογική συμπεριφορά των TNBC. Μολονότι οι μοριακές πτυχές της παθογένειας TNBC έχουν αποκρυπτογραφηθεί σε μεγάλο βαθμό, η αποτελεσματική πρόγνωση και θεραπεία των ασθενών με TNBC εξακολουθεί να αποτελεί δύσκολο έργο σε κλινικό επίπεδο, επισημαίνοντας έτσι την ανάγκη ταυτοποίησης νέων και πιο αξιόπιστων προγνωστικών και προγνωστικών δεικτών για ασθενείς με TNBC.

Η κατανόηση του ζωτικού ρόλου των ανοσολογικών σημείων ελέγχου στη διευκόλυνση της διαφυγής όγκων αποκάλυψε μια νέα τάξη πιθανών βιολογικών δεικτών καρκίνου και θεραπευτικών στόχων. Μεταξύ των πλέον μελετημένων ανοσολογικών σημείων ελέγχου είναι ο προγραμματισμένος συνδέτης θανάτου-1 (PD-L1). Τα miRNAs επίσης αποτελούν μία νέα πηγή αναζήτησης νέων μοριακών βιοδεικτών και τα τελευταία χρόνια η εντατική μελέτη της κλινικής τους αξίας έχει καταλήξει σε ελπιδοφόρα αποτελέσματα. Τέλος υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές που σχετίζουν την ύπαρξη πολυμορφισμών μονήρους νουκλεοτιδίου (SNPs) με την ανάπτυξη του καρκίνου, την πρόγνωση και την αντοχή στη θεραπεία, κυρίως μέσω της αλληλεπίδρασής τους με άλλους παράγοντες.

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη και η κλινική αξιολόγηση των πολυμορφισμών μονήρους νουκλεοτιδίου του γονιδίου *PD-L1* rs4143815 C>G και miR-34 rs4938723 T>C ως νέων μοριακών δεικτών για την πρόγνωση του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού. Για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε συλλογή και επεξεργασία του καρκινικού ιστού 114 γυναικών με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού και αίμα 124 υγιών γυναικών. Ακολούθησε σχεδιασμός και εφαρμογή της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) για την ανίχνευση των εξεταζόμενων πολυμορφισμών στα υπό μελέτη δείγματα και εκτενής βιοστατική ανάλυση για την διερεύνηση της κλινικής αξίας των εν λόγω πολυμορφισμών.

Σε ό,τι αφορά τον πολυμορφισμό miR-34 rs4938723 T>C η στατιστική ανάλυση αποκάλυψε ότι η πλειονότητα των ασθενών με προγενές καρκίνωμα του μαστού έχουν TC ή CC γονότυπο ($P=0.020$). Επιπλέον, οι ασθενείς αυτές είχαν μικρότερα διαστήματα ολικής

επιβίωσης ($P < 0.001$). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε και από την ανάλυση επιβίωσης, η οποία αποκάλυψε ότι οι ασθενείς που φέρουν τα αλληλόμορφα TC ή CC είχαν μικρότερα διαστήματα ολικής ($P < 0.001$) ($HR = 3.2$, $95\% CI = 2.0-5.5$, $P = 0.008$) και χωρίς υποτροπές ($P = 0.05$) επιβίωσης ($P = 0.05$). Η πραγματοποίηση της ανάλυσης επιβίωσης μετά από κατηγοριοποίηση των ασθενών με βάση τον ιστολογικό τύπο του καρκίνου αποκάλυψε ότι οι γυναίκες με πορογενή καρκινώματα και TC ή CC γονότυπο είχαν μειωμένη επιβίωση ($P < 0.001$) και χειρότερη πρόγνωση ($HR = 2.35$, $95\% CI = 2.1-4.65$, $P = 0.003$).

Αναφορικά με τον πολυμορφισμό του *PD-L1* rs4143815 C>G η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι ο GC γονότυπος σχετίζεται με προχωρημένο στάδιο της νόσου ($P = 0.015$) και με την εμφάνιση υποτροπών ($P = 0.048$). Η ανάλυση επιβίωσης αποκάλυψε ότι οι γυναίκες που φέρουν το GC αλληλόμορφο χαρακτηρίζονται από μικρότερα διαστήματα επιβίωσης χωρίς υποτροπές ($P = 0.013$) σε σχέση με τις ασθενείς που φέρουν τα αλληλόμορφα CC ή GG. Επιπλέον βρέθηκε ότι οι γυναίκες με όγκους σταδίου III και GC ή GG γονότυπο είχαν μικρότερη ολική ($P < 0.001$) και χωρίς υποτροπές επιβίωση ($P = 0.002$). Η ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox επιβεβαίωσε ότι αυτές οι ασθενείς έχουν χειρότερη πρόγνωση ($HR = 7.28$, $95\% CI = 0.21-5.82$, $P < 0.001$).

Συμπερασματικά, ο πολυμορφισμός rs4143815 του *PD-L1* εκφράζεται διαφορετικά στους τριπλά αρνητικούς ασθενείς με καρκίνο μαστού (TNBCs) και αυτή η κατανομή συνδέεται με δείκτες δυσμενούς πρόγνωσης και με την επιβίωση των ασθενών. Επίσης τα αλληλόμορφα TC και CC του πολυμορφισμού rs4938723 T>C του miR-34 σχετίζονται με δυσμενή πρόγνωση των ασθενών με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού.

Abstract

Triple negative breast cancer (TNBC) represents the most aggressive subtype of breast cancer since it is associated with a high recurrence rate in the first 3 years following the diagnosis and poor outcome. Moreover these patients are often characterized by resistance to hormone therapies or targeted therapies, such as trastuzumab which is mainly attributed to the heterogeneity and the complex biological behavior of TNBC. Although molecular aspects of the TNBC pathogenesis have been largely deciphered, effective prognosis and treatment of TNBC patients still remain a challenging task in the clinical setting of oncology, highlighting thereby the need for identifying novel and more reliable prognostic and predictive markers for TNBC patients.

The understanding of the crucial role of immune checkpoints in facilitating tumor escape, uncovered a new class of potential cancer biomarkers and therapeutic targets. Among the most studied immune checkpoints is the Programmed death ligand-1 (PD-L1) that is expressed on tumor cells or tumor-infiltrating immune cells. miRNAs are a new source of novel molecular biomarkers and lately the intensive study of their clinical value has already yielded fruitful results. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been implicated in cancer development, prognosis and drug-resistance, often interacting with other factors.

The aim of this study was to examine the presence of miR-34 rs4938723 T>C and *PD-L1* rs4143815 C>G polymorphism in 114 formalin fixed paraffin embedded tissues isolated by triple negative breast cancer patients and correlated the single nucleotide polymorphism status with the survival of the patients.

Regarding the miR-34 rs4938723 T>C polymorphism our statistical analysis disclosed that the majority of patients harboring ductal breast carcinoma have the TC or CC genotypes ($P=0.020$). Moreover the survival of the patients was significantly correlated with the occurrence of the TC or CC alleles ($P<0.001$). Regarding the correlation of miR-34 polymorphisms with patients' survival we found that women with TC or CC single nucleotide polymorphisms were characterized by shorter disease free survival intervals ($P=0.05$). Furthermore triple negative breast cancer patients with TC/CC genotype exhibited shorter overall survival intervals as disclosed by Kaplan Meier analysis ($P<0.001$) and Cox regression analysis (HR= 3.2, %95 CI=2.0-5.5, $P=0.008$). Stratified Kaplan-Meier analysis showed that the women harboring the TC or CC genotype along with the ductal histology had significantly

shorter survival ($P < 0.001$). This result was also confirmed by Univariate Cox regression analysis, which showed that women ductal breast cancer and TC or CC genotype are of worse prognosis (HR= 2.35, %95 CI= 2.1-4.65, $P = 0.003$).

Regarding the rs4143815 polymorphism of the *PD-L1* our statistical analysis showed that results the GC genotype was significantly associated with advanced disease stage ($P = 0.015$) and with the disease recurrence ($P = 0.048$). Our survival analysis revealed that women harboring the GC genotype demonstrated ($P = 0.013$) shorter DFS (Disease Free Survival) intervals compared to the CC or GG alleles. Moreover, we found that women with stage III and GC or GG SNPs were characterized by shorter DFS ($P = 0.002$) and OS (Overall Survival) intervals ($P < 0.001$). Cox regression analysis at the univariate level confirmed that these women are characterized by worse prognosis (HR= 7.28, %95 CI=0.21-5.82, $P < 0.001$).

In conclusion we found that the *PD-L1* rs4143815 polymorphisms are differentially expressed in TNBCs and that this distribution is associated with markers of unfavorable prognosis and with patients' survival. Moreover we found that the TC and CC alleles of the miR-34 rs4938723 T>C are associated with unfavorable prognosis in triple negative breast cancer patients.

