



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ,
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Κλινική: Α' Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική, Μονάδα Μαστού,
"Ιπποκράτειο" Γ.Ν.Α.**

Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Κ. Ζωγράφος

**Τίτλος: «Προγνωστική Αξία και Ρόλος Ανοσολογικών και Αγγειογενετικών
Παραγόντων του Κυτταρικού Μηχανισμού της Αυτοφαγίας στον Καρκίνο του
Μαστού »**

Υποψήφια Διδάκτωρ: Θεοφανώ Ορφανέλλη

Αθήνα, 2021



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ,
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Κλινική: Α' Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική, Μονάδα Μαστού,
"Ιπποκράτειο" Γ.Ν.Α.**

Διευθυντής: Καθηγητής Γεώργιος Κ. Ζωγράφος

**Τίτλος: «Προγνωστική Αξία και Ρόλος Ανοσολογικών και Αγγειογενετικών
Παραγόντων του Κυτταρικού Μηχανισμού της Αυτοφαγίας στον Καρκίνο του
Μαστού »**

Υποψήφια Διδάκτωρ: Θεοφανώ Ορφανέλλη

Αθήνα, 2021

Ημερομηνία αιτήσεως του υποψηφίου 5 Ιουνίου 2013

Ημερομηνία ορισμού Συμβουλευτικής Επιτροπής 16 Ιουλίου 2013

Μέλη της 3μελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

1. Επιβλέπων: **Χ. Μπακογιάννης**, Αναπλ. Καθηγητής Αγγειοχειρουργικής, Α΄ Χειρουργική Κλινική Π.Α., Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών –ΛΑΪΚΟ
2. Μέλος: **Γ. Ζωγράφος**, Καθηγητής Χειρουργικής και Διευθυντής, Α΄ Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών- Ιπποκράτειο
3. Μέλος: **Γ. Θεοδωρόπουλος**, Αναπλ. Καθηγητής Χειρουργικής, Α΄ Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών- Ιπποκράτειο

Ημερομηνία ορισμού του Θέματος 8 Ιανουάριου 2014

Ημερομηνία καταθέσεως της διδακτορικής διατριβής 29 Νοεμβρίου 2021

Στη Μαμά μου...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	8
ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ	9
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	11
I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	26
A. Εισαγωγή στην Αυτοφαγία	28
B. Αυτοφαγία στον καρκίνο του μαστού	31
1. Καρκινογένεση	31
1.1 Beclin1	31
1.2 Ras	32
1.3 Έλλειψη Θρεπτικών Συστατικών	32
1.4 Υποξία	32
1.5 Ενδοπλασματικό στρες	33
2. Μικροπεριβάλλον Όγκου	33
3. Μετάσταση	34
4. Αυτοφαγία- Χημειοθεραπεία	35
Γ. Εισαγωγή στην Ανοσοθεραπεία.....	44
1. Ανοσοθεραπεία στον Καρκίνο του Μαστού	49
Δ. Αυτοφαγία και Ανοσοθεραπεία στον Καρκίνο του Μαστού	51
1. PD1/PD-L1 και Αυτοφαγία στον Καρκίνο του Μαστού	51
2. CTLA-4 και Αυτοφαγία στον Καρκίνο του Μαστού	52
3. Μονοπάτια Ανοσορρύθμισης και Αυτοφαγίας στον Καρκίνο του Μαστού	53
3.1 Ογκογόνος Δράση	53
3.2 Ογκοκατασταλτική Δράση.....	53
3.3 Τριπλά Αρνητικός Καρκίνος Μαστού (TNBC)	54

3.4 Ορμονική Θεραπεία	55
3.5 Χημειοθεραπεία	55
3.6 Ακτινοθεραπεία	56
II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	57
A. Σκοπός της μελέτης	61
B. Μεθοδολογία.....	62
1. Συλλογή δειγμάτων	62
2. Επεξεργασία και αποθήκευση δειγμάτων	62
3. Συλλογή κλινικών δεδομένων	63
4. Ορισμός ανοσολογικών και αγγειογενετικών δεικτών ενδιαφέροντος	64
5. Εργαστηριακά Πειράματα	64
6. Στατιστική ανάλυση	65
Δ. Αποτελέσματα	66
E. Συζήτηση	78
III. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	81
IV. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ.....	85
V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	86

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Θερμές ευχαριστίες στον Καθηγητή της Α' Προπαιδευτικής Χειρουργικής Κλινικής και Μονάδας Μαστού στο "Ιπποκράτειο" Γ.Ν.Α. κ. Γεώργιο Ζωγράφο για την αμέριστη υποστήριξη, αγάπη και καθοδήγηση τα τελευταία 15 χρόνια. Η διδασκαλία του τόσο εντός αμφιθεάτρου όσο κι εντός των χειρουργικών αιθουσών υπήρξε αφετηρία έμπνευσης για την ακαδημαϊκή και κλινική μου καριέρα ως Χειρουργός Γυναικολόγος Ογκολόγος. Η ολοκλήρωση αυτής της διδακτορικής διατριβής είναι απόδειξη της εμπιστοσύνης του σε νέους ιατρούς που αγαπά και σέβεται με πράξεις και έργα.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τη βαθύτατη μου ευγνωμοσύνη προς τους καθηγητές μου, κ. Χρήστο Μπακογιάννη και κ. Γεώργιο Θεοδωρόπουλο, οι οποίοι με υπομονή στάθηκαν δίπλα μου καθ' όλη τη διάρκεια της διδακτορικής μου μελέτης. Το τολμηρό εγχείρημα ενός διδακτορικού με έδρα στην Αθήνα και πειράματα στη Νέα Υόρκη, δε θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς τη διαρκή τους ενθάρρυνση και ενεργό συμμετοχή.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το μέντορά μου στο Πανεπιστήμιο Cornell της Νέας Υόρκης, Dr. Witkin και την καθηγήτρια μου στην Ογκολογία, Dr. Andreopoulou, που μου επέτρεψαν να διεξάγω τη μελέτη της διδακτορικής μου διατριβής στο εργαστήριο του Πανεπιστημίου Cornell και τη Μονάδα Μαστού του Memorial Sloan Kettering Cancer Center της Νέας Υόρκης.

Τέλος, ευχαριστώ τους ασθενείς που συμμετείχαν στο ερευνητικό μας πρωτόκολλο και μας έδωσαν την ευκαιρία να συμβάλουμε στον αγώνα τους προσθέτοντας γνώση και δύναμη στη μάχη κατά του καρκίνου του μαστού.

ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, Ἰστορας ποιεύμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύνάμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε.

Ἥγησασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ οὐτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξῃν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε καὶ ὀρκισμένοις νόμῳ ἱητρικῷ, ἅλλῳ δὲ οὐδενί.

Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύνάμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξειν.

Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε. Ὅμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθόριον δώσω. Ἀγνῶς δὲ καὶ ὁσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν.

Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε.

Ἐς οἰκίας δὲ ὁκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμάτων καὶ ἀνδρώων, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων.

Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπήης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκκαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρήτα ἡγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα.

*Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ ξυγγέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου
καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. Παραβαίνοντι δὲ
καὶ ἐπιорκοῦντι, τάναντία τουτέων.*

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

2004 – 2010	Πτυχίο Ιατρικής Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθήνα, Ελλάδα Βαθμός Άριστα
2013 – present	Υποψήφια Διδάκτωρ Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθήνα, Ελλάδα <i>Τίτλος: «Προγνωστική Αξία και ρόλος ανοσολογικών και αγγειογενετικών παραγόντων του κυτταρικού μηχανισμού της αυτοφαγίας στον καρκίνο του μαστού »</i>

ΑΚΑΔΗΜΑΙΚΗ ΘΕΣΗ

2020 – present	Επίκουρος Καθηγήτρια Γυναικολογικής Ογκολογίας (Assistant Professor) Stony Brook University Hospital Cancer Center Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine Stony Brook, NY
----------------	---

ΚΛΙΝΙΚΗ ΘΕΣΗ

2020 – present	Επιμελήτρια Γυναικολογικής Ογκολογίας (Gynecologic Oncology Attending) Stony Brook University Hospital Cancer Center Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine Division of Gynecologic Oncology Stony Brook, NY
----------------	---

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

2017 – 2020	Εξειδίκευση στη Γυναικολογική Ογκολογία (Gynecologic Oncology Fellowship) Icahn School of Medicine at Mount Sinai Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Science New York, NY <i>Thesis: Identification of shared immunogenic frameshift mutations in microsatellite unstable endometrial cancers to guide the design of off- the-shelf cancer vaccines</i>
2015	Ειδικότητα στη Γυναικολογική Ογκολογία (Brunschwig Gynecologic Oncology Rotating Residency) Memorial Sloan-Kettering Cancer Center Department of Surgery, Gynecology Service Supervisor: Sonoda Yukio MD & Richard Barakat, MD
2014 – 2017	Ειδικότητα στη Μαιευτική και Γυναικολογία (Obstetrics and

Gynecology Residency)

Rutgers-Robert Wood Johnson Medical School
Department of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Sciences
New Brunswick, NJ

*Thesis: Evaluation of Women's Understanding and Acceptance of
Ovarian Cancer Prevention*

2013 – 2014

Ειδικότητα στη Μαιευτική και Γυναικολογία (Obstetrics and Gynecology Internship)

New York Presbyterian/Weill Cornell Medicine
Department of Obstetrics and Gynecology
New York, NY

2011 – 2013

Ερευνητική Μετεκπαίδευση στην Άνοσο-Ογκολογία (Postdoctoral Research Fellow in Immuno- Oncology)

New York Presbyterian/Weill Cornell Medicine
Department of Obstetrics and Gynecology
Division of Immunology and Infectious Diseases
Weill Cornell Medical College
New York, NY

Supervisor: Distinguished Professor Steven S. Witkin, PhD

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

2020 – σήμερα	Fellow of the American College of Obstetricians and Gynecologists (FACOG)
2019 – σήμερα	Diplomate of the American Board of Obstetrics and Gynecology (ABOG)
2017 – σήμερα	New York State License: Medical Doctor (288991)
2012 – σήμερα	Educational Commission of Foreign Medical Graduates (ECFMG)
2010 – σήμερα	Licensed Physician, Prefecture of Athens, Greece

ΤΙΜΗΤΙΚΕΣ ΘΕΣΕΙΣ & ΒΡΑΒΕΙΑ

2021	Junior Fellow Award of the Academy of Clinical and Educational Scholars , sponsored by Stony Brook University
2019	Finalist Annual Dean's Healthcare System Team Science Award: Improving Human Performance , sponsored by Conduits, the Institute for Translational Science at the Icahn School of Medicine at Mount Sinai
2018	Perlman Family CCARE Lynch Syndrome Research Prize , from the Foundation for Women's Cancer (FWC)
2016	Annual Resident Achievement Award for Laparoscopic Surgery in Gynecologic Oncology , The Society of Laparoscopic Surgeons

2016	Annual Resident Achievement Awards for Advancing Science in Obstetric Care , The Society of Maternal -Fetal Medicine
2016	Annual Award Recognition for Outstanding Accomplishment in Women's Health Award , Rutgers-Robert Wood Johnson Medical School
2015	Chief Resident's Teamwork Award , Rutgers-Robert Wood Johnson Medical School
2012	Postgraduate "Bodossaki Foundation" Scholarship for research in ovarian cancer, Athens, Greece
2011	Medical Graduate "Papadakis Antonios Memorial Award" (Class Valedictorian), Athens, Greece

ΜΕΛΟΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΤΑΙΡΕΙΕΣ

2020 – σήμερα	American Association for Cancer Research
2020 – σήμερα	European Society for Medical Oncology
2019 – σήμερα	NRG Oncology Foundation
2016 – σήμερα	Society of Gynecologic Oncology
2013 – σήμερα	American College of Obstetricians and Gynecologists
2013 – σήμερα	American Medical Association
2012 – σήμερα	Hellenic Medical Society of New York
2011 – σήμερα	Athens Medical Association
2006 – 2011	Scientific Society of Hellenic Medical Students

ΔΙΟΙΚΗΤΙΚΗ ΘΕΣΗ

2020- σήμερα	Chair of Gynecologic Oncology Tumor Board Stony Brook University Hospital Cancer Center Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine Division of Gynecologic Oncology Stony Brook, NY
2020- σήμερα	Director of Gynecologic Oncology Residency Rotation Stony Brook University Hospital Cancer Center Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine Division of Gynecologic Oncology Stony Brook, NY
2020- σήμερα	Member of the GYN, Neuro and OTHER (Solid Tumors) "Clinical Research Team"

	Stony Brook University Hospital Cancer Center Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine Division of Gynecologic Oncology Stony Brook, NY
2020- σήμερα	Member at Obstetrics and Gynecology Quality Improvement Quarterly Meeting Stony Brook University Hospital Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine Division of Gynecologic Oncology Stony Brook, NY
2020- σήμερα	Member of Obstetrics and Gynecology Residency Program Evaluation Committee Stony Brook University Hospital Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine Division of Gynecologic Oncology Stony Brook, NY
2019 – 2020	Gynecologic Oncology Administrative Fellow Icahn School of Medicine at Mount Sinai Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Science
2018 – 2020	Leading Presenter at Gynecologic Oncology Tumor Board Weekly Meeting Icahn School of Medicine at Mount Sinai Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Science
2017 – 2020	Invited Member at Gynecologic Oncology “Disease Focused Group” Monthly Meeting Icahn School of Medicine at Mount Sinai Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Science
2017 – 2020	Invited Member at Obstetrics and Gynecology Quality Improvement Quarterly Meeting Icahn School of Medicine at Mount Sinai Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Science
2017 – 2020	Member of Gynecologic Oncology Fellowship Program Evaluation Committee Icahn School of Medicine at Mount Sinai Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Science
2016 – 2017	Obstetrics and Gynecology Education Chief House Staff Rutgers-Robert Wood Johnson Medical School Department of Obstetrics and Gynecology

2015 – 2016	Class Representative at Obstetrics and Gynecology Program Evaluation Committee Rutgers-Robert Wood Johnson Medical School Department of Obstetrics and Gynecology
2014 – 2017	Elected Supervisor at the Medical Student Gynecology Clinic at Eric B. Chandler Rutgers- Robert Wood Johnson Medical School Department of Obstetrics and Gynecology
2008 – 2010	Teaching assistant in educational program for junior doctors and medical students University of Athens, Greece Department of Surgery

ΣΥΓΓΡΑΦΙΚΟ ΕΡΓΟ

2020- σήμερα	Επιστημονικός Κριτής (Peer reviewer) “ <i>Gynecologic Oncology</i> ” Scientific Journal
2020- σήμερα	Επιστημονικός Κριτής (Peer reviewer) “ <i>Obstetrics & Gynecology</i> ” Scientific Journal
2020- σήμερα	Επιστημονικός Κριτής (Peer reviewer) “ <i>Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica</i> ” Scientific Journal
2020- σήμερα	Μέλος Επιστημονικής Επιτροπής Δημοσιεύσεων - Society of Gynecologic Oncology

ΔΙΑΔΕΞΕΙΣ (κατόπιν προσκλήσεως) ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

December 12-14, 2019	2019 Gynecologic Oncology Fellows’ Advanced Course in Cytoreductive Surgery for Ovarian Cancer Mayo Clinic Rochester, MN
September 23-25, 2019	2019 Society of Gynecologic Oncology Minimally Invasive Surgery Academy Hands-On Workshop Society of Gynecologic Oncology Sunnyvale, CA
September 11, 2019	Obstetrics and Gynecology Physician Assistant School “Endometrial Cancer: Diagnosis and Management” Icahn School of Medicine at Mount Sinai Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Science
November 28,	Department of Obstetrics and Gynecology Grand Rounds

2018	“Bleed less – Bloodless Surgery in Gynecologic Oncology” Icahn School of Medicine at Mount Sinai Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Science
November 28, 2018	Department of Obstetrics and Gynecology Grand Rounds “Bleed less – Bloodless Surgery in Gynecologic Oncology” Icahn School of Medicine at Mount Sinai Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Science
September 6 & 27, 2018	Obstetrics and Gynecology Resident School “Robotic assisted laparoscopic surgery: In service training for residents” Icahn School of Medicine at Mount Sinai Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Science
April 5, 2018	Obstetrics and Gynecology Resident School “Gynecologic Oncology: Perioperative Management” Icahn School of Medicine at Mount Sinai Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Science
November 29, 2017	Department of Obstetrics and Gynecology Grand Rounds “Sentinel Lymph Node (SLN) Biopsy in Endometrial Cancer Staging” Icahn School of Medicine at Mount Sinai Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Science

ΕΘΕΛΟΝΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

October, 2018	Mount Sinai Health Hackathon 2018- Perspectives of Rare Diseases
October, 2017	Mount Sinai Health Hackathon 2017- Technology Needs in Cancer
2017 – present	New York Cares
2009	Volunteer, Santorini Community Health Center
2004	Volunteer, Athens Summer Olympic Games

ΓΛΩΣΣΕΣ

Greek (native), English (fluently), French (fluently), Spanish (basic)

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ ΣΕ ΚΑΙΝΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

1. **AVB500-OC-004/GOG-3059** : A Phase 3, Randomized, Double-Blind, Adaptive, Placebo/Paclitaxel-Controlled Study of AVB-S6-500 in Combination with Paclitaxel in Patients with Platinum-Resistant Recurrent Ovarian Cancer
2. **Pilot Study Responses for ASCO-ACCC Site Self-Assessment Tool**

ΣΥΝ-ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ ΣΕ ΚΑΙΝΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

1. **GOG-3011; FORWARD 1:** A Randomized, Open Label Phase 3 Study to Evaluate the Safety and Efficacy of Mirvetuximab Soravtansine (IMGN853) Versus Investigator's Choice of Chemotherapy in Women with Folate Receptor α -positive Advanced Epithelial Ovarian Cancer, Primary Peritoneal Cancer or Fallopian Tube Cancer
2. **GOG-3015;** A Phase III, Multicenter, Randomized, Study Of Atezolizumab Versus Placebo Administered In Combination With Paclitaxel, Carboplatin, And Bevacizumab To Patients With Newly-Diagnosed Stage III Or Stage IV Ovarian, Fallopian Tube, Or Primary Peritoneal Cancer
3. **NRG-GY006;** A Randomized Phase II Trial of Radiation Therapy and Cisplatin Alone or in Combination with Intravenous Triapine in Women with Newly Diagnosed Bulky Stage IB2, Stage II, IIIB, or IVA Cancer of the Uterine Cervix or Stage II-IVA Vaginal Cancer.
4. **RTOG-0724;** Phase III Randomized Study Of Concurrent Chemotherapy And Pelvic Radiation Therapy With Or Without Adjuvant Chemotherapy In High-Risk Patients With Early-Stage Cervical Carcinoma Following Radical Hysterectomy
5. **NRG-GY009;** A Randomized, Phase II/III Study Of Pegylated Liposomal Doxorubicin And CTEP-Supplied Atezolizumab (IND #134427) Versus Pegylated Liposomal Doxorubicin/Bevacizumab And CTEP-Supplied Atezolizumab Versus Pegylated Liposomal Doxorubicin/Bevacizumab in Platinum Resistant Ovarian Cancer
6. **NRG-GY012;** A Randomized Phase II Study Comparing Single-Agent Olaparib, Single Agent Cediranib, and the Combination of Cediranib/Olaparib in Women with Recurrent, Persistent or Metastatic Endometrial Cancer.
7. **TESARO FIRST;** ENGOT-0V44 The FIRST (First-line Ovarian Cancer Treatment With Niraparib Plus TSR-042) Study: A Randomized, Double-Blind, Phase 3 Comparison of Platinum-Based Therapy With TSR-042 and Niraparib Versus Standard of Care Platinum-Based Therapy as First-Line Treatment of Stage III or IV Nonmucinous Epithelial Ovarian Cancer
8. **SGNTV-002 (Seattle Genetics);** Open Label Phase 2 Study of Tisotumab Vedotin for Patients with Platinum-Resistant Ovarian Cancer with a Safety Run-in of a Dose-Dense Regimen
9. **MERCK - MK3475-826;** A Phase 3 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Pembrolizumab (MK-3475) Plus Chemotherapy Versus Chemotherapy Plus Placebo for the First-Line Treatment of Persistent, Recurrent, or Metastatic Cervical Cancer (KEYNOTE-826)
10. **MERCK - MK7902-001;** A Phase 3 Randomized, Open-Label, Study of Pembrolizumab (MK-3475) Plus Lenvatinib (E7080/MK-7902) Versus

Chemotherapy for First-line Treatment of Advanced or Recurrent Endometrial Carcinoma (LEAP-001)

11. **NRG-GY019**; A Randomized Phase III, Two-Arm Trial of Paclitaxel/Carboplatin/Maintenance Letrozole Versus Letrozole Monotherapy in Patients with Stage II-IV, Primary Low-Grade Serous Carcinoma of the Ovary or Peritoneum
12. **NRG-GY018**: A Phase III Randomized, Placebo-Controlled Study of Pembrolizumab (MK-3475, NSC #776864) in Addition to Paclitaxel and Carboplatin for Measurable Stage III or IVA, Stage IVB or Recurrent Endometrial Cancer.
13. **The FIRST** (First-line ovarian cancer treatment with Niraparib plus TSR-042) Study: A RANDOMIZED, DOUBLE-BLIND, PHASE 3 COMPARISON OF PLATINUM-BASED THERAPY WITH TSR-042 AND NIRAPARIB VERSUS STANDARD OF CARE PLATINUM-BASED THERAPY AS FIRST-LINE TREATMENT OF STAGE III OR IV NONMUCINOUS EPITHELIAL OVARIAN CANCER
14. **QPT-ORE-005/GOG 3035**: A Phase 3, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Clinical Study comparing Chemo-Immunotherapy (Paclitaxel-Carboplatin-Oregovomab) versus Chemotherapy (Paclitaxel-Carboplatin-Placebo) in Patients with Advanced Epithelial Ovarian, Fallopian Tube or Peritoneal Carcinoma.
15. **NRG-GY020** (ClinicalTrials.gov NCT #04214067) (05-FEB-2020) A PHASE III RANDOMIZED TRIAL OF RADIATION +/- MK-3475 (PEMBROLIZUMAB) FOR NEWLY DIAGNOSED EARLY STAGE HIGH INTERMEDIATE RISK MISMATCH REPAIR DEFICIENT (dMMR) ENDOMETRIOID ENDOMETRIAL CANCER

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Orfanelli T**, Giannopoulos S, Zografos E, Athanasiou A, Bongiovanni A, Doulaveris G, Moo T, LaPolla D, Bakoyiannis C, Theodoropoulos G, Zografos G, Andreopoulou E, Witkin SS. Alterations of the 70 kDa heat shock protein (HSP70) and sequestosome-1 (p62) in women with breast cancer. *Sci Rep*. 2021 Nov 15;11(1):22220.
2. Roudko V, Bozkus CC, **Orfanelli T**, McClain CB, Carr C, O'Donnell T, Chakraborty L, Samstein R, Huang KL, Blank SV, Greenbaum B, Bhardwaj N. Shared Immunogenic Poly-Epitope Frameshift Mutations in Microsatellite Unstable Tumors. *Cell*. 2020 Dec 10;183(6):1634-1649.e17.
3. Gilla CM, **Orfanelli T**, Yoxtheimer L, Roy-McMahon C, Suhner J, Tomita S, Kalir T, Liu Y, Houldsworth J, Kolev V. Histology-specific FGFR2 alterations and FGFR2-TACC2 fusion in mixed adenoid cystic and neuroendocrine small cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol Rep* 2020 Nov 2;34:100668.
4. Cybulska P, Sioulas V, **Orfanelli T**, Zivanovic O, Mueller JJ, Broach VA, Long Roche KC, Sonoda Y, Hensley ML, O'Cearbhaill RE, Chi DS, Alektiar KM, Abu-Rustum NR, Leitao MM Jr. Secondary surgical resection for patients with recurrent

uterine leiomyosarcoma. *Gynecol Oncol*. 2019;154(2):333-337.

5. Nasioudis D, **Orfanelli T**, Frey MK, Chapman-Davis E, Caputo TA, Witkin SS, Holcomb K. Role of adjuvant chemotherapy in the management of non-granulosa cell ovarian sex cord-stromal tumors. *J Gynecol Oncol*. 2019;30(2):e19.
6. Kohut A, **Orfanelli T**, Poggio JL, Gibbon D, Buckley de meritens A, Richard S. Morbidity and Mortality Risk Assessment in Gynecologic Oncology Surgery Using the American College of Surgeons National Surgical Quality Improvement Program Database. *Int J Gynecol Cancer*. 2018;28(4):840-847.
7. **Orfanelli T**, Chung S, Kohut A, Gibbon D, Leiser A. Ogilvie's Syndrome after Robotic-Assisted Radical Hysterectomy for Cervical Cancer. *J Minim Invasive Gynecol*. 2018;25(1):175-179.
8. Awomolo A, **Orfanelli T**, Segal J, Duzyj C. T cell lymphoma associated with immunomodulator therapy in a pregnant patient with Crohn's disease. *J Cases Obstet Gynecol*, 2017;4(3):76-79
9. **Orfanelli T**, Sultanik E, Shell R, Gibbon D. Nonbacterial thrombotic endocarditis: A rare manifestation of gynecologic cancer. *Gynecol Oncol Rep*. 2016 May 31;17:72-4.
10. **Orfanelli T**, Kim CS, Vitez SF, Van gorp J, Misra N. A Case Report of Aggressive Angiomyxoma in Pregnancy: Do Hormones Play a Role?. *Case Rep Obstet Gynecol*. 2016;2016:6810368.
11. Ramer I, Kruczek A, Doulaveris G, **Orfanelli T**, Shulman B, Witkin SS, Spandorfer SD. Reduced Circulating Concentration of Brain-derived Neurotrophic Factor is Associated with Peri- and Post-implantation Failure following In Vitro Fertilization-Embryo Transfer. *Am J Reprod Immunol*. 2016;75(1):36-41.
12. Lekovich J, Witkin SS, Doulaveris G, **Orfanelli T**, Shulman B, Pereira N, Rosenwaks Z, Spandorfer SD. Elevated serum interleukin-1b levels and interleukin-1b-to-interleukin-1 receptor antagonist ratio 1 week after embryo transfer are associated with ectopic pregnancy. *Fertil Steril*. 2015;104(5):1190-4.
13. **Orfanelli T**, Doulaveris G, Holcomb K, Jeong JM, Sisti G, Kanninen TT, Caputo TA, Gupta D, Witkin SS. Inhibition of autophagy in peripheral blood mononuclear cells by vaginal fluid from women with a malignant adnexal mass. *Int J Cancer*. 2015;137(12):2879-84.
14. Jayaram A, Esbrand F, Doulaveris G, **Orfanelli T**, Sobel R, Ledger WJ, Witkin SS. Decreased concentration of protease inhibitors: possible contributors to allodynia and hyperalgesia in women with vestibulodynia. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;212(2):184.e1-4.
15. Jayaram A, **Orfanelli T**, Doulaveris G, Linhares IM, Ledger WJ, Witkin SS. Autophagy and female genital tract infections: new insights and research directions.

BJOG. 2014;121(7):801-8.

16. **Orfanelli T**, Jeong JM, Doulaveris G, Holcomb K, Witkin SS. Involvement of autophagy in cervical, endometrial and ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2014;135(3):519-28.
17. **Orfanelli T**, Jayaram A, Doulaveris G, Forney LJ, Ledger WJ, Witkin SS. Human epididymis protein 4 and secretory leukocyte protease inhibitor in vaginal fluid: relation to vaginal components and bacterial composition. *Reprod Sci*. 2014;21(4):538-42.
18. Jaffe S, Normand N, Jayaram A, **Orfanelli T**, Doulaveris G, Passos M, Kanninen TT, Bongiovanni AM, Linhares IM, Witkin SS. Unique variation in genetic selection among Black North American women and its potential influence on pregnancy outcome. *Med Hypotheses*. 2013;81(5):919-22.
19. Doulaveris G, **Orfanelli T**, Benn K, Zervoudakis I, Skupski D, Witkin SS. A polymorphism in an autophagy-related gene, ATG16L1, influences time to delivery in women with an unfavorable cervix who require labor induction. *J Perinat Med*. 2013;41(4):411-4.
20. Linhares IM, Kanninen TT, **Orfanelli T**, Jayaram A, Doulaveris G, Witkin SS. The vaginal microbiome: New findings bring new opportunities. *Drug Dev Res* (2013) 74, 360–364.
21. Jaffe S, Doulaveris G, **Orfanelli T**, Arantes M, Damasceno D, Calderon I, Rudge MV, Witkin SS. Induction of the 72 kDa heat shock protein by glucose ingestion in black pregnant women. *Cell Stress Chaperones*. 2013;18(4):527-30.

ΔΙΑΔΕΞΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Carr C, Tomita S, **Orfanelli T**, Papatla K, Zeligs K, Prasad Hayes M, Stoffels G, Kolev V, Zakashansky K, Dottino P, Beddoe A, Cohen S, Blank S. Outcomes of gynecologic oncology patients at an epicenter of the COVID-19 pandemic. 2021 Society of Gynecologic Oncology 52nd Annual Meeting on Women's Cancer, March 19-25, 2021 (Virtual)
2. Doulaveris G, **Orfanelli T**, Renz M, Barlow S, Kaplan J, Fridman D, Dar P, Rotenberg O. Obesity is an independent risk factor for endometrial polyps and surgical interventions in women with postmenopausal bleeding. 31st World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, 15–17 October 2021 (Virtual)
3. Barlow S, Doulaveris G, **Orfanelli T**, Dar P, Rotenberg O. Performance of Simultaneous Endometrial Aspiration and Sonohysterography in the diagnosis of endometrial polyps in women with postmenopausal bleeding. 29th World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, Berlin, Germany, October 2019
4. Spandorfer S, Doulaveris G, **Orfanelli T**, Kanninen T, Goldschlag D, Witkin SS.

Serum levels of interleukin (IL)-13, insulin-like growth factor-2 (IGF-2) and neurotrophic factor 4 (NT-4) predict spontaneous abortion (SAB) of a normal karyotypic fetus. American Society for Reproductive Medicine 2014 Scientific Congress & Expo, Honolulu, HI, October 2014.

5. **Orfanelli T**, Doulaveris G, Shulman P, Bongiovanni AM, Witkin SS, Spandorfer SD. Human Epididymis protein 4 (HE4) and secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) are two novel biomarkers predictive of IVF outcome. American Society for Reproductive Medicine 2013 Scientific Congress & Expo, Boston, MA, USA, October 2013
6. Doulaveris G, **Orfanelli T**, Shulman P, Bongiovanni AM, Witkin SS, Spandorfer SD. Serum levels of interleukins (IL) 11, 13 and 17 predict IVF outcome four days before a positive pregnancy test. American Society for Reproductive Medicine 2013 Scientific Congress & Expo, Boston, MA, USA, October 2013
7. Kruczek A, **Orfanelli T**, Doulaveris G, Witkin SS, Spandorfer SD. Neurotrophins as markers of IVF pregnancy outcome. American Society for Reproductive Medicine 2013 Scientific Congress & Expo, Boston, MA, USA, October 2013
8. Lekovic J, Doulaveris G, **Orfanelli T**, Shulman B, Witkin SS, Spandorfer SD. Interleukin-1b and Interleukin- 1 receptor antagonist serum levels one week after embryo transfer may predict ectopic pregnancy in IVF cycles. American Society for Reproductive Medicine 2013 Scientific Congress & Expo, Boston, MA, USA, October 2013
9. **Orfanelli T**, Efstathiou E. The role of Targeted Therapy in Treatment of Colorectal Cancer. 15th Scientific Congress of the Hellenic Medical Students, Thessaloniki, Greece, May 2008

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. Tomita, S, Suhner J, Bucknor A, **Orfanelli T**, Carr C, Blank SV, Loudon HC. Perioperative bundle does not decrease the rate of surgical site infection in patients undergoing hysterectomy. SGO 2020 Annual Meeting on Women's Cancer (Virtual presentation due to COVID19 pandemic)
2. Sekandari N, Doulaveris G, **Orfanelli T**, Xianghong X, Dar P, Rotenberg O. Risk of recurrent bleeding and surgical interventions among women with proliferative endometrium. 69th ACOG Annual Clinical and Scientific Meeting (Virtual presentation due to COVID19 pandemic)
3. Doulaveris G, Chen A, **Orfanelli T**, Escobar P, Dar P, Rotenberg O. Risk of cancer and performance of ultrasound in postmenopausal women who failed endometrial biopsy. 2019 ACOG Annual Clinical and Scientific Meeting, Nashville, TN, USA, May 2019
4. **Orfanelli T**, Sokoloff L, Schwartz MA, Tomita S, Prasad-Hayes M, Blank SV. What happens in the Real World? Assessment of Two Screening Tools for Lynch

Syndrome in Patients with Endometrial Cancer: Universal Tumor Testing Versus Clinical Screening. SGO 50th Annual Meeting, Honolulu, HI, USA, March 2019

5. **Orfanelli T**, Cohen N, Schwartz MA, Tomita S, Kolev V, Blank SV, Cohen S. Racial and Socioeconomic Disparities in Treatment and Survival for Women with Advanced Endometrial Cancer. SGO 50th Annual Meeting, Honolulu, HI, USA, March 2019
6. **Orfanelli T**, Roudko V, Cimen C, Greenbaum B, Blank SV, Bhardwaj N. Shared tumor antigens in uterine cancers with microsatellite instability- Putative targets for immunotherapeutic approaches. SGO 50th Annual Meeting, Honolulu, HI, USA, March 2019
7. Schwartz M, Schoenbrun R, Hua P, Tomita S, **Orfanelli T**, Overbey J, Ascher-Walsh c, Blank SV, Loudon H. Use of Vaginal Chlorhexidine Antisepsis Prior to Hysterectomy to Reduce Surgical Site Infection. SGO 50th Annual Meeting, Honolulu, HI, USA, March 2019
8. Kohut A, Patel J, Earnhardt MC, **Orfanelli T**, Song M, Girda E, Buckley de Meritens A, Stephenson R, Leiser A, Rodriguez L. The identification of genetic mutations associated with prolonged survival in Ovarian Serous Cystadenocarcinoma using the Cancer Genome Atlas. SGO 50th Annual Meeting, Honolulu, HI, USA, March 2019
9. Athanasiou A, **Orfanelli T**, Lapolla D, Andreopoulou E, Moo TA, Marti J, Cigler T, Bongiovanni AM, Witkin SS. Elevated 70kDa heat shock protein (hsp70) and autophagy levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in women with a malignant breast mass. ESMO 2018 Congress, Munich, Germany, October 2018
10. Nair N, Schwartz MA, **Orfanelli T**, Pan S, Overbey J, Zakashansky K, Blank SV, Dottino P, Kolev V. Disparities in time to treatment among cervical cancer patients receiving primary radiation treatment: A National Cancer Data Base analysis. SGO 49th Annual Meeting on Women's Cancer, New Orleans, LA, USA, March 2018
11. Cybulska P, Sioulas V, **Orfanelli T**, Zivanovic O, Long Roche K, Sonoda Y, Hensley ML, O'Cearbhaill R, Chi DS, Abu-Rustum NR, Leitao Jr MM. Secondary surgical resection for patients with recurrent uterine leiomyosarcoma. SGO 49th Annual Meeting on Women's Cancer, New Orleans, LA, USA, March 2018
12. Schwartz MA, Kolev V, Nair N, **Orfanelli T**, Blank SV, Kalir T, Dottino P, Liu Y. Neoadjuvant chemotherapy for gynecologic high-grade serous carcinoma: Correlation of tumor response with tumor morphology and immunophenotype. SGO 49th Annual Meeting on Women's Cancer, New Orleans, LA, USA, March 2018
13. Schwartz MA, Kolev V, Nair N, **Orfanelli T**, Blank SV, Kalir T, Dottino P, Liu Y. A new era: Changing patterns of high-grade serous Fallopian tube cancer diagnosis. SGO 49th Annual Meeting on Women's Cancer, New Orleans, LA, USA, March 2018
14. **Orfanelli T**, Awomolo A, Gomez D, Doulaveris G, Duzyi C. Comparison of

Peripartum Scoring Systems of Anticoagulation for Venous Thromboembolic Prophylaxis. ACOG's 65th Annual Clinical and Scientific Meeting, San Diego, CA, USA, May 2017

15. Kohut, A, **Orfanelli T**, Buckley de Meritens A, Leiser, A, Gibbon D, Rodriguez L. Determining Risk of Postoperative Pulmonary Embolism in the Gynecologic Oncology Population. SGO 48th Annual Meeting on Women's Cancer, National Harbor, MD, USA, March 2017
16. Chung S, **Orfanelli T**, Bachmann G. Breast Cancer Risk and Menopausal Hormone Therapy: Does type of progestin matter? 27th Annual Meeting of The North American Menopause Society, Orlando, FL, USA, October 2016
17. **Orfanelli T**, Kohut, A, Sisti G, Doulaveris G, Gibbon D. High Grade Serous Carcinoma of ovary and fallopian tube after the new model of assignment of primary site: an analysis of incidence, demographic and clinical features. SGO 47th Annual Meeting on Women's Cancer, San Diego, CA, USA, March 2016
18. Kohut A, **Orfanelli T**, Richard SD, Gibbon DG, Sisti G, Poggio JL. Morbidity and mortality risk assessment in gynecologic oncology surgery using the ACS NSQIP database. SGO 47th Annual Meeting on Women's Cancer, San Diego, CA, USA, March 2016
19. Spandorfer S, Doulaveris G, **Orfanelli T**, Kanninen T, Goldschlag D, Witkin SS. Can we identify a panel of serum biomarkers highly predictive of ectopic pregnancies (EP) after IVF? American Society for Reproductive Medicine 2014 Scientific Congress & Expo, Honolulu, HI, October 2014.
20. **Orfanelli T**, Doulaveris G, Holcomb K, Jeung JM, Sisti G, Kanninen TT, Caputo TA, Gupta D, Witkin SS. Inhibition of autophagy in peripheral blood mononuclear cells by vaginal fluid from women with a malignant adnexal mass. SGO 45th Annual Meeting on Women's Cancer, Tampa, FL, USA, March 2014
21. Doulaveris G, **Orfanelli T**, Kanninen TT, Shulman P, Witkin SS, Spandorfer SD. The Insulin like growth factor axis as an early predictor of IVF outcome. American Society for Reproductive Medicine 2013 Scientific Congress & Expo, Boston, MA, USA, October 2013
22. Doulaveris G, **Orfanelli T**, Benn K, Skupski D, Witkin SS. Association between a polymorphism in an autophagy-related gene, ATG16L1, and time to delivery in women who require induction of labor. Society of Maternal Fetal Medicine, Annual Meeting, San Francisco, CA, USA, February 2013
23. Passos M, **Orfanelli T**, Doulaveris G, Jayaram A, Rudge MV, Jaffe S, Witkin SS. A Mannose-Binding Lectin (MBL) Gene Polymorphism is Associated with Increased Insulin Resistance in Pregnant Hispanic Women. Society of Maternal Fetal Medicine, Annual Meeting, San Francisco, CA, USA, February 2013
24. Jaffe S, Normand N, Jayaram A, **Orfanelli T**, Doulaveris G, Passos M, Kanninen

TT, Bongiovanni AM, Linhares IM, Witkin SS. Large Differences in the Frequency of Genetic Variants in Multiple Genes in Pregnant African-Americans as Compared to Whites and Hispanics. Society of Maternal Fetal Medicine, Annual Meeting, San Francisco, CA, USA, February 2013

25. **Orfanelli T**, Doulaveris G, Sezen D, Zervoudakis IA, Skupski D, Witkin SS. Inhibition of amniocyte-derived tumor necrosis factor (TNF)- α production of Histone 2B (H2B). 28th International Congress “The Fetus as a patient”, Mykonos, Greece, September 2012
26. Doulaveris G, **Orfanelli T**, Sezen D, Zervoudakis IA, Skupski D, Witkin SS. Induced amniocyte production of anti-viral interferon alpha and its stimulation by an unsaturated fatty acid. 28th International Congress “The Fetus as a patient”, Mykonos, Greece, September 2012

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. Γενικό μέρος

Σε παγκόσμιο επίπεδο κατά το έτος 2020 διαγνώσθηκαν 2.3 εκατομμύρια νέα κρούσματα καρκίνου μαστού αποτελώντας τον πιο συχνό καρκίνο για τις γυναίκες. Την ίδια χρονιά 685.00 θάνατοι σημειώθηκαν εξαιτίας της νόσου παγκοσμίως. Στις ΗΠΑ το 2020 ο καρκίνος μαστού ήταν η δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες μετρώντας 39.000 θανάτους και 229.000 νέες διαγνώσεις (1).

Η θεραπεία του καρκίνου του μαστού προσεγγίζεται με ποικίλους τρόπους, συμπεριλαμβανομένων χειρουργικών επεμβάσεων (λοβεκτομή, μαστεκτομή), ακτινοθεραπείας και χημειοθεραπείας. Ως επί το πλείστον, η θεραπεία του καρκίνου του μαστού σε πρώιμο στάδιο περιλαμβάνει λοβεκτομή, ακολουθούμενη από επικουρική ακτινοθεραπεία, η οποία επιτρέπει την καλύτερη διατήρηση του μαστού. Η ακτινοθεραπεία μπορεί να εξαλείψει τις εναποθέσεις καρκινικών κυττάρων που παραμένουν στον ιστό του μαστού μετά από την χειρουργική επέμβαση, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο υποτροπής τοπικά και συστηματικά. Τα σχήματά χημειοθεραπείας στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού ποικίλλουν σημαντικά ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του όγκου και το στάδιο του καρκίνου του μαστού που αντιμετωπίζεται και μπορεί να είναι επικουρική του χειρουργείου ή και προεγχειρητική.

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι η αυτοφαγία παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου του μαστού αλλά και στην ανταπόκριση στην χημειοθεραπεία (2).

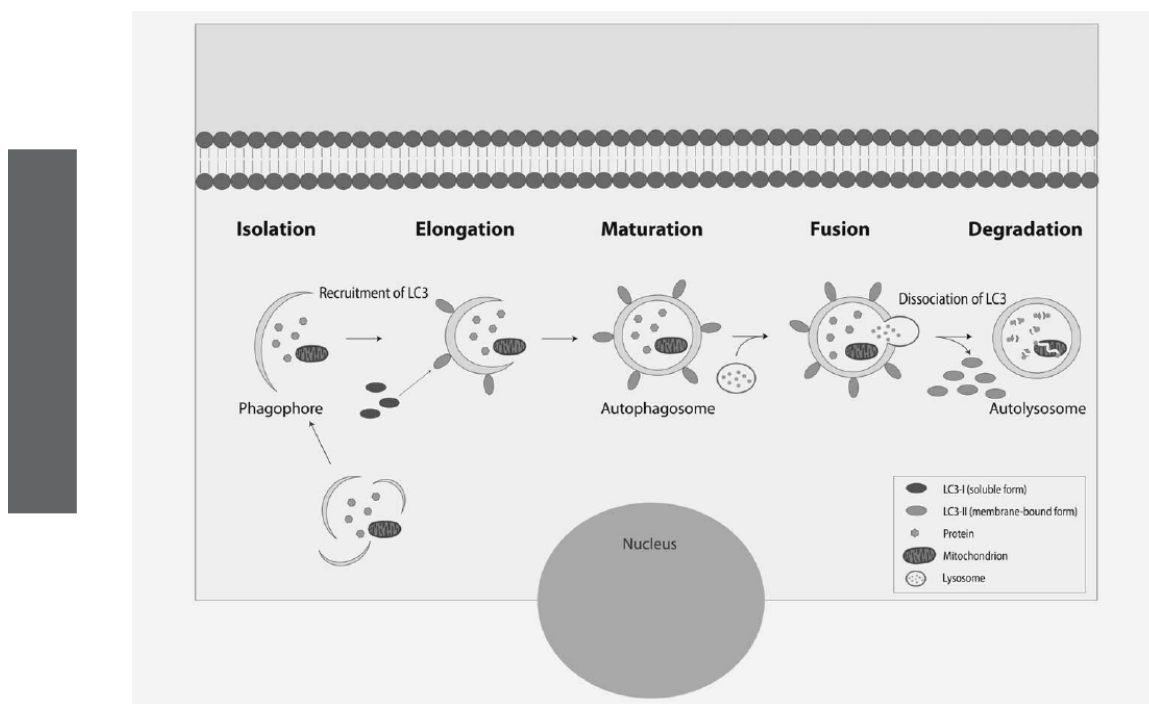
Για τους παραπάνω λόγους πιστεύουμε ότι η περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού της αυτοφαγίας στον καρκίνο του μαστού θα συνεισφέρει σημαντικά στην βαθύτερη κατανόηση και κατ'επέκταση καταπολέμηση του καρκίνου του μαστού.

A. Εισαγωγή στην Αυτοφαγία

Η λέξη «αυτοφαγία», χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Christian de Duve, πριν από περισσότερα από 50 χρόνια. Η αυτοφαγία αποτελεί κυτταρικό μηχανισμό μέσω του οποίου το κύτταρο καταβολίζει και ανακυκλώνει απαραίτητα συστατικά όπως πρωτεΐνες και οργανίδια (3,4). Οι πρωτεΐνες και τα οργανίδια που έχουν «σημανθεί» για απόσυρση και καταστροφή, ενώνονται με ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών, το αυτόσωμα, το οποίο με τη σειρά του συγχωνεύεται με ένα λυσόσωμα δημιουργώντας το αυτολυσόσωμα, όπου το εκάστοτε σημασμένο κυτταρικό συστατικό διασπάται στα βασικά του στοιχεία τα οποία είναι ελεύθερα να χρησιμοποιηθούν εκ νέου προς σχηματισμό νέων κυτταρικών δομών (3). Οι λειτουργικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μονοπάτι της αυτοφαγίας έχουν μελετηθεί κυρίως σε μύκητες και έχουν ονομαστεί Atg (Autophagy-related) (5).

Το πολύπλοκο μονοπάτι της αυτοφαγίας απαιτεί την συνεργασία διαφορετικών πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων τα οποία μπορούν να ομαδοποιηθούν αδρά στα παρακάτω κατηγορίες/ στάδια (Εικόνα 1):

- Atg 1 σύμπλεγμα: υπεύθυνο για την έναρξη της αυτοφαγίας (6-8).
- Τάξη-III φωσφατιδιλινωσιτόλη 3-κινάση σύμπλεγμα (PS3K): για τον σχηματισμό της μεμβράνης του αυτοφαγοσώματος (9).
- p62 πρωτεΐνη: ενώνεται με πρωτεΐνες σημασμένες με ουμπικιτίνη εντός του αυτοφαγοσώματος οδηγώντας στον καταβολισμό τους (10).
- Atg5-Atg12 και LG3-φωσφατιδιλεθανολαμίνη: δύο σύνεργα συστήματα - συμπλέγματα τα οποία συμμετέχουν στην επέκταση της μεμβράνης του αυτοφαγοσώματος (11-13).

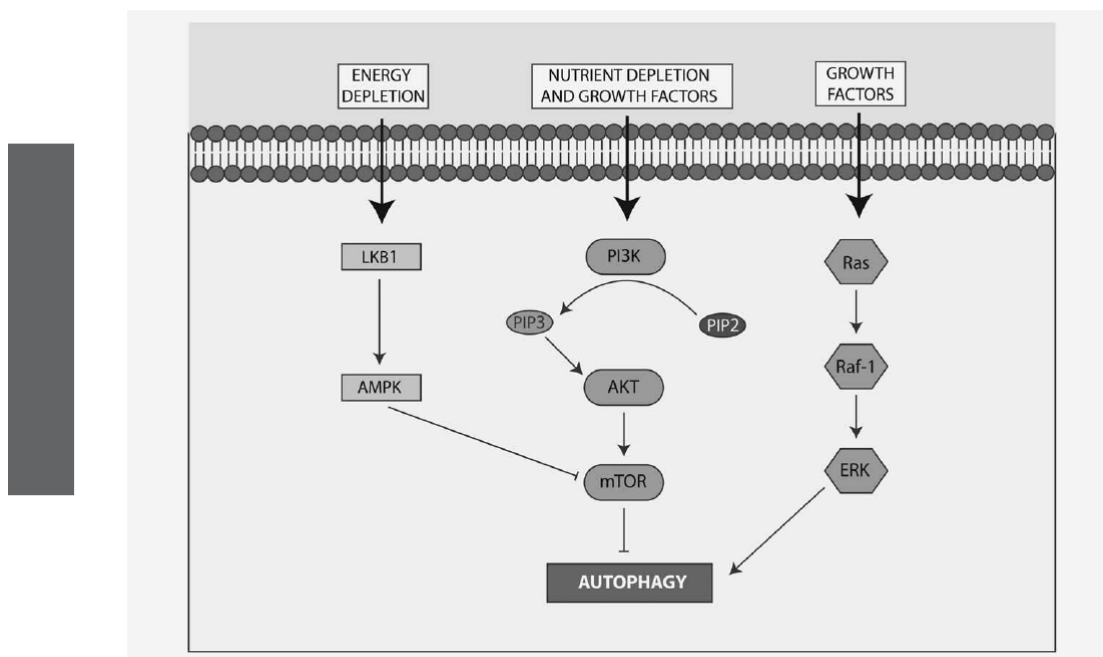


Εικόνα 1: Στάδια του μηχανισμού της αυτοφαγίας.

Κάθε βήμα της αυτοφαγίας βρίσκεται υπό τον έλεγχο ρυθμιστικών πρωτεϊνών για την εύρυθμη λειτουργία του μονοπατιού (14) (Εικόνα 2).

Το σύμπλεγμα mTOR (σύμπλεγμα ραπαμσίνης) το οποίο ενεργοποιείται από αυξητικούς παράγοντες και αμινοξέα, αναστέλλει την αυτοφαγία μέσω αναστολής του συμπλέγματος ULK1 (7, 15-17). Εν αντιθέσει η AMP-activated πρωτεϊνική κινάση (AMPK) η οποία ενεργοποιείται από χαμηλά επίπεδα ενέργειας στο κύτταρο, ενεργοποιεί το μονοπάτι της αυτοφαγίας είτε άμεσα μέσω φωσφορλίωσης του συμπλέγματος ULK1 (18-20) είτε έμμεσα μέσω αναστολής του συμπλέγματος mTOR (21).

Οι πρωτεΐνες της απόπτωσης, Bcl-2 και Mcl1 αναστέλλουν την αυτοφαγία παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Atg6 (γνωστή και ως Beclin1) με το σύμπλεγμα PS3K, αναστέλλοντας έτσι τη δημιουργία του αυτοφαγοσώματος (22-24).



Εικόνα 2: Ρυθμιστικές πρωτεΐνες στο μονοπάτι της αυτοφαγίας.

Απορρύθμιση οποιουδήποτε από τα παραπάνω στάδια της αυτοφαγίας οδηγεί σε υπερλειτουργία ή υπολειτουργία του μηχανισμού προκαλώντας πληθώρα κυτταρικών διαταραχών συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου (25). Κατ'έκταση δυσλειτουργία της αυτοφαγίας μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση ή/και επιβίωση καρκινικών κυττάρων σε συνθήκες στρες.

Στο μικροπεριβάλλον του καρκίνου, η υποξία και η οξείδωση αποτελούν αιτίες μεταβολικού στρες (26). Η χημιοθεραπεία και η ακτινοβολία καταστρέφουν το γενετικό υλικό των καρκινικών κυττάρων προκαλώντας μια διαφορετική μορφή κυτταρικού στρες (27). Σε κάθε περίπτωση η αυτοφαγία μπορεί να ενεργοποιηθεί εντός των νεοπλασματικών κυττάρων βοηθώντας στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, οδηγώντας εντέλει είτε στην εξέλιξη της κακοήθειας είτε στην ανάπτυξη ανοχής στην θεραπεία (28, 29). Υπό αυτή την έννοια, αναστολή της αυτοφαγίας θα συνέβαλε στην αναστολή της ανάπτυξης του όγκου αλλά και θα αύξανε την αποτελεσματικότητα των θεραπειών κατά του καρκίνου (30, 31).

Ωστόσο η αυτοφαγία, εκτός από την προάσπιση της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων, μπορεί παραδόξως να οδηγήσει και σε μια μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, διαφορετικού από την απόπτωση και την νέκρωση, οδηγώντας σε θάνατο των καρκινικών κυττάρων (32). Αντίθετα από την απόπτωση, ο αυτοφαγικός κυτταρικός θάνατος δεν ενεργοποιείται από κασπάσες και έχει ως αποτέλεσμα αποσύνθεση κυτταρικών οργανιδίων και διατήρηση του κυτταροσκελετού (33,34). Επίσης σε σύγκριση με την νέκρωση, ο αυτοφαγικός θάνατος χαρακτηρίζεται από την απουσία φλεγμονώδους αντίδρασης. Η εφαρμογή της παραπάνω ιδιότητας της αυτοφαγίας, να λειτουργεί δηλαδή ως μηχανισμός κυτταρικού θανάτου θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως μια νέα μέθοδος θεραπείας του καρκίνου (35).

B. Αυτοφαγία στον καρκίνο του μαστού.

1. Καρκινογένεση

1.1 Beclin1

Η πρωτεΐνη Beclin1 αλληλεπιδρά με το σύμπλεγμα PI3K και οδηγεί στη δημιουργία του αυτοφαγοσώματος. Το γονίδιο της Beclin1 έχει χαρτογραφηθεί κοντά στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο BRCA1 στο χρωμόσωμα 17.

-Διαγραφή ενός αλληλίου της Beclin1 οδηγεί σε απώλεια του ογκοκατασταλτικού ρόλου της αυτοφαγίας (36).

-Σε ποντίκια υπολλειπόμενα ως προς την Beclin1 η συχνότητα υπερπλασίας του μαστού αυξήθηκε (37, 38).

-Σε ιστούς από καρκίνο μαστού βρέθηκε μειωμένη έκκριση της Beclin1 σε σύγκριση με υγιή ιστό μαστού (39).

-Σε σειρά καρκινικών κυττάρων μαστού (MCF-7), υπολλειπόμενα ως προς την Beclin1, η έκτοπη έκφραση του γονιδίου προκάλεσε μείωση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και στον σχηματισμό όγκου *in vivo* (42).

-Στην ίδια σειρά καρκινικών κυττάρων, υπερέκφραση της Beclin1 συσχετίστηκε με αυξημένο κυτταρικό θάνατο (40).

-Μετάλλαξη του γονιδίου Beclin1 στη σειρά MCF-7, ώστε να στερείται ιδιότητες αυτοφαγίας, οδήγησε σε μείωση της ογκογένεσης (41).

1.2 Ras

Αν και η μετάλλαξη του γονιδίου Ras δεν είναι συχνή στον καρκίνο του μαστού, έχει παρατηρηθεί ότι σε σειρές καρκινικών κυττάρων μαστού το μονοπάτι Ras ενεργοποιείται (42).

-Η υπερλειτουργία του Ras στον καρκίνο του μαστού μπορεί να ξεκινήσει μέσω του ErbB2 μονοπατιού (43,44).

-Σε μη κακοήγη κυτταρική σειρά μαστού (MCF-10A), η αυτοφαγία συνέβαλε στη μετάλλαξη των κυττάρων σε κακοήγη μέσω του H- Ras μονοπατιού (45).

- Αντίθετα, σε κυτταρική σειρά μαστού με μετάλλαξη K-Ras παρατηρήθηκε αύξηση της αυτοφαγίας (46).

- Σε ποντίκια με καρκίνο μαστού, διαγραφή του γονιδίου FIP200 οδήγησε σε αναστολή της αυτοφαγίας και μείωση της ανάπτυξης του όγκου (47).

1.3 Έλλειψη Θρεπτικών Συστατικών

Όταν η νεοαγγειογένεση αρχίζει να είναι ανεπαρκής τροφοδοτικός μηχανισμός για το καρκινικό κύτταρο, το κύτταρο μπαίνει σε κατάσταση «λοιμοκτονίας» ενεργοποιώντας την αυτοφαγία ως μηχανισμό επιβίωσης (48, 49).

- Σε σειρές καρκινικών κυττάρων μαστού, η αυτοφαγία ενεργοποιείται λόγω «ασιτίας»- έλλειψη θρεπτικών στοιχείων και αυξητικών παραγόντων (50, 51).

- Σε ιστό από ασθενείς με καρκίνο μαστού βρέθηκε ότι αυξημένη έκφραση της αυτοφαγίας συσχετίζεται με μείωση της επιβίωσης των ασθενών (52).

1.4 Υποξία

Σε συνθήκες υποξίας τα καρκινικά κύτταρα παράγουν παράγοντες (HIF- hypoxia induced factors) που βοηθούν στην προσαρμογή τους σε χαμηλά επίπεδα οξυγόνου.

-Ο παράγοντας HIF1α, ο οποίος υπερεκφράζεται σε καρκίνους μαστού με διαφορετικό προφίλ υποδοχέων όπως ErbB2+, ER/PR -, μεσολαβεί στην ενεργοποίηση της αυτοφαγίας προάγοντας την επιβίωση των κυττάρων σε καταστάσεις υποξίας (53).

- Ενεργοποίηση της αυτοφαγίας μέσω υποξίας σε κύτταρα με καρκίνο μαστού βρέθηκε ότι προάγει την επιβίωση αυτών των κυττάρων (54).

1.5 Ενδοπλασματικό στρες

- Σε σειρές κυττάρων καρκίνου μαστού (MCF-7, MDA-MB231), η αυτοφαγία αυξάνει παρουσία καψσαϊκίνης, προκαλώντας αντίσταση στην απόπτωση που προκαλεί το ενδοπλασματικό στρες (55).

- Ωστόσο σε μη καρκινικά κύτταρα της σειράς μαστού MCF-10A, προαγωγή της αυτοφαγίας με τον ίδιο τρόπο δεν είχε τον ίδιο προστατευτικό ρόλο στην επιβίωση του κυττάρου (55).

- Σε καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7 που εκτέθηκαν σε βορτεξομίδη, το ενδοπλασματικό στρες και η αυτοφαγία βρέθηκαν να είναι οι κύριοι μηχανισμοί αντίστασης στη θεραπεία και αναστολή της αυτοφαγίας αύξησε την απάντηση στη θεραπεία (56).

2. Μικροπεριβάλλον Όγκου

Το μικροπεριβάλλον των όγκων αποτελείται εκτός από καρκινικά κύτταρα, από μη κακοήγη επιθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, κύτταρα αγγείων, κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και του στρώματος του όγκου. Η δυναμική αλληλεπίδραση των παραπάνω κυτταρικών πληθυσμών επηρεάζει άμεσα την ανάπτυξη του όγκου (57).

- Έρευνες έχουν δείξει ότι σε καλλιέργειες κυττάρων καρκίνου μαστού με ινοβλάστες, τα καρκινικά κύτταρα αυξάνουν το οξειδωτικό στρες εντός των ινοβλαστών (58). Με τη σειρά του το οξειδωτικό στρες προάγει την αυτοφαγία εντός των ινοβλαστών η οποία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ανακυκλωμένων

θρεπτικών συστατικών τα οποία χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων (59, 60).

- Επίσης οι ινοβλάστες χάνουν τα μιτοχόνδριά τους μέσω αυτοφαγίας. Έτσι αναγκάζονται να χρησιμοποιήσουν αναερόβιους μηχανισμούς γλυκόλυσης. Οι ινοβλάστες απελευθερώνουν παράγωγα αναερόβιας γλυκόλυσης στο μικροπεριβάλλον τα οποία χρησιμοποιούνται από τα καρκινικά κύτταρα για την επιβίωσή τους (61-65).

- Η αυτοφαγία στους ινοβλάστες σχετίζεται με απώλεια του γονιδίου της πρωτεΐνης Cav-1 (92). Στον καρκίνο του μαστού απώλεια της Cav-1 σχετίζεται με υποτροπή, αυξημένες λεμφαδενικές μεταστάσεις και αντοχή σε θεραπεία με ταμοξιφένη (66-69). Ενδεχομένως θρεπτικά συστατικά που παράγονται μέσω της αυτοφαγίας λόγω απώλειας της Cav-1, να τροφοδοτούν και πάλι την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων.

- Βλαστικά κύτταρα στον καρκίνο του μαστού επιβιώνουν μέσω της αυτοφαγίας και συμβάλλουν στην ανάπτυξη του όγκου (70,71).

- Στα βλαστικά κύτταρα μαστού CD44(+)CD24(-/low), αναστολή της αυτοφαγίας οδήγησε σε μείωση του ρυθμού ανάπτυξής τους (71).

- Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα SD-MSC στον καρκίνο του μαστού επιβιώνουν σε συνθήκες «ασιτίας» μέσω ενεργοποίησης της αυτοφαγίας (72). Επίσης αναστέλλουν την απόπτωση των καρκινικών κυττάρων και προάγουν την επιβίωσή τους σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών in vitro αλλά και in vivo.

3. Μετάσταση

Μεταστάσεις αναπτύσσονται όταν καρκινικά κύτταρα με ενδογενές δυναμικό ανάπτυξης νέων όγκων αποκολλώνται από το στρώμα του πρωτογενή όγκου και μεταναστεύουν σε δευτερογενείς εστίες (73).

- Ωστόσο έχει βρεθεί ότι όταν τα κύτταρα στερούνται τη στήριξη του στρώματος αδυνατούν να επιβιώσουν και υφίστανται κυτταρικό θάνατο (74). Πιστεύεται ότι αύξηση της αυτοφαγίας εντός αυτών των «μεταναστευτικών» κυττάρων αποτελεί

μηχανισμό άμυνας και προστασίας που εξασφαλίζει την επιβίωσή τους με τελικό αποτέλεσμα την ανάπτυξη μεταστάσεων (75,76). Μέχρι στιγμής δεν έχουν δημοσιευθεί έρευνες που να μελετούν την παραπάνω υπόθεση στοχευμένα στον καρκίνο του μαστού.

- Επίσης τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν δυναμικό μετάστασης μέσω αλλαγής των ιδιοτήτων τους από επιθηλιακές σε μεσεγχυματικές (77). Έρευνα έδειξε ότι αύξηση της αυτοφαγίας σε κύτταρα από καρκίνο μαστού σχετίζεται με αναστολή της μετάλλαξης των κυττάρων από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά (78).

- Επίσης διαγραφή του γονιδίου της Beclin 1 αυξάνει την έκφραση του μεσεγχυματικού προφίλ των κυττάρων στη σειρά MCF-7 καρκινικών κυττάρων μαστού (78).

- Μεταστατικοί όγκοι βρισκόμενοι σε συνθήκες μεταβολικής αδράνειας καταφέρνουν να διαφύγουν την επίδραση των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. Σε πειραματικό μοντέλο με ποντίκια βρέθηκε ότι η αυτοφαγία προάγει τη μεταβολική αδράνεια των κυττάρων (79-81).

- Καρκινικά κύτταρα που έχουν αποκολληθεί από τον αρχικό όγκο μαστού «φωλιάζουν» στον μυελό των οστών για μακρές περιόδους πριν προκαλέσουν μετάσταση στα οστά. Έχει βρεθεί ότι η αυτοφαγία προκαλεί χειμερία νάρκη στα καρκινικά κύτταρα εμποδίζοντας μια μορφή απόπτωσης σχετιζόμενη με τον παράγοντα νέκρωσης όγκων (tumor-necrosis factor- TNF) (81). Δεδομένου ότι στον μυελό των οστών υπάρχει αυξημένη έκφραση αυτού του είδους απόπτωσης, θεωρείται ότι αυξημένη έκφραση της αυτοφαγίας στα κύτταρα μαστού που ζουν στον μυελό, τα προστατεύει από την TNF σχετιζόμενη απόπτωση και διευκολύνει την ανάπτυξη μεταστάσεων στα οστά (82).

4. Αυτοφαγία- Χημειοθεραπεία

- Αναστολή της αυτοφαγίας ευαισθητοποίησε κύτταρα με καρκίνο μαστού στη θεραπεία με ταμοξιφένη (83).

- Σε καρκίνο μαστού θετικό για τον υποδοχέα ErbB2+, ο συνδυασμός τρανστιζουμάμπ και του χημικού αναστολέα της αυτοφαγίας, 3-μεθυλαδενίνη, αύξησε την χημειοθεραπευτική δράση του μονοκλωνικού αντισώματος (84).
- Καρκινικά κύτταρα μαστού που δεν εκφράζουν κανέναν από τους τρεις ορμονικούς υποδοχείς- οιστρογόνων, προγεστερόνης και Her2/neu- είναι δύσκολο να θεραπευτούν. Η αύξηση της αυτοφαγίας με AMPK ενεργοποιητές και αναστολείς από-ακετυλίωσης της ιστόνης, αποτελεί μια νέα προσέγγιση για την θεραπεία αυτών των όγκων (85-87). Επίσης η αναστολή της αυτοφαγίας μέσω χλωροκίνης στους ίδιους όγκους αύξησε την κυτταροτοξικότητα των παραπάνω χημικών παραγόντων (86,86).
- Αναστολή της αυτοφαγίας μέσω χημικών αναστολέων ή μέσω αλλαγής της έκφρασης των ATG γονιδίων βοήθησε στην ευαισθητοποίηση του καρκίνου του μαστού στην ακτινοβολία (88,89).
- Οι αναστολείς της αυτοφαγίας, χλωροκίνη και υδροχλωροκίνη, βρίσκονται σε προ-κλινικές αλλά και κλινικές έρευνες για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού (90, 91, 92, 93) (Πίνακας 1 και 2).

Πίνακας 1. Κλινικές μελέτες με τη χρήση χλωροκίνης ή υδροχλωροκίνης ως μονοθεραπεία ή συνδυαστικά με άλλους αντικαρκινικούς παράγοντες στην θεραπεία του καρκίνου του μαστού

ClinicalTrials.gov ID	Intervention	Study Phase	Location	Status	First received	Completed	Participants	Condition	Details	Primary Outcome	Results
NCT00765765	HCQ + Ixabepilone	Phase 1-2 Non-randomized Open label	USA	terminated	February 2009	December 2011	6	Metastatic Breast Cancer	Dose escalation from 200 mg po qd to 200 mg po bid	Assess the antitumor activity, measured by tumor response rate, in patients who receive this regimen as a third-line treatment	The study was closed early due to slow accrual. Insufficient data were collected to analyze this outcome measure
NCT01292408	HCQ	Phase 2 Open Label	Netherlands	Unknown	January 2011	-	20	Breast Cancer	Included patients with core-biopsy proven invasive adenocarcinoma of the breast	Detect differences in endogenous hypoxia markers (CA9, PAI-1, VEGF) and autophagy (LC3b) before and after treatment with HCQ.	-
NCT01446016	CQ + Taxan/ Taxotere/ Abraxane/ Ixabepilone	Phase 2 Non-randomized Open label	USA	Completed	Sept 2011	March 2019	47	Advanced or Metastatic Breast Cancer	CQ in combination with Taxane or Taxane-like chemo agents in the treatment of patients with	To determine the anti-tumor activity of the combination of CQ + Taxane or Taxane-like	The overall response rate was 45.1%, the combination was well

									advanced or metastatic breast cancer who have failed anthracycline chemo base therapy	chemo agents (Paclitaxel, Docetaxel, Abraxane, Ixabepilone) measured by overall response rate	tolerated with only 13.2% of patients experiencing Grade ≥ 3 adverse events.
NCT02333890	CQ vs. Placebo (prior to surgery)	Phase 2 Randomized double-blind placebo-controlled	Canada	Completed	July 2015	March 2018	60	Invasive Breast Cancer	Included patients with newly diagnosed histologically confirmed primary invasive breast cancer who were not undergoing any treatment while awaiting surgery in the next 2-6 weeks	Effect of a brief course of CQ on tumour proliferation and apoptosis based on Ki67 and TUNEL assays	No significant differences between the CQ or placebo arms in Ki67 index pre- and post-drug treatment. Adverse effects were minimal and all classified as grade 1. The effects were significant enough to cause nearly 15% of patients to discontinue therapy

NCT01023477	CQ	Phase 1-2 Non-randomized Open label	USA	Completed	December 2009	October 2016	12	Ductal Carcinoma In Situ (DCIS)	CQ standard dose (500mg/week) or CQ low dose (250mg/week) for 1 month prior to surgical removal of the tumor.	Tumor response evaluated by RECIST criteria as measured by breast MRI	Measurable reduction in proliferation of DCIS lesions and enhancement of immune cell migration into the duct
NCT02414776	HCQ + hormonal therapy	Phase 1-2 Non-randomized Open label	USA	Terminated	July 2014	November 2015	3	ER+ Metastatic Breast Cancer	-	Number of Participants with Adverse Events as a Measure of the safety profile of orally administered HCQ with hormonal therapy	-
NCT04523857	Abemaciclib + HCQ vs. Abemaciclib	Phase 2 Randomized Open label	USA	Not yet recruiting	April 2021	-	66	Invasive Breast Cancer	Rate of protocol defined "severe toxicity" during cycle 1 (4 weeks) of combination HCQ 600mg BID and Abema (at 100 mg and 150 mg BID) in a safety cohort of 6 patients at each dose of Abema	Incidence of treatment-emergent adverse events, Frequency of "clearance" of bone marrow DTCs by arm after 6 cycles of study treatment.	-

NCT03032406	HCQ + Everolimus vs. Everolimus vs HCQ	Phase 2 Pilot Randomized	USA	Recruiting	January 2017	-	60	Breast Cancer Stage IIB	Histologically-confirmed, primary, invasive breast cancer diagnosed within 5 years of study entry.	Number of Adverse Events	-
NCT04316169	Abemaciclib + HCQ	Phase 1 Non-randomized Open Label	USA	Not yet recruiting	July 2021	-	44	HR+/Her 2- Advanced Breast Cancer	Arm A: Abemaciclib + HCQ 200 mg b.i.d. Arm B: Abemaciclib + HCQ 400 mg b.i.d. Arm C: Abemaciclib + HCQ 600 mg b.i.d. Arm D: Abemaciclib + HCQ + endocrine therapy	To determine safety and tolerability of HCQ + abemaciclib and HCQ + abemaciclib + endocrine therapy in HR+/Her2- Advanced Breast Cancer	-
NCT03774472	HCQ + Palbociclib + Letrozole	Phase 1-2 Open label	USA	recruiting	August 2018	-	54	Advanced, metastatic (stage IV) Breast Cancer (phase I) Early stage (stage I-III) Breast Cancer	This phase I/II trial studies the side effects and best dose of HCQ when given together with palbociclib and letrozole before surgery in treating participants with estrogen receptor positive, HER2	Incidence of adverse events, change in breast tumor proliferation index (Ki67), Change in autophagy, Change in senescence, Change in cell cycle control,	-

								(phase II)	negative breast cancer.	Change in proportion of patients achieving tumoral complete cell cycle arrest	
--	--	--	--	--	--	--	--	------------	-------------------------	---	--

Πίνακας 2. Προ-κλινικές μελέτες *in vivo* με τη χρήση χλωροκίνης ή υδροχλωροκίνης συνδυαστικά με άλλους αντικαρκινικούς παράγοντες στην θεραπεία του καρκίνου του μαστού

Studies	Anti-tumor medication	Autophagy inhibitor	Tumor cells	Comparison	Results
Lefort 2014	Cyclophosphamide + Adriamycin (AC)	Chloroquine (CQ)	MDA-MB-231 human breast cancer cells	AC vs. AC+CQ	The combined group experienced an additive tumor growth inhibition of 41% compared to AC treatment alone and a reduction in lung metastases
Liang 2016	Carboplatin	Chloroquine (CQ)	SUM159 cells breast cancer cells	Carb vs. Carb+CQ	Carb+CQ reduced tumor growth, decreased mitochondrial metabolic activity, decreased cell viability and increased levels of LC3b-II and p62 demonstrating that CQ can successfully inhibit autophagy induced by carboplatin
Shoemaker 1978	5-Fluorouracil (5-FU)	Chloroquine (CQ)	C3HBA breast cancer cells	5-FU+CQ vs. control, 5-FU vs. 5-FU+CQ	The 5-FU+CQ group had significantly reduced tumor size compared to control group and 5-FU group
Shoemaker 1979	6-Propylthiouracil (PTU) + 5-Fluorouracil (5-FU)	Chloroquine (CQ)	C3HBA breast cancer cells	5-FU+PTU+CQ vs. control group	Significant reduction in tumor growth compared to control group
Loehberg 2012	Everolimus	Chloroquine (CQ)	MCF7 breast cancer cells	Everolimus + CQ vs. control group	The combined treatment group showed significant weight (4.1-fold) and size (4.6-fold) reduction compared to control
Seront 2013	Rapamycin	Chloroquine (CQ)	MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells	Rapamycin vs. Rapamycin+CQ vs. CQ	When combined with CQ, rapamycin did not further alter tumor progression in either model cancer cell type, suggesting that potential rapamycin-induced autophagy was not playing a critical role in these tumors. Tumor growth reduction was observed only in mice with large, hypoxic mammary tumors
Dragowska 2013	Gefitinib	Hydroxychloroquine (HCQ)	JIMT-1 breast cancer cells	Gefitinib vs. HCQ vs. Gefitinib+HCQ	Notably, when gefitinib was used in combination with HCQ there was a significant 58% reduction in tumor volume compared to vehicle-treated controls

Cufi 2013	Trastuzumab	Chloroquine (CQ)	JIMT-1 breast cancer cells	Trastuzumab vs. CQ vs. Trastuzumab+ CQ	The tumor size in the combination group was drastically reduced in a synergistic manner compared to control and monotherapy groups
Ratikan 2013	Radiotherapy	Chloroquine (CQ)	MCaK breast cancer cells	Radiotherapy + CQ	Chloroquine blocked radiation-induced autophagy and drove MCaK cells into a more rapid apoptotic and more immunogenic form of cell death
Thomas 2012	Nelfinavir + Celecoxib	Chloroquine (CQ)	MDA- MB-468 and MCF- 7 breast cancer cells	Nelfinavir + Celecoxib + CQ	Synergistic enhancement of tumor cell killing by ERSA compounds, particularly in triple-negative breast cancer (TNBC) cells.

Γ. Εισαγωγή στην Ανοσοθεραπεία

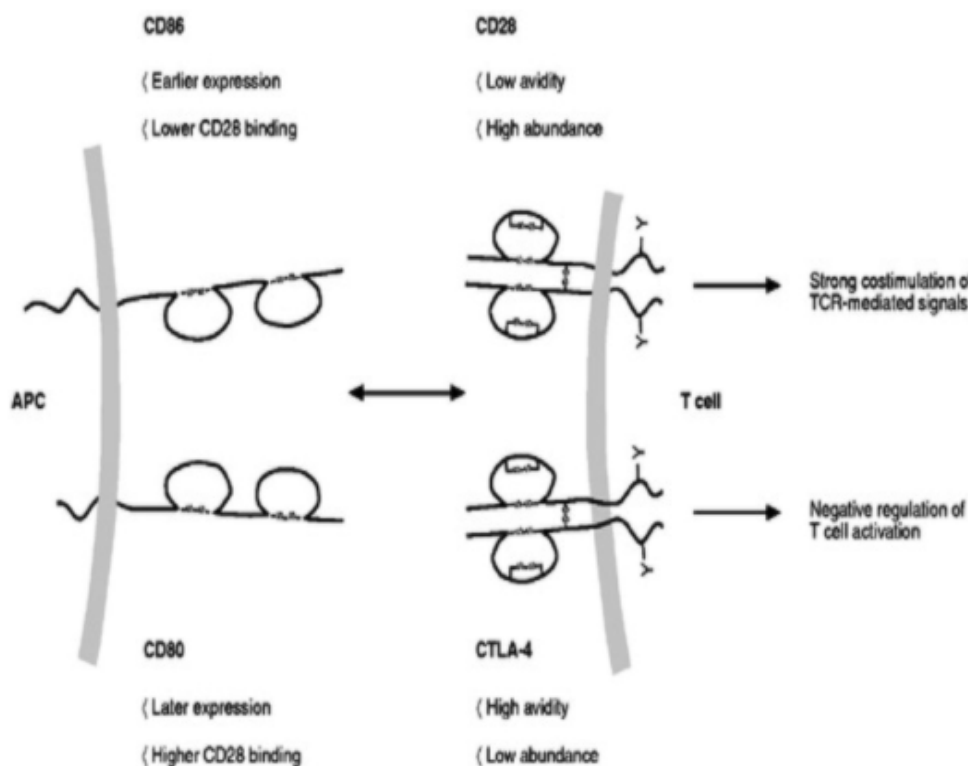
Η ανοσοθεραπεία, η οποία στοχεύει ειδικά ανοσολογικά μονοπάτια, έχει αναδειχθεί ως μια καινοτόμος θεραπευτική προσέγγιση στην ογκολογία. Τα τελευταία χρόνια, θεραπείες που στοχεύουν σε «σημεία ελέγχου του ανοσοποιητικού», ή συγκεκριμένα μόρια αυτών των οδών, έχει αποδειχθεί ότι εμποδίζουν την ανάπτυξη του καρκίνου χωρίς να βλάπτουν τον υγιή ιστό. Στόχος της ανοσοθεραπείας είναι να ενεργοποιηθεί το ανοσοποιητικό σύστημα του ασθενή, συγκεκριμένα εναντίον του κακοήθι όγκου

Το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα εκτελεί προστατευτικές λειτουργίες μέσω πολύπλοκων μονοπατιών που επιτυγχάνουν μια λεπτή ισορροπία μεταξύ κυτταρικής διαφοροποίησης και αυτοανοχής. Πολλές από αυτές τις οδούς μεσολαβούνται από T λεμφοκύτταρα, τα οποία ρυθμίζονται από κεντρικά σημεία ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος (94).

Η ενεργοποίηση των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων (CTLs ή CD8+ κύτταρα) περιλαμβάνει τουλάχιστον δύο σήματα, είτε με τη μεσολάβηση των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων CD4+ είτε μέσω αντιγονο-παρουσιαστικών κυττάρων. Το μόριο Major Histocompatibility Complex (MHC) παρέχει το πρώτο σήμα, συνδυαζόμενο με ένα ειδικό αντιγόνο πεπτίδιο στην κυτταρική επιφάνεια. Αυτό το σύμπλοκο αναγνωρίζεται από έναν υποδοχέα στην επιφάνεια των T κυττάρων και επάγει τον πολλαπλασιασμό του T κυττάρου.

Ένα δεύτερο σήμα, ανεξάρτητο από το αντιγόνο, αποτελεί το συν-διεγερτικό σήμα μεταξύ του συνδέτη CD80 και του υποδοχέα CD28 στην επιφάνεια των T κυττάρων που απαιτείται για την ενεργοποίησή του. Μετά την ενεργοποίηση, τα CTL μπορούν να αναγνωρίσουν και να σκοτώσουν κύτταρα που εκφράζουν το συγκεκριμένο πεπτίδιο.

Αυτός ο συν-διεγερτικός μηχανισμός επιτρέπει επίσης τον πολλαπλασιασμό των Β λεμφοκυττάρων και την παραγωγή αντισωμάτων και προάγει την πρωτογενή ανοσοαπόκριση (95) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Μηχανισμός ενεργοποίησης των Τ λεμφοκυττάρων.

Η ενεργοποίηση των Τ λεμφοκυττάρων ρυθμίζεται από αναστολείς σε «σημεία ελέγχου» του ανοσοποιητικού συστήματος. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν μόρια που αναστέλλουν την ενεργοποίηση των Τ κυττάρων παρά την ενεργοποίησή τους από το CD80 και το MHC, αποτρέποντας έτσι μια ανεξέλεγκτη ανοσοαπόκριση από τα CTL. Αυτό το επίπεδο ρύθμισης αυξάνει την ανοσολογική εξειδίκευση αποτρέποντας τις ανοσο-μεσολαβούμενες αποκρίσεις σε αυτο-αντιγόνα, αποτρέποντας την πρόκληση βλάβης σε υγιείς ιστούς και την εμφάνιση αυτοάνοσων νόσων.

Ορισμένοι καρκίνοι έχουν εξελιχθεί για να εκμεταλλεύονται αυτό το μηχανισμό ρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος ενισχύοντας τους ανασταλτικούς μηχανισμούς του και αποτρέποντας την ενεργοποίηση των CTL. Ενισχύοντας το

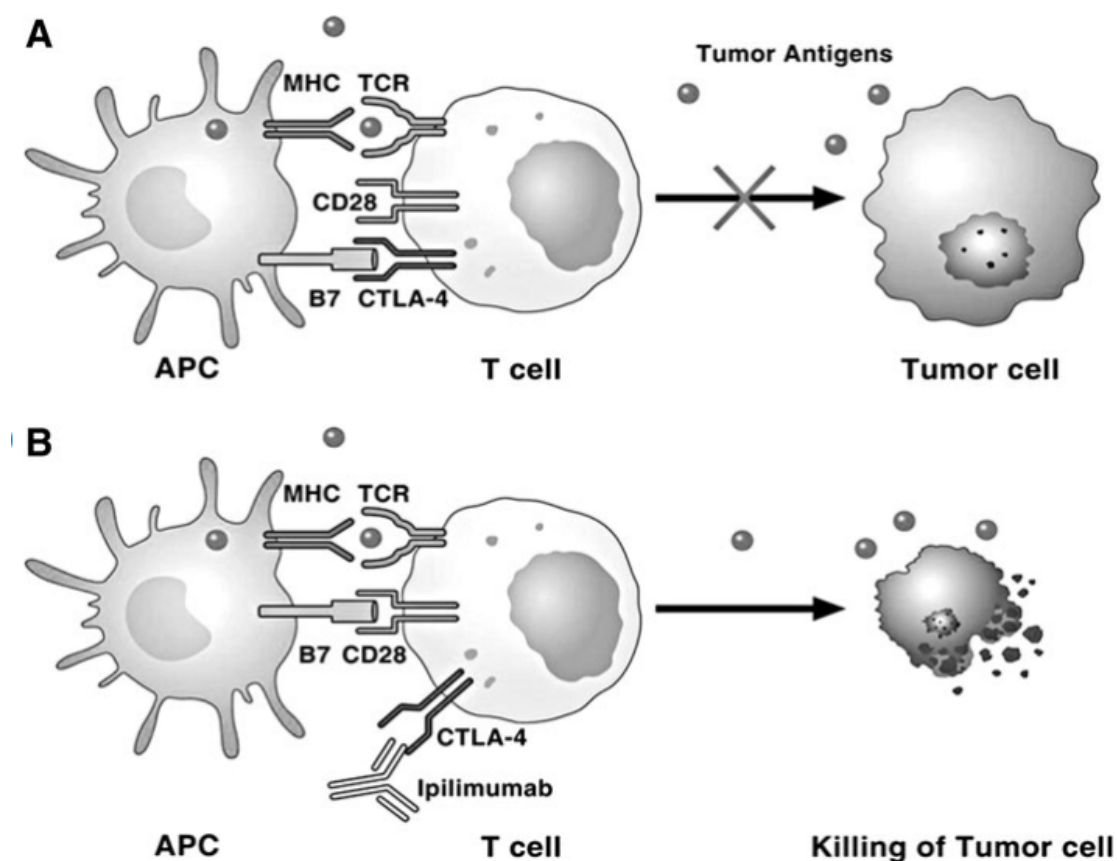
ανοσοποιητικό σύστημα σε «σημεία ελέγχου», οι όγκοι γίνονται μια ανεκτή οντότητα στο ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, επιτρέποντάς στον όγκο να πολλαπλασιαστεί. Ο χαρακτηρισμός αυτών των αναστολέων στα «σημεία ελέγχου» και ο χειρισμός τους είναι ένας ανερχόμενος τομέας έρευνας θεραπείας του καρκίνου, ειδικά σε καρκίνους συμπαγών όγκων (94, 96).

Την τελευταία δεκαετία, η ανακάλυψη αναστολέων σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως οι CTLA-4 και PD-1, έπαιξε κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη νέων ανοσο-ογκολογικών θεραπειών για πολλαπλούς τύπους κακοηθειών. Συγκεκριμένα, το CTLA-4 (κυτταροτοξικό αντιγόνο T-λεμφοκυττάρων-4), μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών που ανακαλύφθηκε αρχικά πριν από περισσότερα από 30 χρόνια, έχει πρόσφατα μεταμορφώσει το τοπίο θεραπείας του καρκίνου (97). Το CTLA-4 εκφράζεται κυρίως σε ενεργοποιημένα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα. CTLs), τα οποία είναι τα κύρια τελεστικά κύτταρα που μετριάζουν τις ανοσολογικές αντινεοπλασματικές αποκρίσεις (98).

Όσον αφορά τον μηχανισμό δράσης του, το CTLA-4 ρυθμίζει την ανοσοκαταστολή ανταγωνιζόμενος με υψηλότερη συγγένεια για δέσμευση τα συν-διεγερτικά μόρια B7 (CD80/CD86) την επιφάνεια των εξειδικευμένων κυττάρων που παρουσιάζουν το αντιγόνο. Κατά την παρουσίαση του αντιγόνου όγκου, αυτό αναιρεί τη δέσμευση του CD28 στους συνδέτες του B7, μειώνοντας έτσι τη σηματοδότηση με τη μεσολάβηση CD28 και τον μειωμένο πολλαπλασιασμό των T κυττάρων και την απελευθέρωση της ιντερλευκίνης-2 (99).

Το 1996, οι πρώτες προσπάθειες για την εφαρμογή αυτής της νέας γνώσης στη θεραπεία του καρκίνου έγιναν από την Allison και συνεργάτες του (100). Η έρευνά τους επικεντρώθηκε στον αποκλεισμό των ανασταλτικών επιδράσεων του CTLA-4 με ένα μονοκλωνικό αντίσωμα, οδηγώντας σε ενισχυμένες αντικαρκινικές αποκρίσεις. Μετά από αυτή την τεράστια ανακάλυψη, η οποία αποκάλυψε το αντικαρκινικό δυναμικό των αναστολέων σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος, οι κλινικές δοκιμές κατέληξαν στην ανάπτυξη του μονοκλωνικού αντισώματος anti-

CTLA-4, του Ipilimumab, το οποίο εγκρίθηκε για τη θεραπεία του μελανώματος το 2011 (101, 102, 103) (Εικόνα 4).



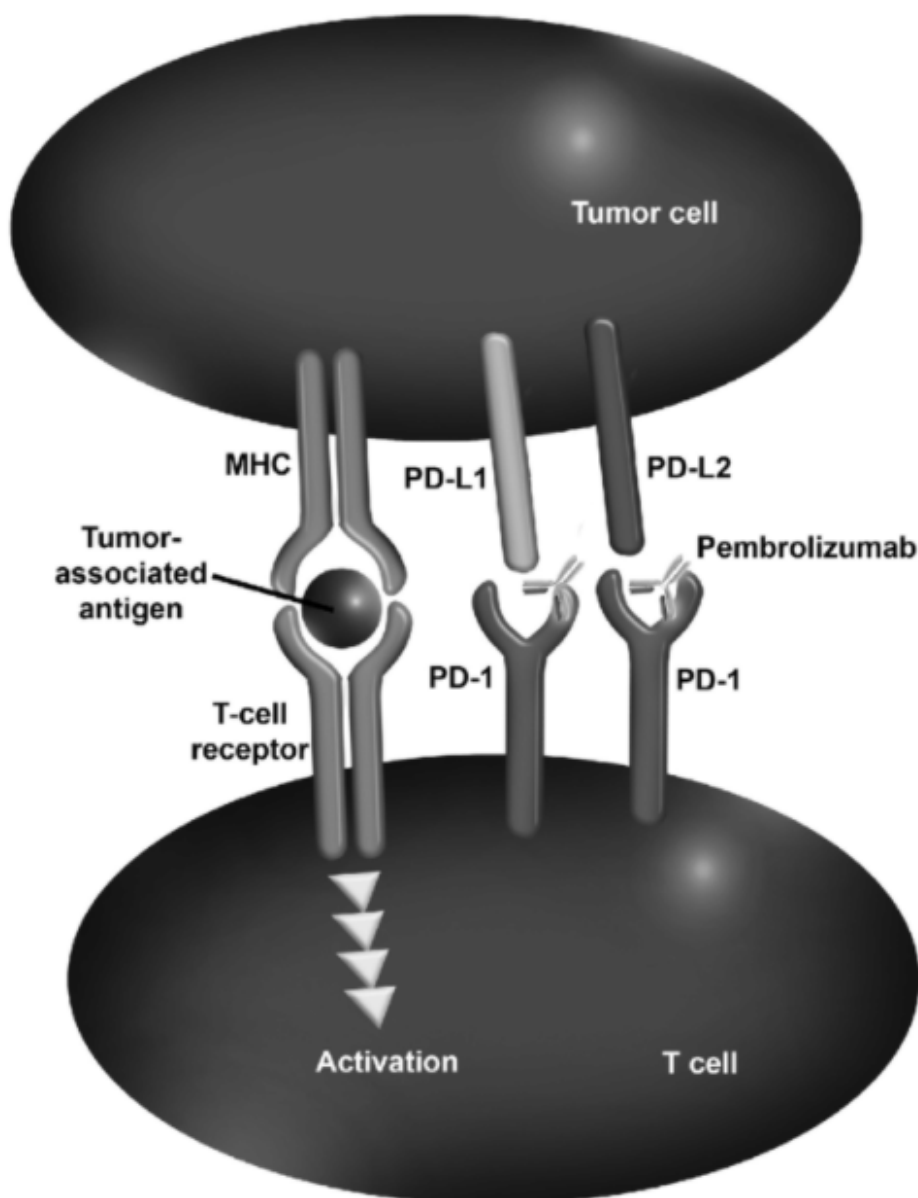
Εικόνα 4: Μηχανισμός δράσης Ipilimumab.

Η ανακάλυψη του ipilimumab και τα ενθαρρυντικά αποτελέσματά του στην αύξηση της συνολικής επιβίωσης των ασθενών με μελάνωμα προκάλεσαν το ενδιαφέρον και άνοιξαν το δρόμο για τη χρήση προηγούμενων προκλινικών ερευνών σχετικά με πρόσθετα συν-διεγερτικά μόρια σχετικά με την ενεργοποίηση των T κυττάρων (104, 105, 106). Αυτές οι προσπάθειες τελικά οδήγησαν στο ανακάλυψη μονοκλωνικών αντισωμάτων που στοχεύουν τους υποδοχείς προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου πρωτεΐνης 1 (PD-1).

Το PD-1 είναι μια πρωτεΐνη με λειτουργία διαμεμβρανικού υποδοχέα στην επιφάνεια των Τ λεμφοκυττάρων, Β λεμφοκυττάρων και στα μυελοειδή κύτταρα. Ανήκει στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών CD28/CTLA-4 (104). Το PD-1 αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του 1990 ως ανασταλτικό μόριο που ρυθμίζει την ανοσολογική απόκριση στους περιφερικούς ιστούς. Η απώλεια του PD-1 είχε ως αποτέλεσμα την εξασθένηση της περιφερειακής ανοχής (102).

Λίγα χρόνια αργότερα, ο Freeman και οι συνεργάτες του αναγνώρισαν το PD-L1 ως σύνδεσμο για τον υποδοχέα PD-1 και έδειξαν ότι η σύνδεση του PD-1 από το PD-L1 οδήγησε στην αναστολή της ενεργοποίησης των Τ λεμφοκυττάρων (107). Μεταγενέστερα *in vivo* και *in vitro* πειράματα επιβεβαίωσαν την ανοσοανασταλτική δράση της πρωτεΐνης PD-L1 στο μικροπεριβάλλον του όγκου σε διάφορους ανθρώπινους καρκίνους αλλά όχι σε φυσιολογικούς ιστούς (108).

Περαιτέρω έρευνες έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση ενεργοποιημένων Τ λεμφοκυττάρων με PDL-1, που σχετίζεται με τον όγκο, οδήγησε σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Έτσι, η οδός PD-1/PD-L1 λειτούργησε ως μηχανισμός αντίστασης μέσω του οποίου οι όγκοι μπορούν να ξεφύγουν από την ενδογενή ανοσολογική καταστροφή. Συλλογικά, τα προκλινικά ευρήματα οδήγησαν στην ιδέα της ανοσοθεραπείας του καρκίνου, αναστέλλοντας την σύνδεση μεταξύ PD-1 και PD-L1 (109, 110). Η πρώτη κλινική δοκιμή ξεκίνησε το 2006 (111), και έκτοτε, έξι αναστολείς του ανοσοποιητικού σημείου ελέγχου για το σημείο ελέγχου PD-1/PD-L1 έχουν εγκριθεί, είτε στοχεύοντας το PD-1 (pembrolizumab, NCT01295827; nivolumab, CheckMate Clinical Trials; cemiplimab, NCT02760498- NCT02383212) είτε το PD-L1 (atezolizumab, NCT01295820; NCT01295827; NCT01295827) (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Μηχανισμός δράσης Pembrolizumab.

1. Ανοσοθεραπεία στον Καρκίνο του Μαστού

Ο καρκίνος του μαστού παραδοσιακά θεωρείται ασθενώς ανοσογόνος με χαμηλότερο μεταλλακτικό φορτίο από άλλους τύπους όγκων. Ωστόσο, υπότυποι, ιδιαίτερα ο «τριπλά αρνητικός» καρκίνος του μαστού (TNBC), η έλλειψη έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνων (ER), των υποδοχέων προγεστερόνης (PR) και των υποδοχέων HER2 (μέλος της οικογένειας των υποδοχέων του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα), είναι επιρρεπείς σε ανοσοθεραπεία (112).

Βιολογικά φάρμακα όπως το pembrolizumab (anti-PD1) και το atezolizumab (anti-PD-L1) διερευνώνται ειδικά σε σχέση με τον καρκίνο του μαστού (113). Οι δοκιμές που εξετάζουν τη χρήση του σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία βρίσκονται επί του παρόντος υπό διερεύνηση (114).

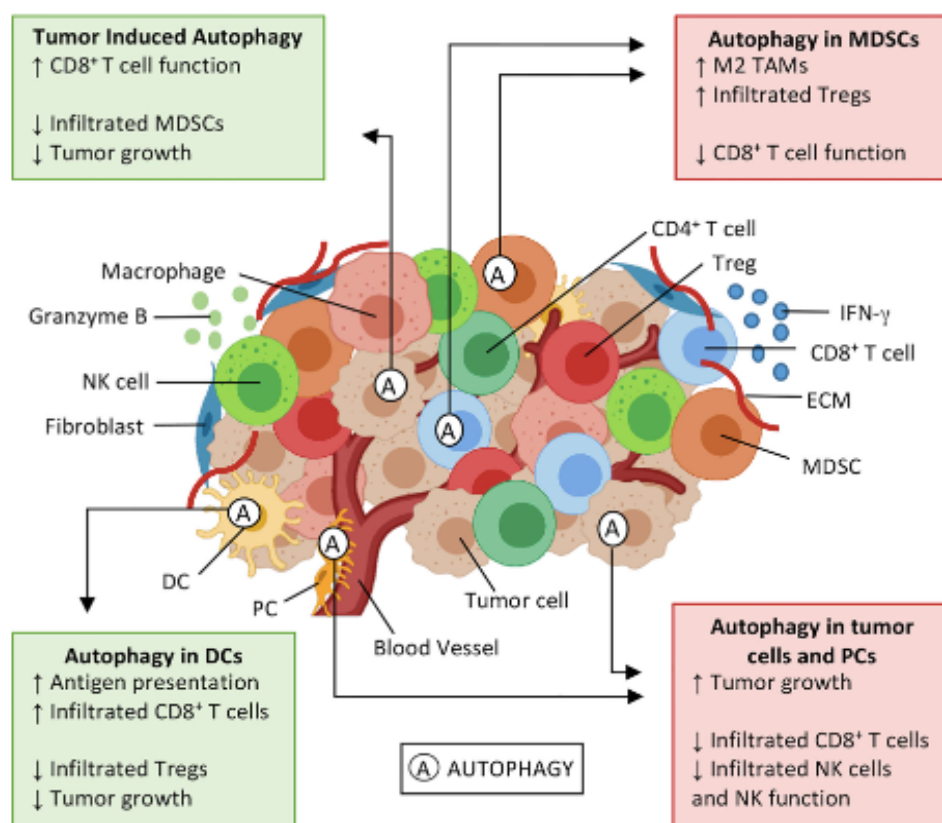
Το 2019, εγκρίθηκε το πρώτο μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του PD-L1 (atezolizumab) για τη θεραπεία ασθενών με ανεγχείρητο τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό TNBC, σε συνδυασμό με το χημειοθεραπευτικό φάρμακο (nab)-paclitaxel (115). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της κλινικής δοκιμής με τίτλο IMpassion130 (NCT02425891), ο συνδυασμός atezolizumab με nab-paclitaxel ως θεραπεία πρώτης γραμμής στο μεταστατικό TNBC οδήγησε σε σημαντικά παρατεταμένη επιβίωση στην υποομάδα ασθενών που ήταν θετικοί στην έκφραση του PD-L1 ($\geq 1\%$) σε ανοσοδιηθήματα. Αυτή η πρώτη έγκριση έχει αυξήσει τον ενθουσιασμό για περαιτέρω προκλινικές μελέτες και κλινικές δοκιμές στον τομέα της ανοσοογκολογίας του μαστού, τόσο με τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της ανοσοθεραπείας ως μονοθεραπείας όσο και σε συνδυασμό με υπάρχοντα σχήματα χημειοθεραπείας για τον καρκίνο του μαστού (116).

Ωστόσο, ο καρκίνος του μαστού είναι μια πολύπλοκη ασθένεια, με κάθε μοριακό υπότυπο να εμφανίζει ετερογενή ανταπόκριση στη θεραπεία με τη χρήση αναστολέων σημείων ελέγχου, καθώς και ποικίλη έκφραση PD-L1 και CTLA-4, μη συνώνυμα του φορτίου μεταλλάξεων στον όγκο και την έκφραση φλεγμονωδών κυτοκινών (117, 118, 119). Κατά συνέπεια, οι στρατηγικές και οι στοχευμένες παρεμβάσεις χρειάζεται ακόμη να βελτιστοποιηθούν, για να ενισχύσουν την ανοσοαπόκριση και να καταστήσουν τους ετερογενείς όγκους του καρκίνου του μαστού πιο ευάλωτους στην ανοσοθεραπεία.

Δ. Αυτοφαγία και Ανοσοθεραπεία στον Καρκίνο του Μαστού

1. PD1/PD-L1 και Αυτοφαγία στον Καρκίνο του Μαστού

Η ενεργοποίηση του μηχανισμού της αυτοφαγίας παίζει κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη αντικαρκινικής ανοσίας και στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. (120, 121) (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Αυτοφαγία και αντικαρκινική ανοσία.

Επομένως, οποιαδήποτε εμπλοκή αναστολέων σημείων ελέγχου στο μονοπάτι της αυτοφαγίας σχετίζεται και με τη θεραπεία του καρκίνου. Υπάρχουν ενδείξεις ότι το μονοπάτι της αυτοφαγίας επηρεάζεται από τον άξονα PD-L1/PD-1. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι το PD-L1 ενεργοποιεί τον υποδοχέα mTOR, έναν κεντρικό αναστολέα της αυτοφαγίας. Τα καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν το PD-L1 σε υψηλά επίπεδα

έχουν χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης της αυτοφαγίας (122, 123). Η μείωση της εμπλοκής PD-L1/PD1 σε κύτταρα όγκου σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα αυτοφαγίας, προάγοντας επομένως την ανακύκλωση των θρεπτικών συστατικών και την κάθαρση των τοξικών ειδών και προάγοντας την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Ταυτόχρονα, η σύνδεση του PD1 στα T λεμφοκύτταρα αναστέλλει την ικανότητά τους να ανταποκρίνονται στα αντιγόνα όγκου και έτσι αναστέλλει την ανοσία κατά του όγκου.

Ωστόσο, ορισμένες μελέτες έχουν βρει ότι αυτές οι ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της αυτοφαγίας και των ανοσορυθμιστικών μηχανισμών λειτουργούν διαφορετικά στον καρκίνο του μαστού. Συγκεκριμένα, η αποικοδόμηση του PD-L1 με τη μεσολάβηση της αυτοφαγίας σε κυτταρικές σειρές TNBC και σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του προστάτη, συμβάλλει στη μείωση του όγκου. Αυτή η οδός αποικοδόμησης του PD-L1 μέσω της αυτοφαγίας ήταν σχετικά συγκεκριμένη, δηλ. όχι μαζική μακρο-αυτοφαγία ή αυτοφαγία σχετιζόμενη με το ενδοπλασματικό στρες, εξηγώντας πιθανώς το παράδοξο ότι προηγούμενες μελέτες παρατήρησαν αύξηση στην αυτοφαγία και μειωμένη έκφραση του PD-L1.

2. CTLA-4 και Αυτοφαγία στον Καρκίνο του Μαστού

Ο αναστολέας σημείου ελέγχου CTLA-4 και ο ρόλος του στην αυτοφαγία και την ανοσία κατά του καρκίνου έχει μελετηθεί κυρίως στο μελάνωμα. Μελέτες έχουν δείξει ότι το αντίσωμα κατά του CTLA-4 έχει τη δυνατότητα να προάγει την ανοσοαπόκριση του ξενιστή. Αυτή η επίδραση μελετήθηκε σε μοντέλα όγκων ποντικών, οδηγώντας σε ένα εγκεκριμένη χρήση του αντισώματος αντι-CTLA-4, το ipilimumab, που θεραπεύει το μελάνωμα.

Τα αντισώματα κατά του CTLA-4 μειώνουν την ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων προάγοντας την ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR (ένα μονοπάτι που ενεργοποιείται σε πολλούς όγκους και παίζει ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου)(124), μειώνοντας έτσι την έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αυτοφαγία. Επιπλέον, ο αποκλεισμός της ενεργοποίησης των υποδοχέων του CTLA-4

μέσω των αντισωμάτων προκάλεσε ένα αυξημένο επίπεδο αντικαρκινικής ανοσίας, οδηγώντας σε ακόμα πιο έντονη μείωση του όγκου (96).

Μπορούμε να υποθέσουμε ότι μια παρόμοια αλληλεπίδραση μπορεί να συμβεί μεταξύ του μηχανισμού της αυτοφαγίας και συστήματος ελέγχου του CTLA-4, αν και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες στον καρκίνο του μαστού που να διερευνούν αυτήν την πιθανή σύνδεση.

3. Μονοπάτια Ανοσορρύθμισης και Αυτοφαγίας στον Καρκίνο του Μαστού

3.1 Ογκογόνος Δράση

Μελέτες έχουν αναδείξει την ογκογενή επίδραση της αυτοφαγίας και του ανοσοποιητικού μικροπεριβάλλοντος. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχτεί αυξημένη έκφραση ενός δείκτη αυτοφαγίας, της μεμβρανικής γλυκοπρωτεΐνη 2a που σχετίζεται με το Λυσόσωμα (LAMP2a) (125), σε μακροφάγα του μικροπεριβάλλοντος του καρκίνου του μαστού και μάλιστα αυτή η αυξημένη έκφραση υποδηλώνει πτωχή πρόγνωση. Απενεργοποίηση της LAMP2a οδήγησε σε ενίσχυση της κυτταροτοξικότητας του όγκου από τα μακροφάγα και σε *in vivo* μείωση του όγκου (126).

Ο ογκογόνος ρόλος της αυτοφαγίας στον καρκίνο του μαστού μέσω ανοσοποιητικών μηχανισμών επισημάνθηκε επίσης σε μια ξεχωριστή μελέτη που έδειξε πως η αυτοφαγία που ενεργοποιείται μέσω επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT), παρεμποδίζει τη λύση των καρκινικών κυττάρων που προκαλείται μέσω των CTL (CTL-λύση) (127). Αυτό το εύρημα έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενες παρατηρήσεις που αφορούν στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, όπου η αυτοφαγία προκάλεσε EMT. Επιπρόσθετα, η επαγόμενη από υποξία αυτοφαγία βρέθηκε ότι εμπλέκεται στην αντίσταση των καρκινικών κυττάρων του μαστού στη λύση που προκαλείται από τα φυσικά φονικά κύτταρα (NKC-λύση).

3.2 Ογκοκατασταλτική Δράση

Όπως και με άλλους καρκίνους, η αυτοφαγία έχει επίσης πιθανό ογκοκατασταλτικό ρόλο στον καρκίνο του μαστού μέσω της ανοσολογικής ενεργοποίησης. Μια μελέτη έδειξε ότι η ενεργοποίηση της αυτοφαγίας μεσολαβεί στην CTL- και NK- λύση των καρκινικών κυττάρων του μαστού μέσω του p53 μονοπατιού, και συγκεκριμένα μέσω του συμπλέγματος κινάσης τύπου Unc-51 (ULK). Μέσω αυτού του μηχανισμού η αυτοφαγία παρέχει θρεπτικά συστατικά και σήματα στρες, (128, 129) και ενεργοποιεί το μονοπάτι της σεστρίνης-AMPK-mTOR (130). Σε μια άλλη μελέτη σε ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του μαστού, η απουσία της ελαφριάς αλυσίδας 3 β (LC3β), από κυτταρόπλασμα (που υποδηλώνει μειωμένη αυτοφαγία) και η απώλεια της πυρηνικής έκφρασης HMFB1 (που υποδηλώνει μειωμένη φλεγμονώδη απόκριση από κύτταρα του ανοσοποιητικού), επηρέασαν τη σύνθεση των ανοσοδιηθημάτων στον όγκο. Αυτό ευνόησε το προφίλ ανοσοεπιτήρησης του όγκου και βελτίωσε τη συνολική και χωρίς μεταστάσεις επιβίωση (131).

3.3 Τριπλά Αρνητικός Καρκίνος Μαστού (TNBC)

Η αυτοφαγία αποδείχθηκε ότι είναι απαραίτητη για την επιβίωση ορισμένων τύπων TNBC σε ένα περιβάλλον πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά. Σε αυτές τις καρκινικές κυτταρικές σειρές TNBC, η αυτοφαγία οδήγησε σε παρακρινή έκκριση της ιντερλευκίνης IL-6, μιας προφλεγμονώδους κυτοκίνης, που οδηγεί σε αυξημένη φωσφορυλίωση του Μετατροπέα Σήματος και Ενεργοποιητή Μεταγραφής (STAT3) και στον πολλαπλασιασμό βλαστικών κυττάρων καρκίνου του μαστού (131, 132). Αυτό υποστηρίχθηκε περαιτέρω από στοιχεία που έδειξαν ότι ακόμα κι όταν η αυτοφαγία αναστέλλεται, η χορήγηση IL-6 οδήγησε στη συντήρηση των καρκινικών βλαστοκυττάρων. Παραδόξως, η IL-6 είχε τον αντίθετο ρόλο σε ένα περιβάλλον φτωχό σε θρεπτικά συστατικά: η αυτοφαγία είχε ως αποτέλεσμα μειωμένη έκκριση IL-6, η οποία οδήγησε σε αυξημένη συντήρηση των βλαστικών κυττάρων του καρκίνου του μαστού.

Ο περιορισμός της αερόβιας γλυκόλυσης όγκου σε δύο μοντέλα ποντικών TNBC βρέθηκε ότι αναστέλλει την έκφραση του παράγοντα διέγερσης αποικίας κοκκιοκυττάρων όγκου (G-CSF) και παράγοντα διέγερσης αποικίας μακροφάγων

κοκκιοκυττάρων (GM-CSF) μέσω ενός πολύπλοκου μοριακού δικτύου που περιλαμβάνει το μηχανισμό της αυτοφαγίας. Αυτό οδήγησε σε αύξηση της ανοσίας των T λεμφοκυττάρων, ανοσοκαταστολή του όγκου, μειωμένη μετάσταση και παρατεταμένη επιβίωση (133). Αυτά τα αποτελέσματα υπογραμμίζουν την ανάγκη προσδιορισμού του πλαισίου της αυτοφαγίας και των ανοσορρυθμιστικών μηχανισμών για προγνωστικούς και θεραπευτικούς σκοπούς.

3.4 Ορμονική Θεραπεία

Έρευνες στον καρκίνο του μαστού με μετάσταση στους πνεύμονες έδειξαν ότι η μετορμίνη αύξησε την ευαισθησία στην ανοσοθεραπεία με συνθετικά ολιγοδεοξυνουκλεοτίδια κυτοσίνης φωσφορικής-γουανοσίνης (CpG). Αυτά είναι βραχεία μονόκλωνα μόρια DNA που περιέχουν μη μεθυλιωμένα δινουκλεοτίδια CpG σε συγκεκριμένες αλληλουχίες και μπορεί να προκαλέσουν ενεργοποίηση αυτοφαγίας που οδηγεί σε αυξημένη απόκριση των CTL (134). Σε μια άλλη μελέτη που υπογραμμίζει τον ρόλο της αυτοφαγίας στην καταστολή του όγκου, έδειξε ότι η ανοσοθεραπεία με τον αγωνιστή του υποδοχέα-5 τύπου Toll (TLR5) αύξησε άμεσα την αυτοφαγία και μείωσε τον πολλαπλασιασμό του καρκίνου του μαστού μέσω αυξημένης δραστηριότητας του MAP1S (135). Αυτή είναι μια πρωτεΐνη προσαρμογής στο μονοπάτι της αυτοφαγίας που συμμετέχει στον συντονισμό των μικροσωληναρίων και στη ρύθμιση της καταστολής της ογκογένεσης που προκαλείται από την αυτοφαγία (136).

3.5 Χημειοθεραπεία

Ο ανοσοποιητικός κυτταρικός θάνατος και η αυτοφαγία μπορεί επίσης να συνδέονται έμμεσα με τη χρήση συμβατικών χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Η βινορελβίνη αναστέλλει τη μίτωση αλληλεπιδρώντας με την τουμπουλίνη και είναι μια πιθανή θεραπεία του φλεγμονώδους καρκίνου του μαστού. Έχει αποδειχθεί ότι έχει αντινεοπλασματική δράση προκαλώντας ισχυρή φλεγμονή μέσω του υποδοχέα-4 (TLR4), επαγωγής κυτοκίνης και κυτταρικού θανάτου μέσω μιτωτικής απόπτωσης και αυτοφαγίας (137). Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να επιβεβαιωθεί εάν τα μόρια που ενεργοποιούν το TLR4 ή οι αναστολείς του ανοσοποιητικού σημείου ελέγχου θα μπορούσαν να αυξήσουν την αντικαρκινική δράση της βινορελβίνης.

3.6 Ακτινοθεραπεία

Τέλος, άλλες μελέτες έχουν τονίσει ότι η ίδια η διαταραχή αυτού καθεαυτού του μηχανισμού της αυτοφαγίας θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ανοσοθεραπεία. Έρευνες έχουν δείξει ότι αναστολή της αυτοφαγίας οδηγεί σε ακτινο-ευαισθητοποίηση των καρκινικών κυττάρων, η οποία πιθανότατα οφείλεται σε αυξημένη έκφραση του MHC Τάξης I με επακόλουθη αύξηση της δραστηριότητας των CTL (138). Αν και αυτές οι μελέτες υπογραμμίζουν την επίδραση της αυτοφαγίας στην ανοσοθεραπεία καρκίνου του μαστού και είναι πολλά υποσχόμενες θεραπευτικές στρατηγικές, έχουν επίσης περιορισμούς στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων επειδή κάθε ερευνητικό πρωτόκολλο χρησιμοποίησε διαφορετικό σχήμα ανοσοθεραπείας (π.χ. ακτινοβολημένα καρκινικά κύτταρα, ενεργοποίηση TLR5, αντιδραστικά T-κύτταρα, IFN- γ) στο πλαίσιο διαφορετικών υποτύπων καρκίνου του μαστού. Επιπλέον, η πειραματική μέθοδος για τη διαταραχή της αυτοφαγίας θα μπορούσε επίσης να επηρεάσει τα αποτελέσματα. Μια μελέτη παρατήρησε αλλαγή στην ανοσοθεραπεία και ανταπόκριση στην ακτινοβολία μέσω παροδικής εξωγενούς αναστολής της αυτοφαγίας με χλωροκίνη, αλλά υπήρξε μειωμένη ακτινο-ευαισθητοποίηση με την ενδοκυτταρική αναστολή της αυτοφαγίας (139).

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Βασικοί στόχοι της διατριβής που επιτεύχθηκαν ανά ακαδημαϊκό έτος

2014-2015- Έκθεση προόδου του ακαδημαϊκού έτους 2014-2015

- Παρατηρήσαμε ότι στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά με τη χρήση της αυτοφαγίας ως προγνωστικού δείκτη στον καρκίνο του μαστού. Επιπλέον οι περισσότερες έρευνες έχουν γίνει σε κυτταρικές σειρές ή σε ιστό από καρκίνο του μαστού. Δεν βρήκαμε κλινικές ή προκλινικές έρευνες που να μελετούν τα επίπεδα της αυτοφαγίας σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού στην περιφέρεια όπως στο αίμα. Συγκεκριμένα επικεντρωθήκαμε στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα λόγω του ιδιαίτερου ρόλου τους στο ανοσοποιητικό σύστημα και μελετήσαμε τα επίπεδα έκφρασης της αυτοφαγίας σε αυτό τον πληθυσμό κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος.

- Τέλος παρατηρήσαμε ότι δεν έχει μελετηθεί στο παρελθόν η σχέση της αυτοφαγίας στον καρκίνο του μαστού με τις πρωτεΐνες θερμικού σοκ. Μια τέτοιου είδους συσχέτιση πιστεύουμε θα συνεισφέρει στην βαθύτερη κατανόηση του μηχανισμού της αυτοφαγίας γενικότερα αλλά και ειδικότερα στον καρκίνο του μαστού.

- Για να μας δοθεί άδεια συλλογής δειγμάτων και διεξαγωγής των εργαστηριακών πειραμάτων και μετρήσεων στο εργαστήριο Ανοσολογίας και Λοιμωδών νοσημάτων του Weill Cornell Medical College, το οποίο εξειδικεύεται στον τομέα της αυτοφαγίας καταθέσαμε το πρωτόκολλο της έρευνας μας στο θεσμικό συμβούλιο έρευνας και ηθικής δεοντολογίας του κολλεγίου προς επιθεώρηση. Η κατάθεση περιελάμβανε μετάφραση του αρχικού πρωτοκόλλου έρευνας που είχε εγκριθεί από το Πανεπιστήμιο Αθηνών, αίτηση για την συλλογή δειγμάτων από την κλινική μαστού του New York Presbyterian- Weill Cornell Medical Center και αίτημα άδειας για την ανάλυση των δειγμάτων στο εργαστήριο Ανοσολογίας των Λοιμωδών Νοσημάτων του κολλεγίου. Μέσω του πρωτοκόλλου η επιστημονική ομάδα

δεσμευόταν να συλλέγει γραπτή συγκατάθεση από κάθε υποψήφιο συμμετέχοντα-ασθενή στην οποία περιγράφεται το θέμα, οι στόχοι και τα μέσα της έρευνας και εγγυόταν τη προστασία των προσωπικών δεδομένων και δικαιωμάτων κάθε ασθενούς. Μέσω της συγκατάθεσης ο ασθενής συμφωνούσε ελεύθερα να συμμετέχει στην έρευνα χωρίς οποιοδήποτε όφελος ή χρέος. Η κατάθεση του πρωτοκόλλου έγινε στις 17 Δεκεμβρίου 2014 και εγκρίθηκε στις 6 Οκτωβρίου 2015.

- Τέλος έγινε πρόταση συνεργασίας με την κλινική μαστού του Memorial Sloan Kettering Cancer Center η οποία και έγινε δεκτή. Η συνεργασία προέβλεπε συλλογή δειγμάτων αίματος από γυναίκες ασθενείς με καρκίνο μαστού και η συλλογή δειγμάτων από την παραπάνω κλινική μαστού ξεκίνησε 1 Νοεμβρίου 2015.

2015-2016

- Μελετήσαμε τη βιβλιογραφία, ορίσαμε λεπτομερώς τη μέθοδο επεξεργασίας και συντήρησης των δειγμάτων και ξεκινήσαμε τη διαδικασία συλλογής και αποθήκευσης τους. Η εγκυρότητα και αξιοπιστία της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε έχει δοκιμαστεί όχι μόνο στο εργαστήριο Ανοσολογίας και Λοιμωδών νοσημάτων του Weill Cornell Medical College, αλλά και σε άλλα εργαστήρια βασικής έρευνας με ενδιαφέρον στην απομόνωση περιφερικών πολυμορφοπύρηνων κυττάρων.

- Ορίσαμε τις δημοσιογραφικές και κλινικές παραμέτρους με προγνωστικό χαρακτήρα στον καρκίνο του μαστού και οργανώσαμε ένα σύστημα καταγραφής το οποίο επιτρέπει όχι μόνο την προστασία των προσωπικών δεδομένων των ασθενών αλλά και τη εύκολη στατιστική ανάλυση τους.

2016-2017- Έκθεση προόδου του ακαδημαϊκού έτους 2016-2017.

- Ορίσαμε τους ανοσολογικούς και αγγειογενετικούς δείκτες ενδιαφέροντος με πιθανή προγνωστική αξία στον καρκίνο του μαστού.

- Ξεκινήσαμε τα εργαστηριακά πειράματα για την μελέτη του αντικειμένου της διδακτορικής διατριβής και ολοκληρώσαμε την καταγραφή των κλινικών δεδομένων του ερευνητικού πληθυσμού.

2017-2018- Έκθεση προόδου του ακαδημαϊκού έτους 2017-2018.

- Κατά τη διάρκεια του τέταρτου ακαδημαϊκού έτους της διδακτορικής διατριβής επικεντρωθήκαμε στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων από τα εργαστηριακά πειράματα.
- Τέλος παρουσιάσαμε τα αποτελέσματα της έρευνάς μας στο διεθνές επιστημονικό συνέδριο της Ευρωπαϊκής Κοινότητας Ογκολογίας (EUROPEAN SOCIETY FOR MEDICAL ONCOLOGY - ESMO) το οποίο διεξήχθη στο Μόναχο της Γερμανίας, στις 19-23 Οκτωβρίου, 2018.

2018-2019

- Συγγραφή ανασκόπησης με θέμα το ρόλο της αυτοφαγίας στην ανοσολογία του καρκίνου του μαστού (υπό κατάθεση).

2019-2020

- Αίτημα παράτασης λόγω COVID- 19 και αυξημένων κλινικών υποχρεώσεων σε μονάδα COVID.

2020-2021

- Συγγραφή και δημοσίευση άρθρου πρωτότυπης έρευνας.

A. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Τα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα του αίματος (μονοκύτταρα, μακροφάγα, λεμφοκύτταρα) ενεργοποιούνται όταν το ανοσοποιητικό σύστημα εκτίθεται σε αντίξοες συνθήκες (π.χ. λοίμωξη, φλεγμονή, τραύμα, στρες, έλλειψη θρεπτικών συστατικών, καρκίνο) με σκοπό να ενισχύσουν την άμυνα του οργανισμού και να αποκαταστήσουν την ομοιόσταση. Η θερμική πρωτεΐνη Hsp70 συμμετέχει στη διατήρηση της λειτουργίας πρωτεϊνών του σώματος καθώς και στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Η αυτοφαγία αποτελεί κυτταρικό μηχανισμό μέσω του οποίου το κύτταρο καταβολίζει και ανακυκλώνει απαραίτητα συστατικά όπως πρωτεΐνες και οργανίδια τα οποία βοηθούν στην επιβίωση του κυττάρου υπό αντίξοες συνθήκες.

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι η αυτοφαγία παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου του μαστού αλλά και στην ανταπόκριση στην χημειοθεραπεία. Για τους παραπάνω λόγους σχεδιάσαμε μια σειρά πειραμάτων για να διερευνήσουμε την αλληλεπίδραση του μηχανισμού της αυτοφαγίας με κυτταροκίνες και αγγειογενετικούς παράγοντες στον καρκίνο του μαστού.

Εξετάσαμε την υπόθεση ότι τα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα του αίματος ανταποκρίνονται στην παρουσία μιας κακοήθους μάζας στο μαστό αυξάνοντας την παραγωγή φλεγμονωδών και προ- φλεγμονωδών μοριακών δεικτών. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας την ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA, εξετάσαμε τα επίπεδα έκφρασης των IFN- γ , TNF- α , IL1 β , IL-4, IL-10, LPA, HSP70, στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα του αίματος γυναικών, οι οποίες είχαν διαγνωσθεί είτε με καρκίνο του μαστού είτε με καλοήθεις μάζες του μαστού.

B. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Συλλογή δειγμάτων

Μετά την έγκριση του ερευνητικού πρωτοκόλλου μας από το θεσμικό συμβούλιο έρευνας και ηθικής δεοντολογίας του Weill Cornell Medical College το οποίο κατατέθηκε στις 17 Δεκεμβρίου 2014 και εγκρίθηκε στις 6 Οκτωβρίου 2015 ξεκινήσαμε τη συλλογή δειγμάτων από την κλινική μαστού και τη γενική γυναικολογική κλινική του New York Presbyterian Hospital-Weill Cornell Medical Center.

2. Επεξεργασία και αποθήκευση δειγμάτων

Η κάθε ασθενής μετά την υπογραφή γραπτής συγκατάθεσης στην οποία περιγράφεται το θέμα, οι στόχοι και τα μέσα της έρευνας και εγγυάται η προστασία των προσωπικών δεδομένων και δικαιωμάτων κάθε ασθενούς, υποβλήθηκε σε φλεβοτομή και αιμοληψία. Από την κάθε ασθενή συλλέξαμε συνολικά 5mL αίματος. Η συλλογή των πρώτων 2.5mL αίματος έγινε σε μη ηπαρινισμένο δοκιμαστικό σωλήνα τα οποία συντηρήθηκαν σε θερμοκρασία 4 oC για 24ώρες μέχρι την τελική επεξεργασία του δείγματος. Τα υπόλοιπα 2.5mL αίματος συνελέγησαν σε ηπαρινισμένο δοκιμαστικό σωλήνα και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 24ώρες μέχρι την τελική επεξεργασία του δείγματος.

Μετά από την φυγοκέντρηση του νωπού φλεβικού αίματος στο μη ηπαρινισμένο δοκιμαστικό σωλήνα διαχωρίσαμε και απομονώσαμε τον υπερκείμενο ορό του αίματος. Έπειτα φυλάξαμε τον ορό σε Eppendorf του 1.5 ml. Κάθε Eppendorf με ορό ασθενούς έφερε ετικέτα ανεξίτηλης μελάνης προστατευμένη από την υγρασία και τη φθορά με αύξοντα αριθμό που αντιστοιχεί στο ηλεκτρονικό αρχείο όπου φυλάσσονται τα στοιχεία του ασθενή. Στη συνέχεια αποθηκεύσαμε τον ορό σε συνθήκες ψύξης στους -80 oC.

Από τον ηπαρινισμένο δοκιμαστικό σωλήνα απομονώσαμε τα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα (μονοκύτταρα, μακροφάγα, λεμφοκύτταρα) κάθε

ασθενούς με την παρακάτω διαδικασία. Αναμείξαμε το νωπό φλεβικό αίμα με Ficoll –Hypaque. Ακολούθησε φυγοκέντριση του δείγματος. Από το προϊόν της φυγοκέντρωσης απομονώσαμε το στρώμα των περιφερικών πολυμορφοπύρηνων κυττάρων τα οποία αναμείξαμε με το διαλύτη Roswell Park Memorial Institute (RPMI) και φυγοκεντρίσαμε ξανά. Μετά τη φυγοκέντρωση απομακρύναμε το υπερκείμενο, επαναδιαλύσαμε το ίζημα με RPMI και επαναλάβαμε τη φυγοκέντρωση. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε δις. Με την παραπάνω διαδικασία καταφέραμε να απομονώσουμε περιφερικά πολυμορφοπύρηνια κύτταρα από κάθε ασθενή με συγκέντρωση 5×10^6 κύτταρα/mL σε RPMI όπως μετρήθηκαν με τη χρήση αιμοκυτταρόμετρο.

Στη συνέχεια εκθέσαμε τα περιφερικά πολυμορφοπύρηνια κύτταρα σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης και απομονώσαμε το υπερκείμενο των λυμένων κυττάρων ως ακολούθως. Κατασκευάσαμε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (Tris 1mL, χλωριούχο Μαγνήσιο $[MgCl_2]$ 10μL, DNase 1mg, lysis buffer 20mL, phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF] 200μL, Protease Inhibitor Cocktail [PIC] 10μL). Τοποθετήσαμε σε τρυβλία Petri 400μl περιφερικών πολυμορφοπύρηνων κυττάρων με τελική πυκνότητα 2×10^6 κύτταρα/τρυβλίο. Στη συνέχεια σε κάθε τρυβλίο έγινε προσθήκη 130μl διάλυμα λύσης των κυττάρων για 30 λεπτά, σε πάγο (2-4°C). Ακολούθησε φυγοκέντρωση του τρυβλίου. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης το υπερκείμενο των λυμένων κυττάρων αποθηκεύτηκε σε ξεχωριστό Eppendorf. Κάθε Eppendorf με υπερκείμενο των λυμένων κυττάρων έφερε ετικέτα ανεξίτηλης μελάνης προστατευμένη από την υγρασία και τη φθορά με αύξοντα αριθμό που αντιστοιχεί στο ηλεκτρονικό αρχείο όπου φυλάσσονται τα στοιχεία του ασθενή. Στη συνέχεια αποθηκεύσαμε το δείγμα σε συνθήκες ψύξης στους -80 °C.

3. Συλλογή κλινικών δεδομένων

Δημιουργήσαμε φύλλο εργασίας Excel για την αρχειοθέτηση των δημογραφικών και κλινικών δεδομένων των ασθενών που συμμετέχουν στο ερευνητικό μας πρωτόκολλο. Στο ηλεκτρονικό αρχείο κάθε ασθενής έλαβε αύξοντα αριθμό ο οποίος και χρησιμοποιήθηκε έναντι του ονόματος του ασθενούς για την αποθήκευση των δειγμάτων. Τα στοιχεία που συλλέξαμε περιλαμβάναν πληροφορίες σχετικά με την

ηλικία, την εθνικότητα, το δείκτη μάζας σώματος, τον αριθμό των εγκυμοσύνων, τον αριθμό γεννήσεων, την ηλικία εμμηναρχής, την ηλικία εμμηνόπαυσης, τα συνοδά νοσήματα, τη χρήση φαρμάκων, τη συγκέντρωση του καρκινικού δείκτη CA 15-3 και CA 27.29, τον ιστολογικό τύπο της βλάβης του μαστού, τα στάδια του καρκίνου του μαστού, το βαθμό διαφοροποίησης (grade), την έκφραση ορμονικών υποδοχέων (οιστρογονικοί, προγεστερονικοί, HER2), μεταλλάξεις του BRCA1 και/ή BRCA2 μετά από γενετικό έλεγχο που οι ασθενείς είχαν για τις ανάγκες της συνιστάμενης θεραπείας τους από τον θεράποντα ιατρό..

4. Ορισμός ανοσολογικών και αγγειογενετικών δεικτών ενδιαφέροντος

- Σχετικά με τα εργαστηριακά πειράματα, και ύστερα από μελέτη της πιο πρόσφατης βιβλιογραφίας, όπως περιγράφεται στην εναρκτήρια έκθεση προόδου, ορίσαμε και συμπεριλάβαμε στα εργαστηριακά πειράματα τις παρακάτω κυτταροκίνες, πρωτεΐνες θερμικού σοκ και αγγειογενετικούς παραγόντες που έχουν συσχετιστεί με το μονοπάτι της αυτοφαγίας και τον καρκίνο του μαστού: : IFN- γ , TNF- α , IL1 β , IL-4, IL-10, LPA, HSP70, p62.

5. Εργαστηριακά Πειράματα

Για τα εργαστηριακά πειράματα χρησιμοποιήσαμε τη βιοχημική μέθοδο ενζυμικής ανοσοδοκιμασίας ELISA (ή Δοκιμασία ΕνζυμοΣυζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης/Enzyme-linked Immunosorbent Assay) με την οποία έγινε ανίχνευση κάθε αντιγόνου ξεχωριστά (Πίνακας 3). Η ποσοτικοποίηση του τελικού προϊόντος της ανοσοδοκιμασίας για κάθε πείραμα ELISA πραγματοποιήθηκε με χρωματομετρία χρησιμοποιώντας φωτόμετρο για πλακίδια 96 φρεατίων.

Πίνακας 3: Ελάχιστο επίπεδο ανίχνευσης μοριακών δεικτών ενδιαφέροντος με βάση τον κατασκευαστή ELISA sandwich (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY)	
Μοριακός Δείκτης	pg/mL
IFN- γ	<10
TNF- α	3.9
IL1 β	1

IL-4	3.75
IL-10	4.34
p62	100
LPA (Lysophosphatidic acid)	250
HSP70	156

Συγκεκριμένα, ο αποθηκευμένος υπερκείμενος ορός αίματος κάθε δείγματος, ο οποίος είχε προηγουμένως ψυχθεί και αποψυχθεί για τις ανάγκες των εργαστηριακών πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα με ELISA sandwich στα οποία έγινε ανίχνευση των μοριακών δεικτών ενδιαφέροντος: IFN- γ , TNF- α , IL1 β , IL-4, IL-10, LPA, HSP70. Το ελάχιστο επίπεδο ανίχνευσης για κάθε δείκτη ορίστηκε με βάση τον κατασκευαστή ELISA (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, Πίνακας 1). Παρομοίως στο αποθηκευμένο και αποψυγμένο υπερκείμενο λυμένων περιφερικών πολυμορφοπύρηνων κύτταρων του αίματος μελετήσαμε τα ενδοκυττάρια επίπεδα έκφρασης όλων των παραπάνω δεικτών, συμπεριλαμβανομένου του ενδοκυττάριου μοριακού δείκτη της αυτοφαγίας p62. Το ελάχιστο επίπεδο ανίχνευσης για p62 με βάση τον κατασκευαστή ELISA (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) ορίστηκε στα 100 pg/ml.

6. Στατιστική ανάλυση

Ορός αίματος και περιφερικά πολυμορφοπύρηννα κύτταρα του αίματος απομονώθηκαν από κάθε ασθενή που συμμετείχε στο ερευνητικό πρωτόκολλο για τις ανάγκες των εργαστηριακών πειραμάτων. Τα εξωκυττάρια επίπεδα των παρακάτω ανοσολογικών και αγγειογενετικών δεικτών, IFN- γ , TNF- α , IL1 β , IL-4, IL-10, LPA, HSP70, μετρήθηκαν στον ορό του αίματος με τη χρήση της ενζυμικής ανοσοδοκιμασίας ELISA. Παρομοίως, τα ενδοκυττάρια επίπεδα των ίδιων δεικτών καθώς και το δείκτη της αυτοφαγίας p62, μετρήθηκαν με ELISA στο υπερκείμενο λυμένων περιφερικών πολυμορφοπύρηνων κύτταρων του αίματος.

Κάθε δείγμα δοκιμάστηκε τουλάχιστον δύο φορές σε κάθε πείραμα ELISA, για λόγους επαλήθευσης και ακρίβειας. Επίσης, όλες οι μετρήσεις και τα ερευνητικά

πειράματα πραγματοποιήθηκαν από προσωπικό τυφλό στα κλινικά δεδομένα των ασθενών, ώστε να διασφαλιστεί η αμερόληπτη συλλογή των αποτελεσμάτων.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αποτελούντο από τιμές μη-κανονικά κατανοημένες κι έτσι η συσχέτισή τους με την τελική διάγνωση (καρκίνος του μαστού έναντι καλοήθους μάζας του μαστού) έγινε με τη χρήση Mann–Whitney test. Συγκεκριμένα, διαφορές στα ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια επίπεδα έκφρασης των παραπάνω μοριακών δεικτών μεταξύ γυναικών με καλοήθεις και κακοήθεις μάζες του μαστού υπολογίστηκαν με τη χρήση Mann–Whitney test. Η συσχέτιση των συγκεντρώσεων μεταξύ δύο μοριακών δεικτών έγινε με Spearman rank correlation test. Διαφορές τιμής με $p < 0.05$ ορίστηκαν ως στατιστικά σημαντικές. Το λογισμικό GRAPH PAD INSTAT 3.0 (Graft Pad Software, San Diego, CA), χρησιμοποιήθηκε για τη βιοστατιστική ανάλυση των δεδομένων.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην πιλοτική αυτή έρευνα συμμετείχαν 70 γυναίκες με μάζα στο στήθος. Οι γυναίκες αυτές διαγνώστηκαν με μάζα στο στήθος μετά από μαστογραφία ή/και υπέρηχο μαστού. Βιοψία με κόπτουσα βελόνη (core biopsy) ή/και χειρουργείο πραγματοποιήθηκαν μετά από ιατρική εκτίμηση. Μεταξύ αυτών των 70 γυναικών, οι 42 διαγνώστηκαν με καρκίνο μαστού και οι 28 με καλοήθεις μάζες του μαστού. Ωστόσο από τις 42 γυναίκες με καρκίνο μαστού, 4 δείγματα δεν είχαν βιώσιμα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα στο τέλος της επεξεργασίας του δείγματος της ασθενούς. Αντίστοιχα από τις 28 γυναίκες με καλοήθεις μάζες, μόνο 8 είχαν βιώσιμα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα στο τέλος της επεξεργασίας του δείγματος. Τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού περιγράφονται στους (Πίνακας 4, 5)

- Στατιστικά σημαντική διαφορά έκφρασης παρατηρήθηκε στα εξωκυττάρια επίπεδα έκφρασης Hsp70. Συγκεκριμένα γυναίκες με καρκίνο του μαστού παρατηρήθηκε να έχουν υψηλότερα εξωκυττάρια επίπεδα Hsp70 στον ορό τους ($p = 0.03$) (Εικόνα 7).

- Επίσης, η μέση τιμή των ενδοκυττάρων επιπέδων Hsp70 στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα του αίματος γυναικών με καρκίνο του μαστού ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα Hsp70 σε γυναίκες με καλοήθεις μάζες του μαστού (79255 vs 44238.7 pg/ml, $p=0.04$) (Εικόνα 8).

- Στις γυναίκες με καρκίνο του μαστού η μέση τιμή των επιπέδων p62 ήταν 0.6 ng/ml, ενώ στις γυναίκες με καλοήγη μάζα του μαστού η μέση τιμή των επιπέδων p62 ήταν σημαντικά λιγότερη, 2.3 ng/ml ($p<0.0001$) (Εικόνα 9).

- Οι γυναίκες με καρκίνο μαστού είχαν υψηλότερο επίπεδο hsp70 στην κυκλοφορία τους και χαμηλότερο επίπεδο p62 στα PBMC τους από ό,τι οι γυναίκες με καλοήγη μάζα (Πίνακας 6, Εικόνα 10).

- Το επίπεδο p62 ήταν υψηλότερο (η αυτοφαγία ήταν χαμηλότερη) στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα σε ασθενείς με αρνητική βιοψία λεμφαδένα φρουρού σε σύγκριση με τις ασθενείς των οποίων η βιοψία του φρουρού λεμφαδένα ήταν θετική (Εικόνα 11). Στον πληθυσμό με αρνητική βιοψία φρουρού λεμφαδένα το επίπεδο p62 είχε μέση τιμή 1.4pg/mL (1.2, 1.6) έναντι 0.04pg/mL (0.02-0.90) του πληθυσμού με θετική βιοψία φρουρού λεμφαδένα ($p = 0.0083$).

- Το επίπεδο p62 ήταν υψηλότερο (η αυτοφαγία ήταν χαμηλότερη) στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα σε ασθενείς των οποίων η ιστολογία ήταν *in situ* καρκίνος σε σχέση με εκείνους των οποίων η ιστολογία ήταν διηθητικός καρκίνος (Εικόνα 12). Σε ασθενείς με καρκίνωμα *In situ* η μέση τιμή ήταν 1.1pg/mL (0.6-1.4) έναντι αυτών με διηθητικό καρκίνο μαστού με μέση τιμή 0.3pg/mL (0.2-0.7) ($p = 0.0146$). Άρα η αυτοφαγία στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα και το επίπεδο Hsp70 στην κυκλοφορία αυξανόταν καθώς ο καρκίνος του μαστού γινόταν πιο διεσδυτικός.

- Το επίπεδο Hsp70 ήταν χαμηλότερο στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα σε ασθενείς των οποίων η βιοψία του λεμφαδένα φρουρού ήταν αρνητική σε σχέση με εκείνους των οποίων η βιοψία φρουρού λεμφαδένα ήταν θετική (Εικόνα 13). Η μέση τιμή των ενδοκυττάρων επιπέδων Hsp70 για τις ασθενείς με αρνητικό λεμφαδένα φρουρό ήταν 234 ng/ml (18-770) και για αυτές με θετικό λεμφαδένα φρουρό ήταν 1283 ng/ml (301-5156) ($p = 0.0967$).

Στατιστικά σημαντικές διαφορές δεν παρατηρήθηκαν μεταξύ των μετρήσεων των υπολοίπων μοριακών δεικτών της μελέτης μεταξύ γυναικών με καρκίνο του μαστού ή καλοήγη μάζα του μαστού. Επίσης, στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα δεν παρατηρήθηκαν μεταξύ των διαφορετικών ιστολογικών τύπων του καρκίνου του μαστού ούτε στα διαφορετικά στάδια καρκίνου του μαστού, πλην των προαναφερθέντων διαφορών στις γυναίκες με θετικό λεμφαδένα φρουρό ή καρκίνωμα *in situ*.

Πίνακας 4. Χαρακτηριστικά πληθυσμού

Χαρακτηριστικά	Καλοήθεια (n=8)	Κακοήθεια (n=38)	P value
Ηλικία, διάμεση (εύρος)	49.5 (34,71)	54 (31,71)	NS
Εθνικότητα – n (%)			NS
Non-Hispanic White	3 (37.5)	15 (39.5)	
Non-Hispanic Black	2 (25.0)	9 (18.8)	
Asian	1 (12.5)	4 (10.5)	
Hispanic	2 (25.0)	7 (18.4)	
Other	0 (0.0)	3 (7.9)	
Δείκτης Μάζας Σώματος (BMI) – μέσο (SD)	30.2 (6.5)	30.9 (8.3)	NS
Αριθμός κυήσεων, διάμεσος (εύρος)	3 (0,6)	3 (0,10)	NS
Αριθμός τοκετών, διάμεσος (εύρος)	2 (0,5)	2 (0,8)	NS
NS, στατιστικά μη σημαντικό εύρημα			

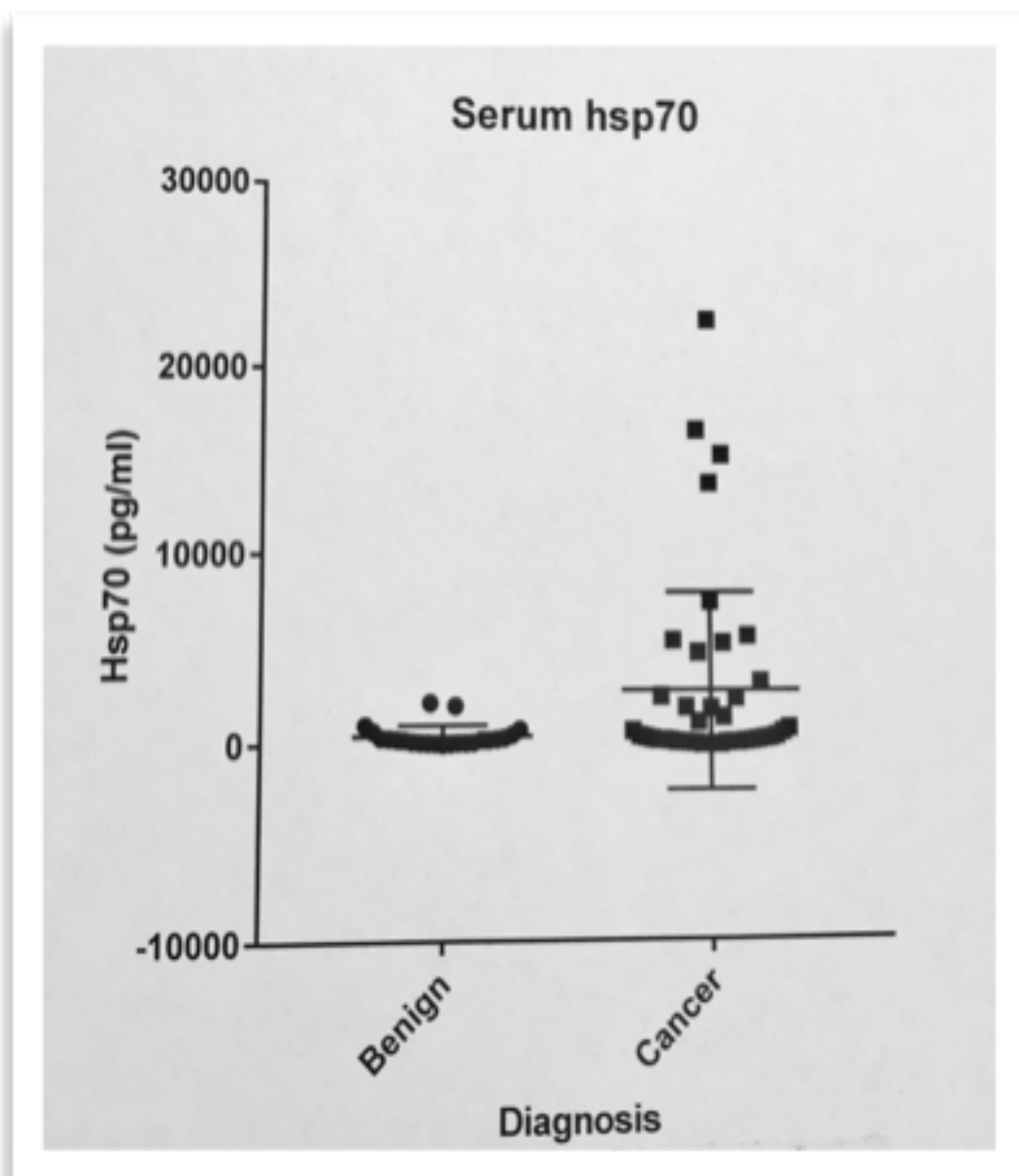
Πίνακας 5. Ιστολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με καρκίνο μαστού

Χαρακτηριστικά	No. γυναικών (n=38)
Ιστολογικός Υπότυπος – n (%)	
Πορογενές	25 (65.8)
Λοβιακό	9 (23.7)
Μεικτό (Πορογενές και Λοβιακό)	4 (10.5)
Υποδοχείς Οιστρογόνων – n (%)	
Θετικοί	33 (86.8)
Αρνητικοί	5 (13.2)
Υποδοχείς Προγεστερόνης – n (%)	
Θετικοί	32 (84.2)
Αρνητικοί	6 (15.8)
Υποδοχείς HER2 – n (%)	
Θετικοί	6 (15.8)
Αρνητικοί	29 (76.3)
Άγνωστο	3 (7.9)
Ιστολογικό Grade – n (%)	
1	7 (18.4)
2	16 (42.1)
3	14 (36.8)
Λεμφαδένας Φρουρός – n (%)	
Θετικός	8 (21.1)
Αρνητικός	28 (73.7)
Άγνωστο	2 (5.2)

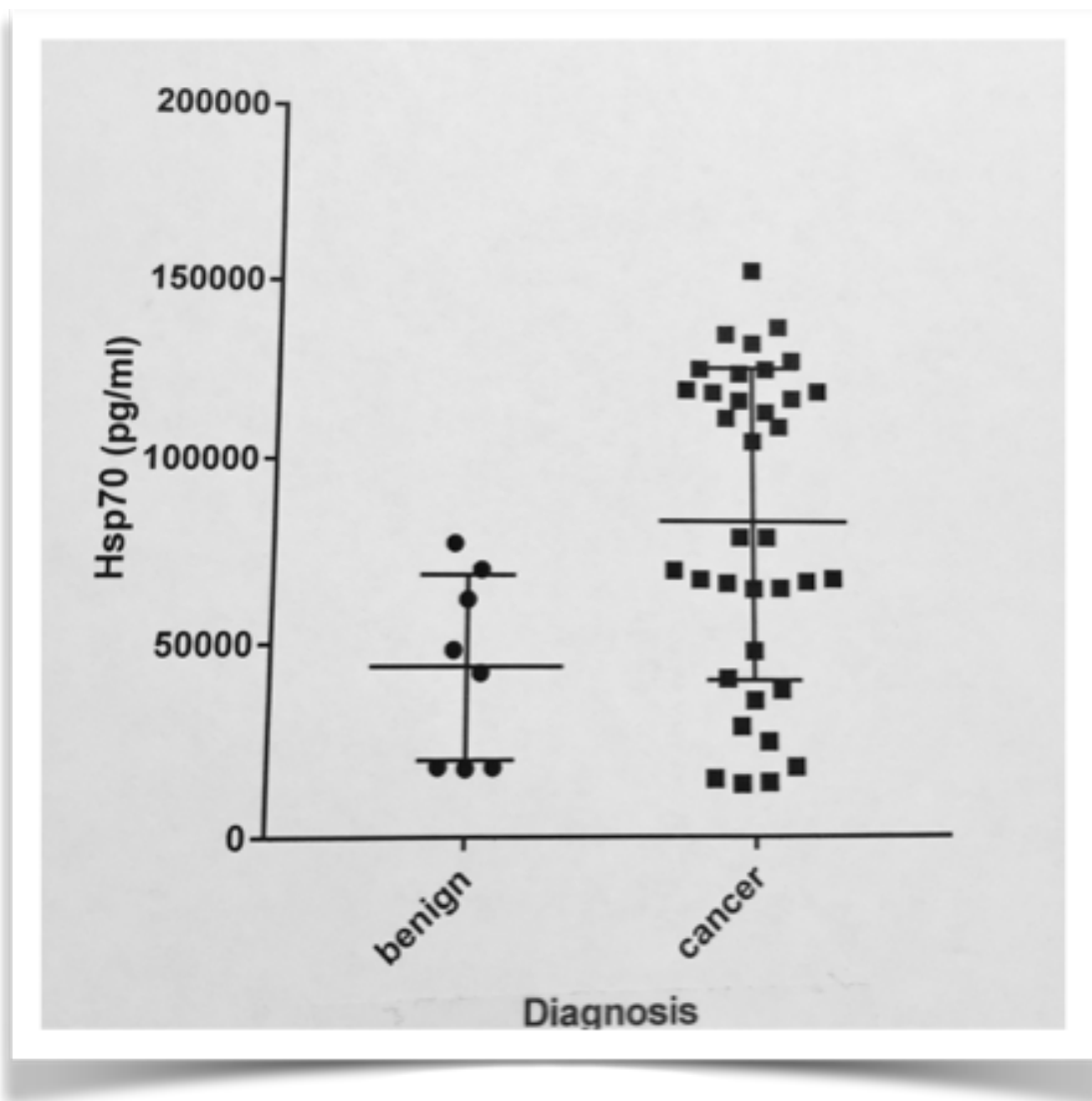
Στάδιο – n (%)

0 (in situ)	4 (10.5)
IA	20 (52.6)
IB	0 (0.0)
IIA	6 (15.8)
IIB	7 (18.4)
IIIA	0 (0.0)
IIIB	0 (0.0)
IIIC	1 (2.6)
IV	0 (0.0)

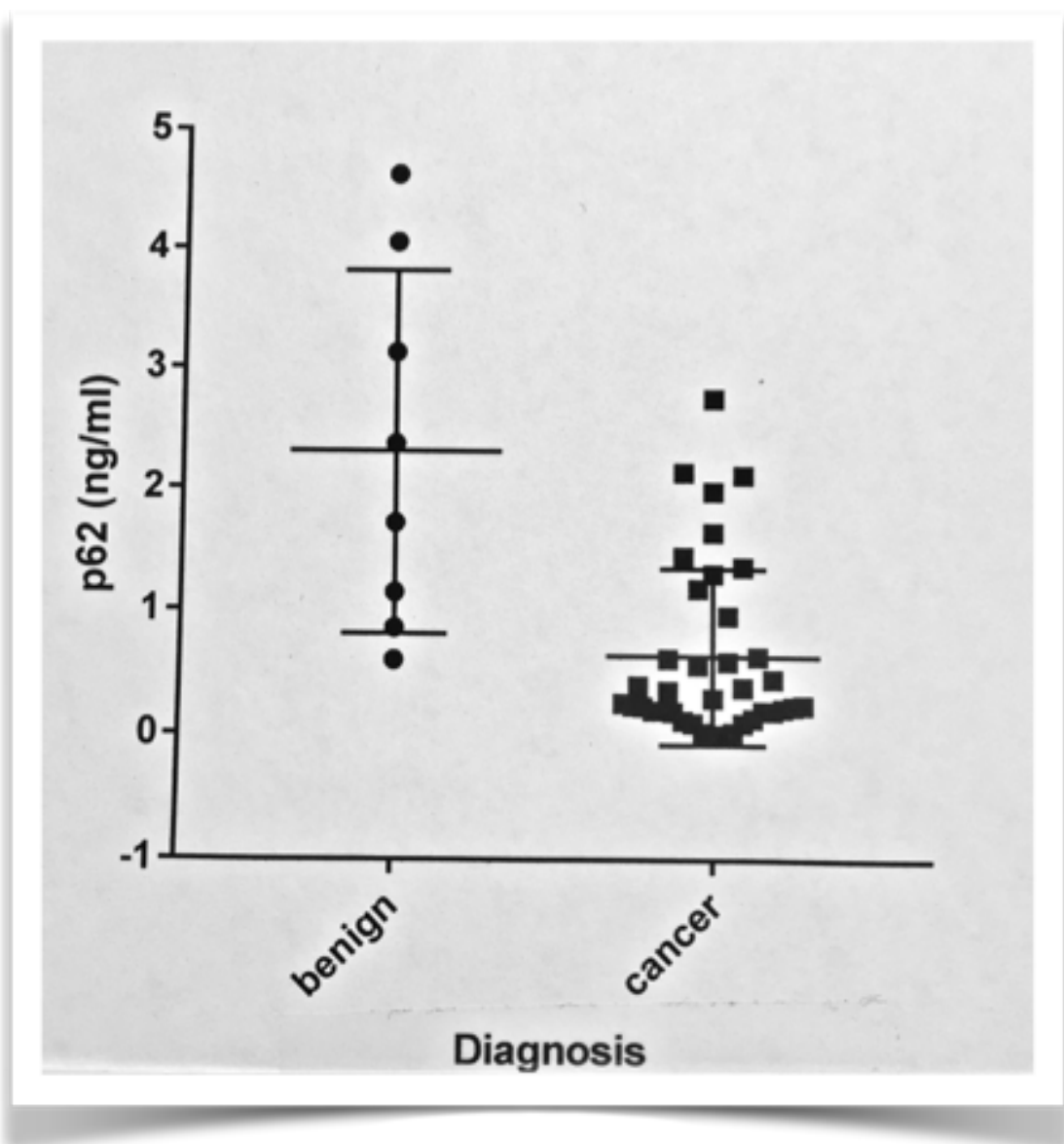
HER2; Human Epidermal growth factor Receptor 2



Εικόνα 7: Γυναίκες με καρκίνο του μαστού είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα εξωκυττάρια επίπεδα Hsp70 (2814.2 vs 442.4 pg/ml, $p=0.03$).



Εικόνα 8: Τα επίπεδα Hsp70 στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα του αίματος γυναικών με καρκίνο του μαστού ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα Hsp70 σε γυναίκες με καλοήθεις μάζες του μαστού (79255 vs 44238.7 pg/ml, $p=0.04$).

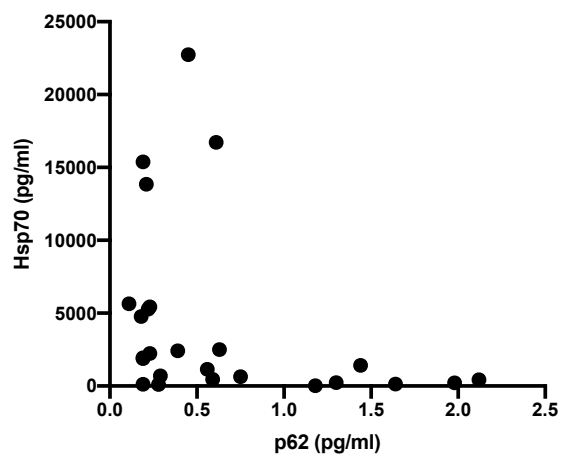


Εικόνα 9: Στις γυναίκες με καρκίνο του μαστού η μέση τιμή των επιπέδων p62 ήταν 0.6 ng/ml, ενώ στις γυναίκες με καλοήγη μάζα του μαστού η μέση τιμή των επιπέδων p62 ήταν 2.3 ng/ml ($p < 0.0001$).

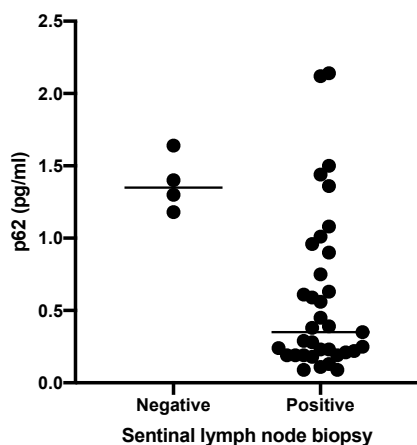
Πίνακας 6. Σύγκριση Ενδοκυττάρων Επιπέδων HSP70 and p62 σε περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα από γυναίκες με κακοήθειες ή καλοήθειες όγκους μαστού

	Κακοήθεια (n=38)	Καλοήθεια (n=8)	p value
Ενδοκυττάρια	79.3 ± 7.4	44.2 ± 8.6	0.04
HSP70, (ng/ml)			
Ενδοκυττάρια	0.6 ± 0.1	2.3 ± 0.5	<0.01
p62, (ng/ml)			

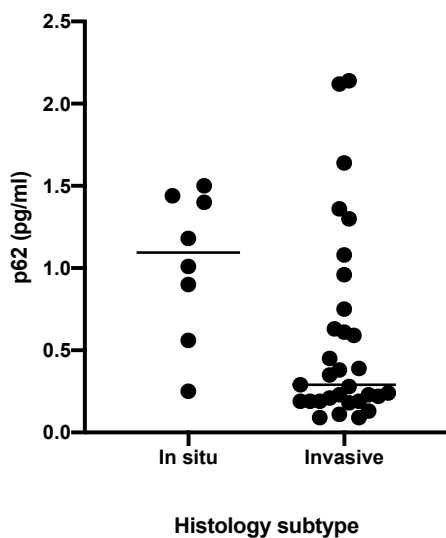
Παρουσίαση δεδομένων με μέση τιμή ± SEM.



Εικόνα 10: Σύγκριση ενδοκυττάρων επιπέδων Hsp70 και p62 σε περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα γυναικών με καρκίνο μαστού (Spearman $r = -0.4749$ $p = 0.0165$).



Εικόνα 11: Το επίπεδο p62 ήταν υψηλότερο (η αυτοφαγία ήταν χαμηλότερη) στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα σε ασθενείς με αρνητική βιοψία λεμφαδένα φρουρού.



Εικόνα 12: Το επίπεδο p62 ήταν υψηλότερο (η αυτοφαγία ήταν χαμηλότερη) στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα σε ασθενείς των οποίων η ιστολογία ήταν in situ καρκίνος μαστού.

Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι το HSP70 είναι αυξημένο και το επίπεδο p62 μειώνεται στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα από γυναίκες με καρκίνο του μαστού σε σύγκριση με τα επίπεδά τους σε περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα από γυναίκες με καλοήθεις αλλοιώσεις του μαστού.

Βρήκαμε επίσης ότι το επίπεδο p62 μειώθηκε περαιτέρω στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα από ασθενείς με διηθητικό καρκίνωμα σε σύγκριση με εκείνα με *in situ* καρκίνωμα. Αυτό ήταν παράλληλο με την παρατήρησή μας ότι το p62 ήταν χαμηλότερο στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα από ασθενείς με καρκίνο του μαστού με θετική βιοψία λεμφαδένα φρουρού σε σύγκριση με αυτούς με αρνητικό λεμφαδένα φρουρό.

Η επίδραση των επιπέδων HSP70 στην αυτοφαγία έχει διερευνηθεί προηγουμένως. Ο Doklandy και οι συνεργάτες του (140), σε *in vitro* μελέτη έδειξαν ότι τα επίπεδα HSP70 σχετίζεται αντιστρόφως με το επίπεδο έκφρασης της αυτοφαγίας σε κυτταρικές σειρές όγκου. Ο μηχανισμός που περιέγραψαν περιλάμβανε την ενεργοποίηση της κινάσης Akt και του υποδοχέα ραπαμυκίνης mTOR, μια κινάση που εμποδίζει την επαγωγή της αυτοφαγίας. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι μια αντίστροφη συσχέτιση θα μπορούσε να υπάρχει μεταξύ των επιπέδων HSP70 και αυτοφαγίας σε κύτταρα όγκου. Επιπλέον, ο Kanninen και οι συνεργάτες του (141) έδειξαν ότι η ενδοκυτταρική συγκέντρωση HSP70 σε περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα από έγκυες γυναίκες και τα επίπεδα p62 ήταν αντιστρόφως ανάλογα. Άλλες μελέτες σε κύτταρα ζυμομύκητα έδειξαν ότι η δράση του HSP70 μπορεί να είναι ο κύριος μηχανισμός για την πρόληψη της συσσώρευσης ελλατωματικών πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο και με αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση του μηχανισμού της αυτοφαγίας (142,143).

Οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τα μειωμένα επίπεδα p62 και την αυξημένη παραγωγή HSP70 στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα στις γυναίκες με κακοήγη όγκο του μαστού παραμένουν ένα ερευνητικό ερώτημα. Ωστόσο, είναι πιθανό αυτό να είναι συνέπεια της εμφάνισης στην κυκλοφορία αντιγόνων που σχετίζονται με όγκους καθώς και ενδοκυτταρικών μακρομορίων που

απελευθερώνονται από λυμένα κύτταρα μετά τον κακοήγη μετασχηματισμό των μαστικών κυττάρων. Αυτές οι αλλαγές στο εξωκυτταρικό περιβάλλον του όγκου ίσως σηματοδοτούν την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος.

Τόσο τα αυξημένα επίπεδα στρες όσο και η αυξημένη δραστηριότητα της αυτοφαγίας στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα υπό αυτές τις συνθήκες θα αύξαναν τα επίπεδα HSP70 και, εναλλακτικά, θα οδηγούσαν σε μείωση της p62 καθώς καταναλώνεται κατά την αυτοφαγία. Αυτή η μείωση στην ενδοκυτταρική p62 μπορεί επίσης να πυροδοτεί δραστηριότητες που σχετίζονται με κινάσες που διευκολύνουν περαιτέρω την ενεργοποίηση περιφερικών πολυμορφοπύρρηνων κυττάρων που σχετίζεται με τον όγκο. Αυτό είναι συνεπές με τη παρατήρησή μας για περαιτέρω μείωση της p62 και αύξηση της HSP70 στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα ασθενών με διηθητικό καρκίνο του μαστού έναντι αυτών με καρκίνο *in situ*. Ως εκ τούτου, υποθέτουμε ότι αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα HSP70 και μειωμένα επίπεδα p62 στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα μπορεί να είναι δείκτης καρκίνου του μαστού σε ασθενείς με προχωρημένη νόσο.

Ένα πλεονέκτημα της μελέτης μας είναι η μοναδική δημοσιευμένη μελέτη που εστιάζει στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα και όχι στα καρκινικά κύτταρα, και συγκεκριμένα στις αλλαγές στα ενδοκυτταρικά επίπεδα των μορίων που σχετίζονται με την αυξημένη ανοσολογική ενεργοποίηση.

Ωστόσο, τα ευρήματά μας θα πρέπει να ερμηνεύονται στο πλαίσιο αρκετών περιορισμών. Πρώτον, το μέγεθος του δείγματος του πληθυσμού της μελέτης, ιδιαίτερα η ομάδα με καλοήθεις αλλοιώσεις του μαστού, ήταν πολύ μικρή και, επομένως, υπόκειται σε περιορισμούς λόγω επιλογής. Η πλειοψηφία των γυναικών με καλοήθεις μάζες δεν υποβάλλονται συνήθως σε χειρουργική επέμβαση και αυτό περιόρισε την ικανότητά μας να συμπεριλάβουμε στη μελέτη μας περισσότερους ασθενείς σε αυτή την κατηγορία. Θεωρήσαμε ότι ήταν απαραίτητο να συμπεριλάβουμε μόνο γυναίκες με καλοήγη νόσο που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση διότι αυτός είναι ο καλύτερος τρόπος για να επαληθευτεί η διάγνωσή τους. Επιπλέον, η μελέτη μας δεν σχεδιάστηκε για τον εντοπισμό διαφορών των HSP70 και p62 με βάση την ιστολογία και το στάδιο του καρκίνου του μαστού. Ως εκ τούτου, η μελέτη μας ήταν ανεπαρκής για να αξιολογήσει αυτές τις διαφορές και τα ευρήματά πρέπει να θεωρηθούν ως προκαταρκτικά. Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται για τη

σύγκριση των προεγχειρητικών και μετεγχειρητικών επιπέδων αυτών των δεικτών, δεδομένου ότι η HSP70 και τα επίπεδα p62 μπορεί επίσης να αυξομειώνονται ανάλογα με τις φυσικές συνθήκες και το στρες εκτός από την κακοήθεια του μαστού.

Τέλος, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο δείκτης της αυτοφαγίας έχει πολλαπλές ενδοκυτταρικές δραστηριότητες και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τον προσδιορισμό παραγόντων και αλλοιώσεων που ενδεχομένως να επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης της αυτοφαγίας στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού.

III. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Παρουσίαση των αποτελεσμάτων στο διεθνές επιστημονικό συνέδριο της Ευρωπαϊκής Κοινότητας Ογκολογίας (EUROPEAN SOCIETY FOR MEDICAL ONCOLOGY -ESMO), Μόναχο Γερμανίας, 19-23 Οκτωβρίου, 2018.

Τα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα του αίματος (μονοκύτταρα, μακροφάγα, λεμφοκύτταρα) ενεργοποιούνται όταν το ανοσοποιητικό σύστημα εκτίθεται σε αντίξοες συνθήκες (π.χ. λοίμωξη, φλεγμονή, τραύμα, στρες, έλλειψη θρεπτικών συστατικών, καρκίνο) με σκοπό να ενισχύσουν την άμυνα του οργανισμού και να αποκαταστήσουν την ομοιόσταση. Η θερμική πρωτεΐνη Hsp70 συμμετέχει στη διατήρηση της λειτουργίας πρωτεϊνών του σώματος καθώς και στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Η αυτοφαγία αποτελεί κυτταρικό μηχανισμό μέσω του οποίου το κύτταρο καταβολίζει και ανακυκλώνει απαραίτητα συστατικά όπως πρωτεΐνες και οργανίδια τα οποία βοηθούν στην επιβίωση του κυττάρου υπό αντίξοες συνθήκες.

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι η αυτοφαγία παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου του μαστού αλλά και στην ανταπόκριση στην χημειοθεραπεία. Για τους παραπάνω λόγους σχεδιάσαμε μια σειρά πειραμάτων για να διερευνήσουμε την αλληλεπίδραση του μηχανισμού της αυτοφαγίας με κυτταροκίνες και αγγειογενετικούς παράγοντες στον καρκίνο του μαστού.

Εξετάσαμε την υπόθεση ότι τα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα του αίματος ανταποκρίνονται στην παρουσία μιας κακοήθους μάζας στο μαστό αυξάνοντας την παραγωγή φλεγμονωδών και προ- φλεγμονωδών μοριακών δεικτών. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας την ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA, εξετάσαμε τα επίπεδα έκφρασης των IFN-γ , TNF-α, IL1β, IL-4, IL-10, LPA, HSP70, στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα του αίματος γυναικών, οι οποίες είχαν διαγνωσθεί είτε με καρκίνο του μαστού είτε με καλοήθεις μάζες του μαστού.

Διαπιστώσαμε ότι στατιστικά σημαντικές διαφορές υπήρξαν μεταξύ Hsp70 και p62. Πιο συγκεκριμένα, στις γυναίκες με καρκίνο του μαστού παρατηρήθηκε να έχουν υψηλότερα εξωκυττάρια επίπεδα hsp70 στον ορό τους. Επίσης, η μέση τιμή των

ενδοκυττάρων επιπέδων Hsp70 στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα του αίματος γυναικών με καρκίνο του μαστού ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα επίπεδα Hsp70 σε γυναίκες με καλοήθεις μάζες του μαστού. Τέλος, στις γυναίκες με καρκίνο του μαστού η μέση τιμή των επιπέδων p62 ήταν 0.6 ng/ml, ενώ στις γυναίκες με καλοήθη μάζα του μαστού η μέση τιμή των επιπέδων p62 ήταν σημαντικά χαμηλότερη, 2.3 ng/ml.

Με βάση τη βιβλιογραφία, τα επίπεδα p62 είναι αντιστρόφως ανάλογα των επιπέδων έκφρασης της αυτοφαγίας. Άρα στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα του αίματος γυναικών με καρκίνο του μαστού, ο μηχανισμός της αυτοφαγίας είναι σημαντικά πιο ενεργός, συμβάλλοντας στην επιβίωση αυτών των κυττάρων.

Επιπλέον, παρατηρήσαμε ότι ο βαθμός έκφρασης της αυτοφαγίας στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα του αίματος γυναικών με καρκίνο του μαστού είναι ανάλογος των ενδοκυττάρων επιπέδων έκφρασης hsp70 στα ίδια κύτταρα. Ενδεχομένως το ερέθισμα που αυξάνει τα επίπεδα hsp70 σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού να συνεργεί στην ενεργοποίηση του μηχανισμού της αυτοφαγίας στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα του αίματος επηρεάζοντας την καρκινογένεση και ανταπόκριση στην χημειοθεραπεία και ανοσοθεραπεία.

Τέλος, η ανίχνευση υψηλών επιπέδων hsp70 και αυτοφαγίας στα περιφερικά πολυμορφοπύρρηνα κύτταρα, καθώς και τα υψηλότερα επίπεδα hsp70 στον ορό αίματος, μπορούν να βοηθήσουν με έναν μη επεμβατικό τρόπο στην προεγχειρητική διαφοροποίηση μεταξύ γυναικών με καρκίνο του μαστού και ασθενών με καλοήθεις μάζες του στήθους.

Elevated 70kDa heat stock protein (hsp70) and autophagy levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in women with a malignant breast mass

A.I. Athanasiou¹, T. Orfanelli², D. Lapolla³, E. Andreopoulos³, T.A. Moo⁴, J. Mart⁴, T. Cigler³, A.M. Bongiovanni¹, S.S. Witkin¹,
¹Department of OBGYN, Weill Cornell Medical College, New York, NY, US, ²Department of OBGYN, Rutgers-Robert Wood Johnson Medical School, New Brunswick, NJ, US, ³Department of Medical Oncology, Weill Cornell Medicine/New York Presbyterian Hospital, New York, NY, US, ⁴Department of Surgical Oncology, Weill Cornell Medicine/New York Presbyterian Hospital, New York, NY, US

* equally contributing authors



Abstract

Background: PBMCs respond to adverse physiological conditions to maximize survival and to alleviate the threat. Hsp70 is produced to maintain protein function and activates an immune response. Autophagy is induced to provide sufficient nutrients in response to accelerated gene expression. Autophagy is a cellular process that degrades and recycles intracellular components, leading to an increase in cell mass by increasing production of hsp70 and manifesting a higher level of autophagy.

Methods: In this pilot study seventy women had their breast mass evaluated by mammogram and/or breast ultrasound. A core biopsy and surgery was performed as indicated. PBMCs were isolated from peripheral blood, lysed and intracellular levels of hsp70 and p62 (a measure of autophagy) were quantified by ELISA. Differences in lab measurements between women with a diagnosis of a benign or malignant breast mass were determined. All assays were performed by personnel blinded to the clinical data.

Results: A breast malignancy was diagnosed in 42 women while 28 had a benign lesion. PBMCs were isolated from 38 women with a malignant breast mass and 38 women with a benign breast mass. Mean hsp70 levels were higher in PBMCs from 38 women with a malignant breast mass than in 8 women with a benign breast mass ($p=0.04$). The PBMC p62 levels were higher in women with a benign breast mass than in those with a malignant breast mass ($p<0.0001$). Since p62 is inversely related to the level of autophagy this indicates that autophagy is higher in PBMCs from women with a malignant breast mass. There was no difference in the concentration of hsp70 or p62 between women with different histological types or stages of breast cancer.

Conclusion: Detection of elevated levels of hsp70 and autophagy in PBMCs, and higher plasma hsp70 levels, may differentiate between women with a malignant or benign breast lesion. Further studies on a larger sample are needed to confirm if the extent of autophagy and hsp70 induction in PBMCs may be of value in the preoperative triage of women with a breast mass.

Introduction

Autophagy is an intracellular molecular pathway that maintains cellular homeostasis. A role for autophagy in the development as well as in the treatment of gynecologic malignancies, while still under-investigated, is receiving increased interest.

Autophagy can either promote or suppress development of cervical, endometrial, ovarian and breast cancer.

Moreover, these cancer cells can utilize autophagy to promote its resistance to cytotoxic agents. Conversely, autophagy can enhance the efficacy of cytotoxic agents by promoting autophagic cell death.

Methods

70 women had their breast mass evaluated by mammogram and/or breast ultrasound.

A core biopsy and surgery was performed as indicated.

PBMCs were isolated from peripheral blood, lysed and intracellular levels of hsp70 and p62 were quantified by ELISA.

Extracellular hsp70 in plasma was also measured.

All assays were performed by personnel blinded to the clinical data.

Results

- Plasma hsp70 levels were higher in women with a malignant lesion ($p = 0.03$).
- Mean hsp70 levels were higher in PBMCs from 38 women with a malignant lesion than in 8 women with a benign breast mass ($p=0.04$).
- The PBMC p62 levels were higher in women with a benign breast mass than in those with a malignant breast mass ($p<0.0001$). This indicates that autophagy is higher in PBMCs from women with a malignant breast mass.
- There was no difference in the concentration of hsp70 or p62 between women with different histological types or stages of breast cancer.

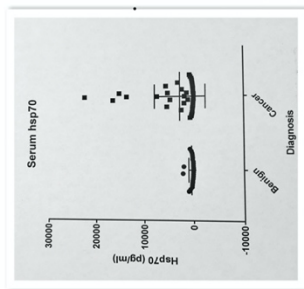


Fig.1: Women with a malignant breast mass have a significantly higher mean serum hsp70 (2814.2 vs 442.4 pg/ml, $p=0.03$).

Results (continued)

- Mean p62 levels were 0.6 ng/ml in the 38 women with a malignant breast mass compared to 2.3 ng/ml in the 8 women with a benign breast mass ($p<0.0001$).

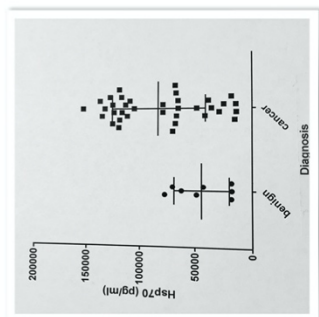


Fig.3: The hsp70 level in the lysates is significantly higher in women with a malignant breast mass (79255 vs 44238.7 pg/ml, $p=0.04$).

Discussion

Detection of elevated levels of hsp70 and autophagy in PBMCs, and higher plasma hsp70 levels, may differentiate between women with a malignant or benign breast lesion.

Further studies on a larger sample are needed to confirm if the extent of autophagy and hsp70 induction in PBMCs may be of value in the preoperative triage of women with a breast mass.

REFERENCES:

- Orfanelli, T., Jeong, J., Doulavris, G., Holcomb, K., & Witkin, S. (2013). Involvement of autophagy in cervical cancer. *International Journal of Cancer*, 133(5), 519-526. doi: 10.1002/ijc.28524
- Martini, W., Agostini, P., Nardone, B., et al. Autophagy in disease: a double-edged sword with therapeutic potential. *Clin Sci* 2009; 116:697-712
- Orfanelli, T., Doulavris, G., Holcomb, K., Jeong, J., Soti, G., & Kaminen, T. et al. (2015). Inhibition of autophagy in peripheral blood mononuclear cells by vaginal fluid from women with a malignant cervical mass. *International Journal of Cancer*, 137(12), 2879-2884. doi: 10.1002/ijc.28685

IV. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗ

V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. American Cancer Society. How Common Is Breast Cancer? Jan. 2021. Available at: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/how-common-is-breast-cancer.html>.
2. Debnath J. The multifaceted roles of autophagy in tumors-implications for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2011; 16: 73-187.
3. He C and Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 2009; 43: 67-93.
4. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 931-937.
5. Mizushima N, Yoshimori T and Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011; 27: 107- 132.
6. Mizushima N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22: 132-139.
7. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M and Kim DH. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* 2009; 20: 1992-2003.
8. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N and Mizushima N. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* 2009; 20: 1981-1991.
9. Itakura E, Kishi C, Inoue K and Mizushima N. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell* 2008; 19: 5360-5372.

10. Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H and Johansen T. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 2005; 171: 603-614.
11. Romanov J, Walczak M, Ibiricu I, Schuchner S, Ogris E, Kraft C and Martens S. Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *EMBO J* 2012; 31: 4304- 4317.
12. Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, Inagaki F and Ohsumi Y. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem* 2007; 282: 37298-37302
13. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y and Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000; 19: 5720-5728.
14. Sridharan S, Jain K and Basu A. Regulation of autophagy by kinases. *Cancers* 2011; 3: 2630-2654.
15. Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S Jiang X. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem* 2009; 284: 12297-12305.
16. Zoncu R, Efeyan A and Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12: 21-35.
17. Suzuki T and Inoki K. Spatial regulation of the mTORC1 system in amino acids sensing pathway. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2011; 43: 671-679.
18. Kim J, Kundu M, Viollet B and Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 132-141.

19. Bach M, Larance M, James DE and Ramm G. The serine/threonine kinase ULK1 is a target of multiple phosphorylation events. *Biochem J* 2011; 440: 283-291.
20. Shang L, Chen S, Du F, Li S, Zhao L and Wang X. Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 4788-4793.
21. Shaw RJ. LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol (Oxf)* 2009; 196: 65-80.
22. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD and Levine B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 2005; 122: 927-939.
23. Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, Tasdemir E, Pierron G, Troulinaki K, Tavernarakis N, Hickman JA, Geneste O and Kroemer G. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* 2007; 26: 2527- 2539.
24. Tai WT, Shiau CW, Chen HL, Liu CY, Lin CS, Cheng AL, Chen PJ and Chen KF. Mcl-1-dependent activation of Beclin 1 mediates autophagic cell death induced by sorafenib and SC-59 in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death Dis* 2013; 4: e485.
25. Choi AM, Ryter SW and Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med* 2013; 368: 651-662.
26. Bailey KM, Wojtkowiak JW, Hashim AI and Gillies RJ. Targeting the metabolic microenvironment of tumors. *Adv Pharmacol* 2012; 65: 63- 107.
27. Chabner BA and Roberts TG Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 65-72.
28. Mathew R and White E. Autophagy, stress, and cancer metabolism: what doesn't kill you makes you stronger. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2011; 76: 389-396.

29. Qiang L, Wu C, Ming M, Viollet B and He YY. Autophagy controls p38 activation to promote cell survival under genotoxic stress. *J Biol Chem* 2013; 288: 1603-1611.
30. Janku F, McConkey DJ, Hong DS and Kurzrock R. Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2011; 8: 528-539.
31. Palumbo S and Comincini S. Autophagy and ionizing radiation in tumors: the “survive or not survive” dilemma. *J Cell Physiol* 2013; 228: 1-8.
32. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B and Bao JK. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif* 2012; 45: 487-498.
33. Bursch W, Hochegger K, Torok L, Marian B, Ellinger A and Hermann RS. Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *J Cell Sci* 2000; 113: 1189-1198.
34. Blommaert EF, Luiken JJ and Meijer AJ. Autophagic proteolysis: control and specificity. *Histochem J* 1997; 29: 365-385.
35. Espina V, Wysolmerski J, Edmiston K and Liotta LA. Attacking breast cancer at the preinvasion stage by targeting autophagy. *Womens Health (Lond Engl)* 2013; 9: 157-170.
36. Aita VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL, Yu W, Cayanis E, Kalachikov S, Gilliam TC and Levine B. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* 1999; 59: 59-65.
37. Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ and Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 15077-15082.

38. Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G and Levine B. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 2003; 112: 1809-1820.
39. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H and Levine B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999; 402: 672-676.
40. Elgendy M, Sheridan C, Brumatti G and Martin SJ. Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. *Mol Cell* 2011; 42: 23-35.
41. Liang XH, Yu J, Brown K and Levine B. Beclin 1 contains a leucine-rich nuclear export signal that is required for its autophagy and tumor suppressor function. *Cancer Res* 2001; 61: 3443-3449.
42. Eckert LB, Repasky GA, Ulku AS, McFall A, Zhou H, Sartor CI and Der CJ. Involvement of Ras activation in human breast cancer cell signaling, invasion, and anoikis. *Cancer Res* 2004; 64: 4585-4592.
43. Birnbaum D, Sircoulomb F and Imbert J. A reason why the ERBB2 gene is amplified and not mutated in breast cancer. *Cancer Cell Int* 2009; 9: 5.
44. Arias-Romero LE and Chernoff J. p21-activated kinases in Erbb2-positive breast cancer: A new therapeutic target? *Small GTPases* 2010; 1: 124-128.
45. Lock R, Roy S, Kenific CM, Su JS, Salas E, Ronen SM and Debnath J. Autophagy facilitates glycolysis during Ras-mediated oncogenic transformation. *Mol Biol Cell* 2011; 22: 165- 178.
46. Kim MJ, Woo SJ, Yoon CH, Lee JS, An S, Choi YH, Hwang SG, Yoon G and Lee SJ. Involvement of autophagy in oncogenic K-Ras-induced malignant cell transformation. *J Biol Chem* 2011; 286: 12924-12932.

47. Wei H, Wei S, Gan B, Peng X, Zou W and Guan JL. Suppression of autophagy by FIP200 deletion inhibits mammary tumorigenesis. *Genes Dev* 2011; 25: 1510-1527.
48. Onodera J and Ohsumi Y. Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J Biol Chem* 2005; 280: 31582-31586.
49. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhiya and Mizushima N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 2004; 432: 1032-1036.
50. Lavieu G, Scarlatti F, Sala G, Carpentier S, Levade T, Ghidoni R, Botti J and Codogno P. Regulation of autophagy by sphingosine kinase 1 and its role in cell survival during nutrient starvation. *J Biol Chem* 2006; 281: 8518- 8527.
51. Santi SA and Lee H. Ablation of Akt2 induces autophagy through cell cycle arrest, the downregulation of p70S6K, and the deregulation of mitochondria in MDA-MB231 cells. *PloS One* 2011; 6: e14614.
52. Sivridis E, Koukourakis MI, Zois CE, Ledaki I, Ferguson DJ, Harris AL, Gatter KC and Giatromanolaki A. LC3A-positive light microscopy detected patterns of autophagy and prognosis in operable breast carcinomas. *Am J Pathol* 2010; 176: 2477-2489.
53. Zhou J, Zhang W, Liang B, Casimiro MC, Whitaker- Menezes D, Wang M, Lisanti MP, Lanza-Jacoby S, Pestell RG and Wang C. PPARgamma activation induces autophagy in breast cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 2334- 2342.
54. Rzymiski T, Milani M, Pike L, Buffa F, Mellor HR, Winchester L, Pires I, Hammond E, Ragoussis I and Harris AL. Regulation of autophagy by ATF4 in response to severe hypoxia. *Oncogene* 2010; 29: 4424-4435.
55. Choi CH, Jung YK and Oh SH. Autophagy induction by capsaicin in malignant human breast cells is modulated by p38 and extracellular signal-regulated mitogen-activated protein kinases

- and retards cell death by suppressing endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Mol Pharmacol* 2010; 78: 114-125.
56. Milani M, Rzymiski T, Mellor HR, Pike L, Bottini A, Generali D and Harris AL. The role of ATF4 stabilization and autophagy in resistance of breast cancer cells treated with Bortezomib. *Cancer Res* 2009; 69: 4415-4423.
 57. Mueller MM and Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 839-849.
 58. Martinez-Outschoorn UE, Balliet RM, Rivadeneira DB, Chiavarina B, Pavlides S, Wang C, Whitaker Menezes D, Daumer KM, Lin Z, Witkiewicz AK, Flomenberg N, Howell A, Pestell RG, Knudsen ES, Sotgia F and Lisanti MP. Oxidative stress in cancer associated fibroblasts drives tumor-stroma co evolution: A new paradigm for understanding tumor metabolism, the field effect and genomic instability in cancer cells. *Cell cycle* 2010; 9: 3256-3276.
 59. Martinez-Outschoorn UE, Trimmer C, Lin Z, Whitaker-Menezes D, Chiavarina B, Zhou J, Wang C, Pavlides S, Martinez-Cantarín MP, Capozza F, Witkiewicz AK, Flomenberg N, Howell A, Pestell RG, Caro J, Lisanti MP and Sotgia F. Autophagy in cancer associated fibroblasts promotes tumor cell survival: Role of hypoxia, HIF1 induction and NFκB activation in the tumor stromal microenvironment. *Cell cycle* 2010; 9: 3515-3533.
 60. Martinez-Outschoorn UE, Whitaker-Menezes D, Pavlides S, Chiavarina B, Bonuccelli G, Casey T, Tsirigos A, Migneco G, Witkiewicz A, Balliet R, Mercier I, Wang C, Flomenberg N, Howell A, Lin Z, Caro J, Pestell RG, Sotgia F and Lisanti MP. The autophagic tumor stroma model of cancer or “battery-operated tumor growth”: A simple solution to the autophagy paradox. *Cell cycle* 2010; 9: 4297-4306.
 61. Pavlides S, Tsirigos A, Vera I, Flomenberg N, Frank PG, Casimiro MC, Wang C, Fortina P, Addya S, Pestell RG, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F and Lisanti MP. Loss of stromal caveolin- 1 leads to oxidative stress, mimics hypoxia and drives inflammation in the tumor microenvironment, conferring the “reverse Warburg effect”: a transcriptional informatics analysis with validation. *Cell cycle* 2010; 9: 2201-2219.

62. Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Whitaker- Menezes D, Howell A, Lisanti MP and Sotgia F. Ketone bodies and two-compartment tumor metabolism: stromal ketone production fuels mitochondrial biogenesis in epithelial cancer cells. *Cell cycle* 2012; 11: 3956-3963.
63. Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Whitaker- Menezes D, Howell A, Sotgia F and Lisanti MP. Ketone body utilization drives tumor growth and metastasis. *Cell cycle* 2012; 11: 3964- 3971.
64. Ko YH, Lin Z, Flomenberg N, Pestell RG, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP and Martinez-Outschoorn UE. Glutamine fuels a vicious cycle of autophagy in the tumor stroma and oxidative mitochondrial metabolism in epithelial cancer cells: implications for preventing chemotherapy resistance. *Cancer Biol Ther* 2011; 12: 1085-1097.
65. Bonuccelli G, Tsirigos A, Whitaker-Menezes D, Pavlides S, Pestell RG, Chiavarina B, Frank PG, Flomenberg N, Howell A, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F and Lisanti MP. Ketones and lactate “fuel” tumor growth and metastasis: Evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism. *Cell cycle* 2010; 9: 3506-3514.
66. Witkiewicz AK, Dasgupta A, Sotgia F, Mercier I, Pestell RG, Sabel M, Kleer CG, Brody JR and Lisanti MP. An absence of stromal caveolin-1 expression predicts early tumor recurrence and poor clinical outcome in human breast cancers. *Am J Pathol* 2009; 174: 2023-2034.
67. Witkiewicz AK, Dasgupta A, Sammons S, Er O, Potoczek MB, Guiles F, Sotgia F, Brody JR, Mitchell EP and Lisanti MP. Loss of stromal caveolin- 1 expression predicts poor clinical outcome in triple negative and basal-like breast cancers. *Cancer Biol Ther* 2010; 10: 135-143.
68. El-Gendi SM, Mostafa MF and El-Gendi AM. Stromal caveolin-1 expression in breast carcinoma. Correlation with early tumor recurrence and clinical outcome. *Pathol Oncol Res* 2012; 18: 459-469.
69. Thomas NB, Hutcheson IR, Campbell L, Gee J, Taylor KM, Nicholson RI and Gumbleton M.

- Growth of hormone-dependent MCF-7 breast cancer cells is promoted by constitutive caveolin- 1 whose expression is lost in an EGF-R-mediated manner during development of tamoxifen resistance. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 119: 575-591.
70. Kumar DH and Kutty MK. Review of stem cell deregulation and breast cancer: an emerging hypothesis. *Indian J Pathol Microbiol* 2012; 55: 147-153.
 71. Cufi S, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Martin-Castillo B, Vellon L and Menendez JA. Autophagy positively regulates the CD44(+) CD24(-/low) breast cancer stem-like phenotype. *Cell cycle* 2011; 10: 3871-3885.
 72. Sanchez CG, Penfornis P, Oskowitz AZ, Boonjindasup AG, Cai DZ, Dhule SS, Rowan BG, Kelekar A, Krause DS and Pochampally RR. Activation of autophagy in mesenchymal stem cells provides tumor stromal support. *Carcinogenesis* 2011; 32: 964-972.
 73. Steeg PS. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 55-63.
 74. Taddei ML, Giannoni E, Fiaschi T and Chiarugi P. Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. *J Pathol* 2012; 226: 380-393.
 75. Debnath J. Detachment-induced autophagy during anoikis and lumen formation in epithelial acini. *Autophagy* 2008; 4: 351-353.
 76. Debnath J. Detachment-induced autophagy in three-dimensional epithelial cell cultures. *Methods Enzymol* 2009; 452: 423-439.
 77. Savagner P. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon. *Ann Oncol* 2010; 21 Suppl 7: vii89-92.
 78. Lv Q, Wang W, Xue J, Hua F, Mu R, Lin H, Yan J, Lv X, Chen X and Hu ZW. DEDD interacts with PI3KC3 to activate autophagy and attenuate epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer. *Cancer Res* 2012; 72: 3238- 3250.

79. Lu Z, Luo RZ, Lu Y, Zhang X, Yu Q, Khare S, Kondo S, Kondo Y, Yu Y, Mills GB, Liao WS and Bast RC Jr. The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *J Clin Invest* 2008; 118: 3917-3929.
80. Kenific CM, Thorburn A and Debnath J. Autophagy and metastasis: another double-edged sword. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22: 241-245.
81. Han J, Hou W, Goldstein LA, Lu C, Stolz DB, Yin XM and Rabinowich H. Involvement of protective autophagy in TRAIL resistance of apoptosis- defective tumor cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 19665-19677.
82. White DE, Kurpios NA, Zuo D, Hassell JA, Blaess S, Mueller U and Muller WJ. Targeted disruption of beta1-integrin in a transgenic mouse model of human breast cancer reveals an essential role in mammary tumor induction. *Cancer cell* 2004; 6: 159-170.
83. Qadir MA, Kwok B, Dragowska WH, To KH, Le D, Bally MB and Gorski SM. Macroautophagy inhibition sensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells and enhances mitochondrial depolarization. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 112: 389-403.
84. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C and Menendez JA. Autophagy facilitates the development of breast cancer resistance to the anti- HER2 monoclonal antibody trastuzumab. *PloS One* 2009; 4: e6251.
85. Lee KH, Hsu EC, Guh JH, Yang HC, Wang D, Kulp SK, Shapiro CL and Chen CS. Targeting energy metabolic and oncogenic signaling pathways in triple-negative breast cancer by a novel adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) activator. *J Biol Chem* 2011; 286: 39247-39258.
86. Rao R, Balusu R, Fiskus W, Mudunuru U, Venkannagari S, Chauhan L, Smith JE, Hembruff SL, Ha K, Atadja P and Bhalla KN. Combination of pan-histone deacetylase inhibitor and autophagy inhibitor exerts superior efficacy against triple-negative human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2012; 11: 973-983.

87. Thomas S, Sharma N, Golden EB, Cho H, Agarwal P, Gaffney KJ, Petasis NA, Chen TC, Hofman FM, Louie SG and Schonthal AH. Preferential killing of triple-negative breast cancer cells in vitro and in vivo when pharmacological aggravators of endoplasmic reticulum stress are combined with autophagy inhibitors. *Cancer Lett* 2012; 325: 63-71.
88. Chaachouay H, Ohneseit P, Toulany M, Kehlbach R, Multhoff G and Rodemann HP. Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation. *Radiother Oncol* 2011; 99: 287-292.
89. Bristol ML, Di X, Beckman MJ, Wilson EN, Henderson SC, Maiti A, Fan Z and Gewirtz DA. Dual functions of autophagy in the response of breast tumor cells to radiation: cytoprotective autophagy with radiation alone and cytotoxic autophagy in radiosensitization by vitamin D3. *Autophagy* 2012; 8: 739-753.
90. Cheong H, Lu C, Lindsten T and Thompson CB. Therapeutic targets in cancer cell metabolism and autophagy. *Nat Biotechnol* 2012; 30: 671- 678.
91. Solomon VR and Lee H. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *Eur J Pharmacol* 2009; 625: 220-233.
92. Cocco S, Leone A, Piezzo M, et al. Targeting Autophagy in Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21).
93. Arnaout A, Robertson SJ, Pond GR, et al. A randomized, double-blind, window of opportunity trial evaluating the effects of chloroquine in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2019;178(2):327-335
94. Sharpe AH. Introduction to checkpoint inhibitors and cancer immunotherapy. *Immunol Rev.* 2017;276(1):5-8.
95. Chikuma S, Kanamori M, Mise-Omata S, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling: Potential immune checkpoint molecules for cancer immunotherapy. *Cancer Sci.* 2017;108(4):574-580.
96. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):252-264.
97. Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, et al. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature.* 1987;328(6127):267-270.

98. Schwartz JC, Zhang X, Fedorov AA, Nathenson SG, Almo SC. Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex. *Nature*. 2001;410(6828):604-608.
99. Karandikar NJ, Vanderlugt CL, Walunas TL, Miller SD, Bluestone JA. CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *J Exp Med*. 1996;184(2):783-788.
100. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*. 1996;271(5256):1734-1736.
101. Wolchok JD, Neyns B, Linette G, et al. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *Lancet Oncol*. 2010;11(2):155-164.
102. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2517-2526.
103. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(8):711-723.
104. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *Embo j*. 1992;11(11):3887-3895.
105. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol*. 1996;8(5):765-772.
106. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med*. 1999;5(12):1365-1369.
107. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000;192(7):1027-1034.
108. Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002;8(8):793-800.
109. Carter L, Fouser LA, Jussif J, et al. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol*. 2002;32(3):634-643.
110. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(19):12293-12297.
111. Iwai Y, Hamanishi J, Chamoto K, Honjo T. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *J Biomed Sci*. 2017;24(1):26.

112. Planes-Laine G, Rochigneux P, Bertucci F, et al. PD-1/PD-L1 Targeting in Breast Cancer: The First Clinical Evidences Are Emerging. A Literature Review. *Cancers (Basel)*. 2019;11(7).
113. Adams S, Schmid P, Rugo HS, et al. Pembrolizumab monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer: cohort A of the phase II KEYNOTE-086 study. *Ann Oncol*. 2019;30(3):397-404.
114. Vanmeerbeek I, Sprooten J, De Ruyscher D, et al. Trial watch: chemotherapy-induced immunogenic cell death in immuno-oncology. *Oncoimmunology*. 2020;9(1):1703449.
115. Schmid P, Adams S, Rugo HS, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379(22):2108-2121.
116. Adams S, Gatti-Mays ME, Kalinsky K, et al. Current Landscape of Immunotherapy in Breast Cancer: A Review. *JAMA Oncol*. 2019;5(8):1205-1214.
117. Budczies J, Bockmayr M, Denkert C, et al. Classical pathology and mutational load of breast cancer - integration of two worlds. *J Pathol Clin Res*. 2015;1(4):225-238.
118. Luen S, Virassamy B, Savas P, Salgado R, Loi S. The genomic landscape of breast cancer and its interaction with host immunity. *Breast*. 2016;29:241-250.
119. Kassardjian A, Shintaku PI, Moatamed NA. Expression of immune checkpoint regulators, cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) and programmed death-ligand 1 (PD-L1), in female breast carcinomas. *PLoS One*. 2018;13(4):e0195958.
120. Serrano A, Gonçalves L, Lepique A, Araujo-Souza P. The Role of Autophagy in Tumor Immunology-Complex Mechanisms That May Be Explored Therapeutically. *Front Oncol*. 2020 Dec 1;10:603661.
121. Robainas M, Otano R, Bueno S, Ait-Oudhia S. Understanding the role of PD-L1/PD1 pathway blockade and autophagy in cancer therapy. *Onco Targets Ther*. 2017 Mar 23;10:1803-1807.
122. Clark CA, Gupta HB, Sareddy G, et al. Tumor-Intrinsic PD-L1 Signals Regulate Cell Growth, Pathogenesis, and Autophagy in Ovarian Cancer and Melanoma. *Cancer Res*. 2016;76(23):6964-6974.
123. Lastwika KJ, Wilson W, 3rd, Li QK, et al. Control of PD-L1 Expression by Oncogenic Activation of the AKT-mTOR Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res*. 2016;76(2):227-238.
124. Xu F, Na L, Li Y, Chen L. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. *Cell Biosci*. 2020;10:54.
125. Cuervo AM, Dice JF. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*. 1996;273(5274):501-503.

126. Wang R, Liu Y, Liu L, et al. Tumor cells induce LAMP2a expression in tumor-associated macrophage for cancer progression. *EBioMedicine*. 2019;40:118-134.
127. Akalay I, Janji B, Hasmim M, et al. EMT impairs breast carcinoma cell susceptibility to CTL-mediated lysis through autophagy induction. *Autophagy*. 2013;9(7):1104-1106.
128. Mizushima N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(2):132-139.
129. Wong PM, Puente C, Ganley IG, Jiang X. The ULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation. *Autophagy*. 2013;9(2):124-137.
130. Chollat-Namy M, Ben Safta-Saadoun T, Haferssas D, Meurice G, Chouaib S, Thiery J. The pharmacological reactivation of p53 function improves breast tumor cell lysis by granzyme B and NK cells through induction of autophagy. *Cell Death Dis*. 2019;10(10):695.
131. Ladoire S, Enot D, Senovilla L, et al. The presence of LC3B puncta and HMGB1 expression in malignant cells correlate with the immune infiltrate in breast cancer. *Autophagy*. 2016;12(5):864-875.
132. Maycotte P, Gearheart CM, Barnard R, et al. STAT3-mediated autophagy dependence identifies subtypes of breast cancer where autophagy inhibition can be efficacious. *Cancer Res*. 2014;74(9):2579-2590.
133. Li W, Tanikawa T, Kryczek I, et al. Aerobic Glycolysis Controls Myeloid-Derived Suppressor Cells and Tumor Immunity via a Specific CEBPB Isoform in Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Metab*. 2018;28(1):87-103.e106.
134. Curry A, Khatri I, Kos O, Zhu F, Gorczynski R. Importance of CD200 expression by tumor or host cells to regulation of immunotherapy in a mouse breast cancer model. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171586.
135. Shi M, Yao Y, Han F, Li Y, Li Y. MAP1S controls breast cancer cell TLR5 signaling pathway and promotes TLR5 signaling-based tumor suppression. *PLoS One*. 2014;9(1):e86839.
136. Xie R, Nguyen S, McKeehan K, Wang F, McKeehan WL, Liu L. Microtubule-associated protein 1S (MAP1S) bridges autophagic components with microtubules and mitochondria to affect autophagosomal biogenesis and degradation. *J Biol Chem*. 2011;286(12):10367-10377.
137. Altinoz MA, Ozpinar A, Alturfan EE, Elmaci I. Vinorelbine's anti-tumor actions may depend on the mitotic apoptosis, autophagy and inflammation: hypotheses with implications for chemo-immunotherapy of advanced cancers and pediatric gliomas. *J Chemother*. 2018;30(4):203-212.

- 138.Ratikan JA, Sayre JW, Schaue D. Chloroquine engages the immune system to eradicate irradiated breast tumors in mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2013;87(4):761-768.
- 139.Aqbi HF, Tyutyunyk-Massey L, Keim RC, et al. Autophagy-deficient breast cancer shows early tumor recurrence and escape from dormancy. *Oncotarget.* 2018;9(31):22113-22122.
- 140.Dokladny, K. et al. Regulatory coordination between two major intracellular homeostatic systems: Heat shock response and autophagy. *J. Biol. Chem.* 288(21), 14959–14972 (2013).
- 141.Kanninen, T. T., Sisti, G. & Witkin, S. S. Induction of the 70 kDa heat shock protein stress response inhibits autophagy: Possible consequences for pregnancy outcome. *J. Matern. Fetal Neonatal. Med.* 29(1), 159–162 (2016).
- 142.Patil, C. & Walter, P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: The unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13(3), 349–355 (2001).
- 143.Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z. & Klionsky, D. J. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J. Biol. Chem.* 281(40), 30299– 30304 (2006).

