



ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α' ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΟΥ Γ.Ν.Α «ΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ» ΜΕ  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗ ΤΟΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟ ΖΩΓΡΑΦΟ

Α' ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ- ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ  
«ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ» Γ.Ν.Α.

**Η ΠΡΟΒΛΕΠΤΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟΝ ΤΡΙΠΛΑ  
ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ ΟΓΚΟΛΟΓΟΣ**

**ΑΝΔΡΕΑΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ ΜΑΚΡΑΝΤΩΝΑΚΗΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2023**

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ  
ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 05/05/2017**

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΓΚΡΙΣΗΣ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΑΠΟ ΤΟ  
ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟ ΤΟΥ ΓΕΝΙΚΟΥ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ ΑΘΗΝΑΣ  
ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ 15/05/2017**

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΣΤΗΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΩΝ:15/05/2017**

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 22/12/22**

**ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 30/03/2023**

*Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου  
Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Ν. 5343/32. Άρθρο 202)*

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- 1. ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΜΕΛΟΣ ΔΕΠ: ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΔΗΜΗΤΡΑΚΑΚΗΣ**  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Α΄ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ- ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ» ΓΝΑ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΩΝ, ΕΚΠΑ
- 2. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΖΩΓΡΑΦΟΣ**  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ, Α΄ ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ «ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ» Γ.Ν.Α., ΕΚΠΑ
- 3. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΤΟΥΤΟΥΖΑΣ**  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ, Α΄ ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ «ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ» Γ.Ν.Α., ΕΚΠΑ

## **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- 1. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΔΗΜΗΤΡΑΚΑΚΗΣ**  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Α΄ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ- ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ» ΓΝΑ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΩΝ, ΕΚΠΑ
- 2. ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΖΩΓΡΑΦΟΣ**  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ, Α΄ ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ «ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ» Γ.Ν.Α., ΕΚΠΑ
- 3. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΤΟΥΤΟΥΖΑΣ**  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ, Α΄ ΠΡΟΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ «ΙΠΠΟΚΡΑΤΕΙΟ» Γ.Ν.Α., ΕΚΠΑ
- 4. ΦΛΩΡΑ ΖΑΓΟΥΡΗ**  
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ» ΓΝΑ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΩΝ, ΕΚΠΑ
- 5. ΧΡΗΣΤΟΣ ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ**  
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ, ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗΣ ΜΟΝΑΔΑΣ « ΑΡΕΤΑΙΕΙΟ» , ΕΚΠΑ
- 6. ΜΑΡΙΑ ΓΑΖΟΥΛΗ**  
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΝΑΝΟΙΑΤΡΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ, ΕΚΠΑ
- 7. ΜΙΧΑΗΛ ΛΙΟΝΤΟΣ**  
ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ» ΓΝΑ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΑΘΗΝΩΝ, ΕΚΠΑ

## Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

Ὀρκίζομαι ἐτόν ἀπολλῶνα τὸν ἰατροῦ καὶ ἐτόν Ἀσκληπιό καὶ ἐτήν ὕψια καὶ ἐτήν Πανάκεια καὶ ἐ΄ ὄλοϋε τοϋε θεοϋε ἐπικαλοϋμένῳε τὴν μαρτυρία τοϋε, νὰ τηρήσω πιστὰ κατὰ τὴ δύναμη καὶ τὴν κρίση μου αὐτὸ τὸν ὄρκο καὶ τὸ εὐμβολαῖο μου αὐτῶ. νὰ θεῶρω αὐτὸν ποϋ μου διδάξε αὐτὴ τὴν τέχνη ἰεὸ με τοϋε γονεῖε μου καὶ νὰ μοιραετώ μαζ τοϋ τα ὑπαρχόντα μου καὶ τὰ χήματα μου ἂν ἔχει ἀνάγκη φροντῖδαε. νὰ θεῶρω τοϋε ἀπογονοϋε τοϋε ἰεοϋε με τ' ἀδελφία μου καὶ νὰ τοϋε διδάσω τὴν τέχνη αὐτὴ ἂν θελοϋν νὰ τὴ μάθουν, χωρὶε ἀμοιβῆ καὶ εὐμβολαῖο καὶ νὰ μεταδώσω με γάρβιγκες, ὀδηγέε καὶ εὐμβολέε ὄλε τὴν ὑπόλοιπὴ γνώση μου καὶ ἐτὰ παιδία μου καὶ ἐτὰ παιδία ἐκείνοϋ ποϋ με διδάξε καὶ ἐτοϋε ἄλλοϋε μαθητέε ποϋ ἔχουν κάνει γράπτὴ συμφωνία μαζι μου καὶ ἐ΄ αὐτοϋε ποϋ ἔχουν ὀρκισθεῖ ἐτόν ἰατρικὸ νόμο καὶ ἐε κανέναν ἄλλο καὶ νὰ θεράπεϋω τοϋε πᾶσχόντεε κατὰ τὴ δύναμη μου καὶ τὴν κρίση μου χωρὶε ἴοτε, ἐκοϋεῖοε, νὰ τοϋε βλαψῶ ἢ νὰ τοϋε ἀδικῆσω. καὶ νὰ μὴ δῶσω ποτε ἐε κανένα, ἐετῶ κι ἂν μου τὸ ζητήε, θανάτηφορο φάρμακο, οὔτε νὰ δῶσω ποτε τέτοια εὐμβολή. ὁμοῖοε, νὰ μὴ δῶσω ποτε ἐε γυναῖκα φάρμακο γιὰ ν' ἀποβαλεῖ. νὰ διατηρήσω δε τὴ ζωή μου καὶ τὴν τέχνη μου καθαρὴ καὶ ἀτην. καὶ νὰ μὴ χεῖροὔρησω πᾶσχόντεε ἀπὸ λῆθοϋε ἄλλα ν' ἀφήσω τὴν πράξη αὐτὴ γιὰ τοϋε ἐδικοϋε. καὶ ἐ΄ ὁποῖα ἐπιτία κι ἂν μῆσω, νὰ μῆσω γιὰ τὴν ὠφελεία τῶν πᾶσχόντων ἀποφεύγονταε καθε ἐκοϋεῖα ἀδικία καὶ βλάβη καὶ καθε γενεθηῖα πράξη καὶ με γυναῖκεε καὶ με ἀνδρέε, ἐλεύθεροϋε καὶ δούλοϋε. καὶ ὅτι δὴ ἢ ἀκοϋεῶ κατὰ τὴν δεκξὴν τοϋ ἐπαγγέλματοε μου, ἢ κ' ἐκτοε, γιὰ τὴ ζωή τῶν ἀνθρώπων, ποϋ δὲν πρέπει ποτε νὰ κοινοποιηθεῖ, νὰ εἰσπῆσω καὶ νὰ τὸ τηρήσω μυστικὸ. ἀν τὸν ὄρκο μου αὐτὸ τηρήσω πιστὰ καὶ δὲν τὸν ἀφῆθησω, εἶθε ν' ἀτολᾶϋσω γιὰ πάντα τὴν ἐκτίμησὴ ὄλων τῶν ἀνθρώπων γιὰ τὴ ζωή μου καὶ γιὰ τὴν τέχνη μου, ἂν ὁμοῖε παραβῶ καὶ ἀφῆθηῶ τὸν ὄρκο μου νὰ ὑπόστῶτα ἀντιθέτα ἀπὸ αὐτὰ.

## **ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ**

### **ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ**

**Όνοματεπώνυμο:** Ανδρέας Ευάγγελος Μακραντωνάκης του Παρίση

### **ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ**

- 25/08/2011 Πτυχίο Ιατρικής Σχολής , Πανεπιστήμιο Comenius  
Μπρατισλάβα, Σλοβακία (λίαν καλώς)
- 29/11/2011 Άδεια Άσκησης Ιατρικού Επαγγέλματος
- 03/12/2012 Ολοκλήρωση Στρατιωτικής Θητείας ως Ιατρός  
Στο ΣΤΕΠ Στο 88ΤΥΓ της 88 ΣΔΙ «Λήμνος»
- 23/04/2014 Ολοκλήρωση υπηρεσίας Ιατρού Υπαίθρου στο Περιφερειακό  
Ιατρείο Αγίου Λαυρέντιου και στο Κέντρο Υγείας Αγαλαστής  
Πηλίου, Θεσσαλίας και στο Γενικό Νοσοκομείο Βόλου «Αχιλλοπούλειο»
- 05/05/2014 Έναρξη Ειδικότητας Παθολογικής Ογκολογίας Στο «Θεαγένειο»  
Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης
- 2016 Πτυχίο Εφαρμογής Ιατρικού Βελονισμού,  
Εκπαιδευτικό Ινστιτούτο Βελονισμού Ελλάδος
- 2017-2018 Παράταση ιατρικής υπηρεσίας στο Νοσοκομείο «Θεαγένειο» λόγω

αναμονής για την επανέναρξη ειδικότητας της Ογκολογίας, υστέρα από την ολοκλήρωση της Παθολογίας και της Αιματολογίας

- 2017 Έναρξη Διδακτορικής Διατριβής στο Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών με θέμα : «Η προβλεπτική αξία των πολυμορφισμών στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού»
- 2018 Εργασία – Poster με τίτλο « Η προβλεπτική αξία των πολυμορφισμών στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού»
- 03/07/2020 Δίπλωμα Ελληνικής Ακαδημίας Ογκολογίας (Ε.ΑΚ.Ο./Ε.Ο.Π.Ε.)
- 13/09/2021 Ολοκλήρωση ειδικότητας Παθολογικής Ογκολογίας στο «Θεαγένειο» Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης
- 23/12/2021 Τίτλος Ειδικότητας Παθολογικής Ογκολογίας «Θεαγένειο» Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης

### **ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ**

- Στρατιωτική θητεία ως ιατρός στο Στρατιωτικό Νοσοκομείο, ΣΤΕΠ Λήμνου 88ΤΥΓ από 11/05/12 μέχρι 03/12/12.

- Αγροτικός Ιατρός, Π.Ι. Αγίου Λαυρέντιου, στο Κ.Υ Αγαλαστής και στο Γενικό Νοσοκομείο Βόλου «Αχιλλοπούλειο» από 04/07/2013 μέχρι 23/04/2014
- Ειδικευόμενος Ιατρός Παθολογίας «Θεαγένειο» Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης  
Από 05/05/2014 μέχρι 03/10/2016
- Ειδικευόμενος Ιατρός Αιματολογίας «Θεαγένειο» Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης  
Από 04/10/2016 μέχρι 07/04/2017
- Παράταση ιατρικής υπηρεσίας στο Νοσοκομείο «Θεαγένειο» λόγω αναμονής για την έναρξη ειδικότητας της Ογκολογίας  
Από 08/04/2017 μέχρι 07/09/2018
- Ειδικευόμενος Ιατρός Ογκολογίας «Θεαγένειο» Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης  
Από 07/09/2018 μέχρι 13/09/2021
- Έναρξη συνεργασίας ως Ειδικός Παθολόγος Ογκολόγος με το Ιατρικό Διαβαλκανικό Κέντρο Θεσσαλονίκης από τον Απρίλιο 2022.

### **ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΜΕ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΩΣ ΟΜΙΛΗΤΗΣ**

- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο «Ενδιαφέρουσα περίπτωση Her2 (+) νόσου στον καρκίνο του μαστού», στο Συνέδριο «Ογκολογία στο Μεταίχμιο των Εξελίξεων», στην Καστοριά στις 09-11/06/2017



- ❖ Συμμετοχή ως Σχολιαστής σε Παρουσίαση με τίτλο «Αξία του Διεπιστημονικού Συμβουλίου στη Διαχείριση Ανεπιθύμητων Ενεργειών στην Ανοσοθεραπεία», στο Συνέδριο «Συνέδριο Κλινικής & Μεταφραστικής Ογκολογίας», στο Ηράκλειο Κρήτης, 23-26/11/2017
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο «Χορήγηση Ανοσοθεραπείας στη Μεταστατική φάση του Μελανώματος και πως επηρεάζει την εξέλιξη της», στο Συνέδριο «Μετεκπαιδευτικά Μαθήματα Χειρουργικής Παγκρέατος & Ήπατος Χοληφόρων», στον Βόλο, στις 27-29/09/2018
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο «Ενδείξεις του βελονισμού στην Ογκολογία», στο Συνέδριο «Η Θεραπεία του Καρκίνου... Υπόθεση Όλων μας» στη Θεσσαλονίκη, στις 14-15/12/2018
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο «Ενδιαφέρουσα Περίπτωση Ασθενή Με Μεταστατικό Καρκίνο στον Πνεύμονα» κατά την Περίοδο Μαθημάτων 2018-2019 στην Ελληνική Ακαδημία Ογκολογίας, στην Αθήνα τον Σεπτέμβριο 2019
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο «Ανοσοθεραπεία και χημειοθεραπεία στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού» στο Συνέδριο «Σύγχρονοι θεραπευτικοί χειρισμοί για τον ογκολογικό ασθενή». Web Scientific Event Θεσσαλονίκη στις 10-12/05/2019
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο «Συστηματική θεραπεία στη μεγάλη ηλικία- Ενδείξεις και περιορισμοί» στο Συνέδριο «2ο Συνέδριο Χειρουργικής Ογκολογίας Μαστού - Νεότερα δεδομένα και εξελίξεις στην θεραπευτική πρακτική» στη Θεσσαλονίκη στις 11-13/10/2019
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο «Συμπληρωματική θεραπεία με Στοχευμένους Παράγοντες στο Μελάνωμα» στο Συνέδριο «Ογκολογική Προσέγγιση από Διαφορετική Οπτική Γωνιά» στη Θεσσαλονίκη, στις 29-30/11/2019

- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο «Ανοσοθεραπεία στην πρώτη γραμμή θεραπείας για τον Προχωρημένο Ηπατοκυτταρικό Καρκίνο», στο συνέδριο «Σύγχρονοι θεραπευτικοί χειρισμοί για τον ογκολογικό ασθενή IV». Στη Δράμα στις 17-19/07/2020
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο «Μεταστατικός καρκίνος παγκρέατος», στο Συνέδριο «Κακοήθη Νεοπλάσματα Πεπτικού II: Πρόληψη, Διάγνωση, Θεραπεία». στη Θεσσαλονίκη, στις 04-05/09/2020
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο «Ανοσοθεραπεία – Παρουσίαση Ενδιαφέροντος Περιστατικού» στο Συνέδριο « Innovation in Oncology» στη Θεσσαλονίκη, στις 02-04/10/2020
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο «Παρουσίαση Περιστατικού», Νεότερα δεδομένα στην πρόληψη και αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα II» στη Θεσσαλονίκη 02-4/10/2020
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο «Σπάνιοι όγκοι στο νεφρό και στον προστάτη» στο Συνέδριο «Επίκαιρα Θέματα στην Ογκολογία του Ουρολογικού Καρκίνου», Web Scientific Event Θεσσαλονίκη στις 04-05/12/20
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο «Μεταστατικός καρκίνος του παγκρέατος» στο Συνέδριο «Ογκολογική Προσέγγιση από Διαφορετική Οπτική Γωνιά II, Web Scientific Event, Θεσσαλονίκη στις 13/12/2020
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο « Τριπλά αρνητικός καρκίνος μαστού και η πιθανότητα προσθήκης χημειοθεραπείας στην τοπική θεραπεία.» στο Συνέδριο «Καρκίνος: Ένα «παιχνίδι» πιθανοτήτων» , Web Scientific Event Θεσσαλονίκη στις 05-06/03/2021
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο «Μεταστατικός καρκίνος του πνεύμονα: διαχείριση νόσου με EGFR (+) και παράκαμψη της αντίστασης», στο Συνέδριο «Σύγχρονα θέματα Ογκολογίας» Web Scientific Event 29/05/2021 Κρήτη, Ηράκλειο

- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο «Νεότερες εξελίξεις στον προχωρημένο Ουροθηλιακό καρκίνο με την έλευση Συζευγμένου Αντισώματος έναντι της Νεκτίνης 4 με Αναστολέα των μικροσωληναρίων (Emfortumab Vedotin ejju)» στο Συνέδριο «Σύγχρονοι Θεραπευτικοί Χειρισμοί για τον Ογκολογικό ασθενή από την έγκαιρη Διάγνωση στην Αποτελεσματική Θεραπεία V.» στη Δράμα, στις 04-05/06/2021
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο «CDK4/6 αναστολείς στη διαχείριση της ER θετικής μεταστατικής νόσου στον καρκίνο του μαστού», στο Συνέδριο «Ογκολογικά Επίκαιρα», Web Scientific Event, 03/07/2021 Θεσσαλονίκη
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο « Παρουσίαση Περιστατικού», στο Συνέδριο «Νεότερα δεδομένα στην Πρόληψη και Αντιμετώπιση του Καρκίνου του Πνεύμονα III», στη Θεσσαλονίκη, στις 01-03/10/2021
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο «Ορμονοθεραπεία στον Καρκίνο του Προστάτη, Όφελος και Τίμημα», στο Συνέδριο « Όφελος και Τίμημα για τον ογκολογικό ασθενή», Web Scientific Event στην Αθήνα στις 11-12/02/2022
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο « Μεταστατικός καρκίνος του πνεύμονα: διαχείριση νόσου με EGFR (+) και παράκαμψη της αντίστασης», στο Συνέδριο «Σύγχρονα Θέματα Ογκολογίας» Web Scientific Event Θεσσαλονίκη στις 17/03/2022
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο «Highlights κλινικών μελετών CDK4/6 αναστολέων. Επιβίωση. Πρωϊμότερα στάδια στον καρκίνο του μαστού.» στο Συνέδριο «Ογκολογικά επίκαιρα» Θεσσαλονίκη, στις 24-25/06/2022
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο «Θεραπευτική αντιμετώπιση στο MMKP με EGFR (+) στο εξώνιο 20» στο Συνέδριο «Νεότερα Δεδομένα στην Πρόληψη και Αντιμετώπιση του Καρκίνου του Πνεύμονα IV» Θεσσαλονίκη στις 14-16/10/2022
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο « Όταν ο ασθενής προτιμά τις εναλλακτικές θεραπείες.» στο 3<sup>rd</sup> Athenian Oncology Congress -

“Improving cancer care by opening therapeutic avenues” Αθήνα στις 21-22/10/2022

- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο « Εξελίξεις στη θεραπεία με μεταστατικό ΜΜΚΠ και μεταλλάξεις στο εξόνιο 20» στο Συνέδριο « «Ογκολογική Προσέγγιση από διαφορετική οπτική γωνία IV» Θεσσαλονίκη στις 18-19/11/2022
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο « Συζευγμένα αντισώματα στον μεταστατικό καρκίνο του μαστού» στο Συνέδριο «Εφαρμογή των Μοριακά Στοχευμένων Θεραπειών και της Ανοσοθεραπείας στους Συμπαγείς Όγκους» στις 21/01/2023
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο «Η ανοσοθεραπεία στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης» στο Συνέδριο με τίτλο «Οι ακτίνες στην ογκολογία ακριβείας» διαδικτυακή σύνδεση στις 03-04/02/2023
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο «Εξελίξεις στη χημειοθεραπεία για ανεγχείρητη νόσο του χολαγγειοκαρκινώματος» στο Συνέδριο με τίτλο « Προσεγγίζοντας το χολαγγειοκαρκίνωμα» στις 04/02/2023
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο «Αναστολή BRAF στο μελάνωμα. Συνδυασμοί BRAF και ανοσοθεραπείας στο Μελάνωμα» στο Συνέδριο «Ταξίδι στον κόσμο των TKI – Αναστολείς τυροσινικών κινασών στην Ογκολογία» Θεσσαλονίκη στις 24-25/2/2023
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο «Θεραπεία μεταστατικής νόσου του καρκίνου του Παγκρέατος» στο Συνέδριο « Κακοήθη Νεοπλάσματα του Πεπτικού V» Θεσσαλονίκη στις 10-11/03/2023
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο « Ο ρόλος του Βελονισμού στον ογκολογικό ασθενή» στο Συνέδριο «Σύγχρονοι θεραπευτικοί χειρισμοί για τον ογκολογικό ασθενή VII: Από την έγκαιρη διάγνωση στην αποτελεσματική θεραπεία», Δράμα στις 21-22/03/23
- ❖ Συμμετοχή ως Ομιλητής σε Παρουσίαση με τίτλο «Ο ρόλος της ανοσοθεραπείας και στοχευτικών παραγόντων στην αντιμετώπιση του καρκίνου ήπατος/χοληφόρων» στο Συνέδριο «Cancer 2023», Θεσσαλονίκη στις 26-27/05/2023

## ΣΥΝΕΔΡΙΑ- ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ

- ❖ Συμμετοχή στο Συνέδριο «19<sup>ο</sup> Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας», στο Ηράκλειο Κρήτης στις 27-29/10/2011
  
- ❖ Συμμετοχή στο Συνέδριο «Περιβάλλον, κάπνισμα& καρκίνος του πνεύμονα», στη Δράμα στις 29-31/03/2013
  
- ❖ Συμμετοχή στο Συνέδριο «Ορθολογική Χρήση Αντιβιοτικών από τον Νοσοκομειακό Ιατρό», στην Αθήνα ,στις 20/04/2013
  
- ❖ Συμμετοχή στο Συνέδριο «3<sup>ο</sup> Ογκολογικό Συνέδριο Βορείου Ελλάδος» στο Βόλο, στις 10-12/05/2013
  
- ❖ Συμμετοχή στο Σεμινάριο «Courses on Clinical Trials», στη Θεσσαλονίκη, από τον Απρίλιο μέχρι τον Ιούνιο 2013
  
- ❖ Συμμετοχή στο Ογκολογικό Συνέδριο με θέμα: «Η συμβολή των νέων φαρμάκων και τεχνικών στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα, μαστού, ουροποιογεννητικού, πεπτικού και μελανώματος. Από τη θεωρία του καρκίνου στη θεραπεία του καρκίνου.» στη Θεσσαλονίκη, 1-2 Νοέμβριου 2013
  
- ❖ Συμμετοχή στο Σεμινάριο «Good Clinical Practice and Regulatory Requirements for Clinical Trials», NHS foundation trust , Thessaloniki στις 29/11/2013
  
- ❖ Συμμετοχή στο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο Κλινικών Μελετών στις 14-15 Νοέμβριου 2015, Αθήνα
  
- ❖ Συμμετοχή στο Σεμινάριο «Minimum criteria for ICH E6 GCP investigator site personnel training», στη Θεσσαλονίκη στις 16 Νοεμβρίου 2015

- ❖ Συμμετοχή στο Συνέδριο «3<sup>ο</sup> Ελληνικό συνέδριο Ογκολογίας », στα Ιωάννινα, στις 21-23 Απρίλιου 2016
- ❖ Συμμετοχή στο Συνέδριο «Εξελίξεις στην Χειρουργική Ογκολογία του Πεπτικού. Σύγχρονες Κατευθυντήριες Οδηγίες, Διάγνωσης, Χειρουργικής και Συντηρητικής Θεραπείας» στο Ηράκλειο Κρήτης στις 24-26 Φεβρουάριου 2017
- ❖ Συμμετοχή στο Συνέδριο «10<sup>ο</sup> συνέδριο Εταιρεία Μελέτης Μεταστατικής Νόσου του Ήπατος», στην Καλαμάτα 10-11 Μαρτίου 2017
- ❖ Συμμετοχή στο Συνέδριο «Εφαρμογή των Μοριακά Στοχευμένων Θεραπειών στους Συμπαγείς Όγκους», στη Θεσσαλονίκη στις 24-25 Μαρτίου 2017
- ❖ Συμμετοχή στο Συνέδριο «23<sup>ο</sup> Ελληνικό Συνέδριο κλινικής ογκολογίας», στην Αθηνά στις 27-29 Απρίλιου 2017
- ❖ Συμμετοχή στο Συνέδριο «The Challenges of Optimizing Immunotherapies and Targeted Therapies from Cancer Biology to Clinic», in Florence, Italy at 24-27 June 2017
- ❖ Συμμετοχή στο Συνέδριο «Esmo 2017 Congress», στην Μαδρίτη Ισπανία, στις 08-12/09/2017
- ❖ Συμμετοχή στο Συνέδριο «Μετεκπαιδευτικά Μαθήματα Χειρουργικής Παγκρέατος & Ήπατος Χοληφόρων», στον Βόλο, στις 28-30/09/2017
- ❖ Συμμετοχή στο Εκπαιδευτικό Σεμινάριο Μοριακής Ογκολογίας & Στοχεύουσας Θεραπείας, στα Ιωάννινα, στις 30-31 Μαρτίου 2018
- ❖ Συμμετοχή στο Συνέδριο «Η Δράμα ενάντια στον Καρκίνο» Στη Δράμα στις 13-15/04/2018

- ❖ Συμμετοχή στο Συνέδριο «Στοχευμένες Ανοσοθεραπείες σε Συμπαγείς Κακοήθειες» στην Αθηνά, στις 27-28 Απριλίου 2018
- ❖ Συμμετοχή στο Συνέδριο «Νεότερες Εξελίξεις στη Διάγνωση και Θεραπεία», στη Θεσσαλονίκη στις 11-12 Μαΐου 2018
- ❖ Συμμετοχή στο Συνέδριο «Esmo 2018 Congress» στο Μόναχο, Γερμανία , στις 19-23/10/2018
- ❖ Συμμετοχή ως Μέλος Επιστημονικής Επιτροπής στο Συνέδριο: «Σύγχρονη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας και Ιατρείο Πόνου – Δομές Οργάνωσης και Λειτουργίας», στη Θεσσαλονίκη στις 14-16/12/2018
- ❖ Συμμετοχή στο Συνέδριο «Κακοήθη Νεοπλάσματα Πεπτικού III: Πρόληψη, Διάγνωση, Θεραπεία», Web Scientific Event, 2-3/04/2021
- ❖ Συμμετοχή στο 6ο Ελληνικό Συνέδριο Ογκολογίας ΕΟΠΕ «Πιο γρήγορα, πιο ψηλά, πιο δυνατά» Θεσσαλονίκη, στις 4-7 Μαΐου 2022
- ❖ Συμμετοχή στο 29ο Ελληνικό Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας ΕΟΠΕ «Επιστήμη, Τεχνολογία, άνθρωπος» Αθήνα, 5-8 Απριλίου 2023

### **ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ**

- ❖ Αγγλική γλώσσα – Αρίστο Επίπεδο (Πανεπιστημιακές Σπουδές σε Αγγλόφωνο Πανεπιστήμιο στο Εξωτερικό)

❖ Γερμανικά – Καλό Επίπεδο ( A2)

❖ Νοηματική Γλώσσα – Μέτριο Επίπεδο



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Επιθυμώ να εκφράσω την ευγνωμοσύνη για τον χρόνο που αφιέρωσαν οι ιατροί της Α' Μαιευτικής-Γυναικολογικής κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών «Αλεξάνδρα» Γ.Ν.Α. και της Α' Προπαιδευτικής Χειρουργικής κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών «Ιπποκράτειο» Γ.Ν.Α., για την συλλογή των δειγμάτων, αλλά και για την πολύτιμη βοήθεια τους στην ταξινόμηση των κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών και υγιών γυναικών, ώστε να διεκπεραιωθεί η παρούσα διατριβή.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Δημητρακάκη, Γυναικολόγο-Μαιευτήρα, Υπεύθυνο Τμήματος του Μαστού στην Α' Μαιευτική Γυναικολογική κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών «Αλεξάνδρα» Γ.Ν.Α, για την εποπτεία, την υπομονή και την πολύτιμη καθοδήγησή του καθ' όλη την διάρκεια της εργασίας μου.

Θερμές ευχαριστίες επίσης απευθύνω στον Καθηγητή κ Γεώργιο Ζωγράφο, Χειρουργό, Διευθυντή της Α' Προπαιδευτικής Χειρουργικής κλινικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών «Ιπποκράτειο» Γ.Ν.Α για τη συμπαράσταση του με συστάσεις και πολύτιμες συμβουλές χειρουργικών τεχνικών στον Τριπλά Αρνητικό Καρκίνο του Μαστού.

Ευχαριστώ πολύ επίσης το τρίτο μέλος της Τριμελούς Επιτροπής μου, τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Τούτουζα, Χειρουργό της Α' Προπαιδευτικής Χειρουργικής κλινικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών «Ιπποκράτειο» Γ.Ν.Α. για την καθοδήγησή του.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να εκφράσω στην Καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας στην Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, ΕΚΠΑ, κα Μαρία Γαζούλη για την επιτυχή εκτέλεση του πειραματικού μέρους της παρούσας εργασίας, καθώς και για την επιστημονική καθοδήγηση και κατανόηση της μοριακής βιολογίας του Τριπλά Αρνητικού Καρκίνου του Μαστού.

Ευχαριστώ για την πολύτιμη συμβολή της Διευθύντριας του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Νοσοκομείου «Αλεξάνδρα» Γ.Ν.Α. κυρίας Ειρήνης Παπασπύρου, για την ανεύρεση και την οργάνωση των ιστολογικών παρασκευασμάτων αλλά και την καθοδήγηση ερμηνείας των αποτελεσμάτων.

Επιπλέον θα ήθελα να εκφράσω την μεγάλη ευγνωμοσύνη μου στην Καθηγήτρια Πανεπιστημιακής Θεραπευτικής Κλινικής Νοσοκομείου «Αλεξάνδρα» ΓΝΑ, Παθολόγο-Ογκολόγο κα Φλώρα Ζαγουρή για τον καθοριστικό ρόλο στην ανεύρεση του θέματος της διατριβής, την πολύτιμη καθοδήγηση της μέσα από τα γονιδιακά μονοπάτια του καρκίνου του μαστού, την οργάνωση κάθε διαδικασίας και την ολοκλήρωση των τελικών διορθώσεων και συστάσεων.

Θερμές ευχαριστίες επιθυμώ να εκφράσω στον Συντονιστή-Διευθυντή της Ογκολογικής Κλινικής του Ιπποκράτειου ΓΝΑ και Πρόεδρο της Ελληνικής και Διεθνούς Εταιρείας Μοριακά Στοχευμένων και Εξατομικευμένων Θεραπειών (Ε.Δ.Ε.Μ.Σ.Ε.Θ) Παθολόγο Ογκολόγο κ. Γεώργιο Σαμέλη για την ανάθεση της παρούσας διατριβής αλλά και για την παροχή υποτροφίας από την εταιρεία, ώστε να διεκπεραιωθεί η επιτυχής εκτέλεση της.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τον πατέρα και δάσκαλο μου Παθολόγο Ογκολόγο Δρ Παρίση Μακραντωνάκη για την στήριξη του, την καθημερινή εκπαίδευση στον καρκίνο του μαστού και την ορθή καθοδήγηση στην επιστήμη της Ογκολογίας.

Αφιερωμένο σε όλους τους δασκάλους μου  
και στην οικογένεια μου

**Διερεύνηση της προβλεπτικής και προγνωστικής αξίας  
των πολυμορφισμών μονήρους νουκλεοτιδίου PD-L1  
rs822336 G>C και PD-L1 rs822337 T>A στον  
Τριπλά Αρνητικό Καρκίνο του Μαστού**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>22</b>
1.1 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ .....	22
1.1.1 Γενετική του καρκίνου του μαστού.....	23
1.1.2 Μοριακή βιολογία του καρκίνου του μαστού.....	23
1.1.3 Ταξινόμηση καρκίνου του μαστού.....	28
1.1.3.1 Ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού.....	28
1.1.3.2 Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού.....	29
1.1.4 Προληπτικός έλεγχος και διάγνωση του καρκίνου του μαστού.....	33
1.1.5 Πρόγνωση του καρκίνου του μαστού.....	34
1.1.6 Θεραπεία του καρκίνου του μαστού.....	36
1.1.7 Γονιδιακές Υπογραφές.....	37
1.2 Η ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ.....	39
1.2.1 Ανοσολογικές τροποποιήσεις στον καρκίνο του μαστού-Μηχανιστικός ρόλος.....	40
1.2.2 Ανοσολογικές τροποποιήσεις στον καρκίνο του μαστού-Κλινικός ρόλος.....	42
1.2.3 Το ανοσοποιητικό σημείο ελέγχου PD-1/PD-L1.....	49
1.2.3.1 PD-1 σηματοδοτικό μονοπάτι και μοριακοί μηχανισμοί.....	50
1.2.3.2 Έκφραση των PD-1/PD-L1.....	51
1.2.3.3 Φυσιολογικός ρόλος του σημείου ελέγχου PD-1.....	52
1.2.3.4 Ρόλος των PD-1/PD-L1 στον καρκίνο.....	54
1.2.3.5 Ανοσοποιητικοί αναστολείς σημείων ελέγχου που στοχεύουν το PD-1.....	55
1.2.3.6 Αναστολείς ανοσοποιητικού σημείου ελέγχου που στοχεύουν το PD-L1.....	56
1.2.4 Το ανοσοποιητικό σύστημα στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού.....	56
1.2.5 Η ανοσοθεραπεία στους τριπλά αρνητικούς ασθενείς με καρκίνο μαστού.....	58
1.3 Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ .....	60
1.3.1 Γενικά Στοιχεία.....	60
1.3.2 Οι πολυμορφισμοί στον καρκίνο.....	61
1.3.3 Η σημασία των πολυμορφισμών στον καρκίνο του μαστού.....	62
1.3.4 Οι πολυμορφισμοί rs822336 G>C και rs822337 T>A του PD-L1.....	64
<b>ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	<b>66</b>
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>67</b>
2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΤΡΙΠΛΑ ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ .....	67
2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΑΠΟ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΣ ΜΑΡΤΥΡΕΣ .....	69
2.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ ΓΙΑ ΤΟΥΣ ΜΟΝΗΡΕΙΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ PD-L1 RS822336 ΚΑΙ RS822337 .....	69
2.4 ΒΙΟΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ .....	70
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>ΣΦΑΛΜΑ! ΔΕΝ ΕΧΕΙ ΟΡΙΣΤΕΙ ΣΕΛΙΔΟΔΕΙΚΤΗΣ.</b>
3.1 ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ PD-L1 RS822336 G>C ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΤΡΙΠΛΑ ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΥΓΙΩΝ ΜΑΡΤΥΡΩΝ .....	71
3.2 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ PD-L1 RS822336 G>C ΜΕ ΤΑ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ .....	72
3.3 ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ PD-L1 RS822337 T>A ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΤΡΙΠΛΑ ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΥΓΙΩΝ ΜΑΡΤΥΡΩΝ .....	75
3.4 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ PD-L1 RS822337 T>A ΜΕ ΤΑ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ .....	76

3.5	ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ PD-L1 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΤΡΙΠΛΑ ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΜΑΣΤΟΥ .....	79
3.5.1	<i>Ανάλυση επιβίωσης και προγνωστική σημασία του rs822336 G&gt;C .....</i>	<i>79</i>
3.5.2	<i>Ανάλυση επιβίωσης και προγνωστική σημασία του rs822337 T&gt;A .....</i>	<i>81</i>
3.5.3	<i>Ανάλυση επιβίωσης και προγνωστική σημασία του συνδυασμού των rs822336G&gt;C/rs822337T&gt;A</i>	<i>83</i>
<b>4.</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>89</b>
<b>5.</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>96</b>

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού συγκαταλέγεται στους τρεις πιο συχνούς τύπους καρκίνου στον γυναικείο πληθυσμό. Η συγκεκριμένη κακοήθεια αντιπροσωπεύει το 30% όλων των περιπτώσεων καρκίνων στις γυναίκες. Ο καρκίνος του μαστού χαρακτηρίζεται επίσης από υψηλά ποσοστά θνησιμότητας αποτελώντας τη δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο στον γυναικείο πληθυσμό. Ο ανδρικός καρκίνος του μαστού αποτελεί μία σπάνια ασθένεια καθώς αντιπροσωπεύει το 1% των περιπτώσεων και μόλις το 0.2% όλων των καρκίνων που παρουσιάζονται στον ανδρικό πληθυσμό<sup>1</sup>.

Ο καρκίνος του μαστού είναι μία πολυπαραγοντική νόσος και σήμερα είναι καλά χαρακτηρισμένοι πολλοί από τους επιβαρυντικούς παράγοντες της συγκεκριμένης κακοήθειας. Πιο αναλυτικά σήμερα γνωρίζουμε ότι η πιθανότητα εμφάνισης του καρκίνου του μαστού επηρεάζεται από 1) δημογραφικούς και γεωγραφικούς παράγοντες (φύλλο, εθνικότητα), 2) γενετικούς παράγοντες και κληρονομικότητα, (ύπαρξη μεταλλάξεων σε γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας (π.χ. *BRCA1* και *BRCA2*) και 3) παράγοντες που σχετίζονται με τον τρόπο ζωής (επίδραση των ορμονών).

Σήμερα έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος στην έγκαιρη διάγνωση της νόσου, κυρίως χάρη στη μαστογραφία, αλλά και στην πρόγνωση και την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας καθώς πλέον υπάρχουν αξιόπιστοι προγνωστικοί δείκτες (π.χ. ιστολογικός τύπος, βαθμός κακοήθειας), αλγόριθμοι (π.χ. Adjuvant!Online), οι οποίοι συνεκτιμούν πολλούς από τους παραπάνω δείκτες, η ταξινόμηση των όγκων του μαστού σε τέσσερεις μοριακούς υπότυπους, (Αυλικού τύπου A-Luminal A, Αυλικού τύπου B- Luminal A, HER-2 θετικοί και τριπλά αρνητικοί όγκοι-Triple Negative) καθώς και οι γονιδιακές υπογραφές (π.χ. Oncotype DX, MammaPrint)<sup>2</sup>.

Η μεγάλη ετερογένεια και η πολυπλοκότητα του καρκίνου του μαστού καθιστούν τις καθιερωμένες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους ανεπαρκείς να προβλέψουν με ακρίβεια την πορεία της νόσου αλλά και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Είναι πλέον αποδεκτό ότι η λύση αυτού του προβλήματος εντοπίζεται στην αποκρυπτογράφηση των μοριακών και γενετικών αλλαγών που οδηγούν στην καρκίνο του μαστού, επιτρέποντας έτσι την δημιουργία ενός εξατομικευμένου γονιδιακού προφίλ που θα επιτρέψει κατά συνέπεια την εξατομικευμένη αντιμετώπιση της ασθένειας.

### 1.1.1 Γενετική του καρκίνου του μαστού

Είναι γνωστό ότι ο καρκίνος συχνά οφείλεται στην εμφάνιση πολλαπλών γενετικών αλλαγών, οι οποίες είναι είτε μεταλλάξεις λειτουργικής ενεργοποίησης (gain of function) ογκογονιδίων είτε μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας (loss of function) ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Ασφαλώς ο καρκίνος του μαστού δεν αποτελεί εξαίρεση και μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί κληρονομήσιμες μεταλλάξεις σε πληθώρα γονιδίων, οι οποίες μάλιστα σχετίζονται με αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης της συγκεκριμένης κακοήθειας<sup>3</sup>. Ακόμη έχουν περιγράψει προσθήκες γενετικού υλικού στη χρωμοσωμική περιοχή 1q, απώλειες γενετικού υλικού στις περιοχές 16q και 17q καθώς και εμπλουτισμός στην 11q.

Σύμφωνα με στατιστικές μελέτες το 10% των περιπτώσεων του καρκίνου του μαστού αφορά σε γυναίκες στο οικογενειακό ιστορικό των οποίων αναφέρεται καρκίνος του μαστού. Όπως αναφέρθηκε έχουν αναγνωριστεί πολλές μεταλλάξεις σε διάφορα γονίδια που σχετίζονται με τον κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού. Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται τα *TP53*, *PTEN*, *ATM*, *CHEK2*, and *HRAS1* και ασφαλώς τα *BRCA1* and *BRCA2*. Έχει υπολογιστεί ότι ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού είναι περίπου 70% σε γυναίκες που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο *BRCA1*. Έτσι σήμερα τα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* ελέγχονται στην κλινική ρουτίνα στα πλαίσια του γενετικού ελέγχου γυναικών με οικογενειακό ιστορικό και τα αποτελέσματα λαμβάνονται υπόψη για την μετέπειτα διαχείριση των συγκεκριμένων γυναικών<sup>4</sup>.

Επιπλέον, έχει επιβεβαιωθεί η συσχέτιση 19 πολυμορφισμών ενός νουκλεοτίδιου (Single Nucleotide Polymorphisms-SNPs) με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου<sup>5</sup>, ενώ τέλος ο κληρονομούμενος καρκίνος του μαστού συχνά ανήκει στο φάσμα κληρονομούμενων συνδρόμων όπως τα σύνδρομα Li-Fraumeni, Cowden, Peutz-Jegher, Αταξία-Τελαγγειεκτασία τα οποία οφείλονται σε μεταλλάξεις των γονιδίων *TP53*, *CHEK2*, *PALB2*, *PTEN*, *STK11/LKB1* και *ATM* αντίστοιχα<sup>6</sup>.

### 1.1.2 Μοριακή βιολογία του καρκίνου του μαστού

Η πολυετής έρευνα για τον καρκίνο του μαστού έχει αποκαλύψει την πολυπλοκότητα της μοριακής παθολογία του καρκίνου του μαστού. Είναι σήμερα γνωστό ότι η καρκινογένεση στον συγκεκριμένο αδένα οφείλεται σε ένα σύνθετο δίκτυο αλληλεπιδράσεων ανάμεσα σε πρωτεΐνες/ορμόνες- γονίδια-μη κωδικά μόρια RNA, η φυσιολογική δράση των οποίων έχει τροποποιηθεί λόγω διαφόρων γενετικών αλλαγών και της επίδρασης περιβαλλοντικών παραγόντων. Αναλυτικότερα πληθώρα πειραματικών δεδομένων προτείνουν ένα μοριακό μοντέλο σύμφωνα με το οποίο η διαταραγμένη δράση των στεροειδών ορμονών του φύλου

συνδυαστικά με την ενεργοποίηση συγκεκριμένων ογκογονιδίων και την απενεργοποίηση ορισμένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων οδηγούν στην καρκινογένεση του μαστού.

Τα γονίδια που εμφανίζουν πιο συχνά μεταλλάξεις ή/και ενίσχυση είναι τα *TP53* (41%), *PIK3CA* (30%), *MYC* (20%), *PTEN* (16%), *CCND1* (16%), *ERBB2* (13%), *FGFR1* (11%) and *GATA3* (10%). Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν μόρια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο τα οποία είτε καταστέλλονται (π.χ. *TP53*) είτε ενεργοποιούνται (π.χ. *CCND1*) με αποτέλεσμα την διατήρηση ενός υψηλού πολλαπλασιαστικού δυναμικού ή την αναστολή της απόπτωσης. Μεταλλάξεις παρατηρούνται επίσης σε γονίδια (*MYC*, *HER2* και *FGFR1*) τα οποία κωδικοποιούν μόρια που συμμετέχουν σε ογκογόνα σηματοδοτικά μονοπάτια καθώς και σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες-αναστολείς αυτών των μονοπατιών (π.χ. *PTEN*), οι οποίες καταστέλλουν την ανασταλτική τους δράση<sup>3</sup>.

Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι πολλές επιγενετικές αλλαγές εμπλέκονται στην ανάπτυξη αλλά και στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού. Αναλυτικότερα έχει βρεθεί ότι πολλά γονίδια υφίστανται ολική υπερμεθυλίωση με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των γονιδίων, υπερέκφραση των ογκογονιδίων καθώς και σε χρωμοσωμική αστάθεια. Έχει επίσης βρεθεί μερική υπερμεθυλίωση κάποιων γονιδίων, η οποία οδηγεί σε αναστολή της έκφρασης αυτών των γονιδίων αλλά και σε γενετική αστάθεια λόγω της αποσιώπησης των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA.

Η δράση των ορμονικών υποδοχέων έχει σημαντική συμβολή στη μοριακή παθολογία του καρκίνου του μαστού. Η έκθεση των μαστικών κυττάρων στις φυλετικές ορμόνες είναι ο σημαντικότερος επιβαρυντικός παράγοντας του καρκίνου του μαστού. Τα οιστρογόνα προωθούν την καρκινογένεση του μαστού καθώς η πρόσδεσή τους στους οιστρογονικούς υποδοχείς, οι οποίοι εντοπίζονται στον πυρήνα, έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της δράσης τους σαν μεταγραφικοί παράγοντες. Ο φυσιολογικός ρόλος των φυλετικών ορμονών είναι η προώθηση της ανάπτυξης των μαστών κατά τη διάρκεια της εφηβείας. Επίσης κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των οιστρογόνων και της προγεστερόνης ενισχύει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μπορεί να προκαλέσει συσσώρευση βλαβών του DNA. Η επανάληψη αυτής της διαδικασίας σε κάθε έμμηνο κύκλο μπορεί να οδηγήσει σε ελαττωματική λειτουργία του μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA με αποτέλεσμα την εμφάνιση ογκογόνων μεταλλάξεων στα προ-καρκινικά κύτταρα και στη συνέχεια στα καρκινικά. Στο στάδιο αυτό, τα οιστρογόνα ενεργοποιούν τον πολλαπλασιασμό αυτών των καρκινικών κυττάρων του μαστού αλλά και των στρωματικών κυττάρων, ενισχύοντας έτσι την ανάπτυξη του καρκίνου. Όπως προαναφέρθηκε η πρόσδεση των οιστρογόνων στους αντίστοιχους υποδοχείς οδηγεί στην ενεργοποίηση των τελευταίων. Οι



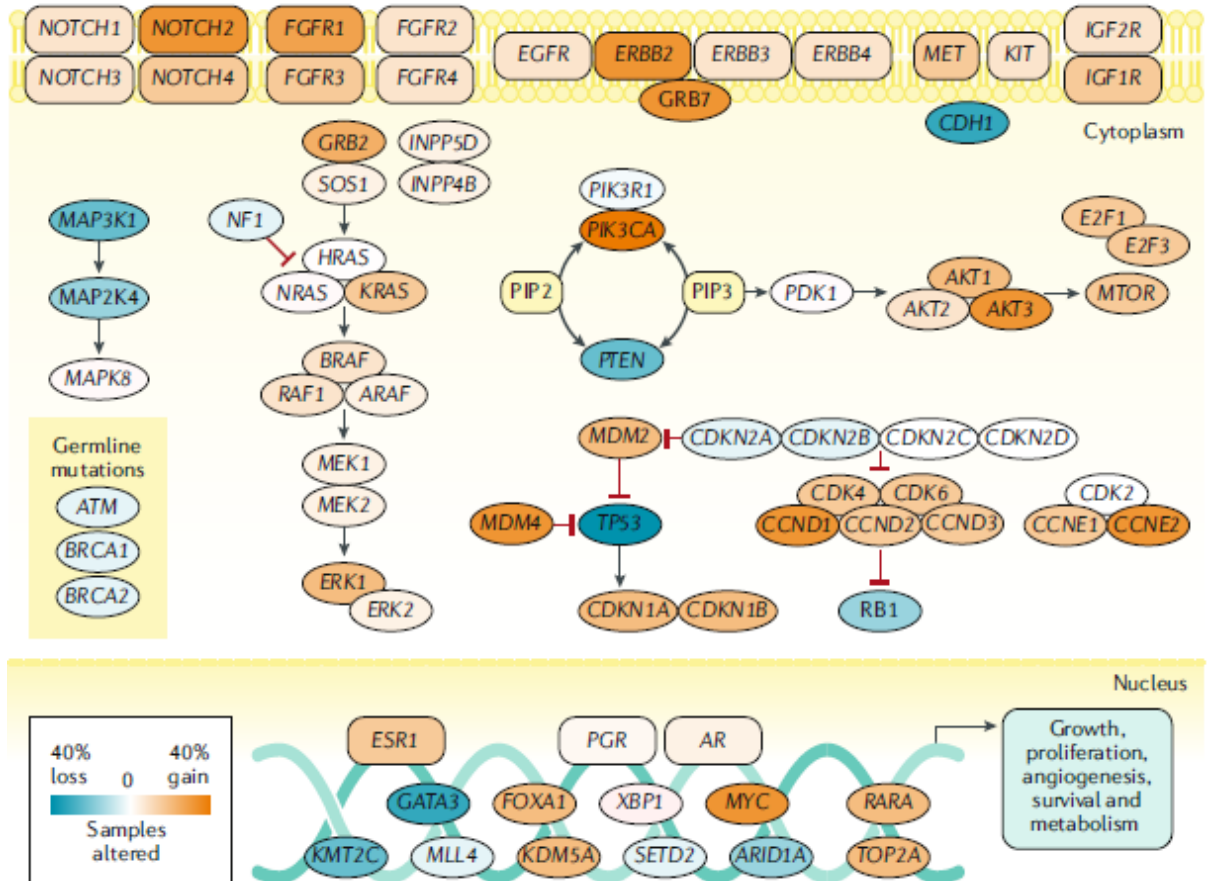
υποδοχείς αυτοί λειτουργώντας σαν μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση γονιδίων τα οποία φέρουν στον υποκινητή τους αλληλουχίες που είναι γνωστές σαν στοιχεία απόκρισης στα οιστρογόνα. Η λειτουργία των οιστρογονικών υποδοχέων μπορεί να ενεργοποιηθεί επίσης από συγκεκριμένα εξωκυττάρια ερεθίσματα απουσία οιστρογόνων. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι οι οιστρογονικοί υποδοχείς μπορούν να αλληλεπιδρούν απευθείας με συγκεκριμένες πρωτεΐνες, όπως οι υποδοχείς αυξητικών παραγόντων, ενισχύοντας έτσι την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση.

Σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του μαστού παίζει επίσης και το ογκογονίδιο *HER2*. Το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί τον διαμεμβρανικό υποδοχέα *HER2/neu* ο οποίος είναι μέλος της *ERBB* οικογένειας των υποδοχέων τυροσινικής κινάσης. Έχει βρεθεί ότι σε ένα ποσοστό 13%-15% ασθενών με καρκίνο του μαστού παρατηρείται ενίσχυση του συγκεκριμένου γονιδίου με αποτέλεσμα την υπερέκφραση του αντίστοιχου υποδοχέα αυξητικών παραγόντων και την ενεργοποίηση του αντίστοιχου μονοπατιού. Το αποτέλεσμα αυτής της ενεργοποίησης είναι η προώθηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της μετάστασης και της κυτταρικής προσκόλλησης μέσω της ενεργοποίησης διαφορετικών οδών μεταγωγής σημάτων όπως τα *RAS* και *PIK-AKT-MAPK* μονοπάτια<sup>7</sup>.

Συμπληρωματικό ρόλο στην καρκινογένεση του μαστού παίζει επίσης η ελαττωματική δράση πολλών πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε ενδοκυτταρικούς καταρράκτες μεταγωγής σήματος, η οποία οφείλεται σε α) μεταλλάξεις ή μεταβολή της έκφρασης τους και β) μεταλλάξεις σε ανωροϊκούς (upstream) υποδοχείς. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ενός τέτοιου μονοπατιού είναι το *Ras/Raf/MEK/ERK* μονοπάτι το οποίο επιτρέπει την ενδοκυτταρική μεταγωγή σημάτων από την κυτταρική επιφάνεια στον πυρήνα του κυττάρου με τελικό αποτέλεσμα τη ρύθμιση της δράσης συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων και κατ'επέκταση της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται σε σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες (π.χ. απόπτωση). Σημαντικό ρόλο στον καρκίνο μαστού παίζει επίσης και το μονοπάτι *PI3K/Akt*, το οποίο επίσης υπό φυσιολογικές συνθήκες μετά την επίδραση εξωκυτταρικών μηνυμάτων ρυθμίζει την ισορροπημένη έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (π.χ. κυκλίνες), ενώ στον καρκίνο φαίνεται να κατέχει κεντρικό ρόλο στον κακοήγη μετασχηματισμό των κυττάρων. Μεταλλάξεις του γονιδίου *PIK3CA* είναι ιδιαίτερα συχνές σε διηθητικά πορογενή καρκινώματα του μαστού<sup>8</sup>. Μία άλλη κατηγορία ογκογονιδίων με σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του μαστού είναι αυτά που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες όπως οι *c-Myc*, *c-Jun*, *c-Fos*, *Ly1-1* κ.α. Για παράδειγμα η έκφραση του παράγοντα *c-Myc* είναι κομβικής σημασίας για την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Υπό φυσιολογικές συνθήκες η έκφραση καθώς και η μεταγραφική δραστηριότητα

του συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα υφίσταται ισχυρή και αυστηρή ρύθμιση από τον αυξητικό παράγοντα TGF- $\beta$  καθώς και από την BRCA1. Απώλεια των αντίστοιχων ογκοκατασταλτικών γονιδίων οδηγεί σε απορρύθμιση του c-Myc, με αποτέλεσμα την επαγωγή της ανάπτυξης του όγκου και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων<sup>3</sup>.

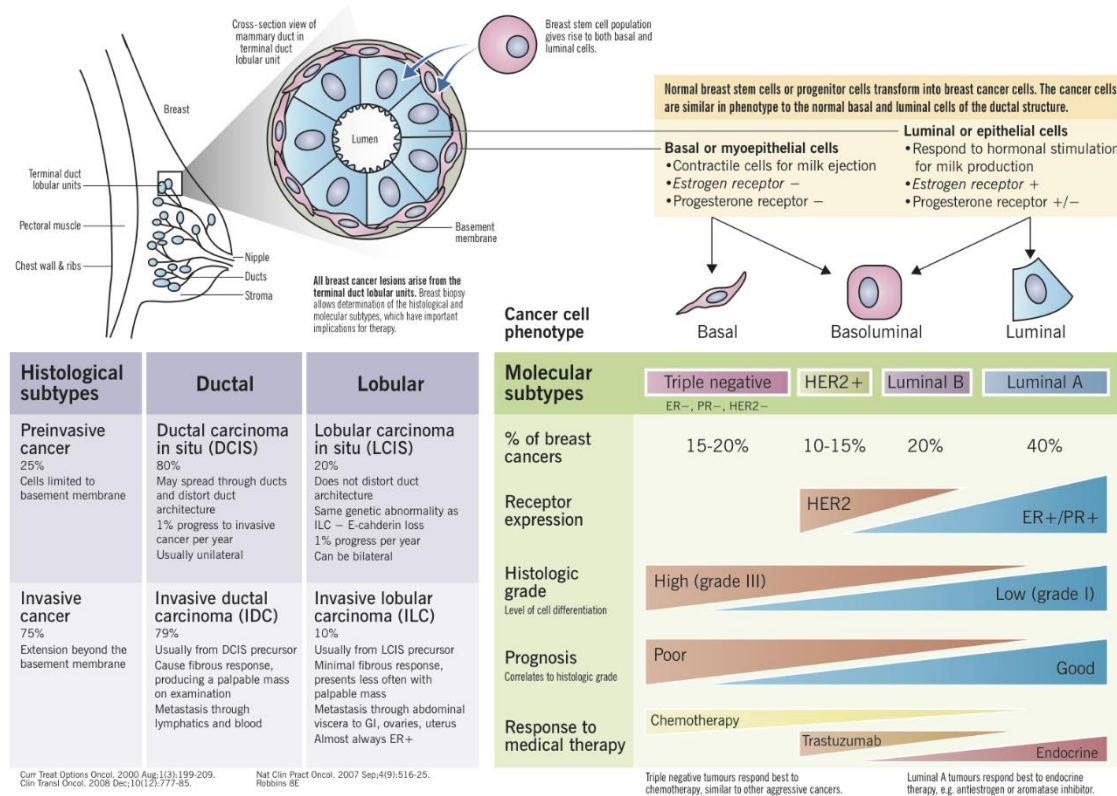
Από την άλλη πλευρά έχουν επίσης αναγνωριστεί και ογκοκατασταλτικά γονίδια, τα οποία επίσης επηρεάζουν την αύξηση, διαφοροποίηση και ομοιόσταση των φυσιολογικών μαστικών κυττάρων, αλλά ανταγωνιζόμενα τα ενεργοποιημένα μετασχηματιστικά ογκογονίδια καταστέλλουν τον καρκινικό φαινότυπο. Ογκοκατασταλτικά γονίδια με σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του μαστού είναι τα *BRCA1/2*, *TP53*, *PTEN* και *RB*. Τα *BRCA1/2* κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA και στη διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος<sup>9,10</sup>. Το *TP53* κωδικοποιεί μία πυρηνική πρωτεΐνη ή συμμετέχει στη ρύθμιση αντιγραφής και της μεταγραφής καθώς και στην απόπτωση. Όμοια με τα *BRCA1/2*, οι μεταλλάξεις στο *TP53* συνοδεύονται από αποτυχία ενεργοποίησης της απόπτωσης μετά από βλάβη στο DNA, επιβίωση των ελαττωματικών κυτταρικών κλώνων και τελικά στην ογκογένεση<sup>11</sup>. Τέλος, το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (*Rb*) κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη-ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου που μπορεί να επηρεάσει την είσοδο στη φάση G1. (Εικόνα 1.1)



Εικόνα 1.1 Μοριακές αλλαγές στον καρκίνο του μαστού<sup>7</sup>

### 1.1.3 Ταξινόμηση καρκίνου του μαστού

Τα καρκινώματα του μαστού ταξινομούνται αξιολογώντας συνδυαστικά τα ιστολογικά χαρακτηριστικά και το μοριακό προφίλ του όγκου. Η ιστολογική ταξινόμηση βασίζεται σε κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά του όγκου ενώ η μοριακή βασίζεται στον προσδιορισμό της έκφρασης συγκεκριμένων υποδοχέων και γονιδίων. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται πιο ακριβής περιγραφή του κάθε όγκου με τελικό σκοπό την εγκυρότερη πρόγνωση της νόσου, την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας αλλά και την πρόβλεψη της ανταπόκρισης των ασθενών στις διαφορετικές θεραπείες.



Εικόνα 1.2 Ιστολογική και Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού<sup>12</sup>

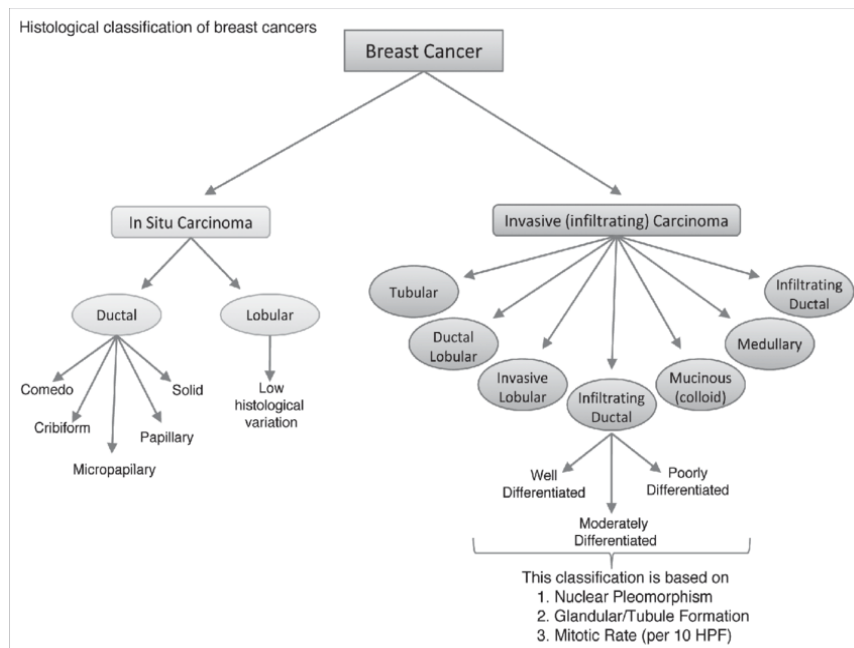
#### 1.1.3.1 Ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού

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

Τα in-situ καρκινώματα προέρχονται από κακοήθη επιθηλιακά κύτταρα τα οποία εντοπίζονται αποκλειστικά στην περιοχή από την οποία προέρχονται αλλά δεν εξαπλώνονται στη βασική μεμβράνη. Επίσης μπορούν να εξελιχθούν περαιτέρω σε διηθητικά καρκινώματα

στην περίπτωση που δεν αντιμετωπιστούν. Οι συγκεκριμένοι όγκοι ταξινομούνται σε πορογενή in-situ (Ductal Carcinoma in-situ- DCIS) και λοβιακό in-situ καρκινώματα (Lobular Carcinoma in-situ-LCIS).

Από την άλλη πλευρά τα διηθητικά καρκινώματα του μαστού είναι πιο επιθετικά καθώς σε αυτή την περίπτωση τα καρκινικά κύτταρα εφορμούν μέσω της βασικής μεμβράνης στο περιβάλλον παρέγχυμα του μαστού, τους λεμφαδένες ή και σε πιο απομακρυσμένες περιοχές. Το 95% των περιπτώσεων αυτών είναι αδenoκαρκινώματα επιθηλιακής προέλευσης, ενώ πιο σπάνιοι είναι όγκοι συνδετικών ιστών προερχόμενοι από στρωματικά κύτταρα, λεμφώματα και δευτεροπαθή νεοπλάσματα του μαστού προερχόμενα από πρωτοπαθείς όγκους άλλων οργάνων. (Εικόνα 1.3) Κατ'αντιστοιχία με τα in-situ καρκινώματα, έχουν αναγνωριστεί τα πορογενή (Invasive Ductal Carcinoma-IDC) και λοβιακά διηθητικά καρκινώματα (Invasive Lobular Carcinoma-ILC). Τα IDCs είναι η πιο συχνή κατηγορία (65-



80%) των διηθητικών όγκων ενώ τα ILCs αντιπροσωπεύουν το 10-15% αυτών των όγκων. Στα διηθητικά καρκινώματα ανήκουν επίσης το φλεγμονώδες καρκίνωμα του μαστού και η νόσος Paget της θηλής.

Εικόνα 1.3 Ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού<sup>13</sup>

### 1.1.3.2 Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού

Η πολυετής έρευνα για την αποκωδικοποίηση των μοριακών αλλαγών που οδηγούν στην καρκινογένεση του μαστού έχουν αποσαφηνίσει πολλές πτυχές αυτής της πολυπαραγοντικής και ετερογενούς κακοήθειας και πλέον είμαστε σε θέση να ανιχνεύουμε τις μοριακές αλλαγές σε κάθε ασθενή ξεχωριστά, επιτρέποντας έτσι τη δημιουργία ενός εξατομικευμένου γονιδιακού προφίλ το οποίο συμβάλλει στον πιο ακριβή βιολογικό χαρακτηρισμό της ασθένειας σε σχέση με την παραδοσιακή ιστοπαθολογική ταξινόμηση<sup>14</sup>. Η

εργασία των Perou *et. al* το 2000 θεμελίωσε την μοριακή εποχή του καρκίνου του μαστού και έφερε επανάσταση στην κατανόηση των μοριακών αλλαγών που εμπλέκονται στη συγκεκριμένη κακοήθεια αλλά και στην αξιοποίηση αυτής της γνώσης στην κλινική πράξη. Πιο αναλυτικά σύμφωνα με τους Perou *et. al* αλλαγές στην έκφραση πολλών γονιδίων, όπως τα *ER*, *ERBB2*, *Ki-67*, *TP53*, χαρακτηρίζουν συγκεκριμένους όγκους του μαστού και σχετίζονται με την επιθετικότητα του όγκου και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Στην κλινική πράξη τα αποτελέσματα αυτά αποτέλεσαν την απαρχή της μοριακής ταξινόμησης του καρκίνου του μαστού σε τέσσερις μοριακούς υπότυπους. Έτσι, αναγνωρίστηκαν όγκοι των οποίων το πρότυπο της έκφρασης των γονιδίων μοιάζει με αυτό των αυλικών (Luminal A and B) ή των βασικών (Basal-like) επιθηλιακών κυττάρων και όγκοι με HER-2(+) φαινότυπο (Erb-B2 overexpression)<sup>15,16</sup>.

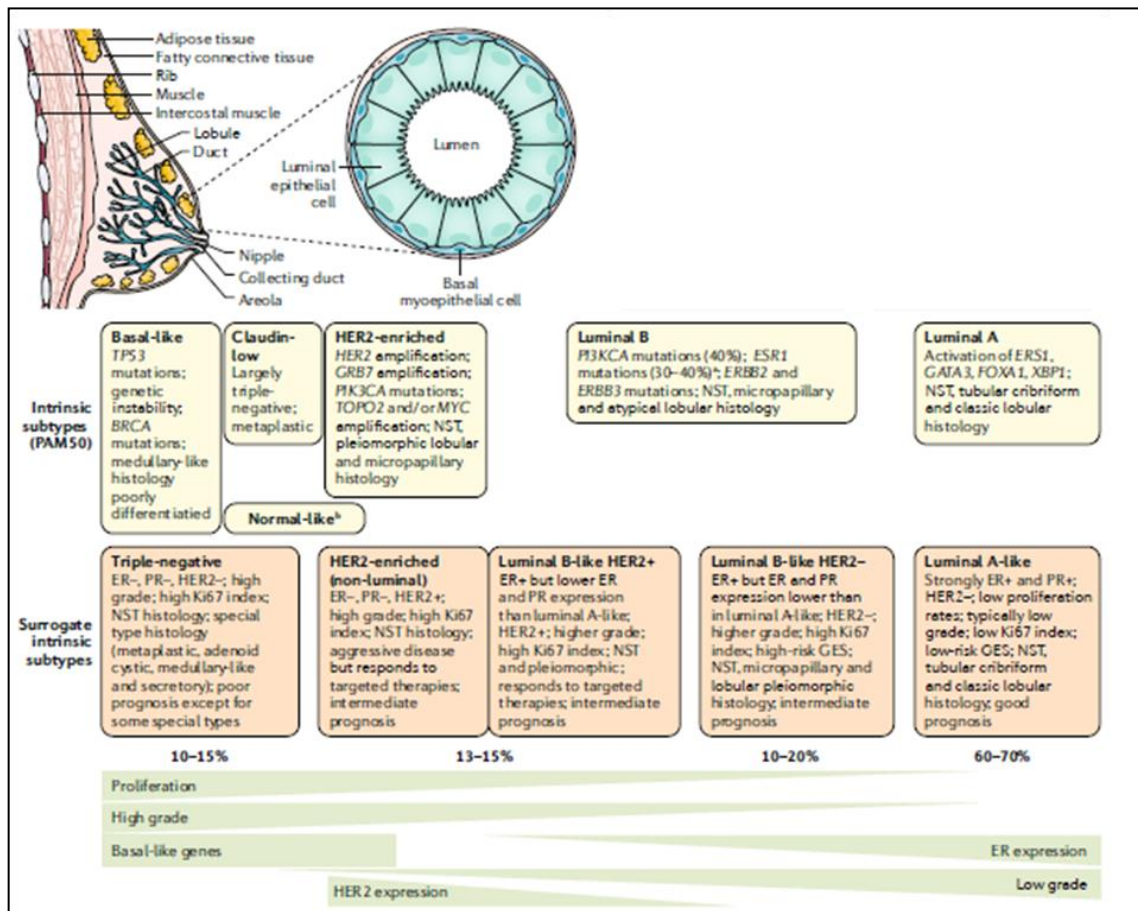
Τα Luminal A καρκινώματα αποτελούν το 50-60% των συνολικών περιπτώσεων περιλαμβάνουν όγκους που είναι θετικοί στη έκφραση των ER και των PR υποδοχέων, αρνητική στην έκφραση του HER-2 και μειωμένα επίπεδα του πυρηνικού αντιγόνου Ki-67. Σε μοριακό επίπεδο οι Luminal A όγκοι υπερεκφράζουν γονίδια που ελέγχονται από τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν οι οιστρογονικοί υποδοχείς και υποεκφράζουν γονίδια που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ανοσοϊστοχημικά οι συγκεκριμένοι όγκοι χαρακτηρίζονται από την έκφραση των Bcl-2 και της κυτοκερατίνης CK8/18 και την απουσία έκφρασης του υποδοχέα EGFR και της κυτοκερατίνης CK5/6. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν όλα τα λοβιακά *in situ* καρκινώματα και η πλειονότητα των διηθητικών λοβιακών καρκινωμάτων και κλινικά τα Luminal A καρκινώματα έχουν την καλύτερη πρόγνωση και ανταποκρίνονται στην ορμονοθεραπεία<sup>14,15</sup>.

Οι Luminal B όγκοι αποτελούν το 10-20% του συνόλου των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού και όμοια με τους Luminal A είναι ER θετικοί ή/και PR θετικοί. Ωστόσο, οι Luminal B είναι HER-2 θετικοί, χαρακτηρίζονται από αυξημένη έκφραση του πυρηνικού αντιγόνου Ki-67 και είναι πιο επιθετικοί, μεγαλύτερου βαθμού κακοήθειας και φυσικά έχουν χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με τους Luminal A<sup>17</sup>.

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



HER-2 θετικών όγκων εμφανίζουν πολύ καλή ανταπόκριση στη στοχευμένη θεραπεία με το μονοκλωνικό αντίσωμα trastuzumab<sup>14,17</sup>. (Εικόνα 1.4)



Εικόνα 1.4 Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού<sup>7</sup>

Τα καρκινώματα μαστού βασικού τύπου (Basal-like), αποτελούν μια ξεχωριστή ομάδα όγκων με χαρακτηριστικό μορφολογικό, ανοσοϊστοχημικό και γενετικό προφίλ. Οι όγκοι αυτοί χαρακτηρίζονται από την απουσία έκφρασης των υποδοχέων ER, PR και HER-2, δικαιολογώντας έτσι τον χαρακτηρισμό τους σαν "τριπλά αρνητικοί όγκοι". Στην πλειονότητα τους οι όγκοι αυτής της κατηγορίας έχουν αυξημένο μέγεθος, συμπαγή αρχιτεκτονική και αυξημένο βαθμό κακοήθειας γεγονός που τους καθιστά ιδιαίτερα επιθετικούς και κακής πρόγνωσης. Συχνά παρουσιάζουν διήθηση των παρακείμενων λεμφαδένων και αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα. Το 80-90% των περιπτώσεων τριπλά αρνητικού καρκίνου ανήκουν στην κατηγορία των πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων ενώ το υπόλοιπο 10-20% είναι σπάνιοι όγκοι όπως το μυελοειδές καρκίνωμα, το λοβιακό καρκίνωμα, το αποκρινές καρκίνωμα, και το μεταπλαστικό καρκίνωμα.

Η γονιδιακή ανάλυση όγκων αυτής της κατηγορίας αποκάλυψε την μεγάλη ετερογένεια των συγκεκριμένων καρκίνων τόσο σε βιολογικό όσο και σε κλινικό επίπεδο. και

οδήγησε τους Lehmann et. al να προχωρήσουν σε περαιτέρω κατηγοριοποίηση των τριπλά αρνητικών όγκων σε 6 κατηγορίες βάσει συγκεκριμένων μοριακών αλλαγών:

1. Basal-like 1 (BL1), οι οποίοι εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά (~92%) μεταλλάξεων στο γονίδιο *TP53*, αλλαγές στα γονίδια που εμπλέκονται στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA (π.χ. *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *RBI*) και του ελέγχου του κυτταρικού κύκλου.
2. Basal-like 2 (BL2), οι οποίοι επίσης παρουσιάζουν μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν μόρια που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο, υπερέκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες καθώς και μόρια που συμμετέχουν στη μυοεπιθηλιακή διαφοροποίηση.
3. Mesenchymal-like (M)
4. Mesenchymal/stem-like (MSL), οι οποίοι όπως και οι όγκοι τύπου M χαρακτηρίζονται από ενίσχυση των γονιδίων που εκφράζουν μόρια-ρυθμιστές της κυτταρικής κινητικότητας, διήθησης και της μεσεγχυματικής διαφοροποίησης. Ωστόσο μόνο οι MSL όγκοι παρουσιάζουν σημαντική ενίσχυση των γονιδίων που εκφράζουν μόρια-ρυθμιστές της επιθήλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης.
5. Immunomodulatory (IM), οι οποίοι χαρακτηρίζονται από τροποποιήσεις σε γονίδια που εμπλέκονται στην ανοσολογική απόκριση καθώς ρυθμίζουν τη λειτουργία των T- και B- κυττάρων, των NK κυττάρων αλλά και τη δράση πολλαπλών σηματοδοτικών μονοπατιών (π.χ. NFκB μονοπάτι, JAK/STAT μονοπάτι κ.α.).
6. Luminal androgen receptor (LAR), οι οποίοι έχουν αυξημένο φορτίο μεταλλάξεων (tumor mutation load) και παρουσιάζουν υπερέκφραση των γονιδίων που ευθύνονται για την εμφάνιση αυλικού φαινότυπου αλλά και γονιδίων που εκφράζουν ρυθμιστικά μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού των ανδρογονικών υποδοχέων. Τέλος χαρακτηρίζονται από αυξημένο ποσοστό μεταλλάξεων των *PIK3CA* (55%), *AKT1*(13%), και *CDH1*(13%).

Σήμερα, η κατηγοριοποίηση αυτή έχει τροποποιηθεί περιλαμβάνοντας τέσσερις κατηγορίες: BL1(immunoactivated), BL2 (immunosuppressed), M (όπου περιλαμβάνονται οι περισσότεροι MSL όγκοι) και LAR και συμβάλλει στην ακριβέστερη πρόβλεψη της ανταπόκρισης των ασθενών στην νεοεπικουρική (neoadjuvant) χημειοθεραπεία. Επιπλέον, η συνδυασμένη εφαρμογή των μεθόδων DNA και RNA αλληλούχισης επέτρεψε μία επιπλέον κατηγοριοποίηση (γνωστή σαν ταξινόμηση Burstein's) των τριπλά αρνητικών όγκων σε τέσσερις κατηγορίες: LAR, mesenchymal (MES), basal-like immunosuppressed (BLIS) and basal-like immuneactivated (BLIA). Κάθε κατηγορία έχει συγκεκριμένους θεραπευτικούς στόχους (π.χ. οι LAR όγκοι ανταποκρίνονται σε φάρμακα που στοχεύουν το AR



σηματοδοτικό μονοπάτι) και ασφαλώς διαφορετική πρόγνωση (π.χ. οι BLIA όγκοι σχετίζονται με καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με τους BLIS)<sup>7</sup>.

Σύμφωνα με τα παραπάνω η μοριακή ταξινόμηση συμπληρώνει και βελτιώνει την ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού και ασφαλώς επιτρέπει την ακριβέστερη πρόγνωση της νόσου καθώς οι αλλαγές που παρατηρούνται σε μοριακό/γενετικό επίπεδο οδηγούν ουσιαστικά σε διαφορετική κλινική εκδήλωση της νόσου<sup>16</sup>. Αυτό όμως που αξίζει να τονιστεί είναι ότι η μοριακή ταξινόμηση είναι ένα χρήσιμο εργαλείο των κλινικών Ογκολόγων για την αναγνώριση των γυναικών που είναι πιο πιθανό να ανταποκριθούν στη θεραπεία από αυτές θα εμφανίσουν αντίσταση σε αυτήν<sup>16</sup>.

#### **1.1.4 Προληπτικός έλεγχος και διάγνωση του καρκίνου του μαστού**

Ο προληπτικός έλεγχος του γενικού πληθυσμού (screening) στοχεύει στον έγκαιρο εντοπισμό της ασθένειας σε αρχικό στάδιο (για την οποία η θεραπεία είναι πιο αποτελεσματική) με την εφαρμογή μίας δοκιμασίας η οποία είναι μη-επεμβατική και χαρακτηρίζεται από αυξημένη ακρίβεια, ευαισθησία και ειδικότητα. Η μαστογραφία πληροί αυτές τις προϋποθέσεις και χρησιμοποιείται σήμερα ευρέως για τον προληπτικό έλεγχο του ασυμπτωματικού πληθυσμού. Οι προϋποθέσεις για την εφαρμογή της μαστογραφίας στο γενικό πληθυσμό διαφέρει μεταξύ των χωρών, γεγονός που οφείλεται στην έλλειψη ομοφωνίας σχετικά με τα πλεονεκτήματα (μείωση θνησιμότητας) και τα μειονεκτήματα (υπερδιάγνωση) αυτής της προσέγγισης αλλά και με το πώς αυτά τα αποτελέσματα εξισορροποούνται συνολικά και σε συγκεκριμένες ηλικιακές ομάδες. Έτσι σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της American Cancer Society προτείνεται ετήσιος έλεγχος σε γυναίκες ηλικίας 40-54 ετών και ανά διετία έλεγχος σε γυναίκες ηλικίας  $\geq 55$  ετών<sup>18</sup>. Στην Ευρώπη οι αντίστοιχες οδηγίες προτείνουν εφαρμογή της μαστογραφίας ανά 2-3 χρόνια σε γυναίκες ηλικίας 45-74 ετών και όχι τον ετήσιο έλεγχο<sup>19</sup>.

Οι γυναίκες που βρίσκονται στην ομάδα υψηλού κινδύνου λόγω της ύπαρξης μεταλλάξεων προδιάθεσης στον καρκίνο του μαστού, προτείνεται πιο συχνός προληπτικός έλεγχος με τη χρήση μαστογραφίας κι άλλων μεθόδων. Καθώς ο συνδυασμός του MRI και της μαστογραφίας αυξάνει τη διαγνωστική ευαισθησία σε γυναίκες με μεταλλάξεις στα γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* προτείνεται η εφαρμογή των συγκεκριμένων προσεγγίσεων σε αυτή την κατηγορία. Τέλος ο γενετικός έλεγχος προτείνεται σε γυναίκες με αυξημένες πιθανότητες εκδήλωσης της νόσου και βασίζεται στην εφαρμογή μεθόδων μοριακής βιολογίας για την ανίχνευση γνωστών ενοχοποιητικών μεταλλάξεων στα γονίδια *BRCA1* και *2*<sup>2</sup>.

### 1.1.5 Πρόγνωση του καρκίνου του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι μια ετερογενής νόσος τόσο στην κλινική εκδήλωση όσο και στην εξέλιξή της, γεγονός που καθιστά επιτακτική την ανάγκη για αναγνώριση και αξιολόγηση πολλών δεικτών πρόγνωσης. Η τακτική αυτή επιτρέπει μία πιο ολοκληρωμένη περιγραφή της νόσου με αποτέλεσμα την εγκυρότερη πρόβλεψη της πορείας της. Οι κλασσικοί προγνωστικοί παράγοντες είναι η ηλικία, το στάδιο της νόσου, ο βαθμός κακοήθειας του όγκου, ο μοριακός και ιστολογικός τύπος του όγκου και ο αριθμός των διηθημένων λεμφαδένων. Η εμφάνιση της ασθένειας σε νέες γυναίκες (<35 ετών) είναι σπάνια και συνήθως σχετίζεται με κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού. Γηραιότερες ασθενείς με καρκίνο του μαστού έχουν αυξημένη πιθανότητα θανάτου λόγω της ασθένειας. Ωστόσο επειδή η φυσική ιστορία του καρκίνου του μαστού έχει αλλάξει, η πρόγνωση βασίζεται στη βιολογία του όγκου (ιστολογικός και μοριακός τύπος, αριθμός διηθημένων λεμφαδένων, βαθμός κακοήθειας). Επιπλέον για την πρόγνωση αλλά και την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας, έχουν αναπτυχθεί πολλοί αλγόριθμοι όπως το Adjuvant! Online, ο δείκτης Nottingham, και οι «γονιδιακές υπογραφές»<sup>20</sup>. Αυτοί οι αλγόριθμοι βελτιώνουν την πρόγνωση των ασθενών και βοηθούν στην επιλογή της κατάλληλης θεραπείας. Ωστόσο, δεν αντικατοπτρίζουν με ακρίβεια όλους τους υπότυπους της ασθένειας και δεν μπορούν να αποτελέσουν το μοναδικό κριτήριο για την επιλογή της θεραπείας, με αποτέλεσμα η αξιολόγηση του μοριακού υπότυπου να αποτελεί τον πιο σημαντικό παράγοντα για την επιλογή της θεραπείας<sup>21</sup>.

Ο σημαντικότερος προγνωστικός παράγοντας είναι ο αριθμός των διηθημένων λεμφαδένων και σύμφωνα με πληθώρα επιδημιολογικών μελετών, η πρόγνωση της νόσου είναι χειρότερη όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των διηθημένων λεμφαδένων. Η διήθηση λεμφαγγείων ή αιμοφόρων αγγείων στην περιφέρεια του όγκου, αλλά και η διήθηση της θηλής ή/και του δέρματος έχει επίσης σημαντική προγνωστική αξία. Επιπλέον ο βαθμός κακοήθειας (Grade) των καρκινικών κυττάρων είναι από τα βασικά χαρακτηριστικά του όγκου που αξιολογούνται για την πρόβλεψη της πορείας της ασθένειας. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι ασθενείς με όγκους με βαθμό κακοήθειας I έχουν 85% πιθανότητα δεκαετούς επιβίωσης σε αντίθεση με γυναίκες με βαθμό κακοήθειας III, στις οποίες το αντίστοιχο ποσοστό μειώνεται στο 45%. Τέλος, η σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο όχι μόνο για την πρόγνωση αλλά και για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας. Σήμερα, η αποδεκτή σταδιοποίηση για τον καρκίνο του μαστού, σύμφωνα με την Αμερικάνικη Επιτροπή Σταδιοποίησης του Καρκίνου (AJCC), είναι το τροποποιημένο σύστημα TNM (Tumor-

Nodes-Metastasis) όπου συνεκτιμώνται το μέγεθος του όγκου (T), η ύπαρξη λεμφαδενικών (N) ή απομακρυσμένων (M) μεταστάσεων (Πίνακας 1.1)<sup>21</sup>.

Πίνακας 1.1 Σταδιοποίηση καρκίνου του μαστού-Σύστημα TNM

<b>Κλινική σταδιοποίηση του πρωτοπαθούς όγκου (T)</b>	
<b>Tx</b>	Ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί
<b>T0</b>	Κανένα στοιχείο για το μέγεθος του πρωτοπαθούς όγκου
<b>Tis</b>	Μη διηθητικό πορογενές ή λοβιακό καρκίνωμα ( DCIS – LCIS) ή νόσος Paget της θηλής χωρίς βλάβη στο μαζικό παρέγχυμα
<b>T1</b>	Όγκος με μέγιστη διάμετρο $\leq 2.0$ cm
<b>T2</b>	Όγκος $>2.0$ και $\leq 5.0$ cm στη μέγιστη διάμετρο
<b>T3</b>	Όγκος $>5.0$ cm στη μέγιστη διάμετρο
<b>T4</b>	Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους με άμεση επέκταση (α) στο θωρακικό τοίχωμα ή (β) στο δέρμα, όπως περιγράφεται παρακάτω: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ T4a: Επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα</li> <li>○ T4b: Επέκταση στο δέρμα και οίδημα</li> <li>○ T4c: T4a και T4b ταυτοχρόνως</li> <li>○ T4d: Φλεγμονώδες καρκίνωμα</li> </ul>
<b>Σταδιοποίηση των περιοχικών λεμφαδένων (N)</b>	
<b>Nx</b>	Οι περιοχικοί λεμφαδένες δεν είναι δυνατόν να εκτιμηθούν
<b>N0</b>	Καμία μετάσταση στους περιοχικούς λεμφαδένες
<b>N1</b>	Μετάσταση σε ευκίνητο λεμφαδένα της σύστοιχης μασχάλης
<b>N2</b>	Ομόπλευροι μασχالياίοι λεμφαδένες με μεταστάσεις συμφύομενοι μεταξύ τους ή σε άλλες δομές
<b>N3</b>	Εμφανής ομόπλευρη διήθηση των έσω μαστικών λεμφαδένων ή μετάσταση σε υποκλείδιους λεμφαδένες.
<b>Απομακρυσμένη Μετάσταση (M)</b>	
<b>MX</b>	Η παρουσία απομακρυσμένης μετάστασης δεν μπορεί να αξιολογηθεί
<b>M0</b>	Καμία απομακρυσμένη μετάσταση
<b>M1</b>	Ύπαρξη απομακρυσμένης μετάστασης

### 1.1.6 Θεραπεία του καρκίνου του μαστού

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

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

Η πρώτη σημαντική εξέλιξη στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού ήταν η σύνθεση μη στεροειδών ουσιών οι οποίες ανταγωνίζονται την δράση των οιστρογόνων. Τα συγκεκριμένα σκευάσματα χορηγούνται ευρέως στα πλαίσια της ενδοκρινικής θεραπείας σε όλες τις γυναίκες με Luminal A και B καρκίνο του μαστού. Η ταμοξιφαίνη είναι ο πιο γνωστός εκπρόσωπος αυτών των φαρμάκων και παραμένει η ορμονοθεραπεία πρώτης επιλογής σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες<sup>2</sup>. Η χημειοθεραπεία χορηγείται κατά κύριο λόγο σε ασθενείς με τριπλά αρνητικούς ή HER-2 θετικούς όγκους. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι χημειοθεραπευτικοί παράγοντες είναι οι ανθρακυκλίνες ή/και οι ταξάνες, και η χρήση τους έχει συμβάλλει σημαντικά στη μείωση της θνησιμότητας των ασθενών με τη συγκεκριμένη νόσο<sup>2</sup>. Το επόμενο σημαντικό βήμα στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού ευνοήθηκε από την κατανόηση της μοριακής βιολογίας του καρκίνου του μαστού και έγινε με την ανάπτυξη της πιο εκλεπτυσμένης, αντι-HER-2 θεραπείας. Αντι-HER-2 μονοκλωνικά αντισώματα χορηγούνται σε γυναίκες με HER-2 θετικούς όγκους. Το Trastuzumab είναι το πρώτο μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει τον HER-2 υποδοχέα και σήμερα βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην κλινική πράξη. Άλλοι εκπρόσωποι της συγκεκριμένης κατηγορίας φαρμάκων είναι τα πρόσφατα εγκεκριμένα από τον οργανισμό τροφίμων και φαρμάκων των Η.Π.Α (U.S. Food and Drug Administration / FDA), Ado-Trastuzumab Emtansine και Pertuzumab<sup>2</sup>.

Η κατανόηση της μοριακής βάσης της ασθένειας έχει επιτρέψει την αναγνώριση πολλών μορίων που μπορούν να λειτουργήσουν σαν θεραπευτικοί στόχοι. Για παράδειγμα το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K–AKT–mTOR αποτελεί ένα πεδίο εντατικής έρευνας στον καρκίνο του μαστού, η οποία έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη των PI3K αναστολέων Alpelisib και taselelisib<sup>22</sup>. Μάλιστα ο FDA πρόσφατα ενέκρινε τη χορήγηση του Alpelisib σε ασθενείς με ER-θετικούς, HER-2 αρνητικούς όγκους με μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIK3CA* καθώς βρέθηκε ότι η χορήγηση του συγκεκριμένου παράγοντα βελτιώνει την επιβίωση χωρίς υποτροπές<sup>23</sup>. Τέλος η ανοσοθεραπεία με τη χορήγηση αναστολέων σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος (π.χ Pembrolizumab, Atezolizumab) έχει ήδη δώσει ελπιδοφόρα αποτελέσματα.

Για παράδειγμα μία μελέτη φάσης III έδειξε ότι ο συνδυασμός των Atezolizumab και Nab-paclitaxel μπορεί να βελτιώσει την ολική επιβίωση η χορήγηση ταξάνης σε ασθενείς με όγκους με  $\geq 1\%$  PD- L1 immune cell staining<sup>24</sup>.

Ο προσδιορισμός της έκφρασης ER/PR/HER-2 υποδοχέων με σκοπό την εξατομικευμένη χορήγηση θεραπείας αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα επιτυχημένης μετάφρασης πειραματικών δεδομένων στην κλινική πράξη. Σήμερα ο τομέας της εξατομικευμένης θεραπείας του καρκίνου του μαστού έχει εξελιχθεί περαιτέρω και πλέον σε περιστατικά όπου η επιλογή της κατάλληλης θεραπείας δεν είναι σαφής, οι «γονιδιακές υπογραφές», που προκύπτουν από εμπορικά διαθέσιμους εργαστηριακά τεστ (π.χ. Oncotype DX, EndoPredict, MammaPrint κ.α.), κατευθύνουν τη χορήγηση της καταλληλότερης θεραπείας<sup>2</sup>. Επιπλέον σήμερα έχουν αναπτυχθεί κατάλληλες μεθοδολογίες και εργαστηριακά τεστ που επιτρέπουν την ανίχνευση μορίων που είτε αποτελούν θεραπευτικούς στόχους είτε χρησιμεύουν σαν δείκτες ανταπόκρισης στις νέες στοχευμένες θεραπείες. Χαρακτηριστικό<sup>25</sup> παράδειγμα αποτελεί η ανίχνευση κληρονομήσιμων μεταλλάξεων των γονιδίων *BRCA* για τη χορήγηση PARP αναστολέων<sup>25</sup>.

### 1.1.7 Γονιδιακές Υπογραφές

Σύμφωνα με πρόσφατες επιδημιολογικές μελέτες ο καρκίνος του μαστού αποτελεί σταθερά έναν από τους τύπους καρκίνου με τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας. Τα αυξημένα αυτά ποσοστά προκαλούν εντύπωση αν αναλογιστούμε ότι έχει γίνει μεγάλη πρόοδος τόσο στην κατανόηση της μοριακής βάσης της ασθένειας όσο και στη θεραπεία της συγκεκριμένης κακοήθειας. Το παράδοξο αυτό οφείλεται εν πολλοίς στην ανεπάρκεια των καθιερωμένων δεικτών πρόγνωσης και πρόβλεψης της ανταπόκρισης στη θεραπεία να προβλέψουν την κλινική πορεία της ασθένειας και να κατευθύνουν την επιλογή της καταλληλότερης θεραπείας αντίστοιχα. Είναι πλέον αναμφισβήτητο το γεγονός ότι η αξιολόγηση των γονιδιακών υπογραφών του κάθε όγκου αποτυπώνει καλύτερα την πολυπλοκότητα της ασθένειας, συμπληρώνει τις αδυναμίες των ιστοπαθολογικών παραγόντων πρόγνωσης και μειώνει τα ποσοστά της υπερ-θεραπείας. Στις μέρες μας υπάρχουν 2 πολυγονιδιακές υπογραφές πρόγνωσης, τα MammaPrint και PAM50, που έχουν εγκριθεί από τον FDA και 6 (MammaPrint, PAM50, Oncotype DX, EndoPredict, Genomic grade index και Breast cancer index) είναι εμπορικά διαθέσιμες και εφαρμόζονται στην κλινική πράξη.

Αυτοί οι εργαστηριακοί έλεγχοι βασίζονται στον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης πολλών γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού. Στη συνέχεια με

τη χρήση ειδικών αλγορίθμων υπολογίζεται η πιθανότητα υποτροπής, βάσει της οποίας οι ασθενείς κατηγοριοποιούνται σε ομάδες υψηλού ή χαμηλού κινδύνου. Επιπλέον οι γονιδιακές υπογραφές παρέχουν πληροφορίες για την αναγνώριση των ασθενών που δε θα ωφεληθούν από τη χορήγηση χημειοθεραπείας<sup>26</sup>. Αναφέρεται στις κατευθυντήριες οδηγίες των European Society of Medical Oncology, ASCO και St Gallen, ότι οι υπάρχουσες πολυγονιδιακές υπογραφές είναι χρήσιμες μέχρι στιγμής μόνο για τις ασθενείς με ER-θετικούς όγκους αρχικών σταδίων<sup>2,27</sup>.

## 1.2 Η ανοσολογία του καρκίνου του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού αναπτύσσεται σε ένα σύνθετο περιβάλλον το οποίο περιλαμβάνει πολλούς τύπους καλοηθών κυτταρικών τύπων καθώς και την εξωκυττάρια μήτρα, η οποία υποστηρίζει μηχανιστικά την κυτταρική αλληλεπίδραση και την διήθηση των καρκινικών κυττάρων στους γειτονικούς ιστούς. Αν και ο πιο συχνά απαντώμενος τύπος κυττάρων είναι οι καρκίνο-σχετιζόμενοι ινοβλάστες, στον καρκίνο του μαστού το μικροπεριβάλλον περιέχει επίσης κύτταρα λευκοκυτταρικής προέλευσης (λεμφοκύτταρα, μακροφάγα κ.α.). Η ανοσογονικότητα (immunogenicity) του καρκίνου του μαστού ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών μοριακών υποτύπων, όντας αυξημένη στους τριπλά αρνητικούς και HER2-θετικούς όγκους και πιο περιορισμένοι στους όγκους αυλικού τύπου (Luminal A/B). Επιπλέον, η πρόγνωση αλλά και η ανταπόκριση στη θεραπεία σχετίζονται με τον αριθμό των λευκοκυττάρων που διεισδύουν στον όγκο (Tumor-infiltrating lymphocytes-TILs), ο οποίος αντανάκλα την ένταση της ανοσολογικής απόκρισης εντός του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος. Το ανοσολογικό μικροπεριβάλλον του όγκου επηρεάζει την ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου του μαστού ανάλογα με τις τροποποιήσεις που υφίσταται. Συγκεκριμένα στα πρώτα στάδια της καρκινογένεσης το ανοσολογικό μικροπεριβάλλον "ασκεί" την αντικαρκινική του δράση μέσω των κυτοκινών που προέρχονται από τα ενεργοποιημένα CD8<sup>+</sup> και CD4<sup>+</sup> T κύτταρα. Αντίθετα, καθώς η ασθένεια εξελίσσεται σε πιο επιθετικές μορφές, η σύσταση του ανοσολογικού μικροπεριβάλλοντος αλλάζει, περιλαμβάνοντας καρκίνο-σχετιζόμενους ινοβλάστες και κυττοκίνες, τα οποία προωθούν την εξέλιξη του όγκου και "χρησιμοποιούνται" πλέον από τα καρκινικά κύτταρα του μαστού<sup>7</sup>.

Η μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού έφερε πραγματική επανάσταση στη πρόγνωση αλλά και την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας αυτών των ασθενών. Ωστόσο η ανάπτυξη και εφαρμογή της ανοσοθεραπείας έδωσε το έναυσμα για την μελέτη και διαλεύκανση των ανοσολογικών τροποποιήσεων που εμπλέκονται στην παθογένεια και εξέλιξη του καρκίνου του μαστού. Ο απώτερος σκοπός αυτών των προσπαθειών είναι η βελτίωση της κλινικής διαχείρισης αυτής της ετερογενούς νόσου. Τα μέχρι τώρα δεδομένα δείχνουν ότι οι καθιερωμένοι πλέον μοριακοί υπότυποι του καρκίνου του μαστού διαφέρουν ως προς την ποσότητα αλλά και σύσταση των TILs, γεγονός που συνεπάγεται από διαφορετικά επίπεδα ανοσογονικότητας<sup>28</sup>. Οι παρατηρήσεις αυτές ανοίγουν τον δρόμο για έναν πιο εκλεπτυσμένο και ολοκληρωμένο χαρακτηρισμό των διαφορετικών υποτύπων του καρκίνου του μαστού, ο οποίος θα βασίζεται όχι μόνο στις ιστολογικές, μοριακές και γονιδιακές τροποποιήσεις αλλά και στο ανοσολογικό μικροπεριβάλλον του όγκου. Η βελτίωση λοιπόν

της κατηγοριοποίησης του καρκίνου του μαστού μέσω καλύτερης απεικόνισης της βλάβης, πιο ακριβούς μοριακού χαρακτηρισμού του όγκου αλλά και μέσω αναγνώρισης των όγκων με μεγαλύτερη ανοσογονικότητα, αναμένεται να οδηγήσει στη δημιουργία πιο αποτελεσματικών και εξατομικευμένων προγνωστικών υπογραφών και θεραπειών<sup>29</sup>.

### **1.2.1 Ανοσολογικές τροποποιήσεις στον καρκίνο του μαστού-Μηχανιστικός ρόλος**

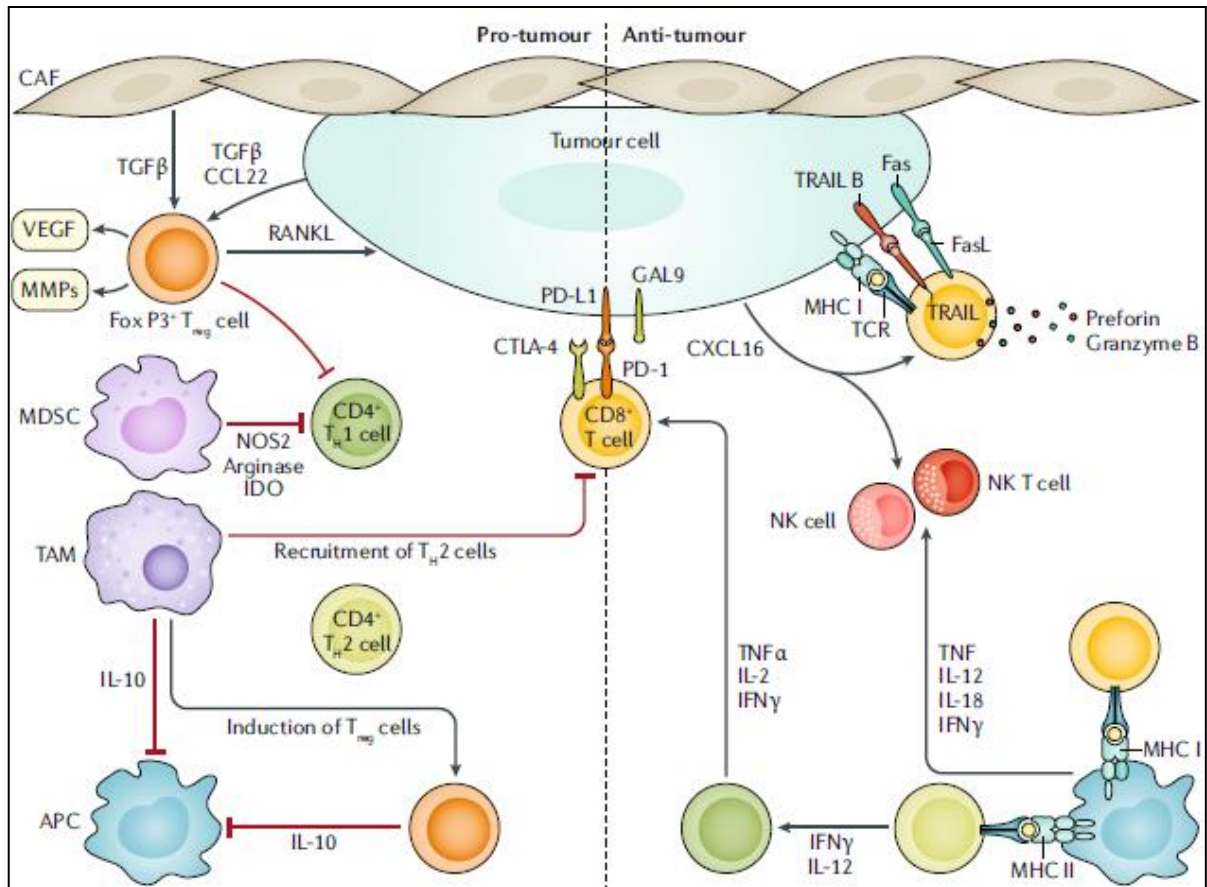
Στον φυσιολογικό μαστικό αδένα, τα ανοσοποιητικά κύτταρα σχηματίζουν έναν ενεργό και δραστικό φραγμό ενάντια στα διάφορα παθογόνα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες στον μαστό ανιχνεύονται λευκοκύτταρα, στα οποία περιλαμβάνονται T κύτταρα (τα οποία εκφράζουν τους δείκτες CD3, CD4 ή CD3, CD8), B κύτταρα (CD20), μακροφάγα (CD68), και δενδριτικά κύτταρα (CD11c). Τα κύτταρα αυτά εντοπίζονται αποκλειστικά εντός των λοβών, όπου τα T κύτταρα σχετίζονται απευθείας με το επιθηλιακό στρώμα. Η ποσότητα των μακροφάγων και των CD4 T κυττάρων είναι σχετικά σταθερή σε αντίθεση με αυτή των CD8 T κυττάρων, η οποία επηρεάζεται από τις ορμονικές αλλαγές και παρουσιάζει την μεγαλύτερη αύξηση κατά την ωχρινική φάση του έμμηνου κύκλου<sup>30,31</sup>. Η μετάβαση από τον φυσιολογικό μαστικό ιστό στον κακοήγη συνήθως συνοδεύεται από αυξημένη διείσδυση των λευκοκυττάρων, στα οποία περιλαμβάνονται τα μυελοειδή κύτταρα, τα B κύτταρα και τα κυτταροτοξικά CD8 T κύτταρα. Αρχικά στα προκαρκινικά DCIS παρατηρείται αυξημένη λεμφοκυτταρική διείσδυση, η οποία είναι υψηλότερη στα HER2(+) αλλά και στα τριπλά αρνητικά DCIS σε σχέση με τα HR+ DCIS. Στα DCIS καρκινώματα, ο αριθμός των ουδετερόφιλων είναι σημαντικά αυξημένος σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό, ωστόσο σε αυτό το στάδιο ο πιο συχνός υποπληθυσμός λεμφοκυττάρων είναι τα ενεργοποιημένα T κύτταρα και ακολουθούν τα B κύτταρα και τα T ρυθμιστικά λεμφοκύτταρα (Tregs: CD4, CD25, FOXP3)<sup>32,33</sup>.

Τα μέχρι τώρα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η ανοσολογική απόκριση στον καρκίνο του μαστού ξεκινά με την έκφραση των νέο-αντιγόνων από τα καρκινικά κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια παρουσιάζονται από τα αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα (APCs) στο μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας τάξης I και II (MHCI, MHCII). Η παρουσίαση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των CD8+ (κυτταροτοξικά) και CD4+ (βοηθητικά) T κύτταρα, με τα πρώτα να αποτελούν τον κύριο τελεστή της αντικαρκινικής ανοσολογικής απόκρισης. Η ενεργοποίηση των CD8+ T κυττάρων, η οποία συντελείται κυρίως μέσω των υποδοχέων των T κυττάρων (TCR), έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση των κυτταροτοξικών ουσιών περφορίνη και granzyme B, τα οποία απευθείας επάγουν την λύση των καρκινικών κυττάρων. Η αντικαρκινική δράση των CD8+ T κυττάρων ενισχύεται από τις



κυττοκίνες IFN $\gamma$ , IL-2 και TNF που εκκρίνονται από τα CD4+ T κύτταρα. Τα ενεργοποιημένα CD8+ T κύτταρα επάγουν επίσης την υπερέκφραση στην μεμβράνη τους του Fas προσδέτη (FasL) και του TRAIL, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του αποπτωτικού μηχανισμού στα καρκινικά κύτταρα. Τα καρκινικά κύτταρα επίσης προκαλούν μία έμφυτη ανοσολογική απόκριση, η οποία περιλαμβάνει τα φυσικά κύτταρα φονιάδες, επίσης γνωστά σαν natural killer T κύτταρα, τα οποία είναι ικανά να κατευθύνουν τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων<sup>33</sup>.

Από την άλλη πλευρά τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αναστείλουν την ανοσολογική απόκριση μέσω έκφρασης των ρυθμιστών των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος. Παραδείγματα τέτοιων ρυθμιστών είναι οι cytotoxic T lymphocyte- associated protein 4 (CTLA-4) και ο programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1). Τα μόρια αυτά υπερεκφράζονται από τα T κύτταρα σαν αποτέλεσμα της χρόνιας έκθεσης στα καρκινικά αντιγόνα. Η μειωμένη αντικαρκινική ανοσολογική απόκριση που οφείλεται στην υπερέκφραση των ρυθμιστών των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος καθιερώνει ένα προ-καρκινικό μικροπεριβάλλον, το οποίο εμπλουτίζεται περαιτέρω από τη στρατολόγηση ανοσοκατασταλτικών κυττάρων, T ρυθμιστικών κυττάρων (Treg) και στρωματικών κυττάρων που προέρχονται από τα μυελώδη (MDSCs). Τα κύτταρα Treg, τα οποία αναστέλλουν την ενεργοποίηση των CD4+ and CD8+ T κυττάρων, ενεργοποιούνται από όγκο-σχετιζόμενα μακροφάγα (TAMs) και από αυξητικούς παράγοντες που εκκρίνονται από τον όγκο ή από ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο (π.χ. TGF $\beta$ ). Επιπρόσθετα, τα κύτταρα TAMs και Treg αναστέλλουν τη δράση των APCs, μέσω της έκκρισης της IL-10, επάγοντας έτσι μία κατάσταση ανοχής στα APCs. Επιπλέον, τα MDSCs επιστρατεύονται στο μικροπεριβάλλον του όγκου από παράγοντες που εκκρίνονται από αυτόν, με αποτέλεσμα α) την αναστολή της μετακίνησης των T κυττάρων σε αυτή την περιοχή και β) την υπερέκφραση των ενζύμων 2,3-indoleaminedioxygenase (IDO) και αργινάση, τα οποία εμπλέκονται στην εξάντληση των θρεπτικών ουσιών των T κυττάρων, με τελικό αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης αυτών των κυττάρων. (Εικόνα 1.5). Το σύνολο των ουσιών που εκκρίνονται από προ-καρκινικό μικροπεριβάλλον περιέχει παράγοντες που ενεργοποιούν την αγγειογένεση και τη διήθηση (π.χ. VEGF και MMPs) και συμβάλλει στη διαφυγή του όγκου από την ανοσολογική επιτήρηση και τελικά στην διάδοση και εξέλιξή του<sup>7</sup>.



Εικόνα 1.5 Ανοσολογικές τροποποιήσεις στον καρκίνο του μαστού<sup>7</sup>

### 1.2.2 Ανοσολογικές τροποποιήσεις στον καρκίνο του μαστού-Κλινικός ρόλος

Οι παραπάνω τροποποιήσεις ωστόσο φαίνεται να έχουν και κλινική αξία αφού αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι σχετίζονται με την πρόγνωση του καρκίνου μαστού ενώ κάποια από αυτά τα μόρια αποτελούν ήδη θεραπευτικούς στόχους. Επιπλέον έχειδειχθεί ότι οι διαφορετικοί μοριακοί υπότυποι χαρακτηρίζονται από διαφορετικές αναλογίες συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων του ανοσοποιητικού συστήματος, γεγονός που επιτρέπει τη βελτίωση της περιγραφής και του χαρακτηρισμού των συγκεκριμένων υπότυπων. Για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι οι ER-αρνητικοί όγκοι έχουν μεγαλύτερο αριθμό TILs (T και B κύτταρα, μακροφάγα και MDSCs) σε σχέση με τους ER-θετικούς όγκους.

Σε ότι αφορά την προγνωστική αξία του ανοσολογικού μικροπεριβάλλοντος στον καρκίνο του μαστού έχει βρεθεί ότι ο αυξημένος αριθμός των κυττάρων Treg στον καρκινικό ιστό αλλά και στο αίμα σχετίζεται με ευμενή πρόγνωση στους ER-αρνητικούς όγκους<sup>34</sup>, ενώ αντίθετα ο αυξημένος αριθμός MDSCs στο αίμα σχετίζεται με νόσο αυξημένων σταδίων και μικρότερη επιβίωση σε αυτούς τους όγκους<sup>35</sup>. Επιπλέον φαίνεται ότι η ύπαρξη αυξημένων ποσοστών λεμφοκυτταρικής διήθησης (>50%) σε τριπλά αρνητικούς καθώς και σε HER2-

θετικούς όγκους σχετίζεται με καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και βελτιωμένα ποσοστά επιβίωσης. Η διήθηση των όγκων σε ποσοστά μεγαλύτερα του 30% από Th1 βοηθητικά κύτταρα συνδέεται με μεγαλύτερα διαστήματα επιβίωσης χωρίς υποτροπές, ενώ αντίθετα η παρουσία Th2 κυττάρων σχετίζεται με χειρότερα ποσοστά επιβίωσης. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι ασθενείς με τριπλά αρνητικούς όγκους και αυξημένο αριθμό CD8+ TILs ανταποκρίνονται καλύτερα στη θεραπεία με anti-EGFR μονοκλωνικά αντισώματα<sup>36</sup>.

Ο αριθμός των TILs μπορεί επίσης να έχει και προβλεπτική αξία καθώς πολλές μελέτες δείχνουν ότι οι καθιερωμένες νέο-επικουρικές θεραπείες οδηγούν σε αύξηση του αριθμού των TILs και σε αλλαγές μικροπεριβάλλοντος του όγκου, ενώ αντίστροφα η παρουσία των TILs πριν από τη θεραπεία φαίνεται να μπορεί να προβλέψει την ανταπόκριση των ασθενών στη χημειοθεραπεία. Αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι ανοσογονιδιακές υπογραφές μπορούν να προβλέψουν την ανταπόκριση στη νεοεπικουρική χημειοθεραπεία ανεξάρτητα από μοριακό υπότυπο του όγκου ή τη θεραπευτική ουσία που χορηγείται<sup>37,38</sup>. Τα αυξημένα ποσοστά TILs (>60%) επίσης μπορούν να προβλέψουν την ανταπόκριση των ασθενών με καρκίνο του μαστού στη χημειοθεραπεία. Από την άλλη πλευρά η χημειοθεραπεία μπορεί να αλλάξει τη σύσταση των ανοσοποιητικών κυττάρων στον καρκινικό ιστό αλλά και στο αίμα και η αλλαγή φαίνεται συχνά έχει σημαντική προβλεπτική αξία. Για παράδειγμα στους ER αρνητικούς όγκους ο αριθμός των T και B κυττάρων πριν τη θεραπεία μπορεί να προβλέψει τη μακροχρόνια (>6 χρόνια) ανταπόκριση των ασθενών σε θεραπεία που βασίζεται στις ανθρακυκλίνες<sup>39</sup>. Ωστόσο η μεγαλύτερη κλινική αξία των μεταβολών του ανοσολογικού περιβάλλοντος που παρατηρούνται στον καρκίνο του μαστού είναι η χρήση τους σαν θεραπευτικοί στόχοι. Για παράδειγμα τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα που έχουν παρατηρηθεί από τη χρήση αναστολέων των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού (immune checkpoint inhibitors) σε διάφορους τύπους καρκίνου (π.χ. μελάνωμα, καρκίνος κεφαλής και τραχήλου, καρκίνος του πνεύμονα) έχει ανοίξει το δρόμο για την εφαρμογή αυτών των θεραπευτικών προσεγγίσεων και στον καρκίνο του μαστού. Αναλυτικότερα η αναστολή των σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων τα οποία στο στοχεύουν το CTLA-4 (Ipilimumab) και τον άξονα PD-1/PD-L1 (Nivolumab/Pembrolizumab) είναι μία ιδιαίτερα αποτελεσματική προσέγγιση για τη θεραπεία διάφορων καρκίνων μεταξύ των οποίων και ο καρκίνος του μαστού. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι το PD-L1 εκφράζεται στο 20% περίπου των περιπτώσεων τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού. Η αυξημένη αυτή έκφραση στην επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων οδηγεί σε μείωση του πολλαπλασιασμού και ταυτόχρονη αύξηση της απόπτωσης των T κυττάρων. Οι παρατηρήσεις αυτές παρέχουν πρόσφορο έδαφος για τη δοκιμή θεραπευτικών

ουσιών που στοχεύουν τον άξονα PD-1/PD-L1 στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού. Πράγματι τόσο το pembrolizumab (PD-1 αναστολέας) όσο και το Atezolizumab and (PD-L1 αναστολέας) έχουν μελετηθεί εκτενώς σε κλινικές μελέτες για την θεραπευτική τους αποτελεσματικότητα στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού. Πρόσφατα ο Διεθνής Οργανισμός Φαρμάκων και Τροφών (FDA) ενέκρινε τη χρήση του Atezolizumab σε συνδυασμό με Nab-paclitaxel σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένο ή τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού, των οποίων ο όγκος εκφράζει το μόριο PD-L1<sup>40</sup>. Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1.2) συνοψίζονται όλοι οι αναστολείς των ανοσολογικών σημείων ελέγχου που έχουν εγκριθεί από τον FDA για τη θεραπεία του καρκίνου (Hargadon KM, Int Immunopharmacol. 2018 Sep;62:29-39.).

*Πίνακας 1.2 Σύνοψη των εγκεκριμένων αναστολέων των ανοσολογικών σημείων ελέγχου στον καρκίνο από τον FDA*

<b>Θεραπεία</b>	<b>Στόχος</b>	<b>Κλινική δοκιμή</b>	<b>Ενδείξεις φαρμάκου</b>
<b>Ipilimumab (Yervoy®)</b>	<b>CTLA-4</b>	NCT00094653	Μη χειρουργήσιμο ή μεταστατικό μελάνωμα
		EORTC 18071	Επικουρική θεραπεία για το δερματικό μελάνωμα με παθολογική εμπλοκή τοπικών λεμφαδένων >1 mm μετά την πλήρη εκτομή, συμπεριλαμβανομένης της ολικής λεμφαδενοεκτομής
		NCT01445379, NCT01696045	Επέκταση της έγκρισης για μη χειρουργήσιμο ή μεταστατικό μελάνωμα σε παιδιά ασθενείς ηλικίας > 12 ετών
<b>Nivolumab (Opdivo®)</b>	<b>PD-1</b>	CheckMate-037 (NCT01721746)	Μη χειρουργήσιμο ή μεταστατικό μελάνωμα που έχει προχωρήσει μετά από θεραπεία με ipilimumab και, εάν η μετάλλαξη BRAF V600 είναι θετική, αναστολέα BRAF
		CheckMate-017 (NCT01642004)	Μεταστατικό πλακώδες NSCLC που έχει προχωρήσει μετά τη λήψη χημειοθεραπείας με βάση την πλατίνα
		CheckMate-057 (NCT01673867)	Μη-πλακώδες NSCLC που έχει προχωρήσει σε χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα; ασθενείς με EGFR ή ALK γονιδιακές αλλοιώσεις θα πρέπει να έχουν

---

προχωρήσει σε πρόοδο νόσου με θεραπεία εγκεκριμένη από τον FDA για αυτές τις αλλοιώσεις

CheckMate-025 (NCT01668784) Προχωρημένο καρκίνωμα νεφρικών κυττάρων μετά από προηγούμενη θεραπεία με αντι-αγγειογόνο θεραπεία

CheckMate-066 (NCT01721772) Μη χειρουργήσιμο ή μεταστατικό μελανώμα άγριου τύπου BRAF V600

CheckMate-039 (NCT01592370) , CheckMate-205 (NCT02181738) Κλασσικό λέμφωμα Hodgkin που έχει υποτροπιάσει ή προχωρήσει μετά από μεταμόσχευση αυτόλογων αιματοποιητικών αρχέγονων κυττάρων και brentuximab βαζοτίνη (Adcetris)

CheckMate-141 (NCT02105636) Υποτροπιάζων ή μεταστατικό SCCHN που έχει προχωρήσει σε / μετά από θεραπεία με βάση την πλατίνα

CheckMate-275 (NCT02387996) Τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα που έχει προχωρήσει κατά τη διάρκεια ή μετά από χημειοθεραπεία που περιέχει πλατίνα ή εντός 12 μηνών κατά τη χορήγηση νεοεπικουρικής ή επικουρικής θεραπεία με χημειοθεραπεία που περιέχει πλατίνα

CheckMate-142 (NCT02060188) Ανεπαρκής επιδιόρθωση DNA και υψηλή μικροδορυφορική αστάθεια μεταστατικού καρκίνου παχέος εντέρου που έχει προχωρήσει μετά από θεραπεία με φθοροπυριμιδίνη, οξαλιπλατίνα και irinotecan σε ασθενείς ηλικίας  $\geq 12$  ετών

CheckMate-040 (NCT01658878) Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα που έχει προηγουμένως λάβει θεραπεία με sorafenib

CheckMate-238 (NCT02388906) Επικουρική θεραπεία για ασθενείς με μελάνωμα με θετικούς λεμφαδένες ή ασθενών με μεταστατική νόσο που έχουν υποβληθεί σε πλήρη εκτομή

---

<b>Ipilimumab+nivolumab</b>	<b>CTLA-4+PD-1</b>	CheckMate-069 (NCT01927419)	BRAF V600 άγριου τύπου, μη χειρουργήσιμο ή μεταστατικό μελάνωμα
		CheckMate-067 (NCT01844505)	Μη χειρουργήσιμο ή μεταστατικό μελάνωμα, ανεξάρτητα από την κατάσταση μετάλλαξης BRAF V600
		CheckMate-214 (NCT02231749)	Ενδιάμεσου ή χαμηλού ρίσκου, σε ασθενείς μεκαρκίνωμα νεφρικών κυττάρων που δεν έχουν λάβει θεραπεία
		KEYNOTE-006 (NCT01866319), KEYNOTE-002 (NCT01704287)	Διευρυμένη έγκριση ως θεραπεία πρώτης γραμμής για μη χειρουργήσιμο ή μεταστατικό μελάνωμα
		KEYNOTE-012 (NCT01848834)	Υποτροπιάζων ή μεταστατικό HNSCC που έχει προχωρήσει μετά από τη χορήγηση χημειοθεραπείας με βάση την πλατίνα
<b>Pembrolizumab (Keytruda®)</b>	<b>PD-1</b>	KEYNOTE-087 (NCT02453594)	Παιδιατρικό ανθεκτικό κλασικό λέμφωμα Hodgkin ενηλίκων ή ενηλίκων / παιδιατρικό κλασικό Hodgkin λέμφωμα

που έχει υποτροπιάσει μετά από 3 ή περισσότερες γραμμές θεραπείας

KEYNOTE-021 (NCT02039674) Συνδυασμός πεμετρεξίδης και καρβοπλατίνας για μη πλακώδες NSCLC χωρίς προηγούμενη λήψη θεραπείας

KEYNOTE-045 (NCT02256436) Τοπικά προχωρημένος ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα που έχει προχωρήσει κατά τη διάρκεια ή μετά από χημειοθεραπεία που περιέχει πλατίνα ή εντός 12 μηνών από νεοεπικουρική ή επικουρική θεραπεία με χημειοθεραπεία που περιέχει πλατίνα; τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα σε ασθενείς που δεν είναι επιλέξιμοι για τη λήψη χημειοθεραπείας cisplatin

KEYNOTE-016 (NCT01876511) , KEYNOTE-164 (NCT02460198) ,

KEYNOTE-012 (NCT01848834) , KEYNOTE-

028 (NCT02054806) ,

dMMR καρκίνου του παχέος εντέρου που έχει προχωρήσει μετά από λήψη θεραπείας με φθοροπυριμιδίνη, οξαλιπλατίνη και ιρινοτεκάνη

KEYNOTE-158 (NCT02628067)

KEYNOTE-059 (NCT02335411) Τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό γαστρικό ή αδenoκαρκίνωμα του γαστροοισοφαγικού συνδέσμου στο οποίο οι όγκοι εκφράζουν PD-L1 με δοκιμή εγκεκριμένη από την FDA; οι ασθενείς πρέπει να έχουν εξέλιξη της νόσου μετά τη λήψη δύο ή περισσότερων προηγούμενων συστηματικών θεραπειών, συμπεριλαμβανομένων των φθοροπυριμιδίνη και χημειοθεραπεία που

			περιέχει πλατίνα και, εάν είναι κατάλληλο, HER2 / στοχευόμενων θεραπειών
<b>Atezolizumab (Tecentriq®)</b>	<b>PD-L1</b>	IMvigor210 (NCT02108652)	Τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα που έχει προχωρήσει κατά τη διάρκεια ή μετά από χημειοθεραπεία που περιέχει πλατίνα ή εντός 12 μηνών από νεοεπικουρική ή επικουρική θεραπεία με χημειοθεραπεία που περιέχει πλατίνα
		POPLAR (NCT01903993), OAK (NCT02008227)	Μεταστατικό NSCLC που έχει προχωρήσει κατά τη διάρκεια ή μετά από τη χρήση χημειοθεραπείας με πλατίνα. Οι ασθενείς με EGFR ή ALK γονιδιακές ανωμαλίες θα πρέπει να έχουν πρόοδο νόσου με τη λήψη εγκεκριμένων FDA-θεραπειών για αυτές τις αλλοιώσεις
		IMvigor210 (NCT02108652)	Θεραπεία πρώτης γραμμής για τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα σε ασθενείς που είναι καταλλήλαιο για τη χορήγηση cisplatin
<b>Avelumab (Bavencio®)</b>	<b>PD-L1</b>	JAVELIN Merkel 200 (NCT02155647)	Μεταστατικό καρκίνωμα κυττάρων Merkel σε ασθενείς > 12 ετών
		JAVELIN Solid Tumor (NCT01772004)	Τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα που έχει προχωρήσει κατά τη διάρκεια ή μετά από χημειοθεραπεία που περιέχει πλατίνα ή εντός 12 μηνών με τη λήψη νεοεπικουρικής ή επικουρικής θεραπείας με χημειοθεραπεία που περιέχει πλατίνα
<b>Durvalumab (Imfinzi®)</b>	<b>PD-L1</b>	Study 1108 (NCT01693562)	Τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα που έχει προχωρήσει κατά τη διάρκεια ή μετά από χημειοθεραπεία που περιέχει πλατίνα ή εντός 12 μηνών με τη λήψη νεοεπικουρικής ή επικουρικής θεραπείας με χημειοθεραπεία που περιέχει πλατίνα



	PACIFIC (NCT02125461)	Μη χειρουργήσιμο NSCLC σταδίου III που δεν έχει προχωρήσει μετά από ταυτόχρονη λήψη χημειοθεραπείας με πλατίνα και ακτινοθεραπεία
--	--------------------------	---

### 1.2.3 Το ανοσοποιητικό σημείο ελέγχου PD-1/PD-L1

Το PD-1 είναι ένας ανασταλτικός υποδοχέας της CD28 οικογένειας που εκφράζεται σε διάφορα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται τα T και B λεμφοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα. Η έκφραση του PD-1 αυξάνεται μετά την ενεργοποίηση μέσω του TCR υποδοχέα και παρατηρείται σε ενεργοποιημένα αλλά και εξασθενημένα T κύτταρα. Αυτά τα εξασθενημένα T κύτταρα. Σε γενικές γραμμές το συγκεκριμένο σημείο ελέγχου παίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της ισορροπίας ανάμεσα στην προστατευτική ανοσία και την ανοσοπαθολογία. Πιο αναλυτικά η κύρια λειτουργία του υποδοχέα PD-1 δεν είναι αυτή που δηλώνει το όνομα του, δηλαδή η επαγωγή του κυτταρικού θανάτου, αλλά η αναστολή του TCR συμβάλλοντας έτσι στη ρύθμιση της ενεργοποίησης, της επιβίωσης, της λειτουργίας και της ανθεκτικότητας των T κυττάρων. Ωστόσο, θα πρέπει να τονιστεί ότι σε περιπτώσεις χρόνιας φλεγμονής αλλά και καρκίνου, η έκφραση του PD-1 μπορεί να περιορίσει την προστατευτική ανοσία.

Το PD-1 ανακαλύφθηκε το 1992 σαν ένα μόριο που σχετίζεται με τον προγραμματισμένο θάνατο των T κυττάρων, ωστόσο ο κύριος ρόλος του σαν ανασταλτικός υποδοχέας που ρυθμίζει αρνητικά τη δραστική λειτουργία των T κυττάρων αναγνωρίστηκε πολύ αργότερα όταν βρέθηκε ότι η απουσία της έκφρασης του σε διαγονιδιακά ποντίκια που φέρουν PD-1 - / - T κύτταρα εμφανίζουν αυτοάνοσα νοσήματα<sup>41</sup>. Λίγα χρόνια αργότερα βρέθηκε ότι τα μόρια PD-L1 και PD-L2 λειτουργούν σαν προσδέτες του PD-1 και η αλληλεπίδραση αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της δραστηριότητας των T κυττάρων<sup>42</sup>. Οι προσδέτες αυτοί είναι μέλη της B7 οικογένειας και μέχρι στιγμής είναι οι μόνοι γνωστοί προσδέτες του PD-1. Αν και τα PD-L1 και PD-L2 προσδένονται στον PD-1 και μεταδίδουν ανασταλτικά μηνύματα στα T κύτταρα, η έκφραση τους διαφέρει σημαντικά<sup>43</sup>. Το PD-L2 εκφράζεται σε σχετικά λίγα κύτταρα και ιστούς αλλά υπερεκφράζεται στα ενεργοποιημένα APCs. Η έκφραση του PD-L1 είναι πιο ποικιλόμορφη καθώς εντοπίζεται στα B κύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα και αυξάνεται μετά από ενεργοποίηση. Η έκφραση του PD-L1 έχει επίσης εντοπιστεί σε πολλούς μη αιμοποιητικούς ιστούς, όπως η καρδιά, το πάγκρεας, ο πλακούντας, το ήπαρ, ο πνεύμονας και το δέρμα. Το

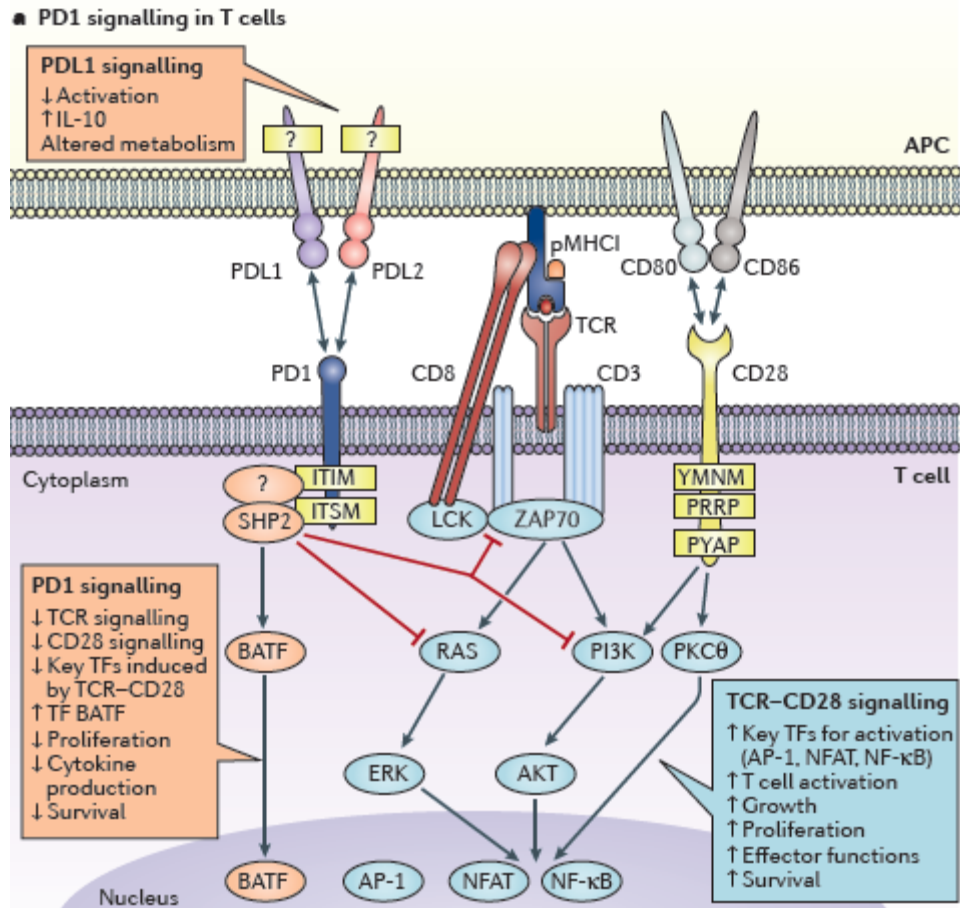
μόριο αυτό συχνά υπερεκφράζεται σε διάφορους καρκίνους και αποτελεί έναν μηχανισμό διαφυγής των καρκινικών κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα<sup>44</sup>.

### 1.2.3.1 PD-1 σηματοδοτικό μονοπάτι και μοριακοί μηχανισμοί

Ο υποδοχέας PD1 και οι προσδέτες του είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και αποτελούνται από μία εξωκυττάρια και μία διαμεμβρανική περιοχή καθώς και μία ουρά που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και η οποία περιλαμβάνει δύο μοτίβα τυροσίνης. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του PD-1 ενεργοποιείται μετά την αλληλεπίδραση του με τους προσδέτες του, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης και κατά συνέπεια την πρόσδεση σε αυτήν την περιοχή πρωτεϊνών με δράση φωσφατάσης τυροσίνης (protein tyrosine phosphatases -PTPs)<sup>45</sup>. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να αποφωσφορυλιώνουν διάφορες κινάσες και να ανταγωνίζονται ενεργοποιητικά σινιάλα που διαμεσολαβούνται από τους TCR και CD28. Με αυτόν τον τρόπο επηρεάζονται κατωροϊκά σηματοδοτικά μονοπάτια μεταξύ των οποίων τα (PI3K)–AKT, RAS, ERK, VAV και PLCγ<sup>46</sup>. Έτσι η ενεργοποίηση του PD-1 οδηγεί σε αναστολή του μονοπατιού RAS του οποίου η δράση επάγεται από τον ενεργοποιημένο TCR και προωθεί την κυτταρική επιβίωση και πολλαπλασιασμό<sup>47</sup>. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του PD-1 αναστέλλει επίσης την ενεργοποίηση του PI3K και του αντίστοιχου μονοπατιού<sup>48</sup>. Άλλη μία συνέπεια της ενεργοποίησης του PD-1 μονοπατιού είναι η μείωση τόσο του πολλαπλασιασμού των T κυττάρων όσο και της σύνθεσης διαφόρων κυτταροκινών όπως ο TNF-α, η ιντερφερόνη γ IFN- γ, και η ιντερλευκίνη 2 (IL-2)<sup>49</sup>.

Η ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού συνοδεύεται από μείωση της λειτουργίας της φωσφορυλιωμένης Akt και αύξηση της PTEN. Έχει επίσης βρεθεί ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι Akt αποτελεί έναν ισχυρό αναστολέα της ανάπτυξης των iTreg κυττάρων (inducible regulatory T cells). Ο συνδυασμός αυτών των δράσεων δικαιολογεί την παρατήρηση ότι ο PD-L1 παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των iTreg κυττάρων<sup>50</sup>.

Πρόσφατα βρέθηκε επιπλέον ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι του PD-1 επηρεάζει τον μεταβολισμό των T κυττάρων, καθώς οδηγεί σε αναστολή της γλυκόλυσης και του μεταβολισμού των αμινοξέων, προωθώντας παράλληλα την οξειδωση των λιπαρών οξέων. Αυτές οι δράσεις στον μεταβολισμό των T κυττάρων συνάδουν με την αναστολή της δράσης των T κυττάρων και εξηγεί εν μέρει το μηχανισμό της ελαττωματικής λειτουργίας των PD-1 θετικών T κυττάρων<sup>51</sup>. Το αποτέλεσμα αυτών των επιδράσεων είναι η μείωση της ενεργοποίησης, του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης των T κυττάρων, η παραγωγή κυτοκινών και η τροποποίηση του μεταβολισμού<sup>46</sup>. (Εικόνα 1.6)



Εικόνα 1.6 Το σηματοδοτικό μονοπάτι του PD-1/PD-L1

### 1.2.3.2 Έκφραση των PD-1/PD-L1

Έκφραση του υποδοχέα PD-1 παρατηρείται σε  $CD4^+CD8^+$  T κύτταρα καθώς και σε ένα μικρό αριθμό κυττάρων των λεμφαδένων, του σπλήνα και του μυελού των οστών. Τα επίπεδα του PD-1 (mRNA ή πρωτεΐνης) είναι πολύ χαμηλά και μπορούν να ανιχνευθούν μετά από περίοδο ενεργοποίησης. Πολλοί παράγοντες μπορούν να επάγουν την έκφραση του συγκεκριμένου υποδοχέα μεταξύ των οποίων διάφορες κυτοκίνες καθώς και παράγοντες που ενεργοποιούν το σηματοδοτικό μονοπάτι των BCR και TCR. Έχει επίσης αναφερθεί ότι η ενεργοποίηση των οιστρογόνων μπορεί να προωθήσει την έκφραση του PD-1 στα T λεμφοκύτταρα αλλά και στα APCs<sup>52</sup>. Η έκφραση του υποδοχέα στους φυσιολογικούς ιστούς δείχνει ότι το PD-1/PD-L1 σηματοδοτικό μονοπάτι μπορεί να εμποδίσει την ιστική φλεγμονή και συμβάλει στη διατήρηση της ομοιόστασης. Όμως έχει αναφερθεί, πως η έκφραση του PD-L1 παρατηρείται επίσης σε καρκινικούς ιστούς και παίζει σημαντικό ρόλο στην αποφυγή της ανοσοποιητικής απόκρισης των καρκινικών κυττάρων. Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι σε χρόνιες ιικές μολύνσεις, η έκφραση του υποδοχέα PD-1 υπερεκφράζεται επιλεκτικά στα

εξασθενημένα CD8 T κύτταρα. Επιπλέον ενώ η παροδική έκφραση του PD-1 παρατηρείται κατά την αρχική ενεργοποίηση των T κυττάρων, η επαναρύθμιση και η διατήρηση της έκφρασης του υποδοχέα στα T κύτταρα λαμβάνει χώρα μετά από παρατεταμένη έκθεση σε αντιγόνα, όπως συμβαίνει κατά τη διάρκεια της χρόνιας ιογενούς λοίμωξης και στο πλαίσιο της προόδου των όγκων<sup>49</sup>.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον PD-L1 (*CD274*) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 9p24.1 και απέχει μόλις 42 KB από το PD-L2. Έχει αναφερθεί ότι η υπερέκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου σχετίζεται με ενίσχυση ή μετατόπιση του, ενώ παράλληλα φαίνεται ότι διάφορα φλεγμονώδη σινιάλα και δίκτυα σηματοδότησης που συχνά δραστηριοποιούνται στο μικροπεριβάλλον του όγκων, ενισχύουν την έκφραση των PD-L1 και PD-L2<sup>53</sup>. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναγνωριστεί διάφοροι διαλυτοί παράγοντες που παράγονται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος οι οποίοι δρουν σαν ρυθμιστές των επιπέδων έκφρασης του PD-L1. Η ιντερφερόνη γ αποτελεί τον βασικό εκπρόσωπο αυτών των ουσιών και φαίνεται ότι ο τρόπος που ρυθμίζει την έκφραση του PD-L1 διαφέρει μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και αυτών του ανοσοποιητικού συστήματος. Η έκφραση του PD-L1 ελέγχεται επίσης από διάφορα miRNAs. Σε αυτά τα miRNAs περιλαμβάνονται τα miR-155, miR-513, miR-34a, miR-142-5p, miR-93, miR-106b, miR-138-5p, miR-200, miR-152, miR-570, miR-17-5p, miR-15a, miR-193a, miR-16, miR-148a-3p, and miR-873<sup>54</sup>.

Ο PD-L1 εκφράζεται σε διάφορα επίπεδα σε μυελοειδή κύτταρα αλλά και σε πολλά καρκινικά κύτταρα. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση του συγκεκριμένου μορίου σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα, η οποία οφείλεται στη δράση ποικίλων προ-φλεγμονωδών ερεθισμάτων. Η έκφραση του PD-L1 ρυθμίζεται μέσω της πρόσδεσης συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου και η πρόσδεση αυτή φαίνεται ότι οφείλεται στη δράση των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών. Για παράδειγμα γνωρίζουμε ότι η ιντερφερόνη γ, που παράγεται από τα T κύτταρα, ενεργοποιεί το JAK σηματοδοτικό μονοπάτι το οποίο με τη σειρά του πυροδοτεί έναν καταρράκτη αντιδράσεων του οποίου το τελικό αποτέλεσμα είναι η ενεργοποίηση της μεταγραφής του PD-L1 γονιδίου<sup>55</sup>.

### **1.2.3.3 Φυσιολογικός ρόλος του σημείου ελέγχου PD-1**

Το μονοπάτι του PD-1 αποτελεί έναν κρίσιμο ρυθμιστή της φυσιολογίας του οργανισμού. Ο συγκεκριμένος υποδοχέας εκφράζεται από όλα T κύτταρα κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησής τους και λειτουργεί σαν ένα φυσικό φρένο που περιορίζει την υπερενεργοποίηση των T κυττάρων. Χωρίς τον υποδοχέα PD-1 η υπερβολική ανοσο-

μεσολαβούμενη καταστροφή των ιστών θα μπορούσε να έχει καταστροφικές συνέπειες για την ομοιότητα του ξενιστή. Επιπρόσθετα, ο PD-1 παίζει σημαντικό ρόλο στην κεντρική και περιφερική ανοχή των T κυττάρων βοηθώντας με αυτόν τον τρόπο στην προστασία των ιστών από αυτοάνοσες αντιδράσεις<sup>46</sup>.

Το μονοπάτι PD-1 βρίσκεται στο επίκεντρο των ερευνών εξαιτίας του ρόλου του στη ρύθμιση της απόκρισης των T κυττάρων στον καρκίνο αλλά και στη χρόνια φλεγμονή, καταστάσεις στις οποίες η παρατεταμένη έκθεση των T κυττάρων στο αντιγόνο μπορεί να οδηγήσει στη εξασθένιση αυτών των κυττάρων. Ωστόσο σημαντική είναι και η συμβολή του PD-1 στη διαμόρφωση της έντασης της ανταπόκρισης των T κυττάρων, στην ισορροπημένη διαφοροποίηση και απόπτωση αυτών των κυττάρων αλλά και στην ανάπτυξη της ανοσολογικής μνήμης. Μια σημαντική επίσης λειτουργία του συγκεκριμένου μονοπατιού είναι η έγκαιρη αναστολή της φλεγμονής και η αποκατάσταση της ανοσολογικής ομοιότητας με τελικό αποτέλεσμα τον περιορισμό των ανοσοπαθολογικών αποκρίσεων στους ιστούς του ξενιστή. Αναλυτικότερα, εάν οι αποκρίσεις των CD8+ T κυττάρων δεν βρίσκονταν υπό αυστηρό έλεγχο, θα μπορούσε να προκληθεί οξεία ανοσοπαθολογία και/ή ανεξέλεγκτος κυτταρικός θάνατος λόγω της παραγωγής προ-φλεγμονοδών κυτοκινών (π.χ. IFN $\gamma$  και TNF)<sup>46</sup>.

Το μονοπάτι αυτό παίζει επίσης σημαντικό ρόλο και στη ρύθμιση της διαφοροποίησης και δράσης των T κυττάρων μνήμης. Πολλοί παράγοντες που εμπλέκονται στην δράση των T κυττάρων συμβάλλουν και στη διαμόρφωση του μεγέθους και της ποιότητας του αποθέματος των T κυττάρων μνήμης που δημιουργείται μετά την αντιμετώπιση και απομάκρυνση του αντιγόνου. Τέτοιοι παράγοντες είναι η ισχύς της αλληλεπίδρασης του TCR με το MHC σύμπλοκο, η διάρκεια της TCR σηματοδότησης και η σύσταση του μικροπεριβάλλοντος της φλεγμονής. Το PD-1 μονοπάτι συντονίζει την TCR σηματοδότηση και συνεπώς κατέχει θέση-κλειδί στη διαμόρφωση της απόκρισης των T κυττάρων μνήμης<sup>46</sup>.

Το PD-1 μονοπάτι έχει επίσης πολλαπλούς ρόλους στη ρύθμιση των αυτοδραστικών T κυττάρων στην περιφέρεια. Για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι η απώλεια του PD-1 σε πειραματικά μοντέλα, επιταχύνει την αυτοανοσία. Επιπλέον, ο PD-1 περιορίζει την ενεργοποίηση, πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των αυτοδραστικών CD4+/CD8+ T κυττάρων στα δευτερογενή λεμφοειδή όργανα, ενώ παράλληλα ρυθμίζει σε αυτά τα κύτταρα την έκφραση των υποδοχέων των κυτοκινών<sup>46</sup>.

#### 1.2.3.4 Ρόλος των PD-1/PD-L1 στον καρκίνο

Μία τακτική που υιοθετείται από τα καρκινικά κύτταρα για να ξεφεύγουν από το ανοσοποιητικό σύστημα είναι η αναστολή της δράσης των κυτταροτοξικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Η αναστολή αυτή επιτυγχάνεται μέσω της PD-1/PD-L1 αλληλεπίδρασης, η οποία όπως είναι γνωστό αποτελεί έναν αρνητικό ρυθμιστή της ανοσολογικής απόκρισης που διαμεσολαβείται από τα T κύτταρα. Επιπρόσθετα, το PD-L1 μπορεί να μεταδώσει απευθείας ενδοκυτταρικά αντιαποπτωτικά μηνύματα στα καρκινικά κύτταρα, επιτρέποντας τους με αυτόν τον τρόπο να "ξεφύγουν" από την κυτταροτοξικότητα των ιντερφερόνων. Το PD-L1 συχνά παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε διάφορους όγκους, γεγονός που οφείλεται στην αύξηση της μεταγραφής του αντίστοιχου γονιδίου, η οποία οφείλεται στη δράση των ιντερφερόνων. Ο PD-L1 μπορεί να εκφράζεται σε καρκινικά, στρωματικά και ανοσοποιητικά κύτταρα, στα οποία περιλαμβάνονται ασφαλώς και τα μυελοειδή και T κύτταρα που διηθούν τον όγκο. Μερικές μελέτες υποστηρίζουν ότι η έκφραση του PD-L1 στα καρκινικά κύτταρα επαρκεί για την εξέλιξη της νόσου, ενώ σε άλλες αναφέρεται ότι η έκφραση αυτού του μορίου παίζει σημαντικό ρόλο και συμβάλλει στην νόσο<sup>55</sup>.

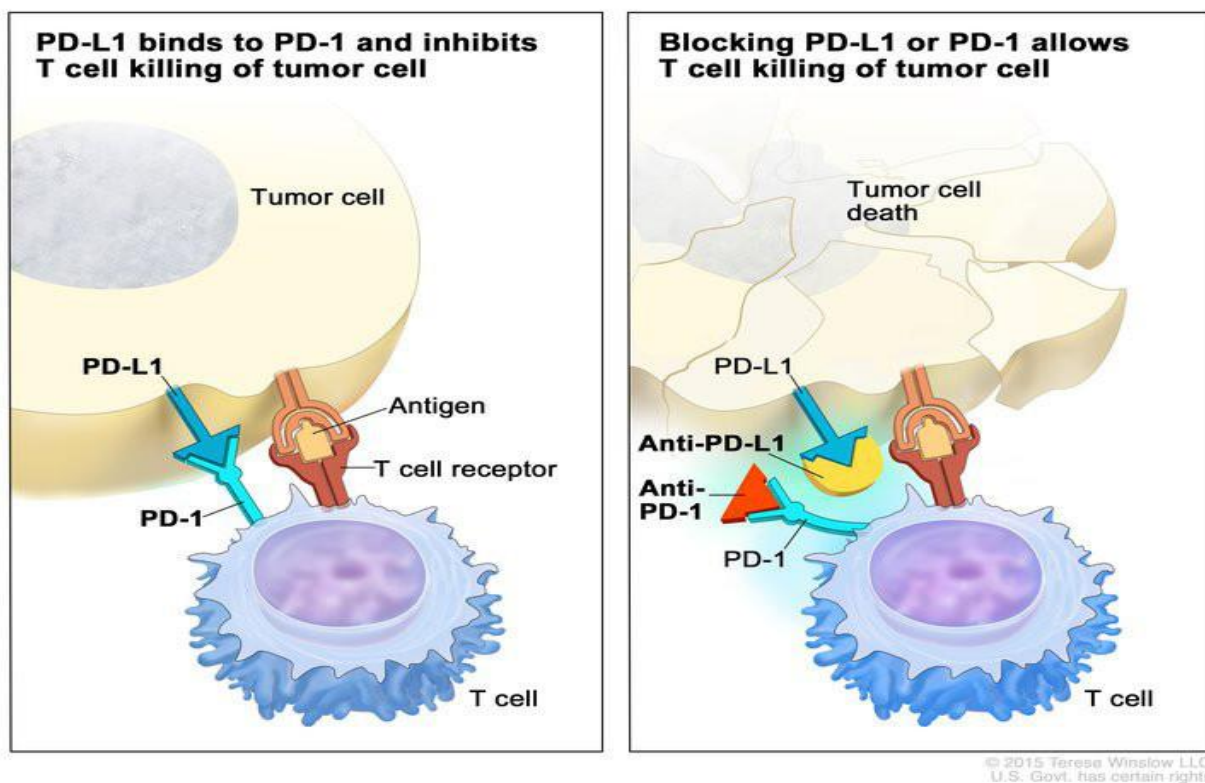
Οι περισσότερες μελέτες για τον ρόλο του PD-L1 στην εξέλιξη του καρκίνου βασίζονται στην ανασταλτική επίδραση που έχει η αλληλεπίδραση του με τον υποδοχέα PD-1 στην ενεργοποίηση των T κυτταροτοξικών κυττάρων. Πράγματι αρχικά είχε βρεθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν τον PD-L1 παρουσίαζαν αυξημένη ανθεκτικότητα στην κυτταροτοξικότητα των T κυττάρων και έμοιαζε να λειτουργεί σαν ένας "προστατευτικός μανδύας" ο οποίος αναστέλλει τη δράση αυτών των ανοσοποιητικών κυττάρων. Αργότερα ωστόσο βρέθηκε ότι ο PD-L1 παρουσιάζει κάποιες σηματοδοτικές ιδιότητες, οι οποίες είναι ανεξάρτητες από την αλληλεπίδρασή του με τον PD-1. Έτσι, μια εναλλακτική εξήγηση της δράσης τους σαν "προστατευτικός μανδύας" ήταν ότι ο PD-L1 προσδίδει μία ανθεκτικότητα στα καρκινικά κύτταρα έναντι διαφόρων προ-αποπτωτικών σημάτων ενώ παράλληλα μεταδίδει ενδοκυτταρικά σινιάλα τα οποία προστατεύουν τα καρκινικά κύτταρα. Πληθώρα πειραματικών δεδομένων επιβεβαίωσαν αργότερα ότι ο PD-L1 παρέχει ανθεκτικότητα στον κυτταρικό θάνατο που διαμεσολαβείται από τα T κυτταροτοξικά κύτταρα και η δράση αυτή είναι ανεξάρτητη από την PD-1- εξαρτώμενη αναστολή της δράσης των T κυτταροτοξικών κυττάρων<sup>55</sup>.

Επίσης κάποια πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι ο PD-L1 έχει την ικανότητα μετάδοσης σημάτων τα οποία εμπλέκονται στην τροποποίηση του μεταβολισμού της

γλυκόζης, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο στην εξέλιξη της κακοήθειας. Πιο αναλυτικά τα καρκινικά κύτταρα καλύπτουν τις ενεργειακές τους ανάγκες μέσω της κατανάλωσης της γλυκόζης, η οποία βρίσκεται στο μικροπεριβάλλον του όγκου, προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο αναστολή της δράσης των T κυτταροτοξικών κυττάρων, η επιβίωση και λειτουργία των οποίων βασίζεται στην αερόβια γλυκόλυση. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η χορήγηση anti-PD-1 ή anti-PD-L1 παραγόντων αποκαθιστά τα επίπεδα της γλυκόζης στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Τέλος υπάρχουν πειραματικά δεδομένα τα οποία δείχνουν ότι το mTOR μονοπάτι, το οποίο έχει ουσιαστικό ρόλο στην παθογένεια διαφόρων τύπων καρκίνου, ρυθμίζεται από το PD-L1 και μάλιστα η ρυθμιστική αυτή ικανότητα είναι ανεξάρτητη από την πρόσδεση του στον υποδοχέα PD-1<sup>55</sup>.

### 1.2.3.5 Ανοσοποιητικοί αναστολείς σημείων ελέγχου που στοχεύουν το PD-1

Η παρατήρηση ότι ο αποκλεισμός του PD-1 μονοπατιού ενισχύει την αντι-καρκινική δράση των T κυτταροτοξικών κυττάρων έχει πυροδοτήσει την ανάπτυξη θεραπειών αναστολής των σημείων ελέγχου στοχεύοντας την PD-1 σε ασθενείς με καρκίνο και τα αποτελέσματα μέχρι τώρα είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά (Εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7 Μηχανισμός δράσης των εγκεκριμένων από τον FDA αναστολέων του ανοσολογικού σημείων ελέγχου PD-1 στη θεραπεία του καρκίνου

Ο πρώτος θεραπευτικός παράγοντας αυτής της κατηγορίας ήταν το ανθρώπινο IgG4κ μονοκλωνικό αντίσωμα, nivolumab (Opdivo®, Bristol-Myers Squibb) και εγκρίθηκε από τον FDA το 2014. Ο FDA προχώρησε στην έγκριση του συγκεκριμένου σκευάσματος λόγω των αποτελεσμάτων της κλινικής δοκιμής CheckMate-037, σύμφωνα με την οποία ασθενείς με μη χειρουργήσιμο ή μεταστατικό μελάνωμα, οι οποίοι εμφάνισαν εξέλιξη της νόσου μετά από τη θεραπεία με Ipilimumab ± έναν αναστολέα BRAF εμφάνισαν βελτιωμένα ποσοστά αντικειμενικής ανταπόκρισης στο Nivolumab σε σχέση με τη χορήγηση χημειοθεραπείας<sup>56</sup>. Το Nivolumab έχει εγκριθεί από τότε ως θεραπεία πρώτης γραμμής για ασθενείς με μελάνωμα χωρίς μετάλλαξη *BRAF*<sup>57</sup>. Πρόσφατα, εγκρίθηκε επίσης η χορήγηση του ως επικουρική θεραπεία για ασθενείς με μελάνωμα σταδίου III / IV που έχουν υποβληθεί σε πλήρη εκτομή<sup>56</sup>). Ένας άλλος αναστολέας του ανοσοποιητικού σημείου ελέγχου έναντι του PD-1 που έχει λάβει σημαντική προσοχή τα τελευταία χρόνια είναι το Pembrolizumab, το οποίο χορηγείται ως δεύτερη γραμμή θεραπείας σε ασθενείς με μη χειρουργήσιμο ή μεταστατικό μελάνωμα<sup>58</sup>.

#### **1.2.3.6 Αναστολείς ανοσοποιητικού σημείου ελέγχου που στοχεύουν το PD-L1**

Στην ίδια λογική έχουν αναπτυχθεί και αναστολείς ανοσοποιητικών σημείων ελέγχου που στοχεύουν τον PD-L1 (Εικόνα 1.7). Το Atezolizumab αποτελεί τον πρώτο εκπρόσωπο αυτής της κατηγορίας καθώς εγκρίθηκε το 2016 ως θεραπεία αποκλεισμού σημείων ελέγχου, σε τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα και στο NSCLC. Σε ότι αφορά το ουροθηλιακό καρκίνωμα η χορήγηση του συγκεκριμένου παράγοντα προτιμάται έναντι της χημειοθεραπείας διότι αν και δεν προσφέρει μεγαλύτερο όφελος στην επιβίωση έχει λιγότερες παρενέργειες<sup>59</sup>. Αντίθετα στον NSCLC η χορήγηση του Atezolizumab συνοδεύεται από μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης σε σχέση με τη χημειοθεραπεία<sup>60</sup>. Τα Avelumab (Bavencio®, EMD Sorono, Inc. / Pfizer) και Durvalumab (Imfinzi®, AstraZeneca / MedImmune) είναι επίσης δύο αντί-PD-L1 αναστολείς που εγκρίθηκαν πρόσφατα από τον FDA για χορήγηση στο μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα που έχει εμφανίσει εξέλιξη νόσου μετά από προηγούμενη χημειοθεραπεία<sup>61,62</sup>.

#### **1.2.4 Το ανοσοποιητικό σύστημα στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού**

Ο καρκίνος του μαστού ανήκει στους καρκίνους που μπορούν να επάγουν την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Είναι πλέον επιβεβαιωμένο ότι συχνά οι μαστικοί όγκοι παρουσιάζουν λεμφοκυτταρική διήθηση και ο αριθμός των T κυττάρων που διηθούν τον όγκο παρουσιάζει θετική συσχέτιση με ευμενή πρόγνωση των ασθενών. Ωστόσο στην πλειονότητα των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού παρατηρείται περιορισμένη ή



ακόμα και απουσία διήθησης των T κυττάρων στον όγκο, γεγονός που οφείλεται σε διάφορους λόγους. Για παράδειγμα η σύσταση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου σε ότι αφορά τα ανοσοποιητικά κύτταρα οδηγεί σε αναστολή της λειτουργίας των CD8+ T κυττάρων και στην παρεμπόδιση της μετακίνησης τους στον όγκο. Επιπλέον, το 30%-50% του συνόλου των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού χαρακτηρίζεται από αυξημένη έκφραση του PD-L1 στην κυτταρική επιφάνεια με αποτέλεσμα να υπάρχει αυξημένη αλληλεπίδραση του PD-L1 με τον PD-1 που εντοπίζεται στην επιφάνεια των T κυττάρων, γεγονός που οδηγεί στην αναστολή της λειτουργίας των τελευταίων<sup>63</sup>. Τα τελευταία χρόνια γνωρίζουμε ότι οι διαφορετικοί μοριακοί υπότυποι του καρκίνου του μαστού διαφέρουν στο ποσοστό διήθησης τους από τα ανοσοποιητικά κύτταρα και οι τριπλά αρνητικοί όγκοι του μαστού παρουσιάζουν τα υψηλότερα ποσοστά τέτοιας διήθησης σε σύγκριση με τους υπόλοιπους υπότυπους. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι οι τριπλά αρνητικοί όγκοι του μαστού παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του PD-L1 τόσο σε mRNA όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, ενώ παράλληλα γνωρίζουμε ότι ένα σημαντικό ποσοστό αυτών των όγκων παρουσιάζουν συχνά ενίσχυση του συγκεκριμένου γονιδίου. Αυτές οι τροποποιήσεις στην έκφραση του PD-L1 δικαιολογούνται εν μέρει από το γεγονός ότι η έκφραση του PD-L1 σχετίζεται σημαντικά με τη παρουσία των TILs<sup>64</sup>.

Σε αυτούς τους όγκους η αυξημένη διήθηση φαίνεται να είναι ένας σημαντικός προγνωστικός και προβλεπτικός δείκτης, καθώς σχετίζεται με την ανταπόκριση στη θεραπεία και με μεγαλύτερη επιβίωση<sup>65,66</sup>. Πράγματι τα αποτελέσματα πολλών ανεξάρτητων μελετών συμφωνούν ότι τα αυξημένα ποσοστά λεμφοκυτταρικής διήθησης στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού σχετίζονται με: 1) καλύτερη ανταπόκριση pCR (pathologic complete response) στην νεοεπικουρική θεραπεία, 2) μεγαλύτερη χωρίς υποτροπές αλλά και ολική επιβίωση 3) με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης υποτροπών ή θανάτου. Χαρακτηριστικά αναφέρονται τα αποτελέσματα μίας μετά-ανάλυσης, (η οποία περιελάβανε 3000 ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού και στην οποία η διάμεσος του χρόνου παρακολούθησης των ασθενών ήταν 113 μήνες) σύμφωνα με τα οποία τα αυξημένα επίπεδα TILs σχετίζονται με 30% μείωση του κινδύνου υποτροπής, 22% μείωση της πιθανότητας εμφάνισης απομακρυσμένης μετάστασης και 33% μείωση του κινδύνου θανάτου<sup>67</sup>. Επίσης έχει βρεθεί ότι η αυξημένη έκφραση του PD-L1 σχετίζεται με μεγαλύτερα διαστήματα ολικής επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο του μαστού<sup>68</sup>. Μία πρόσφατη μελέτη ανασκόπησης αναφέρει ότι η αυξημένη έκφραση του PD-L1 ειδικά στις ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού επίσης σχετίζεται με ευμενή πρόγνωση<sup>69</sup>.

Ένα ερώτημα που μελετάται εντατικά τα τελευταία χρόνια είναι γιατί ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού είναι πιο πιθανό να διηθείται από τα λεμφοκύτταρα σε σχέση με τους άλλους μοριακούς υποτύπους. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι αυτή η κατηγορία καρκίνου του μαστού χαρακτηρίζεται από γενετική αστάθεια και επιπλέον παρουσιάζει αυξημένο φορτίο μεταλλάξεων. Τα μεταλλαγμένα γονίδια είναι πιθανόν να κωδικοποιούν πρωτεΐνες που παρουσιάζονται και συνεπώς αναγνωρίζονται διαφορετικά από το ανοσοποιητικό σύστημα. Με άλλα λόγια, η υψηλότερη γενετική αστάθεια και το σύνολο των μεταλλάξεων προκαλεί τη δημιουργία πεπτιδικών επιτόπων που φέρουν μία μετάλλαξη και έτσι λειτουργούν σαν νεοαντιγόνα, τα οποία μπορούν να αναγνωριστούν ως «μη-εαυτούς» από το ανοσοποιητικό σύστημα<sup>63</sup>. Επιπλέον οι τριπλά αρνητικοί όγκοι του μαστού, σε σύγκριση με τους άλλους υποτύπους, σχετίζονται ισχυρά με μία προγνωστική υπογραφή ευμενούς πρόγνωσης που είναι B-cell ειδική. Τα B κύτταρα ενεργοποιούνται από τα Th2 T κύτταρα και η παρουσία τους στον καρκίνο του μαστού σχετίζεται με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό<sup>70</sup>.

Ωστόσο υπάρχουν δεδομένα που υποστηρίζουν ότι η παρουσία B κυττάρων που στοχεύουν τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να ενισχύσει την αντικαρκινική ανοσία μέσω ενεργοποίησης ενός μηχανισμού θανάτου των καρκινικών κυττάρων, ο οποίος ενεργοποιείται από την ιντερφερόνη γ που εκκρίνεται από τα κύτταρα NK (natural killer)<sup>71</sup>. Μάλιστα η παρουσία πληθυσμών B κυττάρων σε τριπλά αρνητικούς όγκους του μαστού έχει συσχετισθεί με καλύτερη επιβίωση χωρίς εμφάνιση υποτροπών<sup>72</sup>.

### **1.2.5 Η ανοσοθεραπεία στους τριπλά αρνητικούς ασθενείς με καρκίνο μαστού**

Η παρατηρούμενη αυξημένη παρουσία TILs στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού, παρέχει πρόσφορο έδαφος για την διερεύνηση της πιθανής χρησιμότητας των αναστολέων των ανοσοποιητικών σημείων ελέγχου στη θεραπεία των συγκεκριμένων ασθενών. Η ανοσοθεραπεία στον καρκίνο του μαστού αποτελεί αντικείμενο εντατικής μελέτης τα τελευταία χρόνια και τα αποτελέσματα είναι ήδη αρκετά ενθαρρυντικά. Σύμφωνα με δύο πρόσφατες δοκιμές φάσης I, όπου συμμετείχαν ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού προχωρημένου σταδίου, βρέθηκε ότι το 18.5% των ασθενών που ήταν θετικοί, ως προς την έκφραση του PD-L1 ανταποκρίθηκε στη θεραπεία με Pembrolizumab<sup>73,74</sup>. Σήμερα βρίσκονται σε εξέλιξη διαφορετικές κλινικές δοκιμές για τη διερεύνηση του ρόλου των αναστολέων των ανοσοποιητικών σημείων ελέγχου. Πιο αναλυτικά σε τρεις κλινικές δοκιμές στις οποίες συμμετέχουν ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού σταδίου I-III αξιολογείται η αποτελεσματικότητα της συνδυαστικής χορήγησης αναστολέων των

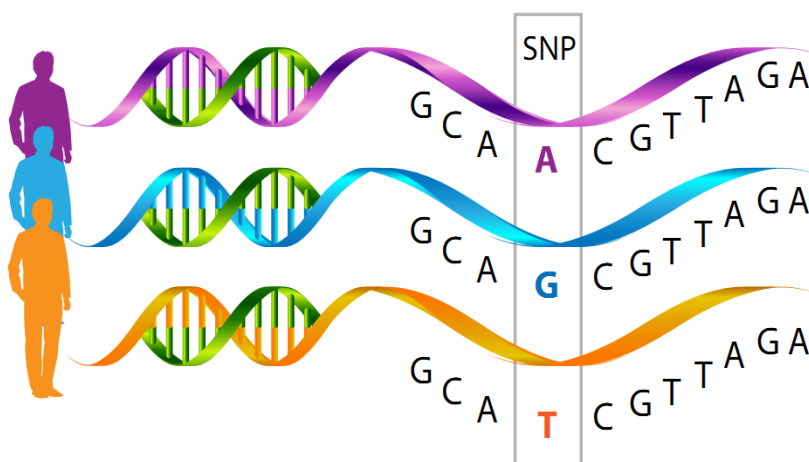
ανοσοποιητικών σημείων ελέγχου με νεοεπικουρική χημειοθεραπεία. Στη δοκιμή NeoTRIPaPD-L1 (NCT02620280) φάσης III, ασθενείς με τοπικά προχωρημένο TNBC λαμβάνουν τυχαία Nab-paclitaxel και καρβοπλατίνη με ή χωρίς τον PD-L1 αναστολέα (Atezolizumab). Επίσης σε μια δοκιμή φάσης II αξιολογείται η αποτελεσματικότητα της συγχορήγησης Atezolizumab/Nab-paclitaxel (NCT02530489), ενώ τέλος σε μια δοκιμή φάσης I / II ελέγχεται η αποτελεσματικότητα του Durvalumab σε συνδυασμό με εβδομαδιαία χορήγηση του Nab-paclitaxel ακολουθούμενη από μεγάλη δόση χημειοθεραπείας που περιέχει κυκλοφωσφαμίδη και δοξορουβικίνη (NCT02489448). Πρόσφατα ο Διεθνής Οργανισμός Φαρμάκων και Τροφών (FDA) ενέκρινε τη χρήση του Atezolizumab σε συνδυασμό με Nab-paclitaxel σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένο ή τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού, των οποίων ο όγκος εκφράζει το μόριο PD-L1<sup>75</sup>.

## 1.3 Η σημασία των πολυμορφισμών στον καρκίνο

### 1.3.1 Γενικά Στοιχεία

Η έλευση των νέων εξελιγμένων και πιο ευαίσθητων μεθοδολογιών μελέτης των νουκλεϊκών οξέων έδωσε τη δυνατότητα για την πιο ολοκληρωμένη μελέτη των μορίων DNA/RNA η οποία αποκάλυψε τελικά ότι η γενετική ποικιλομορφία του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι πολύ μεγαλύτερη από ό, τι είχε αρχικά εκτιμηθεί<sup>76</sup>. Η πιο συνηθισμένη τροποποίηση στην αλληλουχία στο ανθρώπινο γονιδίωμα είναι η σταθερή υποκατάσταση μίας μόνο βάσης, που ονομάζεται πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Polymorphism-SNP) (Εικόνα 1.8). Σύμφωνα με τον επίσημο ορισμό του ο πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου είναι

μία παραλλαγή σε μία νουκλεοτιδική θέση του DNA, η οποία εμφανίζεται στον πληθυσμό σε ποσοστό μεγαλύτερο του 1%<sup>77</sup>. Εάν το SNP εμφανίζεται στην αλληλουχία ενός γονιδίου, τότε θεωρείται ότι το



Εικόνα 1.8 Πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου (SNP)

γονίδιο έχει περισσότερα από ένα αλληλόμορφο και η τροποποίηση αυτή μπορεί να συνεπάγεται αλλαγή στην αμινοξική αλληλουχία. Ωστόσο στις περισσότερες περιπτώσεις η παρουσία των SNPs δεν συνδέεται με αλλαγή στο φαινότυπο, ενώ συχνή είναι και η παρουσία SNPs σε μη κωδικές περιοχές του DNA. Αν και κάποιο SNP μπορεί να μην προκαλεί κάποια διαταραχή, κάποια SNPs σχετίζονται με συγκεκριμένες ασθένειες, γεγονός που επιτρέπει την αξιολόγηση της σύνδεσης της παρουσίας αυτών των SNPs με την γενετική προδιάθεση εμφάνισης αυτών των ασθενειών. Όπως αναφέρθηκε τα περισσότερα SNPs είναι «σιωπηλά» και δεν μεταβάλλουν τη λειτουργία ή την έκφραση ενός γονιδίου. Έτσι τα SNPs διαφέρουν από τις μεταλλάξεις, οι οποίες είναι σπάνιες παραλλαγές με μια ιδιαίτερα υψηλή διείσδυση, που συνήθως συνδέονται με έναν επιβλαβή φαινότυπο, όπως μια κλασική μονογονική διαταραχή (π.χ. δρεπανοκυτταρική ασθένεια ή αιμοφιλία).

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπολογίζεται ότι ο συνολικός αριθμός των SNP είναι πάνω από 10 εκατομμύρια<sup>78</sup>, ενώ ο αριθμός των SNPs με μικρή συχνότητα αλληλόμορφου φαίνεται να είναι ίσως έως και πέντε εκατομμύρια<sup>79</sup>. Επιπλέον έχει δειχθεί ότι η συχνότητα κατανομής

των SNPs στο ανθρώπινο γονιδίωμα είναι τουλάχιστον 1SNP/1000 ζεύγη βάσεων (bp)<sup>80</sup>. Οι πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου προκύπτουν μετά την εξελικτική επιλογή των σημειακών μεταλλάξεων στους πληθυσμούς.

### 1.3.2 Οι πολυμορφισμοί στον καρκίνο

Οι μελέτες γενετικής συσχέτισης των πολυμορφισμών με τον καρκίνο μπορούν να διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: 1) αυτές που μελετούν τη συσχέτιση της ύπαρξης του εξεταζόμενου SNP με την προδιάθεση εμφάνισης της νόσου και 2) αυτές που μελετούν τη συσχέτιση της ύπαρξης του εξεταζόμενου SNP με την κλινική πορεία της νόσου, δηλαδή την επιβίωση, την εμφάνιση υποτροπών/μεταστάσεων και την ανταπόκριση στη θεραπεία.

Σε πολλές περιπτώσεις η αιτιολογία του καρκίνου βρίσκεται στη συνεργιστική δράση μεταξύ διαφόρων γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Για παράδειγμα έχουν γίνει μελέτες στον καρκίνο του πνεύμονα με σκοπό την αναγνώριση γονιδίων που εμπλέκονται στον μεταβολισμό του καπνού και τον εθισμό στη νικοτίνη. Οι μελέτες αυτές αποτελούν μέρος ενός συνόλου μελετών που αποσκοπούν αφενός στην διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του γονιδιακού υποβάθρου της ασθένειας με ένα ισχυρό εξωγενή καρκινογόνο παράγοντα και αφετέρου στην αναγνώριση γενετικών παραλλαγών που παρέχουν ευαισθησία ή ανθεκτικότητα στον καπνό του τσιγάρου. Στο πλαίσιο αυτό λοιπόν έχει βρεθεί ότι υπάρχουν αλληλεπιδράσεις γονιδίων-περιβαλλοντικών παραγόντων που λειτουργούν σαν στρεσογόνοι παράγοντες οι οποίοι πιθανά να εντείνουν την φαινοτυπική επίδραση του SNP που ευθύνεται για την εμφάνιση της νόσου. Για παράδειγμα το γονίδιο της μυελοπεροξειδάσης (*MPO*) έχει μελετηθεί εκτενώς κι έχει βρεθεί ότι η αλλαγή G463>A οδηγεί σε μειωμένα mRNA επίπεδα του *MPO* και ότι φορείς του αλληλόμορφου A σε ομοζυγωτία έχουν σημαντικά μικρότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα σε σχέση με αυτούς που φέρουν δύο G αλληλόμορφα<sup>81</sup>.

Από την άλλη πλευρά οι πολυμορφισμοί συχνά σχετίζονται με την κλινική πορεία της ασθένειας και η πληροφορία αυτή μπορεί να αξιοποιηθεί στη λήψη κλινικών αποφάσεων. Για παράδειγμα η παρουσία συγκεκριμένων αλληλόμορφων μπορεί να αλλάξει τον κίνδυνο ανάπτυξης μεταστατικού ή πιο επιθετικού καρκίνου. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι η παρουσία SNPs στο *CYP3A4* σχετίζεται με πιο επιθετικό καρκίνο του προστάτη και η συσχέτιση αυτή είναι πιο ισχυρή σε μεγαλύτερους ασθενείς χωρίς οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του προστάτη<sup>82</sup>. Η μελέτη των SNPs μπορεί επίσης να βρει εφαρμογή στη φαρμακογονιδιοματική, όπου η παρουσία συγκεκριμένων αλληλόμορφων μπορεί να

σχετίζεται με αυξημένη ανταπόκριση ή ανθεκτικότητα στη θεραπεία. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι πολυμορφισμοί του *CYP2D6* γονιδίου, το οποίο εμπλέκεται στον μεταβολισμό πολλών αντικαρκινικών παραγόντων. Κοινά SNPs του συγκεκριμένου γονιδίου επηρεάζουν την λειτουργία του και πιθανά αλλάζουν τη φαρμακοκινητική αυτών των φαρμάκων. Σε πολλές περιπτώσεις η ελαττωματική λειτουργία του *CYP2D6* ενισχύει την επίδραση αυτών των φαρμάκων<sup>83</sup>.

### 1.3.3 Η σημασία των πολυμορφισμών στον καρκίνο του μαστού

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναγνωριστεί πολλά SNPs που συμβάλλουν μαζί με άλλους παράγοντες στον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Σε μία πρόσφατη μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε σε δύο φάσεις, έγινε αρχικά γονοτύπηση ~266.000 SNPs σε 408 ασθενείς με καρκίνο του μαστού και οικογενειακό ιστορικό καθώς και σε 400 υγιή άτομα. Από την πρώτη αυτή ανάλυση αναγνωρίστηκαν ~12.000 SNPs, τα οποία παρουσίαζαν συσχέτιση με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού, οπότε στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε γονοτύπηση αυτών των SNPs σε 3.990 ασθενείς με καρκίνο του μαστού και 3.916 υγιείς. Από την ανάλυση αυτή επιλέχθηκαν τελικά τα 30 πιο σημαντικά SNPs τα οποία μελετήθηκαν περαιτέρω σε 21.860 ασθενείς και 22.578 υγιείς γυναίκες. Τελικά βρέθηκε ότι τα παρακάτω 6 SNPs σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου ( $P < 10^{-5}$ ): ο rs2981582 στο γονίδιο *FGFR2*, ο rs3817198 στο γονίδιο *LSP1*, ο rs889312 στο γονίδιο *MAP3K1*, οι rs12443621 και rs8051542 στο γονίδιο *TOX3* και ο rs13281615 στη χρωμοσωμική περιοχή 8q24<sup>84</sup>.

Σε άλλες μελέτες έχει διερευνηθεί η συσχέτιση των SNPs με το μοριακό υπότυπο της νόσου. Έτσι έχει βρεθεί ότι οι rs2981582 στο *FGFR2* και rs13281615 στην περιοχή 8q24 παρουσιάζουν ισχυρή συσχέτιση με την παρουσία ER-θετικού καρκίνου του μαστού. Σε μία αντίστοιχη μελέτη βρέθηκε ότι οι πολυμορφισμοί rs3803662 (*TOX3*), rs889312 (*MAP3K1*), rs3817198 (*LSP1*), rs13387042 (χρωμόσωμα 2q35), και rs1982073 (*TGFβ1*) σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού<sup>85</sup>. Τέλος, έχει αναφερθεί ότι ο πολυμορφισμός rs4245739 στο γονίδιο *MDM4* φαίνεται να είναι ειδικός για τον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού<sup>86</sup>.

Επιπρόσθετα, οι Antoniou et. al αναφέρουν ότι πολυμορφισμοί που εντοπίζονται στη χρωμοσωμική περιοχή 19p13 επηρεάζουν τα ποσοστά κινδύνου εμφάνισης της νόσου σε φορείς μεταλλάξεων του *BRCA1*. Μια μεταγενέστερη μελέτη επιβεβαίωσε ότι οι πολυμορφισμοί στη χρωμοσωμική περιοχή 19p13.11 σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού σε φορείς *BRCA1* μεταλλάξεων. Ανάλογα

αποτελέσματα αναφέρθηκαν επίσης για τους πολυμορφισμούς στις χρωμοσωμικές περιοχές 5p15.33 (*TERT*), 6q25.1 (*ESRI*)<sup>87</sup>. Μία άλλη μελέτη αναφέρει επίσης ότι δύο SNPs της χρωμοσωμικής περιοχής 19p13.1, οι rs8170 και rs8100241 καθώς και οι πολυμορφισμοί rs2046210 και rs12662670 στο γονίδιο έκφρασης του υποδοχέα των οιστρογόνων, rs999737 στο γονίδιο *RAD51L1* και rs3803662 στο γονίδιο *TOX3* σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού<sup>88</sup>. Η ίδια ομάδα αργότερα ανέφερε ότι ο πολυμορφισμός rs8170 είναι ειδικός για την εκτίμηση κινδύνου εμφάνισης τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού<sup>89</sup>. (Πίνακας 1.4)

Πίνακας 1.4 Συσχέτιση πολυμορφισμών με τον κίνδυνο εμφάνισης τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού<sup>90</sup>

Location	Gene	SNP	Risk Allele	OR/HR	P-value
1q32	<i>MDM4</i>	rs4245739	C	1.18	4.3x10 <sup>-15</sup>
			C	1.17	3.1x10 <sup>-5</sup>
			C	1.19	4.0x10 <sup>-6</sup>
2q35		rs13387042	G	0.93	0.049
			G	1.12	0.001
5p15	<i>TERT</i>	rs10069690	A	1.28	2.4x10 <sup>-33</sup>
			A	1.24	1.4x10 <sup>-7</sup>
			A	1.25	1.1x10 <sup>-9</sup>
			A	1.27	5.2x10 <sup>-14</sup>
			T	0.77	8.3x10 <sup>-6</sup>
6q25	<i>ESRI</i>	rs2046210	A	1.16	5.3x10 <sup>-5</sup>
			A	1.23	5.5x10 <sup>-12</sup>
			A	1.29	4.4x10 <sup>-7</sup>
			A	1.33	9.3x10 <sup>-6</sup>
			G	1.33	1.1x10 <sup>-4</sup>
14q24	<i>RAD51L1</i>	rs999737	T	0.86	3.0x10 <sup>-4</sup>
			T	0.89	0.02
			A	0.91	0.041
16q12	<i>TOX3</i>	rs3803662	A	1.09	0.022
			A	1.21	3.1x10 <sup>-6</sup>
			A	1.17	3.7x10 <sup>-5</sup>

19p13	rs8170	A	1.26	$1.3 \times 10^{-7}$
		T	1.27	$2.3 \times 10^{-8}$
		A	1.28	$1.2 \times 10^{-6}$
		A	1.25	$3.3 \times 10^{-13}$
19p13	rs2363956	C	0.82	$2.3 \times 10^{-8}$
		C	0.80	$1.1 \times 10^{-7}$
	rs8100241	A	0.81	$2.4 \times 10^{-13}$
		A	0.84	$8.7 \times 10^{-7}$

### 1.3.4 Οι πολυμορφισμοί rs822336 G>C και rs822337 T>A του *PD-L1*

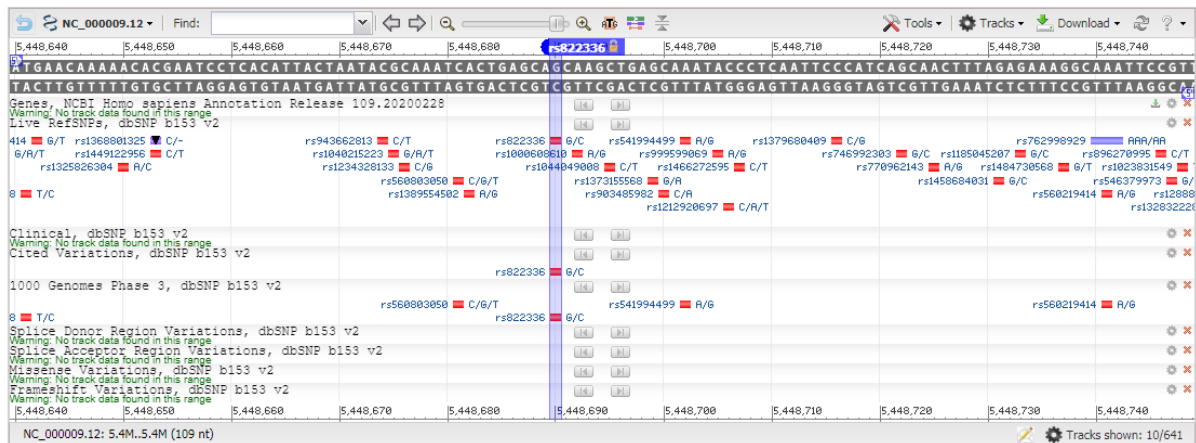
Ο PD-L1 κωδικοποιείται από το γονίδιο *CD274* (HGNC accession number: 17635; Ensembl Gene accession: ENSG00000120217), το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 9p24.1 και έχει μέγεθος περίπου 17.6 kb. Ο υποκινητής του γονιδίου περιλαμβάνει πολλές CpG νησίδες μεθυλίωσης ενώ η μετάφραση ξεκινά από το εξώνιο 2. Όμοια με άλλα γονίδια η 3'-UTR περιοχή του *CD274* είναι αρκετά μεγάλη και περιλαμβάνει αρκετά cis στοιχεία τα οποία εμπλέκονται σε μετα-μεταγραφική ρύθμιση της αποικοδόμησης του mRNA, η οποία αποτελεί κρίσιμο ρυθμιστή της αφθονίας των αντίστοιχων μορίων mRNA και συνεπώς των επιπέδων έκφρασης του<sup>91</sup>.

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί αρκετοί πολυμορφισμοί του *CD274*, ωστόσο είναι περιορισμένες οι πληροφορίες σχετικά με το πώς επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου. Οι πιο καλά μελετημένοι πολυμορφισμοί είναι δύο G>C αλλαγές στην 3'-UTR περιοχή (rs4143815) και στον υποκινητή (rs10815225). Ο πολυμορφισμός που εντοπίζεται στην 3'-UTR του γονιδίου φαίνεται να συμβάλλει στα αυξημένα επίπεδα της πρωτεϊνικής έκφρασης του PD-L1. Η επίδραση αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι η ύπαρξη του rs4143815 παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση του mRNA του PD-L1 με το miR-570. Ο πολυμορφισμός rs10815225 εντοπίζεται σε μία περιοχή του υποκινητή, πλούσια σε GC, η οποία αναγνωρίζεται από τον SP1 μεταγραφικό παράγοντα που εμπλέκεται στην ρύθμιση πολλαπλών κυτταρικών λειτουργιών όπως είναι η απόπτωση και η ανοσολογική απόκριση. Πρόσφατα βρέθηκε ότι ο SP1 αλληλοεπιδρά πιο ισχυρά με τον υποκινητή του *CD274* όταν υπάρχει το rs10815225 G αλληλόμορφο, σε σχέση με όταν υπάρχει το φυσιολογικό αλληλόμορφο. Η ισχυρή αυτή αλληλεπίδραση μπορεί να δικαιολογήσει τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του PD-L1 σε καρκίνους οι οποίοι ήταν ομόζυγοι για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό. Στην περιοχή του υποκινητή έχει βρεθεί ακόμα μία CpG νησίδα αποτελώντας ένα σημείο μεθυλίωσης του

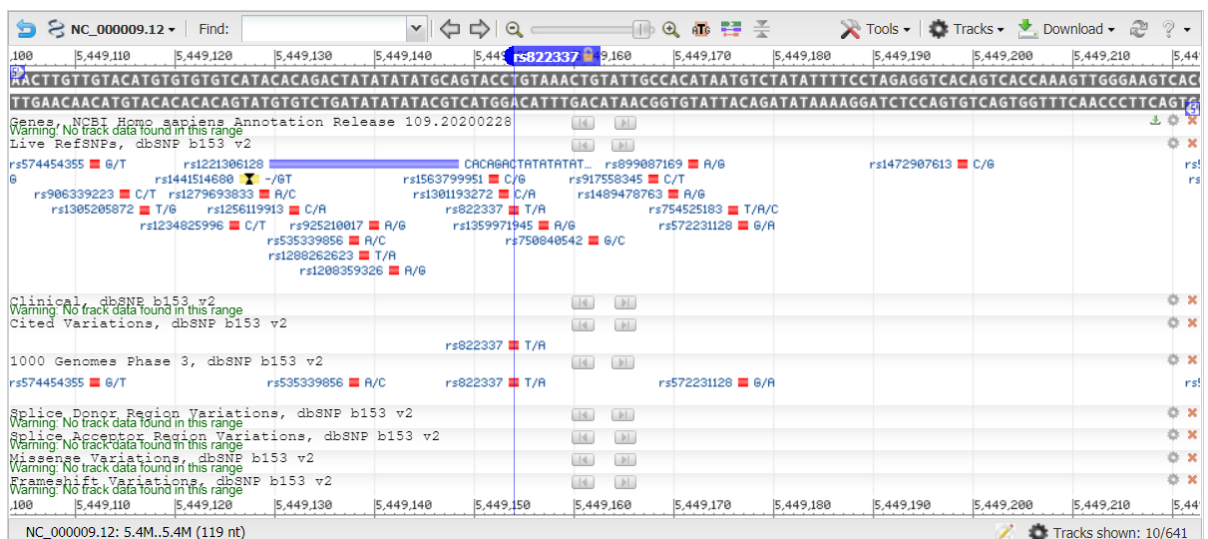


υποκινητή του γονιδίου. Πολλές μελέτες δείχνουν ότι σε διάφορους τύπους καρκίνου αφενός το γονίδιο CD274 υπόκειται σε επιγενετικό έλεγχο μέσω μεθυλίωσης του υποκινητή και αφετέρου ότι το επιγενετικό προφίλ του γονιδίου έχει προγνωστική αξία<sup>91</sup>.

Οι πολυμορφισμοί rs822336G>C και rs822337T>A εντοπίζονται στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου και συγκεκριμένα 1813 και 1349 βάσεις από την σημείο έναρξης της μεταγραφής αντίστοιχα. (Εικόνα 1.9) Οι απλότυποι rs822336C-rs822337A σχετίζονται με σημαντική μείωση της ενεργότητας του υποκινητή, σε σχέση με τους απλότυπους rs822336G-rs822337T, και κατ'επέκταση οι απλότυποι rs822336C και rs822337A σχετίζονται με μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης PD-L1<sup>92</sup>. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι οι περιοχές στις οποίες εντοπίζονται οι εν λόγω πολυμορφισμοί είναι σημαντικοί για την ενεργοποίηση του υποκινητή ενώ ο πολυμορφισμός rs822337T>A εντοπίζεται σε μία περιοχή του υποκινητή με την οποία αλληλοεπιδρά ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB<sup>93</sup>. (Εικόνα 1.10)



Εικόνα 1.9 Θέση του πολυμορφισμού rs822336G>C στο ανθρώπινο γονιδίωμα



Εικόνα 1.10 Θέση του πολυμορφισμού rs822337T>A στο ανθρώπινο γονιδίωμα

## Σκοπός

Ο καρκίνος του μαστού βρίσκεται σταθερά στην πρώτη θέση των πιο συχνά απαντώμενων τύπων καρκίνου και είναι η δεύτερη αιτία θανάτου από καρκίνο στον γυναικείο πληθυσμό. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει μεγάλη πρόοδος στην διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών της καρκινογένεσης του μαστού αλλά και στην αντιμετώπιση σε κλινικό επίπεδο των ασθενών, λόγω βελτίωσης των διαγνωστικών μεθόδων και της εφαρμογής στοχευμένων θεραπειών. Τα δεδομένα αυτά δημιουργούν ένα παράδοξο, το οποίο αποδίδεται εν πολλοίς στην μοριακή αλλά και κλινική ετερογένεια ασθένειας, η οποία καθιστά την συγκεκριμένη νόσο ένα σύνολο ασθενειών με διαφορετική κλινική συμπεριφορά. Μία επιπλέον αιτία αυτού του παράδοξου φαινομένου είναι η ανεπάρκεια των καθιερωμένων προγνωστικών δεικτών να προβλέψουν με ακρίβεια την πορεία της νόσου ή/και την ανταπόκριση στη θεραπεία.

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μελέτη και η κλινική αξιολόγηση των πολυμορφισμών μονήρους νουκλεοτιδίου του γονιδίου *PD-L1* rs822336G>C και rs822337T>A ως νέων μοριακών δεικτών για την πρόγνωση του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε συλλογή και επεξεργασία του καρκινικού ιστού 114 γυναικών με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού και αίμα 124 υγιών γυναικών. Ακολούθησε σχεδιασμός και εφαρμογή της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) για την ανίχνευση των εξεταζόμενων πολυμορφισμών στα υπό μελέτη δείγματα και εκτενής βιοστατιστική ανάλυση για την διερεύνηση της κλινικής αξίας των εξεταζόμενων πολυμορφισμών.

## 2. ΥΔΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

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

Για τους σκοπούς της συγκεκριμένης μελέτης συλλέχθηκε μονιμοποιημένος και έγκλειστος σε παραφίνη καρκινικός ιστός από 114 γυναίκες με ιστολογικά επιβεβαιωμένο τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού, κατά την περίοδο 2000-2014. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στην στην Α Προπαιδευτική Χειρουργική κλινική του νοσοκομείου Ιπποκράτειο ΓΝΑ και στην Πανεπιστημιακή Γυναικολογική και Μαιευτική κλινική του νοσοκομείου Αλεξάνδρα ΓΝΑ που εντάσσονται στην Ιατρική Σχολή του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Κριτήρια αποκλεισμού για περαιτέρω επεξεργασία των δειγμάτων ήταν:

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

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

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

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

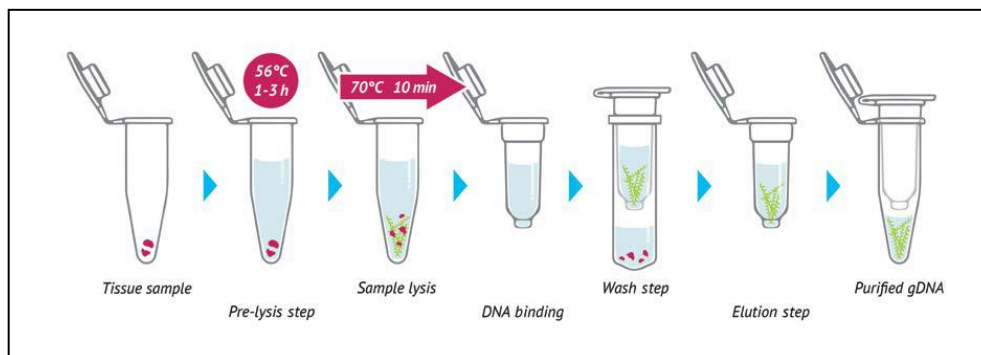
Όλες οι συμμετέχουσες στην μελέτη ενημερώθηκαν εκτενώς για τον σκοπό και τον τρόπο διεξαγωγής της παρούσας μελέτης και υπέγραψαν έντυπο συγκατάθεσης. Η παρούσα μελέτη ασθενών-μαρτύρων είναι σύμφωνη με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι και έχει λάβει έγκριση από το Τοπικό Συμβούλιο Θεσμικής Ανασκόπησης (Επιστημονικό και Διοικητικό Συμβούλιο) του Νοσοκομείου Ιπποκράτειο ΓΝΑ.

Πίνακας 2.1 Περιγραφική στατιστική των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών (n=114)

Μεταβλητή	Αριθμός ασθενών	Μεταβλητή	Αριθμός ασθενών
<b>Ηλικία</b>		<b>Ki-67Index</b>	
≥57	57 (50.0%)	Θετικό	58 (50.9%)
<57	56 (49.1%)	Αρνητικό	15 (13.1%)
Άγνωστο	1(0.9 %)	Άγνωστο	41 (36.0%)
<b>ΣτάδιοTNM</b>		<b>Βαθμός κακοήθειας</b>	
I	20 (17.5 %)	I	2 (1.7%)
II	41 (35.9 %)	II	10 (8.8%)
III	24 (21.1 %)	III	95 (83.4%)
IV	22 (19.4%)	Άγνωστο	7 (6.1%)
Άγνωστο	7 (6.1 %)		
<b>Ιστολογικός τύπος</b>		<b>Διήθηση λεμφαδένων</b>	
Ductal	87 (76.3 %)	N0	66 (57.9%)
Lobular	10 (8.8 %)	N1	13 (11.4%)
Medular	8 (7 %)	N2	9 (7.9%)
Άλλο	9 (7.9 %)	N3	19 (16.7%)
Unknown	0 (0 %)	Άγνωστο	7 (6.1%)
<b>Υποτροπή</b>		<b>Θάνατος</b>	
Ναι	24 (21.1 %)	Ναι	27 (23.7 %)
Όχι	90 (78.9 %)	Όχι	81 (71.0 %)
Άγνωστο	0 (0%)	Άγνωστο	6 (5.3%)

## 2.2 Απομόνωση γενετικού υλικού από ασθενείς και υγιείς μάρτυρες

Η απομόνωση του γενετικού υλικού από το σύνολο των διαθέσιμων δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του NucleoSpin Tissue kit (Macherey Nigel, Germany) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1 Απομόνωση γενετικού υλικού από καρκινικό ιστό και αίμα

## 2.3 Προσδιορισμός του γονότυπου για τους μονήρεις πολυμορφισμούς νουκλεοτιδίου του γονιδίου *PD-L1 rs822336* και *rs822337*

Η ανίχνευση και μελέτη των υπό εξέταση πολυμορφισμών πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο της απλής PCR χρησιμοποιώντας ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές. Τα προϊόντα πέψης συλλέχθηκαν μέσω RFLP και αναλύθηκαν για την ανίχνευση διαφορών μεταξύ ασθενών και υγιών-μαρτύρων.

Στην περίπτωση του πολυμορφισμού του *PD-L1 rs822336 G>C* χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές:

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

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

Για την ανάλυση του πολυμορφισμού PD-L1 rs822337 T>A χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 5'-CTCACCTCCTCTGGGAACCTT-3' (πρόσθιος εκκινητής) και 5'-AAGGCCATACCATTCAAGACAGTA-3' (ανάστροφος εκκινητής) οι οποίοι εξασφαλίζουν τη σύνθεση ενός προϊόντος μεγέθους 226bp. Ακολούθησε πέψη των PCR προϊόντων με το περιοριστικό ένζυμο *TasI* για τη διάκριση της παρουσίας των διαφορετικών αλληλόμορφων.

## 2.4 Βιοστατιστική ανάλυση

Η βιοστατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v.17.0 (IBM, Inc). Η διερεύνηση της συσχέτισης του προφίλ έκφρασης των πολυμορφισμών με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους (ποιοτικές μεταβλητές) πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή του στατιστικού ελέγχου chi-square. Οι διαφορές που ανιχνεύτηκαν σε επίπεδο σημαντικότητας  $p \text{ value} < 0.05$  θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές.

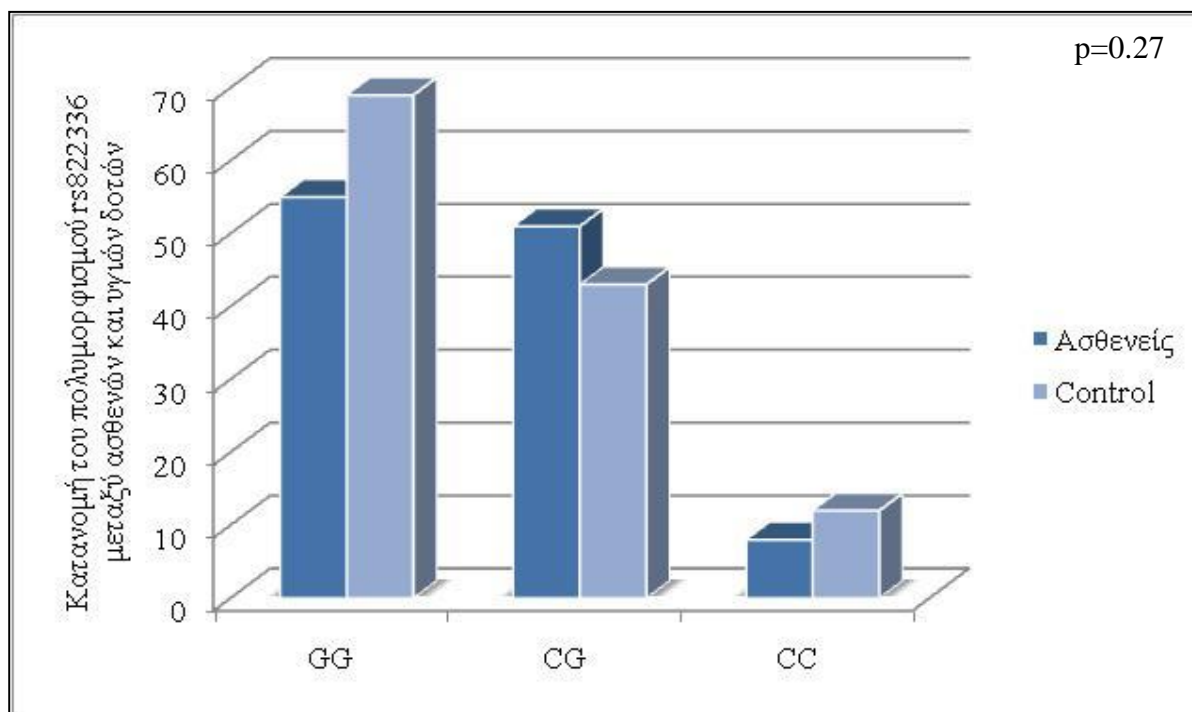
Η αξιολόγηση της προγνωστικής αξίας των εξεταζόμενων πολυμορφισμών πραγματοποιήθηκε με:

- Ανάλυση επιβίωσης κατά Kaplan–Meier, μέσω της οποίας υπολογίζεται η πιθανότητα της επιβίωσης ασθενών οι οποίες έχουν υποβληθεί σε χειρουργική ή φαρμακευτική θεραπεία σε χρονικό διάστημα που ξεκινά από την έναρξη της θεραπείας έως ένα ορισμένο χρονικό διάστημα παρακολούθησης. Στη συγκεκριμένη διατριβή καταληκτική ημερομηνία παρακολούθησης τέθηκε η 31η Ιανουαρίου 2016. Οι διαφορές μεταξύ των καμπυλών εκτιμήθηκαν με τη στατιστική δοκιμασία log rank και το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε πάλι στο 0.05.
- Ανάπτυξη μοντέλων μονομεταβλητής παλινδρόμησης αναλογικού κινδύνου κατά Cox, Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει την εκτίμηση της σχέσης ανάμεσα στο προφίλ έκφρασης των πολυμορφισμών και τον σχετικού κινδύνου υποτροπής ή θανάτου των ασθενών. Ομοίως, τα αποτελέσματα με  $p \text{ value} < 0.05$  θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Διαφορική κατανομή του πολυμορφισμού *PD-L1 rs822336 G>C* μεταξύ των ασθενών με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού και των υγιών μαρτύρων

Η ανίχνευση του πολυμορφισμού *PD-L1 rs822336 G>C* πραγματοποιήθηκε σε 114 ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού και 124 υγιείς μάρτυρες. Η στατιστική ανάλυση αποκάλυψε ότι στην ομάδα των ασθενών τα πιο συχνά αλληλόμορφα ήταν τα GG και CG με ποσοστά εμφάνισης 48.2% και 44.7% αντίστοιχα. Παρόμοια ήταν και η εικόνα στην ομάδα των υγιών δοτών, ωστόσο σε αυτή την περίπτωση το αλληλόμορφο GG είχε ελαφρώς αυξημένα ποσοστά εμφάνισης σε σχέση με το CG (55.6% έναντι 34.7%). Το αλληλόμορφο CC παρουσίασε τα χαμηλότερα ποσοστά τόσο στους ασθενείς (7%) όσο και στους υγιείς δότες (9.7%). Η σύγκριση της κατανομής του κάθε αλληλόμορφου στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς δότες αποκάλυψε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p=0.27$ ) στα ποσοστά εμφάνισης του κάθε αλληλόμορφου σε αυτές τις εξεταζόμενες ομάδες (Εικόνα 3.1, Πίνακας 3.1).



Εικόνα 3.1 Κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού *PD-L1 rs822336 G>C* μεταξύ των ασθενών και των υγιών δοτών

Πίνακας 3.1 Κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού PD-L1 rs822336 G>C μεταξύ των ασθενών και των υγιών δοτών

Μεταβλητή	Αριθμός ασθενών	Πολυμορφισμός rs822336			Τιμή p*
		GG	GC	CC	
Ασθενείς	114	55 (48.2%)	51 (44.7%)	8 (7.0%)	0.27
Υγιείς	124	69 (55.6%)	43 (34.7%)	12 (9.7%)	

\* Υπολογίστηκε με τη μέθοδο chi square test

### 3.2 Συσχέτιση του προφίλ έκφρασης των διαφορετικών αλληλόμορφων του πολυμορφισμού PD-L1 rs822336 G>C με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών

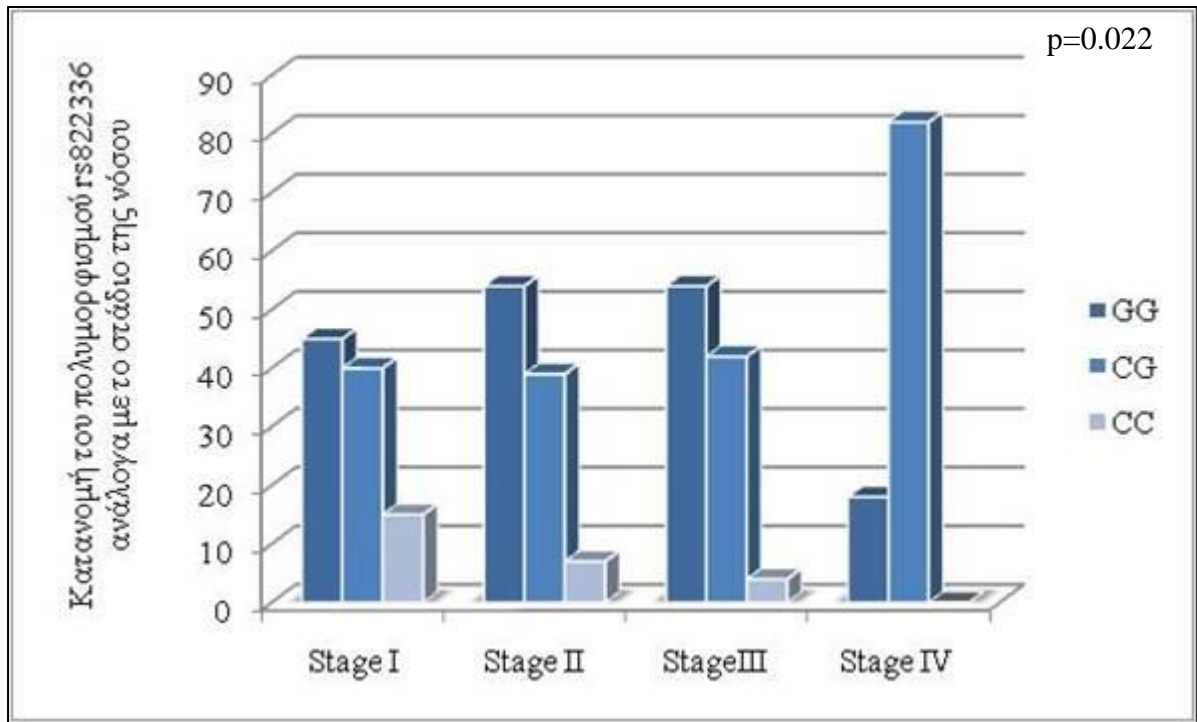
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη μέθοδο chi-square test έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα διαφορετικά αλληλόμορφα του πολυμορφισμού PD-L1 rs822336 G>C με το στάδιο της νόσου καθώς και την ολική και χωρίς υποτροπές επιβίωση (Πίνακας 3.2). Πιο αναλυτικά βρέθηκε ότι η πλειονότητα (81.8%) των γυναικών με όγκους σταδίου IV είναι φορείς του αλληλόμορφου CG, ενώ μόλις 4 ασθενείς (18.2%) με όγκους σταδίου IV έχουν το αλληλόμορφο GG. Αυτή η διαφορά στην κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού PD-L1 rs822336 G>C είναι στατιστικά σημαντική ( $p=0.022$ , Εικόνα 3.2). Επιπλέον βρέθηκε ότι η ύπαρξη του αλληλόμορφου CG σχετίζεται με την χωρίς υποτροπές ( $p=0.020$ , Εικόνα 3.3) αλλά και η ολική επιβίωση των ασθενών ( $p=0.040$ , Εικόνα 3.4). Αναλυτικότερα από τις 26 ασθενείς που έχουν υποτροπιάσει οι 19, δηλαδή το 79.2%, φέρουν το αλληλόμορφο CG. Αντίστοιχα στο σύνολο των 27 γυναικών που απεβίωσαν οι 18 από αυτές, δηλαδή το 66.7%, είναι επίσης φορείς του συγκεκριμένου αλληλόμορφου.



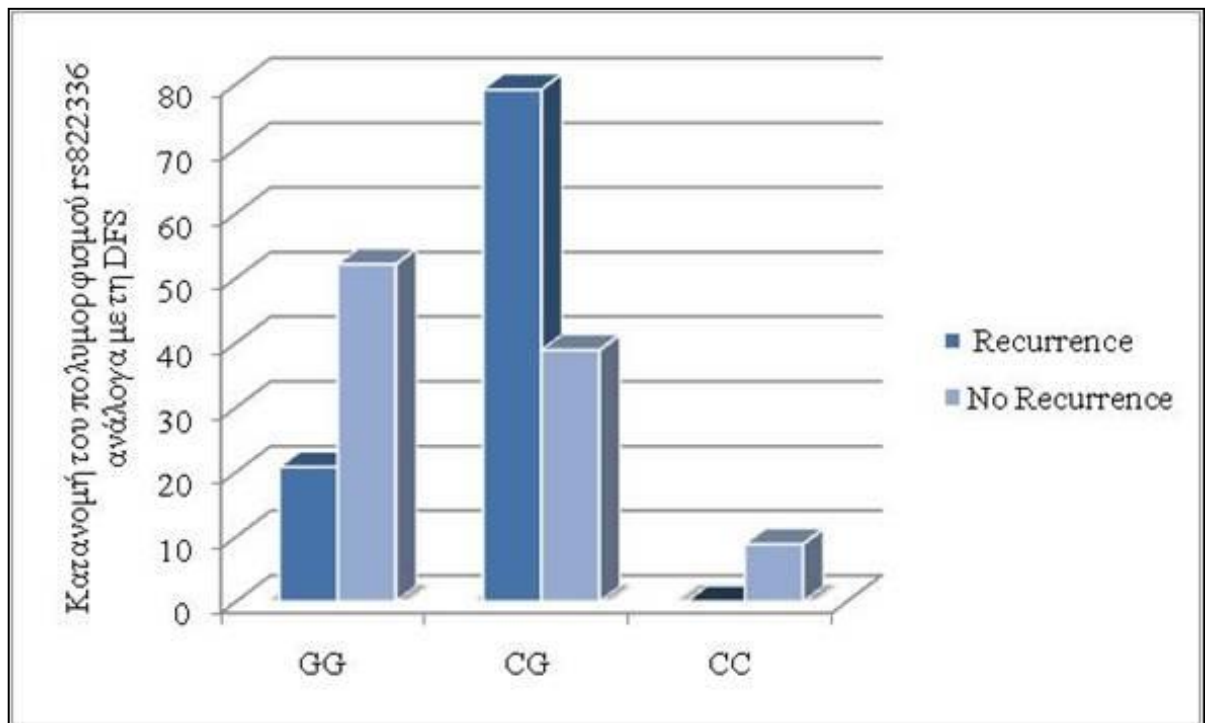
Πίνακας 3.2 Συσχέτιση του πολυμορφισμού PD-L1 rs822336 G>C με τις κλινικοπαθολογικές μεταβλητές των ασθενών

Μεταβλητή	Αριθμός ασθενών	Πολυμορφισμός rs822336			Τιμή p*
		GG	CG	CC	
<b>Ηλικία</b>					
≥57	57	28 (49.1%)	25 (43.9%)	4 (7.0%)	0.99
<57	56	27 (48.2%)	25 (44.6%)	4 (7.1%)	
Άγνωστο	1				
<b>Διήθηση λεμφαδένων</b>					
N0	66	29 (43.9%)	30 (45.5%)	7 (10.6%)	0.44
N1	13	6 (46.2%)	6 (46.2%)	1 (7.7%)	
N2	9	4 (44.4%)	5 (55.6%)	0 (0%)	
N3	19	13 (68.4%)	6 (31.6%)	0 (0%)	
Άγνωστο	7				
<b>Ιστολογικός τύπος</b>					
Ductal	87	44 (50.6%)	37 (42.5%)	6 (6.9%)	0.25
Lobular	10	6 (60.0%)	4 (40.0%)	0 (0%)	
Medular	8	2 (25.0%)	4 (50%)	2 (25.0%)	
Άλλο	9	3 (33.3%)	6 (66.7%)	0 (0%)	
Άγνωστο	0				
<b>Βαθμός κακοήθειας</b>					
I	2	1 (50.0%)	1 (50.0%)	0 (0%)	0.62
II	10	7 (70.0%)	3 (30.0%)	0 (0%)	
III	95	43 (45.3%)	45 (47.4%)	7 (7.4%)	
Άγνωστο	7				
<b>Ki-67 Index</b>					
Αρνητικό	58	27 (46.6%)	26 (44.8%)	5 (8.6%)	0.77
Θετικό	15	28 (50.0%)	25 (44.6%)	3 (5.4%)	
<b>Στάδιο TNM</b>					
I	20	9 (45.0%)	8 (40.0%)	3 (15.0%)	<b>0.022</b>
II	41	22 (53.7%)	16 (39.0%)	3 (7.3%)	
III	24	13 (54.2%)	10 (41.7%)	1 (4.2%)	
IV	22	4 (18.2%)	18 (81.8%)	0 (0%)	
Άγνωστο	7				
<b>DFS</b>					
Υποτροπή	24	5 (20.8%)	19 (79.2%)	0 (0%)	<b>0.02</b>
Όχι υποτροπή	90	47 (52.2%)	35 (38.9%)	8 (8.9%)	
<b>OS</b>					
Θάνατος	27	9 (33.3%)	18 (66.7%)	0 (0%)	<b>0.04</b>
Όχι θάνατος	93	43 (49.4%)	36 (41.4%)	8 (9.2%)	

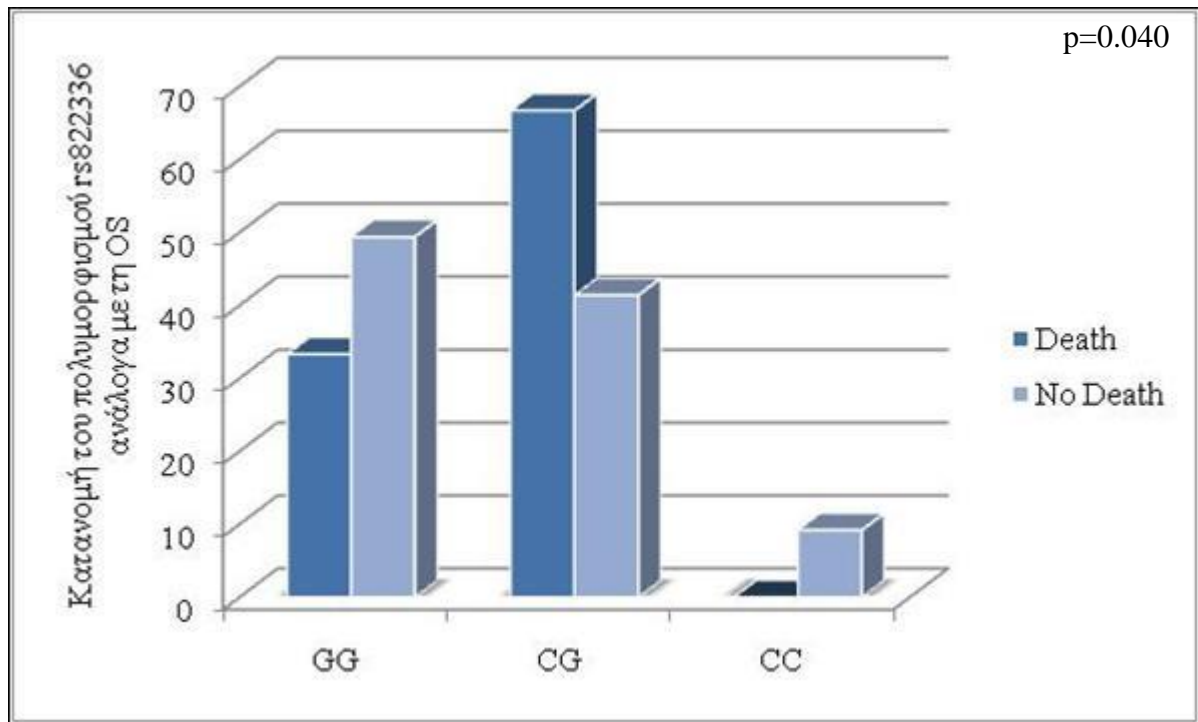
\*Υπολογίστηκε με το τεστ chi square



Εικόνα 3.2 Κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού PD-L1 rs822336 G>C ανάλογα με το στάδιο της νόσου



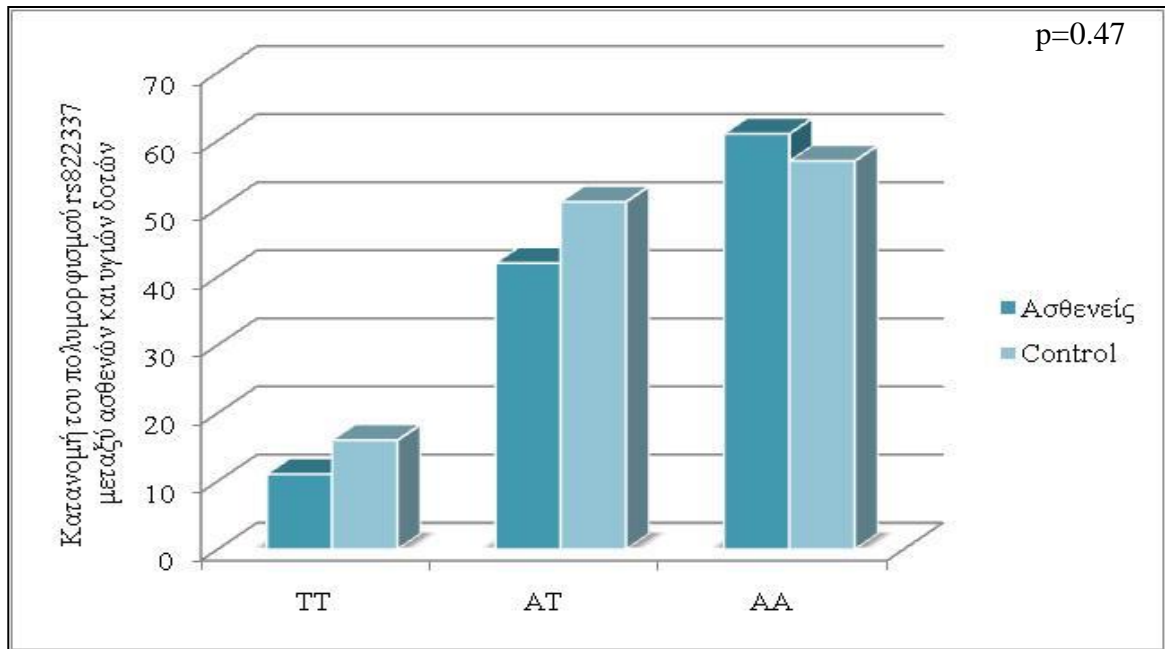
Εικόνα 3.3 Κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού PD-L1 rs822336 G>C ανάλογα με την επιβίωση χωρίς υποτροπές



Εικόνα 3.4 Κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού PD-L1 rs822336 G>C ανάλογα με την ολική επιβίωση

### 3.3 Διαφορική κατανομή του πολυμορφισμού PD-L1 rs822337 T>A μεταξύ των ασθενών με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού και των υγιών μαρτύρων

Η ανίχνευση του πολυμορφισμού PD-L1 rs822336 T>A πραγματοποιήθηκε σε 114 ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού και 124 υγιείς μάρτυρες. Η στατιστική ανάλυση αποκάλυψε ότι στην ομάδα των ασθενών τα πιο συχνά αλληλόμορφα ήταν τα AA και AT με ποσοστά εμφάνισης 53.5% και 36.8% αντίστοιχα. Παρόμοια ήταν και η εικόνα στην ομάδα των υγιών δοτών, όπου παρατηρήθηκε μία ισοκατανομή αυτών των αλληλίων καθώς τα ποσοστά για τα AA και AT ήταν 46% και 41,1% αντίστοιχα. ωστόσο σε αυτή την περίπτωση το αλληλόμορφο GG είχε ελαφρώς αυξημένα ποσοστά εμφάνισης σε σχέση με το CG (55.6% έναντι 34.7%). Το αλληλόμορφο TT παρουσίασε τα χαμηλότερα ποσοστά τόσο στους ασθενείς (9.6%) όσο και στους υγιείς δότες (12.9%). Η σύγκριση της κατανομής του κάθε αλληλόμορφου στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς δότες αποκάλυψε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p=0.47$ ) στα ποσοστά εμφάνισης του κάθε αλληλόμορφου σε αυτές τις εξεταζόμενες ομάδες (Εικόνα 3.5, Πίνακας 3.3).



Εικόνα 3.5 Κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού PD-L1 rs822337 T>A μεταξύ των ασθενών και των υγιών δοτών

Πίνακας 3.3 Κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού PD-L1 rs822337 T>A μεταξύ των ασθενών και των υγιών δοτών

Μεταβλητή	Αριθμός ασθενών	Πολυμορφισμός rs822337			Τιμή p*
		TT	AT	AA	
Ασθενείς	114	11 (9.6%)	42 (36.8%)	61 (53.5%)	0.47
Υγιείς	124	16 (12.9%)	51 (41.1%)	57 (46.0%)	

\* Υπολογίστηκε με τη μέθοδο chi square test

### 3.4 Συσχέτιση του προφίλ έκφρασης των διαφορετικών αλληλόμορφων του πολυμορφισμού PD-L1 rs822337 T>A με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών

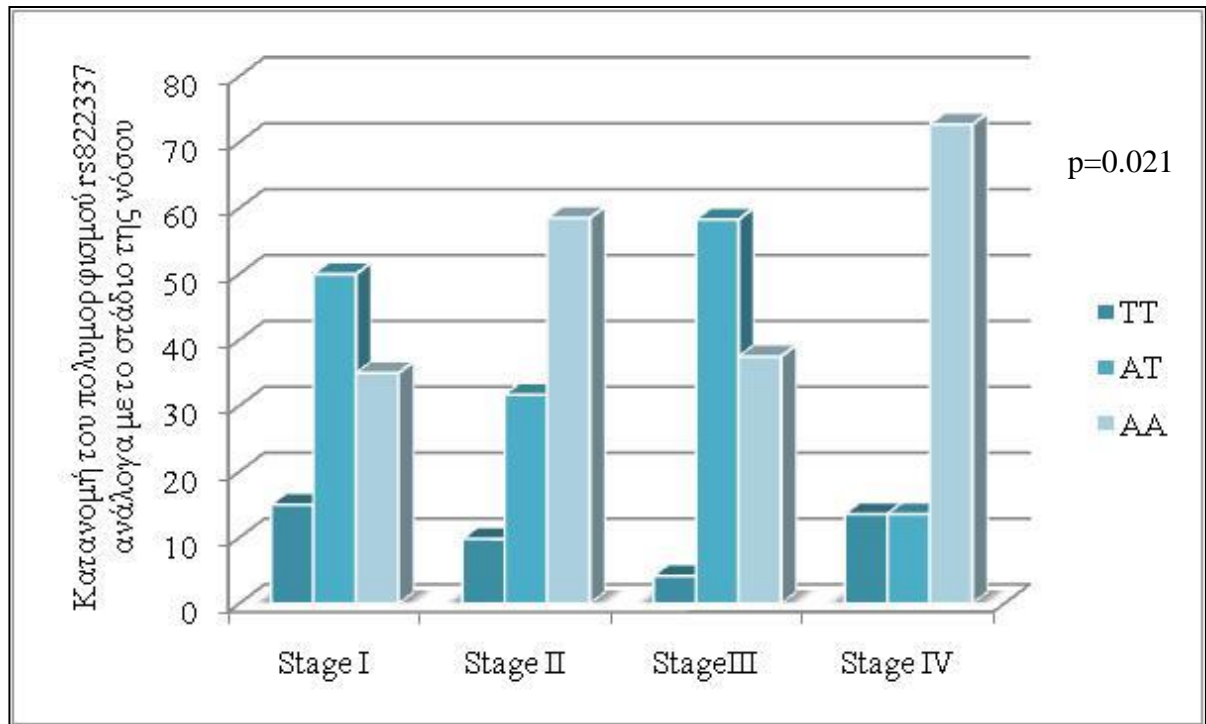
Η στατιστική ανάλυση έδειξε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα διαφορετικά αλληλόμορφα του πολυμορφισμού rs822337 T>A με το στάδιο της νόσου καθώς και την επιβίωση (Πίνακας 3.4). Βρέθηκε ότι η πλειονότητα (72.7%) των όγκων σταδίου IV φέρουν το αλληλίο AA. Αυτή η διαφορά στην κατανομή των αλληλόμορφων είναι στατιστικά σημαντική ( $p=0.04$ , Εικόνα 3.6). Επιπλέον βρέθηκε ότι η ύπαρξη του αλληλόμορφου AA σχετίζεται με την χωρίς υποτροπές ( $p=0.021$ , Εικόνα 3.7) αλλά και την ολική επιβίωση ( $p=0.004$ , Εικόνα 3.8). Έτσι από τις 24 ασθενείς που έχουν υποτροπιάσει οι 18 (75%), φέρουν

το αλληλόμορφο AA. Αντίστοιχα στο σύνολο των 27 γυναικών που απεβίωσαν οι 22 (81.5%) είναι επίσης φορείς του συγκεκριμένου αλληλόμορφου.

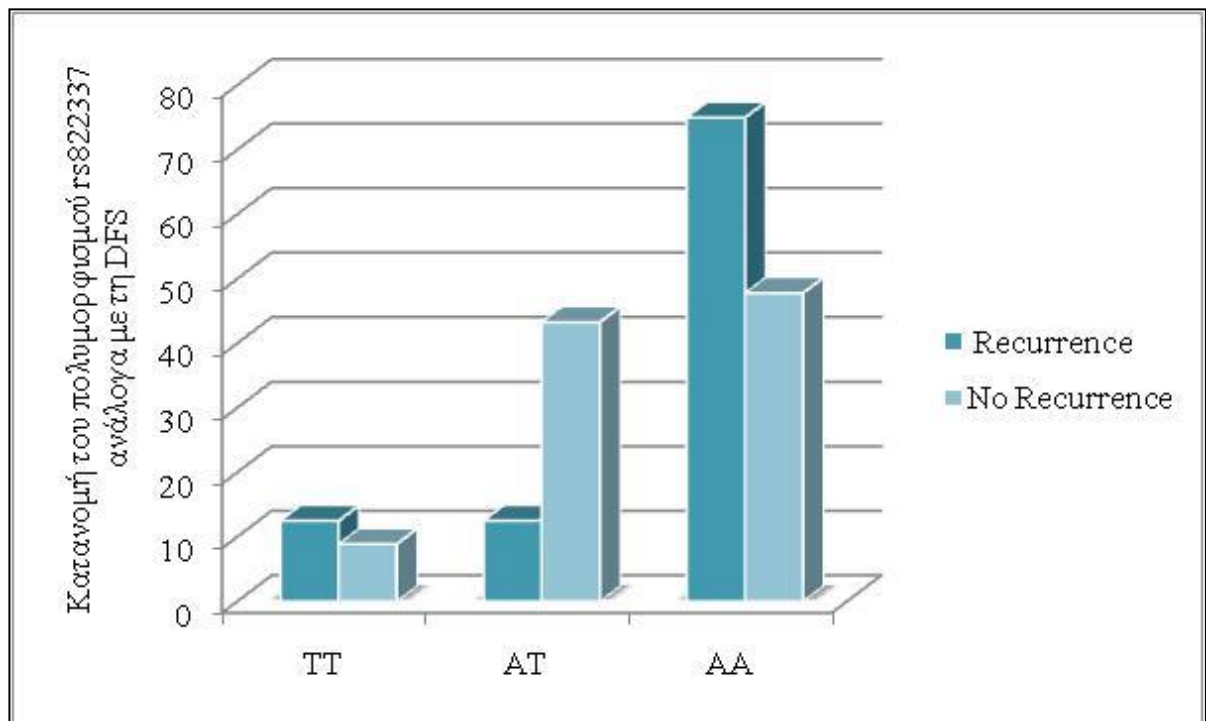
Πίνακας 3.4 Συσχέτιση του πολυμορφισμού PD-L1 rs822337 T>A με τις κλινικοπαθολογικές μεταβλητές των ασθενών

Μεταβλητή	Αριθμός ασθενών	Πολυμορφισμός rs822337			Τιμή p*
		TT	AT	AA	
<b>Ηλικία</b>					
≥57	57	6 (10.5%)	21 (36.8%)	30 (52.6%)	0.94
<57	56	5 (8.9%)	20 (35.7%)	31 (55.4%)	
Άγνωστο	1				
<b>Διήθηση λεμφαδένων</b>					
N0	66	4 (6.1%)	25 (37.9%)	37 (56.1%)	0.15
N1	13	4 (30.8%)	3 (23.1%)	6 (46.2%)	
N2	9	1 (11.1%)	3 (33.3%)	5 (55.6%)	
N3	19	2 (10.5%)	10 (52.6%)	7 (36.8%)	
Άγνωστο	7				
<b>Ιστολογικός τύπος</b>					
Ductal	87	9 (10.3%)	33 (37.9%)	45 (51.7%)	0.93
Lobular	10	1 (10.0%)	4 (40.0%)	5 (50.0%)	
Medular	8	0 (0%)	3 (37.5%)	5 (62.5%)	
Άλλο	9	1 (11.1%)	2 (22.2%)	6 (66.7%)	
<b>Βαθμός κακοήθειας</b>					
I	1	1 (5.00%)	0 (0%)	1 (50.0%)	0.31
II	10	1 (10.0%)	3 (30.0%)	6 (60%)	
III	92	8 (8.4%)	38 (40.0%)	49 (51.6%)	
Άγνωστο	11				
<b>Ki-67 Index</b>					
Αρνητικό	58	5 (8.6%)	18 (31.0%)	35 (60.3%)	0.32
Θετικό	56	6 (10.7%)	24 (42.9%)	26 (46.4%)	
<b>Στάδιο TNM</b>					
I	20	3 (15.0%)	10 (50.0%)	7 (35.0%)	<b>0.04</b>
II	41	4 (9.8%)	13 (31.7%)	24 (58.5%)	
III	24	1 (4.2%)	14 (58.3%)	9 (37.5%)	
IV	22	3 (13.6%)	3 (13.6%)	16 (72.7%)	
<b>DFS</b>					
Υποτροπή	24	3 (12.5%)	3 (12.5%)	18 (75.0%)	<b>0.021</b>
Όχι υποτροπή	90	8 (8.9%)	39 (43.3%)	43 (47.8%)	
<b>OS</b>					
Θάνατος	27	1 (3.7%)	4 (14.8%)	22 (81.5%)	<b>0.004</b>
Όχι θάνατος	87	10 (11.5%)	38 (43.7%)	39 (44.8%)	

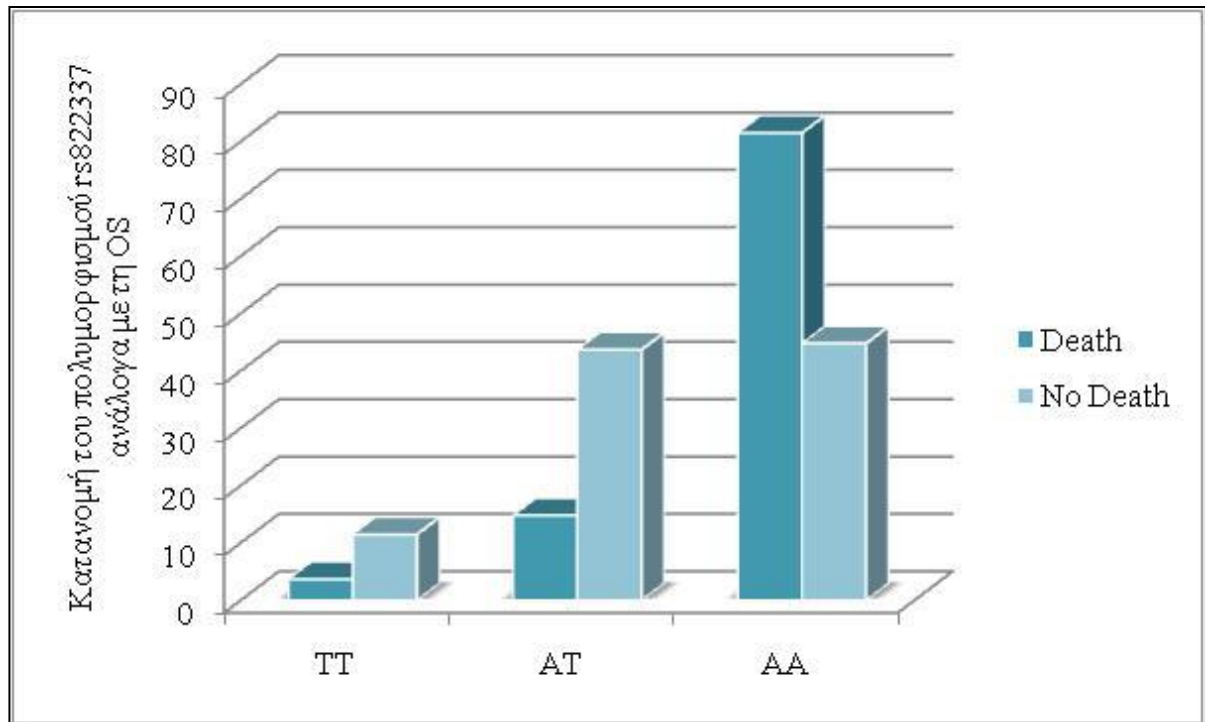
\* Υπολογίστηκε με τη μέθοδο chi square test



Εικόνα 3.6 Κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού PD-L1 rs822337 T>A ανάλογα με το στάδιο της νόσου



Εικόνα 3.7 Κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού PD-L1 rs822337 T>A ανάλογα με την επιβίωση χωρίς υποτροπές



Εικόνα 3.8 Κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού *PD-L1 rs822337 T>A* ανάλογα με την ολική επιβίωση

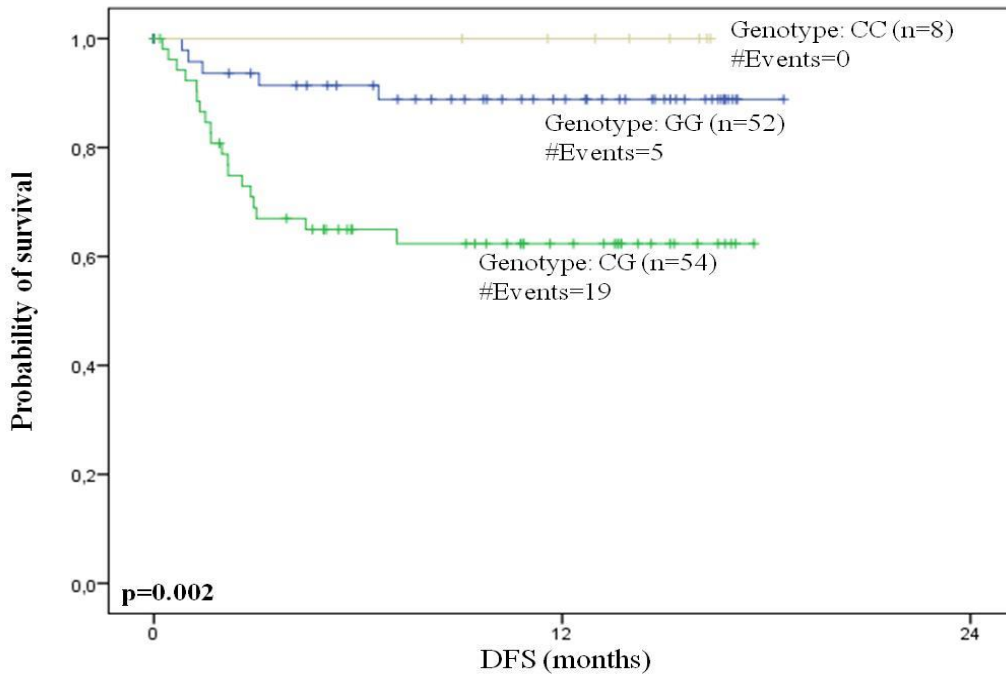
### 3.5 Ανάλυση επιβίωσης και προγνωστική σημασία των *PD-L1* πολυμορφισμών σε ασθενείς με τριπλά αρνητικά καρκίνου μαστού

Από το σύνολο των ασθενών υπήρχαν πληροφορίες για την ολική και χωρίς υποτροπή επιβίωση για τους 108 ασθενείς. Στο σύνολο αυτών των ασθενών, οι 24 (21.1%) εμφάνισαν υποτροπή και 27 απεβίωσαν (23.7%). Από τις 24 ασθενείς που υποτροπίασαν οι 5 (20.8%) έφεραν το αλληλόμορφο GG, οι 19 (79.2%) το αλληλόμορφο CG και καμία (0.0%) το αλληλόμορφο CC (Πίνακας 3.2). Τα αντίστοιχα ποσοστά για τα αλληλόμορφα TT, AT, AA ήταν 12.5%, 12.5% και 75% (Πίνακας 3.4). Επίσης, από τις 27 ασθενείς που απεβίωσαν οι 9 (33.3%) έφεραν το GG αλληλόμορφο, 18 (66.7%) είχαν το αλληλόμορφο CG (Πίνακας 3.2), 1 (3.7%) ήταν φορέας του αλληλίου TT, 4 (14.8%) είχαν το αλληλόμορφο AT και 22 (81.5%) το αλληλίο AA (Πίνακας 3.4).

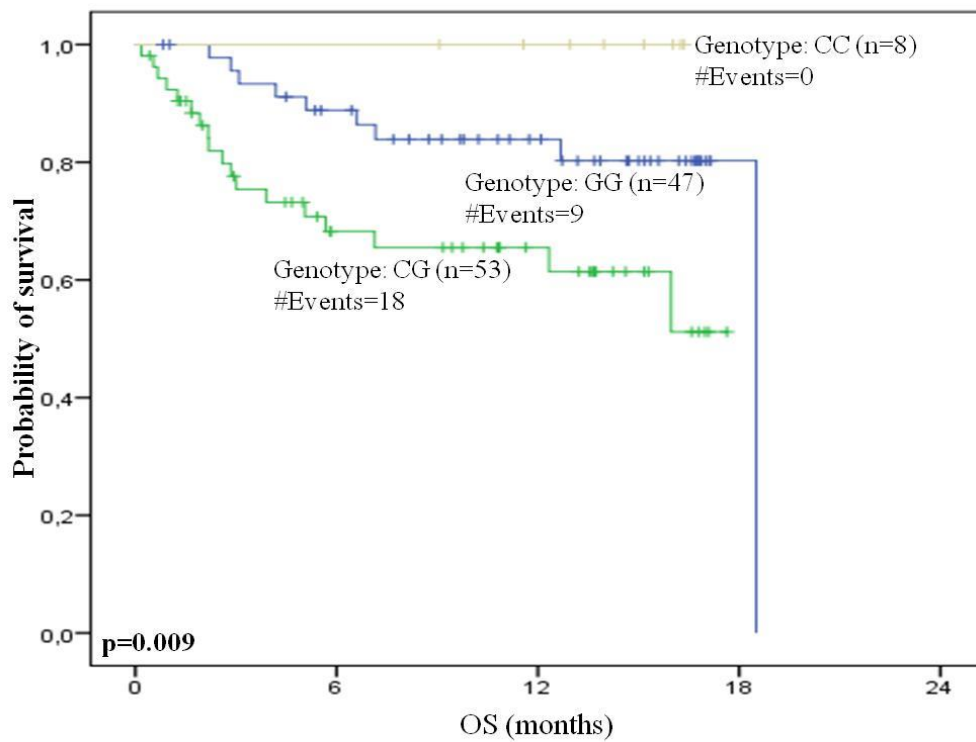
#### 3.5.1 Ανάλυση επιβίωσης και προγνωστική σημασία του *rs822336 G>C*

Για την ανάλυση επιβίωσης πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Kaplan-Meier και ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox. Αρχικά η ανάλυση κατά Kaplan-Meier εφαρμόστηκε στο σύνολο των ασθενών και βρέθηκε ότι οι γυναίκες με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού και γονότυπο CG χαρακτηρίζονται από μικρότερα διαστήματα επιβίωσης χωρίς υποτροπές ( $p=0.002$ , Εικόνα 3.9). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από την ανάλυση κατά

Καρταν-Μεϊερ αναφορικά με την ολική επιβίωση, καθώς παρατηρήθηκε ότι η παρουσία του αλληλόμορφου CG σχετίζεται με μικρότερα διαστήματα ολικής επιβίωσης ( $p=0.009$ , Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.9 Καμπύλες κατά Καρταν-Μεϊερ για την επιβίωση χωρίς υποτροπές



Εικόνα 3.10 Καμπύλες κατά Καρταν-Μεϊερ για την ολική επιβίωση



Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν από την μονομεταβλητή ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox (Πίνακας 3.5). Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι οι ασθενείς που είναι φορείς του CG αλληλόμορφου έχουν 4 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής σε σχέση με τις ασθενείς που φέρουν το αλληλόμορφο GG (HR= 4.06, p=0.005). Αντίστοιχα το αλληλόμορφο CG σχετίζεται με σχεδόν διπλάσιο κίνδυνο θανάτου (HR= 2.74, p=0.018).

Πίνακας 3.5 Μονομεταβλητή ανάλυση των αλληλόμορφων GG, CG και CC αναφορικά με τη ολική (OS) και τη χωρίς υποτροπές (DFS) επιβίωση

<b>Επιβίωση χωρίς υποτροπές (DFS) (n=107)</b>			
<b>Μεταβλητή</b>	<b>HR<sup>a</sup></b>	<b>95% CI<sup>b</sup></b>	<b>Τιμή p</b>
<i>Πολυμορφισμός rs822336</i>			
GG	1.00		
CG	4.06	1.51-4.88	<b>0.005</b>
CC	0.00	0.00	
<b>Ολική επιβίωση (OS) (n=108)</b>			
<b>Μεταβλητή</b>	<b>HR<sup>a</sup></b>	<b>95% CI<sup>b</sup></b>	<b>Τιμή p</b>
<i>Πολυμορφισμός rs822336</i>			
GG	1.00		
CG	2.74	1.18-6.32	<b>0.018</b>
CC	0.00	0.00	

<sup>a</sup> Αναλογία κινδύνου

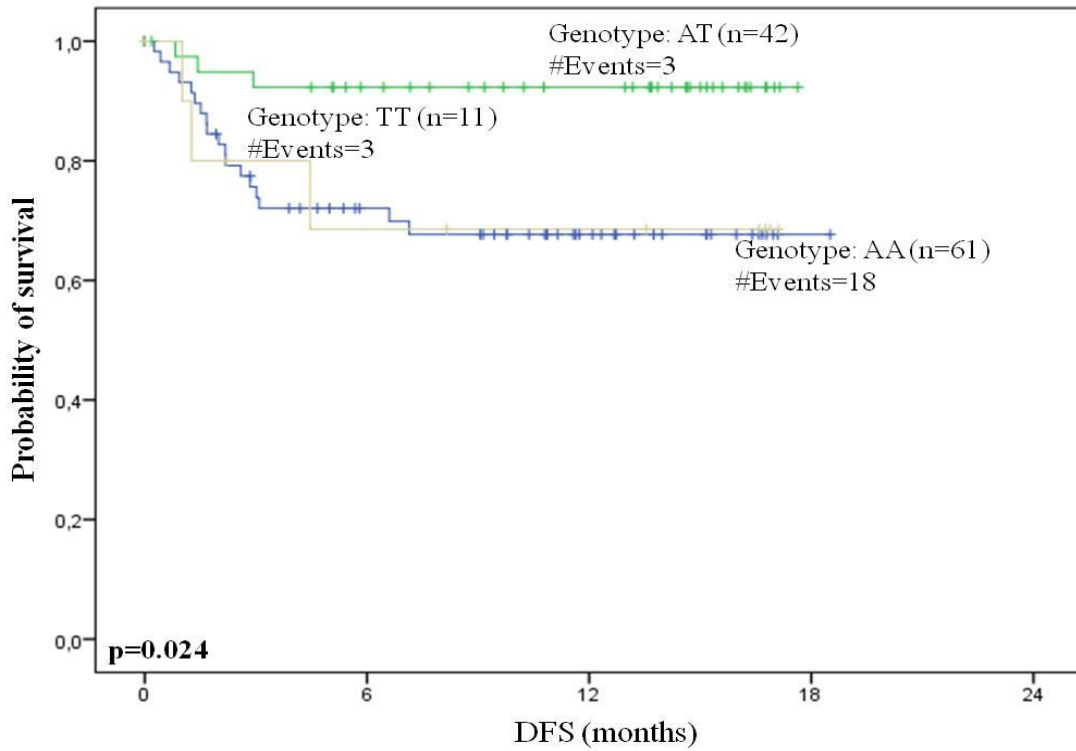
<sup>b</sup> Διάστημα εμπιστοσύνης για την εκτιμώμενη αναλογία κινδύνου.

### 3.5.2 Ανάλυση επιβίωσης και προγνωστική σημασία του rs822337 T>A

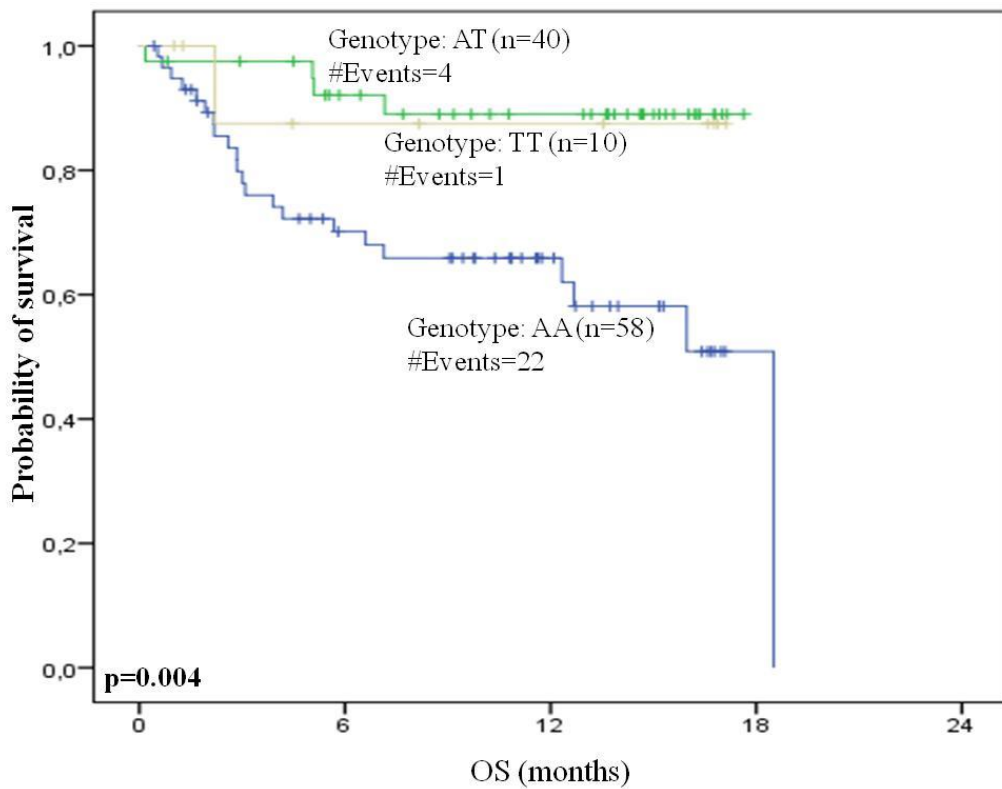
Η αντίστοιχη ανάλυση για τον πολυμορφισμό *PD-L1 rs822337 T>A* έδειξε ότι το 75% των γυναικών που εμφάνισαν υποτροπή και το 81.5% των γυναικών που απεβίωσαν έφεραν το αλληλόμορφο AA (Πίνακας 3.4). Σε συμφωνία με την παραπάνω παρατήρηση η ανάλυση κατά Kaplan-Meier έδειξε ότι το αλληλόμορφο AA σχετίζεται με μικρότερα διαστήματα επιβίωσης χωρίς υποτροπές (p=0.024, Εικόνα 3.11) αλλά και ολικής (p=0.004, Εικόνα 3.12).

Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν από την μονομεταβλητή ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox (Πίνακας 3.6). Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι οι ασθενείς που είναι φορείς του AA αλληλόμορφου έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής σε σχέση με τις ασθενείς που φέρουν το αλληλόμορφο TT (HR= 1.02, p=0.04). Ωστόσο θα πρέπει να αναφερθεί ότι τα επίπεδα σημαντικότητας είναι οριακά αποδεκτά γεγονός που επιβάλλει την προσεκτική αξιολόγηση αυτών των αποτελεσμάτων. Η ανάλυση κατά Cox για την ολική επιβίωση οδήγησε σε πιο ασφαλή συμπεράσματα και έδειξε ότι οι γυναίκες που φέρουν το αλληλόμορφο AA

έχουν 4 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο θανάτου λόγω της νόσου σε σχέση με αυτές που είναι φορείς του TT αλληλόμορφου (HR= 4.04, p=0.01).



Εικόνα 3.11 Καμπύλες κατά Kaplan-Meier για την επιβίωση χωρίς υποτροπές



Εικόνα 3.12 Καμπύλες κατά Kaplan-Meier για την ολική επιβίωση

Πίνακας 3.6 Μονομεταβλητή ανάλυση των αλληλόμορφων TT, AT και AA αναφορικά με τη ολική (OS) και τη χωρίς υποτροπές (DFS) επιβίωση

<b>Επιβίωση χωρίς υποτροπές (DFS) (n=107)</b>			
<b>Μεταβλητή</b>	<b>HR<sup>α</sup></b>	<b>95% CI<sup>β</sup></b>	<b>Τιμή p</b>
<i>Πολυμορφισμός rs822337</i>			
TT	1.00		
AT	0.22	0.04-1.08	<b>0.04</b>
AA	1.02	0.30-2.45	
<b>Ολική επιβίωση (OS) (n=108)</b>			
<i>Πολυμορφισμός rs822337</i>			
TT	1.00		
AT	0.87	0.10-2.75	<b>0.01</b>
AA	4.04	0.54-3.24	

<sup>α</sup> Αναλογία κινδύνου

<sup>β</sup> Διάστημα εμπιστοσύνης για την εκτιμώμενη αναλογία κινδύνου.

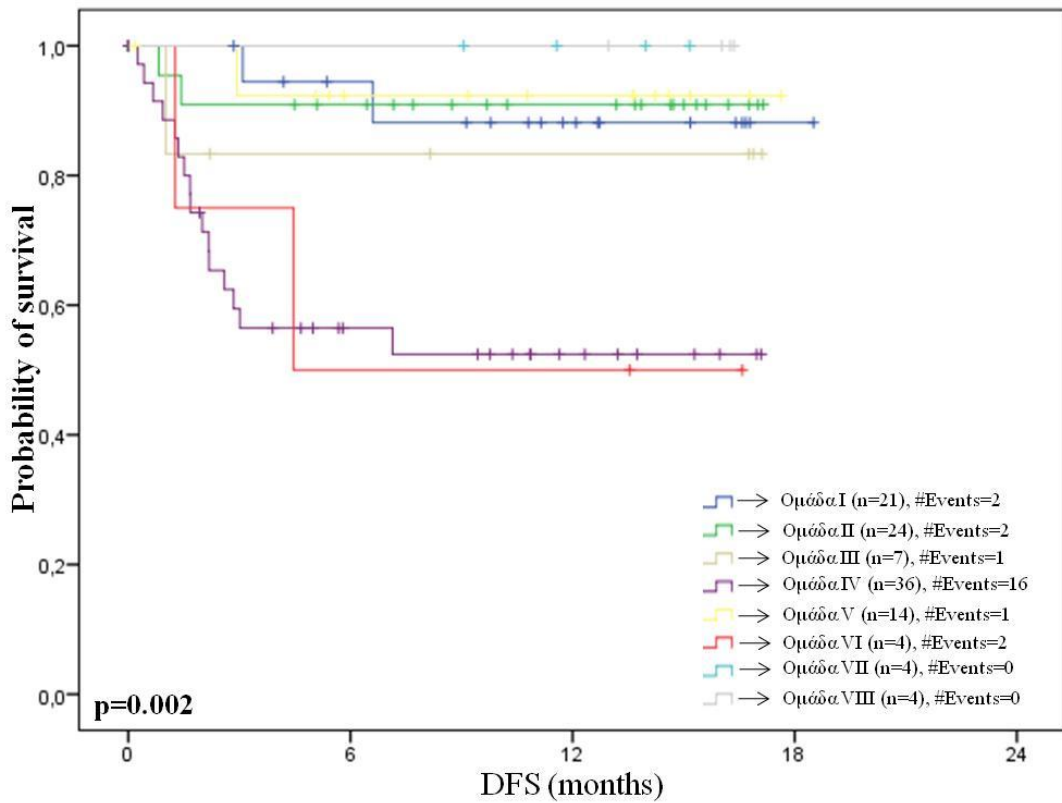
### 3.5.3 Ανάλυση επιβίωσης και προγνωστική σημασία του συνδυασμού των rs822336G>C/rs822337T>A

Στη συνέχεια κρίθηκε ενδιαφέρουσα η πραγματοποίηση της ίδιας ανάλυσης μετά από κατηγοριοποίηση των ασθενών σε ομάδες ανάλογα με το συνδυασμό των πολυμορφισμών rs822336G>C και rs822337T>A. Πιο αναλυτικά κατηγοριοποιήθηκαν στις ομάδες που αναφέρονται στον πίνακα 3.6 και ακολούθησε η ανάλυση κατά Kaplan-Meier και εν συνεχεία η ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox. (Πίνακας 3.7)

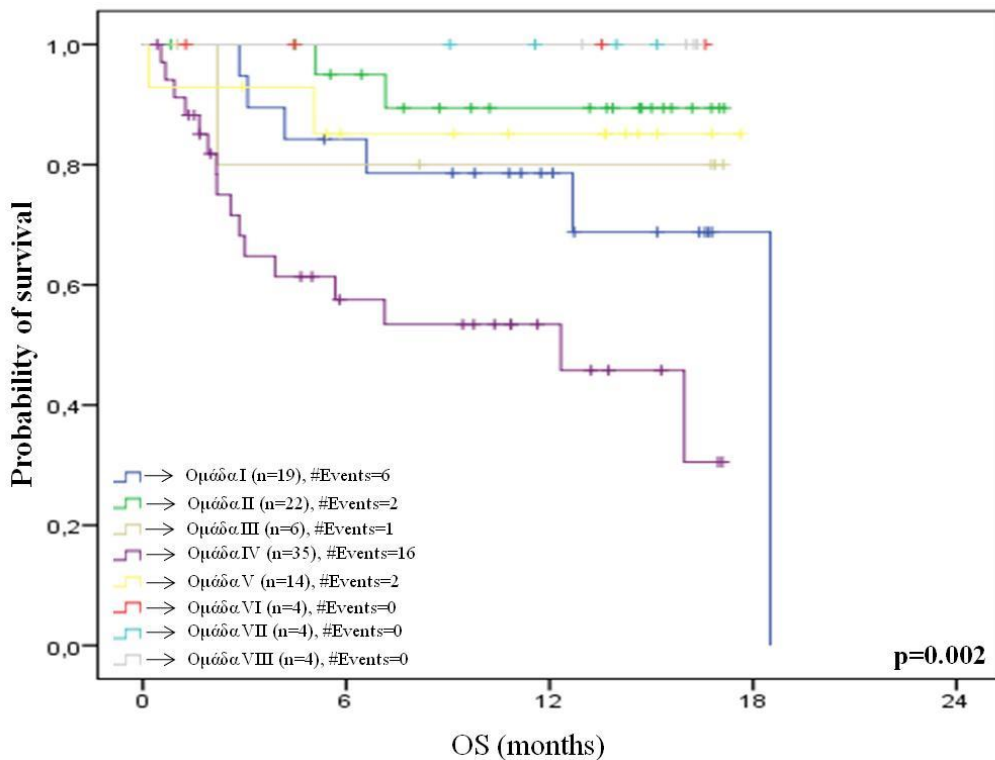
Πίνακας 3.7 Κατηγοριοποίηση ασθενών

<b>Ομάδα</b>	<b>Αλληλόμορφο του rs822336</b>	<b>Αλληλόμορφο του rs822337</b>	<b>Σύνολο</b>	<b>Υποτροπή</b>	<b>Θάνατος</b>
<b>I</b>	GG	AA	21	2 (9.5%)	6 (28.6%)
<b>II</b>	GG	AT	24	2 (8.3%)	2 (8.3%)
<b>III</b>	GG	TT	7	1 (14.3%)	1 (14.3%)
<b>IV</b>	CG	AA	36	16 (44.4%)	16 (44.4%)
<b>V</b>	CG	AT	14	1 (7.1%)	2 (14.2%)
<b>VI</b>	CG	TT	4	2 (50%)	0
<b>VII</b>	CC	AA	4	0	0
<b>VIII</b>	CC	AT	4	0	0
<b>IX</b>	CC	TT	-	-	-

Η ανάλυση κατά Kaplan-Meier έδειξε ότι η συνύπαρξη των αλληλόμορφων CG και AA σχετίζεται με μικρότερα διαστήματα επιβίωσης χωρίς υποτροπές ( $p=0.002$ , Εικόνα 3.13) αλλά και ολικής ( $p=0.002$ , Εικόνα 3.14).



Εικόνα 3.13 Καμπύλες κατά Kaplan-Meier για την επιβίωση χωρίς υποτροπές



Εικόνα 3.14 Καμπύλες κατά Kaplan-Meier για την ολική επιβίωση

Σε συμφωνία με τα παραπάνω αποτελέσματα η ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox έδειξε ότι η συνύπαρξη των αλληλόμορφων CG και AA σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση όσον αφορά την ολική και τη χωρίς υποτροπές επιβίωση (Πίνακας 3.8).

Πίνακας 3.8 Μονομεταβλητή ανάλυση των πολυμορφισμών rs822336 και rs822337 αναφορικά με τη ολική (OS) και τη χωρίς υποτροπές (DFS) επιβίωση

<b>Επιβίωση χωρίς υποτροπές (DFS) (n=107)</b>			
<b>Μεταβλητή</b>	<b>HR<sup>α</sup></b>	<b>95% CI<sup>β</sup></b>	<b>Τιμή p</b>
<i>Ομάδα ασθενών</i>			
I (GG+AA)	1.00		0.05
II (GG+AT)	0.9	0.13-6.38	0.92
III (GG+TT)	1.89	0.1-2.87	0.60
IV (CG+AA)	5.89	1.35-8.65	<b>0.018</b>
V (CG+AT)	0.73	0.07-8.08	0.80
VI (CG+TT)	5.76	0.81-7.93	0.08
VII (CC+AA)	0.0	0.00-0.00	0.98
VIII (CC+AT)	0.0	0.00-0.00	0.98
<b>Ολική επιβίωση (OS) (n=108)</b>			
<i>Ομάδα ασθενών</i>			
I (GG+AA)	1.00		0.06
II (GG+AT)	0.34	0.06-1.76	0.20
III (GG+TT)	0.69	0.08-5.97	0.74
IV (CG+AA)	2.78	1.02-7.65	<b>0.04</b>
V (CG+AT)	0.58	0.11-3.02	0.52
VI (CG+TT)	0.0	0.00-0.00	0.98
VII (CC+AA)	0.0	0.00-0.00	0.98
VIII (CC+AT)	0.0	0.00-0.00	0.98

<sup>α</sup> Αναλογία κινδύνου

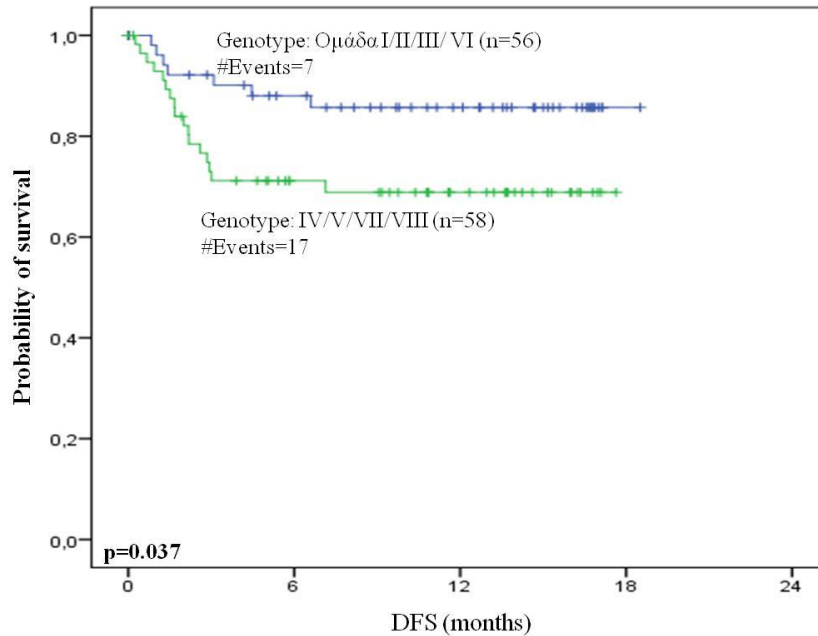
<sup>β</sup> Διάστημα εμπιστοσύνης για την εκτιμώμενη αναλογία κινδύνου.

Στη συνέχεια έγινε ανάλυση επιβίωσης μετά από κατηγοριοποίηση των ασθενών της μελέτης ανάλογα με το εάν έφεραν τουλάχιστον έναν από τους δύο εξεταζόμενους πολυμορφισμούς:

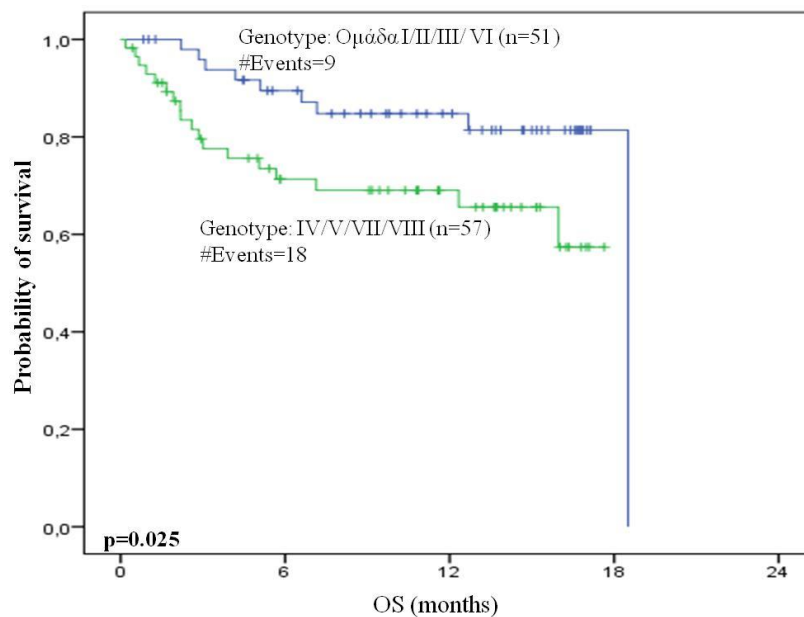
- Ομάδα A: Ασθενείς που ήταν φορείς των αλληλίων GG+AA(I) ή GG+AT (II) ή GG+TT (III) ή CG+TT (VI)

- Ομάδα Β: Ασθενείς που ήταν φορείς των αλληλίων CG+AA (IV) ή CG+AT (V) ή CC+AA (VII) ή CC+AT (VIII).

Από την ανάλυση Kaplan-Meier προέκυψε ότι η παρουσία και των δύο πολυμορφισμών σχετίζεται με μικρότερο ελεύθερο νόσου διάστημα ( $p = 0.037$ ) (Εικόνα 3.15). Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και για την ολική επιβίωση των ασθενών ( $p=0.025$ , Εικόνα 3.16).



Εικόνα 3.15 Καμπύλες κατά Kaplan-Meier για την επιβίωση χωρίς υποτροπές



Εικόνα 3.16 Καμπύλες κατά Kaplan-Meier για την ολική επιβίωση

Στη συνέχεια ακολούθησε ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox σε μονομεταβλητό αλλά και πολυμεταβλητό επίπεδο για τη διερεύνηση της προγνωστικής αξίας της συνύπαρξης των εξεταζόμενων πολυμορφισμών.

Πίνακας 3.9 Μονομεταβλητή και πολυμεταβλητή ανάλυση των πολυμορφισμών rs822336 και rs822337 αναφορικά με τη χωρίς υποτροπές επιβίωση (DFS)

<b>Μονομεταβλητή ανάλυση (n=107)</b>			
<b>Μεταβλητή</b>	<b>HR<sup>α</sup></b>	<b>95% CI<sup>β</sup></b>	<b>Τιμή p</b>
<i>Ομάδα ασθενών</i>			
A	1.00		<b>0.04</b>
B	2.45	1.03-5.98	
<b>Πολυμεταβλητή ανάλυση (n=98)</b>			
<i>Ομάδα ασθενών</i>			
A	1.00		<b>0.02</b>
B	2.89	1.13-7.87	
Βαθμός κακοήθειας	1.37	0.37-5.11	0.63
Ηλικία	0.63	0.26-1.50	0.29
Διήθηση λεμφαδένων	1.35	0.96-1.90	0.07
Ιστολογικός τύπος	1.15	0.75-1.76	0.52

<sup>α</sup> Αναλογία κινδύνου

<sup>β</sup> Διάστημα εμπιστοσύνης για την εκτιμώμενη αναλογία κινδύνου.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 3.9 η συνύπαρξη τουλάχιστον των δύο πολυμορφισμών σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση καθώς οι συγκεκριμένες ασθενείς παρουσιάζουν σχεδόν 2.5 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης υποτροπής σε σχέση με αυτές που φέρουν έναν ή κανέναν από τους εξεταζόμενους πολυμορφισμούς. Ένα ενδιαφέρον αποτέλεσμα προέκυψε από την πολυμεταβλητή ανάλυση κατά Cox η οποία αποκάλυψε την ανεξάρτητη προγνωστική αξία της παρουσίας και των δύο πολυμορφισμών μετά από προσαρμογή του μοντέλου για τις τιμές των μεταβλητών 1) Βαθμός κακοήθειας, 2) Ηλικία, 3) Αριθμός διηθημένων λεμφαδένων και 4) Ιστολογικός τύπος. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι η παρουσία και των δύο πολυμορφισμών αποτελεί έναν ισχυρό και ανεξάρτητο δείκτη πρόβλεψης μικρότερης επιβίωσης χωρίς υποτροπές (HR= 2.89, p=0.02). Ακολούθησε η ίδια ανάλυση για την ολική επιβίωση προκύπτοντας τα αποτελέσματα του πίνακα 3.10.

Πίνακας 3.10 Μονομεταβλητή και πολυμεταβλητή ανάλυση των πολυμορφισμών rs822336 και rs822337 αναφορικά με την ολική επιβίωση (OS)

<b>Μονομεταβλητή ανάλυση (n=108)</b>			
<b>Μεταβλητή</b>	<b>HR<sup>α</sup></b>	<b>95% CI<sup>β</sup></b>	<b>Τιμή p</b>
<i>Ομάδα ασθενών</i>			
A	1.00		<b>0.03</b>
B	2.52	1.09-5.80	
<b>Πολυμεταβλητή ανάλυση (n=98)</b>			
<i>Ομάδα ασθενών</i>			
A	1.00		<b>0.008</b>
B	3.44	1.37-8.61	
Βαθμός κακοήθειας	0.94	0.28-3.10	0.92
Ηλικία	1.88	0.79-4.45	0.15
Διήθηση λεμφαδένων	1.63	1.19-2.22	<b>0.002</b>
Ιστολογικός τύπος	0.86	0.55-1.34	0.51

<sup>α</sup> Αναλογία κινδύνου

<sup>β</sup> Διάστημα εμπιστοσύνης για την εκτιμώμενη αναλογία κινδύνου.

Σύμφωνα με αυτή την ανάλυση βρέθηκε αρχικά ότι η συνύπαρξη των δύο εξεταζόμενων πολυμορφισμών αποτελεί έναν δυσμενή δείκτη πρόγνωσης καθώς σχετίζεται με μειωμένα διαστήματα ολικής επιβίωσης (HR=2.52, p=0.03). Στη συνέχεια αξιολογήθηκε η ανεξαρτησία της προγνωστικής αξίας της παρουσίας των πολυμορφισμών rs822336 και rs822337 μέσω ανάπτυξης ενός πολυμεταβλητής ανάλυσης προσαρμοσμένο για την παρουσία των πολυμορφισμών, τον βαθμό κακοήθειας, την ηλικία, τον αριθμό των διηθημένων λεμφαδένων και τον ιστολογικό τύπο του όγκου. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο η συνύπαρξη των πολυμορφισμών rs822336 και rs822337 αποτελεί έναν ανεξάρτητο δείκτη πρόβλεψης πιο σύντομης ολικής επιβίωσης (HR=3.44, p-0.008).



#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποσκοπεί στην κλινική αξιολόγηση των πολυμορφισμών μονήρους νουκλεοτιδίου του γονιδίου *PD-L1* rs822336 G>C και rs822337 T>A για την πιθανή τους χρήση ως δείκτες πρόβλεψης και πρόγνωσης σε ασθενείς Καυκάσιας φυλής με τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού.

Η έλευση των νέων τεχνολογιών υψηλής απόδοσης για τη μελέτη του γονιδιώματος έχει συμβάλλει σημαντικά στην αναγνώριση νέων εν δυνάμει καρκινικών βιοδεικτών, Οι τεχνολογίες αυτές επιτρέπουν τον καλύτερο μοριακό χαρακτηρισμό του ανθρώπινου γονιδιώματος και παράλληλα έχουν συμβάλλει στην αναγνώριση μεταλλάξεων και SNPs που έχουν ενεργό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου αλλά και κλινική αξία στην διαχείριση αυτών των ασθενών είτε σαν θεραπευτικοί στόχοι είτε σαν δείκτες πρόγνωσης/πρόβλεψης<sup>94-96</sup>.

Ο PD-L1 είναι ο προσδέτης του υποδοχέα θανάτου PD-1 και μαζί συνιστούν το αντίστοιχο ανοσοποιητικό σημείο ελέγχου. Ο φυσιολογικός ρόλος του συγκεκριμένου σημείου ελέγχου έχει πολλαπλές επιδράσεις αλλά κυρίως συμβάλλει στην έγκαιρη αναστολή της φλεγμονής και την αποκατάσταση της ανοσολογικής ομοιόστασης με τελικό αποτέλεσμα τον περιορισμό των ανοσοπαθολογικών αποκρίσεων στους ιστούς του ξενιστή. Αναλυτικότερα, εάν οι αποκρίσεις των CD8<sup>+</sup> T κυττάρων δεν βρίσκονταν υπό αυστηρό έλεγχο, θα μπορούσε να προκληθεί οξεία ανοσοπαθολογία και/ή ανεξέλεγκτος κυτταρικός θάνατος λόγω της παραγωγής προ-φλεγμονοδών κυτοκινών (π.χ. IFN $\gamma$  και TNF)<sup>46</sup>. Επιπλέον, η δράση του συγκεκριμένου σημείου ελέγχου εμπλέκεται στην απομάκρυνση των εξασθενημένων T κυττάρων τα οποία έχουν ελαττωματικό φαινότυπο και δεν είναι ικανά να ανταποκρίνονται αποτελεσματικά στα διάφορα ερεθίσματα<sup>44</sup>.

Τα τελευταία χρόνια το σημείο ελέγχου PD-1/PD-L1 βρίσκεται στο επίκεντρο των μελετών για τον καρκίνο καθώς εμπλέκεται στην τακτική που υιοθετείται από τα καρκινικά κύτταρα για να ξεφεύγουν από το ανοσοποιητικό σύστημα μέσω της αναστολής της δράσης των κυτταροτοξικών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Η αναστολή αυτή επιτυγχάνεται μέσω της PD-1/PD-L1 αλληλεπίδρασης, η οποία όπως είναι γνωστό αποτελεί έναν αρνητικό ρυθμιστή της ανοσολογικής απόκρισης που διαμεσολαβείται από τα T κύτταρα. Επιπρόσθετα, το PD-L1 μπορεί να μεταδώσει απευθείας ενδοκυτταρικά αντιαποπτωτικά μηνύματα στα καρκινικά κύτταρα, επιτρέποντας τους με αυτόν τον τρόπο να "ξεφύγουν" από την κυτταροτοξικότητα των ιντερφερόνων. Παράλληλα τα συγκεκριμένα μόρια έχουν σημαντική προγνωστική αξία σε διάφορους τύπους καρκίνου αλλά κυρίως αποτελούν

χρήσιμους θεραπευτικούς στόχους καθώς πλέον έχουν εγκριθεί από τον FDA παράγοντες που στοχεύουν τα μόρια PD-1 και PD-L1.

Τα τελευταία χρόνια γνωρίζουμε ότι οι διαφορετικοί μοριακοί υπότυποι του καρκίνου του μαστού διαφέρουν στο ποσοστό διήθησής τους από τα ανοσοποιητικά κύτταρα και οι τριπλά αρνητικοί όγκοι του μαστού παρουσιάζουν τα υψηλότερα ποσοστά τέτοιας διήθησης σε σύγκριση με τους υπόλοιπους υπότυπους. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι οι τριπλά αρνητικοί όγκοι του μαστού παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του PD-L1 τόσο σε mRNA όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, ενώ παράλληλα γνωρίζουμε ότι ένα σημαντικό ποσοστό αυτών των όγκων παρουσιάζουν συχνά ενίσχυση του συγκεκριμένου γονιδίου. Αυτές οι τροποποιήσεις στην έκφραση του PD-L1 δικαιολογούνται εν μέρει από το γεγονός ότι η έκφραση του PD-L1 σχετίζεται σημαντικά με τη παρουσία των TILs<sup>64</sup>. Η παρατηρούμενη αυξημένη παρουσία TILs στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού, παρέχει πρόσφορο έδαφος για την διερεύνηση της πιθανής χρησιμότητας των αναστολέων των ανοσοποιητικών σημείων ελέγχου στη θεραπεία των συγκεκριμένων ασθενών. Η ανοσοθεραπεία στον καρκίνο του μαστού αποτελεί αντικείμενο εντατικής μελέτης τα τελευταία χρόνια και τα αποτελέσματα είναι ήδη αρκετά ενθαρρυντικά. Πρόσφατα ο Διεθνής Οργανισμός Φαρμάκων και Τροφών (FDA) ενέκρινε τη χρήση του Atezolizumab σε συνδυασμό με Nab-paclitaxel σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένο ή τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού, των οποίων ο όγκος εκφράζει το μόριο PD-L1<sup>75</sup>.

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί αρκετοί πολυμορφισμοί του *CD274*, ωστόσο είναι περιορισμένες οι πληροφορίες σχετικά με το πώς επηρεάζουν την έκφραση του γονιδίου. Οι πολυμορφισμοί rs822336G>C και rs822337T>A εντοπίζονται στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου και συγκεκριμένα 1813 και 1349 βάσεις από την σημείο έναρξης της μεταγραφής αντίστοιχα. Οι απλότυποι rs822336C-rs822337A σχετίζονται με σημαντική μείωση της ενεργότητας του υποκινητή, σε σχέση με τους απλότυπους rs822336G-rs822337T, και κατ' επέκταση οι απλότυποι rs822336C και rs822337A σχετίζονται με μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης PD-L1<sup>92</sup>. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι οι περιοχές στις οποίες εντοπίζονται οι εν λόγω πολυμορφισμοί είναι σημαντικοί για την ενεργοποίηση του υποκινητή ενώ ο πολυμορφισμός rs822337T>A εντοπίζεται σε μία περιοχή του υποκινητή με την οποία αλληλοεπιδρά ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB<sup>93</sup>. Από κλινικής άποψης έχει αναφερθεί ότι οι πολυμορφισμοί του *PD-L1* πιθανά να μπορούν να προβλέψουν την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία και την επιβίωση των ασθενών με προχωρημένο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα μετά από τη θεραπεία πρώτης γραμμής με Paclitaxel και Cisplatin<sup>97</sup>.

Οι πολυμορφισμοί rs822336G>C και rs822337T>A εντοπίζονται σε περιοχές που αναγνωρίζονται από διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, γεγονός που συνεπάγεται την πιθανή εμπλοκή τους στη ρύθμιση της έκφρασης του PD-L1 και κατ'επέκταση παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την πιθανή κλινική τους αξία. Πράγματι οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί έχουν αποτελέσει αντικείμενο μελέτης για τη διερεύνηση της προγνωστικής τους αξίας στον καρκίνο του πνεύμονα<sup>92,98,99</sup> αλλά και στον καρκίνο του στομάχου<sup>100</sup>.

Σε μία πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι οι απλότυποι rs822336C-rs822337A σχετίζονται με μειωμένη ολική επιβίωση των ασθενών οι οποίοι πάσχουν από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα αρχικών σταδίων και οι οποίοι έχουν υποβληθεί σε χειρουργική εκτομή του όγκου. Στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι οι ασθενείς που έφεραν τον γονότυπο CC για τον πολυμορφισμό rs822336C και τον γονότυπο AA για τον πολυμορφισμό rs822337T παρουσίασαν μειωμένη ολική επιβίωση, αν και η συσχέτιση ήταν οριακά στατιστικά σημαντική ( $p=0.06$ )<sup>92</sup>. Οι Yeo *et. al* επίσης μελέτησαν την πιθανή προγνωστική αξία των πολυμορφισμών rs822336G>C και rs822337T>A σε 147 ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, χωρίς ωστόσο να προκύψει κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα<sup>99</sup>. Τέλος οι Krawczyk *et. al* μελέτησαν τα επίπεδα έκφρασης των διαφορετικών γονότυπων του πολυμορφισμού rs822336G>C σε ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, προχωρώντας στη συνέχεια στη συσχέτισή τους με τα επίπεδα έκφρασης του PD-L1 σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης αλλά και με τον αριθμό αντιγράφων του αντίστοιχου γονιδίου<sup>98</sup>. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι ο γονότυπος CG ήταν ο πιο συχνός, ενώ το αλληλόμορφο G παρουσίασε διαφορετική κατανομή ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο του όγκου. Επιπλέον το ίδιο αλληλόμορφο ήταν πιο συχνό σε ασθενείς με αυξημένο αριθμό αντιγράφων του γονιδίου *PD-L1* σε σχέση με τους ασθενείς που είχαν μικρότερο αριθμό αντιγράφων. Ωστόσο, η διαφορετική αυτή κατανομή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Τέλος παρατηρήθηκε ένα ελαφρώς αυξημένο ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν το PD-L1 σε ασθενείς που φέρουν τον γονότυπο CC. Οι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί έχουν αποτελέσει αντικείμενο μελέτης για τη διερεύνηση της προγνωστικής τους αξίας και στον καρκίνο του στομάχου, χωρίς ωστόσο να προκύψουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα<sup>100</sup>.

Σε ό,τι αφορά τον πολυμορφισμό PD-L1 rs822336 G>C αρχικά μελετήθηκε η διαφορική κατανομή των τριών διαφορετικών αλληλόμορφων ανάμεσα στις ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού και στις υγιείς μάρτυρες. Η σύγκριση της κατανομής του κάθε αλληλόμορφου στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς δότες αποκάλυψε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p=0.27$ ) στα ποσοστά εμφάνισης του κάθε αλληλόμορφου σε αυτές τις εξεταζόμενες ομάδες. Η ίδια ανάλυση για τον πολυμορφισμό PD-

L1 rs822337 T>A οδήγησε σε παρόμοια αποτελέσματα καθώς επίσης δε βρέθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p=0.47$ ) στην κατανομή των τριών αλληλόμορφων μεταξύ ασθενών και υγιών δοτών.

Στην παρούσα διατριβή έγινε επίσης συσχετισμός του προφίλ έκφρασης των διαφορετικών αλληλόμορφων των πολυμορφισμών του PD-L1 rs822336 G>C και rs822337A>T με τα κλινικοπαθολογικά δεδομένα και την επιβίωση των 124 ασθενών με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού. Η στατιστική ανάλυση για τον πολυμορφισμό rs822336 G>C αποκάλυψε ότι η πλειονότητα (81.8%) των γυναικών με όγκους σταδίου IV είναι φορείς του αλληλόμορφου CG, ενώ μόλις 4 ασθενείς (18.2%) με όγκους σταδίου IV έχουν το αλληλόμορφο GG. Αυτή η διαφορά στην κατανομή των αλληλόμορφων του πολυμορφισμού PD-L1 rs822336 G>C είναι στατιστικά σημαντική ( $p=0.022$ ). Επιπλέον βρέθηκε ότι η ύπαρξη του αλληλόμορφου CG σχετίζεται με την χωρίς υποτροπές ( $p=0.020$ ), αλλά και η ολική επιβίωση των ασθενών ( $p=0.040$ , Εικόνα 3.4). Αναλυτικότερα από τις 26 ασθενείς που έχουν υποτροπιάσει οι 19, δηλαδή το 79.2%, φέρουν το αλληλόμορφο CG. Αντίστοιχα στο σύνολο των 27 γυναικών που απεβίωσαν οι 18 από αυτές, δηλαδή το 66.7%, είναι επίσης φορείς του συγκεκριμένου αλληλόμορφου.

Η στατιστική ανάλυση για τον πολυμορφισμό rs822337A>T αποκάλυψε μία σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα διαφορετικά αλληλόμορφα του πολυμορφισμού rs822337 T>A με το στάδιο της νόσου ( $p=0.04$ ) καθώς και την χωρίς υποτροπές ( $p=0.021$ ) και την ολική επιβίωση ( $p=0.004$ ). Βρέθηκε ότι η πλειονότητα (72.7%) των όγκων σταδίου IV φέρουν το αλληλόμορφο AA, ενώ παράλληλα η παρουσία αυτού του αλληλόμορφου σχετίζεται με την επιβίωση. Έτσι από τις 24 ασθενείς που έχουν υποτροπιάσει οι 18 (75%), φέρουν το αλληλόμορφο AA. Αντίστοιχα στο σύνολο των 27 γυναικών που απεβίωσαν οι 22 (81.5%) είναι επίσης φορείς του συγκεκριμένου αλληλόμορφου.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση επιβίωσης για τη διερεύνηση της σχέσης των εξεταζόμενων πολυμορφισμών με την επιβίωση των ασθενών και της προγνωστικής αξίας τους. Για τον πολυμορφισμό rs822336 G>C η ανάλυση επιβίωσης έδειξε ότι οι γυναίκες με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού και γονότυπο CG χαρακτηρίζονται από μικρότερα διαστήματα επιβίωσης χωρίς υποτροπές ( $p=0.002$ ) αλλά και ολικής επιβίωσης ( $p=0.009$ ). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν από την μονομεταβλητή ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox η οποία έδειξε ότι οι ασθενείς που είναι φορείς του CG αλληλόμορφου έχουν 4 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής (HR= 4.06,  $p=0.005$ ) και σχεδόν διπλάσιο κίνδυνο θανάτου (HR= 2.74,  $p=0.018$ ) σε σχέση με τις ασθενείς που φέρουν το αλληλόμορφο GG.

Η αντίστοιχη ανάλυση για τον πολυμορφισμό *PD-L1* rs822337 T>A έδειξε ότι το αλληλόμορφο AA σχετίζεται με μικρότερα διαστήματα επιβίωσης χωρίς υποτροπές ( $p=0.024$ ) αλλά και ολικής ( $p=0.004$ ). Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν από την μονομεταβλητή ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox σύμφωνα με την οποία οι ασθενείς που είναι φορείς του AA αλληλόμορφου έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής σε σχέση με τις ασθενείς που φέρουν το αλληλόμορφο TT (HR= 1.02,  $p=0.04$ ). Ωστόσο θα πρέπει να αναφερθεί ότι τα επίπεδα σημαντικότητας είναι οριακά αποδεκτά γεγονός που επιβάλλει την προσεκτική αξιολόγηση αυτών των αποτελεσμάτων. Η ανάλυση κατά Cox για την ολική επιβίωση οδήγησε σε πιο ασφαλή συμπεράσματα και έδειξε ότι οι γυναίκες που φέρουν το αλληλόμορφο AA έχουν 4 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο θανάτου λόγω της νόσου σε σχέση με αυτές που είναι φορείς του TT αλληλόμορφου (HR= 4.04,  $p=0.01$ ).

Στη συνέχεια κρίθηκε ενδιαφέρουσα η πραγματοποίηση της ίδιας ανάλυσης μετά από κατηγοριοποίηση των ασθενών σε ομάδες ανάλογα με το συνδυασμό των πολυμορφισμών rs822336G>C και rs822337T>A. Η ανάλυση κατά Kaplan-Meier έδειξε ότι η συνύπαρξη των αλληλόμορφων CG και AA σχετίζεται με μικρότερα διαστήματα επιβίωσης χωρίς υποτροπές ( $p=0.002$ , Εικόνα 3.13) αλλά και ολικής ( $p=0.002$ ). Επίσης, η ανάλυση παλινδρόμησης κατά Cox έδειξε ότι η συνύπαρξη των αλληλόμορφων CG και AA σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση όσον αφορά την ολική (HR=2.78,  $p=0.04$ ) και τη χωρίς υποτροπές επιβίωση (HR=5.89,  $p=0.018$ ). Στη συνέχεια έγινε ανάλυση επιβίωσης μετά από κατηγοριοποίηση των ασθενών στις παρακάτω ομάδες: α) Ασθενείς που ήταν φορείς των αλληλίων GG+AA ή GG+AT ή GG+TT ή CG+TT και β) Ασθενείς που ήταν φορείς των αλληλίων CG+AA ή CG+AT ή CC+AA ή CC+AT. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης ανάλυσης έδειξαν ότι η παρουσία και των δύο πολυμορφισμών σχετίζεται με μικρότερο ελεύθερο νόσου διάστημα ( $p = 0.037$ ) και μικρότερη ολική επιβίωση των ασθενών ( $p=0.025$ ).

Η μονομεταβλητή ανάλυση κατά Cox επιβεβαίωσε τα παραπάνω αποτελέσματα αφού η συνύπαρξη τουλάχιστον των δύο πολυμορφισμών σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση καθώς οι συγκεκριμένες ασθενείς παρουσιάζουν σχεδόν 2.5 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης υποτροπής σε σχέση με αυτές που φέρουν έναν ή κανέναν από τους εξεταζόμενους πολυμορφισμούς. Ένα ενδιαφέρον αποτέλεσμα προέκυψε από την πολυμεταβλητή ανάλυση κατά Cox η οποία αποκάλυψε την ανεξάρτητη προγνωστική αξία της παρουσίας και των δύο πολυμορφισμών μετά από προσαρμογή του μοντέλου για τις τιμές των μεταβλητών 1) Βαθμός κακοήθειας, 2) Ηλικία, 3) Αριθμός διηθημένων λεμφαδένων και 4) Ιστολογικός τύπος.

Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι η παρουσία και των δύο πολυμορφισμών αποτελεί έναν ισχυρό και ανεξάρτητο δείκτη πρόβλεψης μικρότερης επιβίωσης χωρίς υποτροπές (HR= 2.89, p=0.02).

Η ίδια ανάλυση πραγματοποιήθηκε για τη διερεύνηση της προγνωστικής αξίας των εξεταζόμενων πολυμορφισμών σε σχέση με την ολική επιβίωση των ασθενών. Έτσι βρέθηκε αρχικά ότι η συνύπαρξη των δύο εξεταζόμενων πολυμορφισμών αποτελεί έναν δυσμενή δείκτη πρόγνωσης καθώς σχετίζεται με μειωμένα διαστήματα ολικής επιβίωσης (HR=2.52, p=0.03). Στη συνέχεια αξιολογήθηκε η ανεξαρτησία της προγνωστικής αξίας της παρουσίας των πολυμορφισμών rs822336 και rs822337 μέσω ανάπτυξης μιας πολυμεταβλητής ανάλυσης για την παρουσία των πολυμορφισμών, τον βαθμό κακοήθειας, την ηλικία, τον αριθμό των διηθημένων λεμφαδένων και τον ιστολογικό τύπο του όγκου. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο η συνύπαρξη των πολυμορφισμών rs822336 και rs822337 αποτελεί έναν ανεξάρτητο δείκτη πρόβλεψης πιο σύντομης ολικής επιβίωσης (HR=3.44, p=0.008).

Συνολικά φαίνεται ότι οι απλότυποι rs822336C και rs822337A είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό σχετίζονται με μειωμένη ολική και χωρίς υποτροπές επιβίωση στις ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν εν μέρει με αυτά των Lee *et. al*, σύμφωνα με την οποία οι απλότυποι rs822336C-rs822337A σχετίζονται με μειωμένη ολική επιβίωση των ασθενών οι οποίοι πάσχουν από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα αρχικών σταδίων και οι οποίοι έχουν υποβληθεί σε χειρουργική εκτομή του όγκου. Στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι οι ασθενείς που έφεραν τον γονότυπο CC για τον πολυμορφισμό rs822336C και τον γονότυπο AA για τον πολυμορφισμό rs822337 παρουσίασαν μειωμένη ολική επιβίωση, αν και η συσχέτιση ήταν οριακά στατιστικά σημαντική (p=0.06)<sup>92</sup>. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής δείχνουν ότι ο συνδυασμός των γονότυπων CG-AA σχετίζεται με μειωμένη επιβίωση των ασθενών. Η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων αυτών των μελετών πιθανά να οφείλεται στους διαφορετικούς τύπους καρκίνου αλλά και στην διαφορετική μεθοδολογία που εφαρμόστηκε. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής μπορούν να ερμηνευθούν από την επίδραση της ύπαρξης των συγκεκριμένων πολυμορφισμών στα επίπεδα έκφρασης του PD-L1. Πιο αναλυτικά έχει βρεθεί ότι οι απλότυποι rs822336C και rs822337A σχετίζονται με μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης PD-L1<sup>92</sup>, ενώ παράλληλα έχει αναφερθεί ότι στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού, η αυξημένη έκφραση του PD-L1 σχετίζεται με ευμενή πρόγνωση. Συνεπώς, η παρουσία των απλότυπων rs822336C και rs822337A φαίνεται να συνδέεται με μειωμένη έκφραση του PD-L1 γεγονός που συνεπάγεται με δυσμενή πρόγνωση των ασθενών.

Συμπερασματικά, βρέθηκε ότι το αλληλόμορφο CG του πολυμορφισμού rs822336G>C και το αλληλόμορφο AA του πολυμορφισμού rs822337T>A του *PD-L1* εκφράζονται διαφορετικά στις ασθενείς με τριπλά αρνητικό καρκίνο μαστού. Η κατανομή αυτή σχετίζεται με το προχωρημένο στάδιο της νόσου καθώς και με μικρότερη ολική και χωρίς υποτροπές επιβίωση. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι υπάρχουν ακόμα αρκετές δυσκολίες για την επιτυχή κλινική διαχείριση των συγκεκριμένων ασθενών, η αναγνώριση νέων βιοδεικτών ικανών να βελτιώσουν την πρόγνωση της συγκεκριμένης ασθένειας είναι αναγκαία. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης διατριβής μπορεί να αποτελέσουν το εναρκτήριο βήμα για την περαιτέρω διερεύνηση της χρησιμότητας και αξιοποίησης των συγκεκριμένων πολυμορφισμών προς αυτή την κατεύθυνση.

## 5. Βιβλιογραφία

1. Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E. & Jemal, A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* **72**, 7–33 (2022).
2. Senkus, E. *et al.* Primary breast cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* **24**, (2013).
3. Lee, E. Y. H. P. & Muller, W. J. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, (2010).
4. Semmler, L., Reiter-Brennan, C. & Klein, A. BRCA1 and Breast Cancer: a Review of the Underlying Mechanisms Resulting in the Tissue-Specific Tumorigenesis in Mutation Carriers. *J Breast Cancer* **22**, 1 (2019).
5. Walsh, T. & King, M. C. Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer Cell* **11**, 103–105 (2007).
6. Lalloo, F. & Evans, D. G. Familial breast cancer. *Clin Genet* **82**, 105–114 (2012).
7. Harbeck, N. *et al.* Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers* **5**, (2019).
8. Ligresti, G. *et al.* Breast cancer: Molecular basis and therapeutic strategies (Review). *Mol Med Rep* **1**, 451–458 (2008).
9. van de Vijver, M. J. Genetic alterations in breast cancer. *Curr Diagn Pathol* **6**, 271–281 (2000).
10. Buchholz, T. A. & Wazer, D. E. Molecular biology and genetics of breast cancer development: a clinical perspective. *Semin Radiat Oncol* **12**, 285–295 (2002).
11. Biegging, K. T., Mello, S. S. & Attardi, L. D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nature Reviews Cancer* 2014 *14*:5 **14**, 359–370 (2014).
12. Yager, J. D. & Davidson, N. E. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* **354**, 270–282 (2006).
13. Malhotra, G. K., Zhao, X., Band, H. & Band, V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther* **10**, 955–960 (2010).
14. Shawarby, M. A., Al-Tamimi, D. M. & Ahmed, A. Molecular classification of breast cancer: An overview with emphasis on ethnic variations and future perspectives. *Saudi J Med Med Sci* **1**, 14 (2013).
15. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).



16. Sørlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10869–10874 (2001).
17. Eroles, P., Bosch, A., Alejandro Pérez-Fidalgo, J. & Lluch, A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev* **38**, 698–707 (2012).
18. Oeffinger, K. C. *et al.* Breast Cancer Screening for Women at Average Risk: 2015 Guideline Update From the American Cancer Society. *JAMA* **314**, 1599–1614 (2015).
19. European Commission Initiative on Breast Cancer (ECIBC): European guidelines on breast cancer screening and diagnosis. (2019).
20. Candido dos Reis, F. J. *et al.* An updated PREDICT breast cancer prognostication and treatment benefit prediction model with independent validation. *Breast Cancer Research* **19**, 1–13 (2017).
21. Phung, M. T., Tin Tin, S. & Elwood, J. M. Prognostic models for breast cancer: a systematic review. *BMC Cancer* **19**, (2019).
22. Campone, M. *et al.* Buparlisib plus fulvestrant versus placebo plus fulvestrant for postmenopausal, hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor 2-negative, advanced breast cancer: Overall survival results from BELLE-2. *Eur J Cancer* **103**, 147–154 (2018).
23. André, F. *et al.* Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* **380**, 1929–1940 (2019).
24. Schmid, P. *et al.* Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* **379**, 2108–2121 (2018).
25. Litton, J. K. *et al.* Talazoparib in Patients with Advanced Breast Cancer and a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med* **379**, 753–763 (2018).
26. Gyorffy, B. *et al.* Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. *Breast Cancer Res* **17**, (2015).
27. Harris, L. *et al.* American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* **25**, 5287–5312 (2007).
28. Bayraktar, S., Batoz, S., Okuno, S. & Glück, S. Immunotherapy in breast cancer. *J Carcinog* **18**, 435–436 (2019).

29. Bates, J. P., Derakhshandeh, R., Jones, L. & Webb, T. J. Mechanisms of immune evasion in breast cancer. *BMC Cancer* **18**, 1–14 (2018).
30. Degnim, A. C. *et al.* Immune cell quantitation in normal breast tissue lobules with and without lobulitis. *Breast Cancer Res Treat* **144**, 539–549 (2014).
31. Alfonso, J. C. L. *et al.* In-silico insights on the prognostic potential of immune cell infiltration patterns in the breast lobular epithelium. *Scientific Reports* **2016 6:1** **6**, 1–18 (2016).
32. Pruneri, G. *et al.* The prevalence and clinical relevance of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in ductal carcinoma in situ of the breast. *Ann Oncol* **28**, 321–328 (2017).
33. Gil Del Alcazar, C. R. *et al.* Immune Escape in Breast Cancer During In Situ to Invasive Carcinoma Transition. *Cancer Discov* **7**, 1098–1115 (2017).
34. West, N. R. *et al.* Tumour-infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. *Br J Cancer* **108**, 155–162 (2013).
35. Diaz-Montero, C. M. *et al.* Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* **58**, 49–59 (2009).
36. Nakai, K., Hung, M. C. & Yamaguchi, H. A perspective on anti-EGFR therapies targeting triple-negative breast cancer. *Am J Cancer Res* **6**, 1609 (2016).
37. Sota, Y. *et al.* Construction of novel immune-related signature for prediction of pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in human breast cancer. *Ann Oncol* **25**, 100–106 (2014).
38. Ignatiadis, M. *et al.* Gene modules and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer subtypes: a pooled analysis. *Journal of Clinical Oncology* **30**, 1996–2004 (2012).
39. West, N. R. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* **13**, (2011).
40. Nagarajan, D. & McArdle, S. E. B. Immune Landscape of Breast Cancers. *Biomedicines* **6**, (2018).
41. Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. & Honjo, T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* **11**, 141–151 (1999).

42. Latchman, Y. *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* **2**, 261–268 (2001).
43. Tseng, S. Y. *et al.* B7-Dc, a New Dendritic Cell Molecule with Potent Costimulatory Properties for T Cells. *J Exp Med* **193**, 839 (2001).
44. Yamazaki, T. *et al.* Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol* **169**, 5538–5545 (2002).
45. Yokosuka, T. *et al.* Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J Exp Med* **209**, 1201–1217 (2012).
46. Sharpe, A. H. & Pauken, K. E. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nature Reviews Immunology 2017 18:3* **18**, 153–167 (2017).
47. Patsoukis, N. *et al.* Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation. *Sci Signal* **5**, (2012).
48. Parry, R. v. *et al.* CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* **25**, 9543–9553 (2005).
49. Barber, D. L. *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682–687 (2006).
50. Francisco, L. M. *et al.* PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med* **206**, 3015–3029 (2009).
51. Patsoukis, N. *et al.* PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nature Communications 2015 6:1* **6**, 1–13 (2015).
52. Polanczyk, M. J., Hopke, C., Vandenbark, A. A. & Offner, H. Estrogen-mediated immunomodulation involves reduced activation of effector T cells, potentiation of Treg cells, and enhanced expression of the PD-1 costimulatory pathway. *J Neurosci Res* **84**, 370–378 (2006).
53. Dong, H. *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* **8**, 793–800 (2002).
54. Ashizawa, M. *et al.* miRNA-148a-3p Regulates Immunosuppression in DNA Mismatch Repair-Deficient Colorectal Cancer by Targeting PD-L1. *Mol Cancer Res* **17**, 1403–1413 (2019).
55. Escors, D. *et al.* The intracellular signalosome of PD-L1 in cancer cells. *Signal Transduction and Targeted Therapy 2018 3:1* **3**, 1–9 (2018).

56. Weber, J. S. *et al.* Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **16**, 375–384 (2015).
57. Robert, C. *et al.* Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation. *New England Journal of Medicine* **372**, 320–330 (2015).
58. Ribas, A. *et al.* Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol* **16**, 908–918 (2015).
59. Powles, T. *et al.* Atezolizumab versus chemotherapy in patients with platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma (IMvigor211): a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* **391**, 748–757 (2018).
60. Rittmeyer, A. *et al.* Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet* **389**, 255–265 (2017).
61. Patel, M. R. *et al.* Avelumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum failure (JAVELIN Solid Tumor): pooled results from two expansion cohorts of an open-label, phase 1 trial. *Lancet Oncol* **19**, 51–64 (2018).
62. Kaufman, H. L. *et al.* Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma: a multicentre, single-group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* **17**, 1374–1385 (2016).
63. Disis, M. L. & Stanton, S. E. Triple-negative breast cancer: immune modulation as the new treatment paradigm. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* e25–e30 (2015) doi:10.14694/EDBOOK\_AM.2015.35.E25.
64. Wimberly, H. *et al.* PD-L1 Expression Correlates with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancer Immunol Res* **3**, 326–332 (2015).
65. Ono, M. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **132**, 793–805 (2012).
66. Dieci, M. v. *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Ann Oncol* **25**, 611–618 (2014).
67. Ibrahim, E. M., Al-Foheidi, M. E., Al-Mansour, M. M. & Kazkaz, G. A. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* **148**, 467–476 (2014).

68. Baptista, M. Z., Sarian, L. O., Derchain, S. F. M., Pinto, G. A. & Vassallo, J. Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer. *Hum Pathol* **47**, 78–84 (2016).
69. Cirqueira, M. B. *et al.* Prognostic role of pd-11 expression in invasive breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancers (Basel)* **13**, (2021).
70. DeNardo, D. G., Andreu, P. & Coussens, L. M. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev* **29**, 309–316 (2010).
71. Ferris, R. L., Jaffee, E. M. & Ferrone, S. Tumor antigen-targeted, monoclonal antibody-based immunotherapy: clinical response, cellular immunity, and immunoescape. *J Clin Oncol* **28**, 4390–4399 (2010).
72. Iglesia, M. D. *et al.* Prognostic B-cell signatures using mRNA-seq in patients with subtype-specific breast and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **20**, 3818–3829 (2014).
73. García-Tejido, P., Cabal, M. L., Fernández, I. P. & Pérez, Y. F. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple Negative Breast Cancer: The Future of Immune Targeting. *Clin Med Insights Oncol* **10**, 31 (2016).
74. Teng, M. W. L., Ngiow, S. F., Ribas, A. & Smyth, M. J. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res* **75**, 2139–2145 (2015).
75. Nagarajan, D. & McArdle, S. E. B. Immune Landscape of Breast Cancers. *Biomedicines* **6**, (2018).
76. Lander, E. S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921 (2001).
77. Risch, N. J. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* **405**, 847–856 (2000).
78. Botstein, D. & Risch, N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet* **33 Suppl**, 228–237 (2003).
79. Kruglyak, L. & Nickerson, D. A. Variation is the spice of life. *Nat Genet* **27**, 234–236 (2001).
80. Carlson, C. S. *et al.* Additional SNPs and linkage-disequilibrium analyses are necessary for whole-genome association studies in humans. *Nat Genet* **33**, 518–521 (2003).

81. Taioli, E. *et al.* Myeloperoxidase G-463A polymorphism and lung cancer: A HuGE Genetic Susceptibility to Environmental Carcinogens pooled analysis. (2007) doi:10.1097/GIM.0b013e31803068b1.
82. Witte, J. S. *et al.* Genomewide Scan for Prostate Cancer–Aggressiveness Loci. *Am J Hum Genet* **67**, 92 (2000).
83. Kivisto, K., Kroemer, H. & Eichelbaum, M. The role of human cytochrome P450 enzymes in the metabolism of anticancer agents: implications for drug interactions. *Br J Clin Pharmacol* **40**, 523–530 (1995).
84. Easton, D. F. *et al.* Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* **447**, 1087–1093 (2007).
85. Siddiq, A. *et al.* A meta-analysis of genome-wide association studies of breast cancer identifies two novel susceptibility loci at 6q14 and 20q11. *Hum Mol Genet* **21**, 5373–5384 (2012).
86. Garcia-Closas, M. *et al.* Genome-wide association studies identify four ER negative-specific breast cancer risk loci. *Nat Genet* **45**, 392–398 (2013).
87. Kuchenbaecker, K. B. *et al.* Associations of common breast cancer susceptibility alleles with risk of breast cancer subtypes in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Res* **16**, (2014).
88. Stevens, K. N. *et al.* Common breast cancer susceptibility loci are associated with triple negative breast cancer. *Cancer Res* **71**, 6240 (2011).
89. Stevens, K. N. *et al.* 19p13.1 is a triple-negative-specific breast cancer susceptibility locus. *Cancer Res* **72**, 1795–1803 (2012).
90. Ellsworth, D. L., Turner, C. E., Ellsworth, R. E. & Li, C. J. A Review of the Hereditary Component of Triple Negative Breast Cancer: High- and Moderate-Penetrance Breast Cancer Genes, Low-Penetrance Loci, and the Role of Nontraditional Genetic Elements. *J Oncol* **2019**, (2019).
91. Fabrizio, F. P. *et al.* Gene code CD274/PD-L1: from molecular basis toward cancer immunotherapy. *Ther Adv Med Oncol* **10**, (2018).
92. Lee, S. Y. *et al.* Functional polymorphisms in PD-L1 gene are associated with the prognosis of patients with early stage non-small cell lung cancer. *Gene* **599**, 28–35 (2017).
93. Huang, G., Wen, Q., Zhao, Y., Gao, Q. & Bai, Y. NF- $\kappa$ B plays a key role in inducing CD274 expression in human monocytes after lipopolysaccharide treatment. *PLoS One* **8**, (2013).

94. Bareche, Y. *et al.* Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an integrative multiomic analysis. *Ann Oncol* **29**, 895–902 (2018).
95. Stevens, K. N., Vachon, C. M. & Couch, F. J. Genetic susceptibility to triple-negative breast cancer. *Cancer Res* **73**, 2025–2030 (2013).
96. Wunderle, M. *et al.* Risk, Prediction and Prevention of Hereditary Breast Cancer – Large-Scale Genomic Studies in Times of Big and Smart Data. *Geburtshilfe Frauenheilkd* **78**, 481 (2018).
97. Lee, S. Y. *et al.* PD-L1 polymorphism can predict clinical outcomes of non-small cell lung cancer patients treated with first-line paclitaxel-cisplatin chemotherapy. *Sci Rep* **6**, (2016).
98. Krawczyk, P. *et al.* PD-L1 gene copy number and promoter polymorphisms regulate PD-L1 expression in tumor cells of non-small cell lung cancer patients. *Cancer Genet* **237**, 10–18 (2019).
99. Yeo, M. K. *et al.* Association of PD-L1 expression and PD-L1 gene polymorphism with poor prognosis in lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* **68**, 103–111 (2017).
100. Sunakawa, Y. *et al.* Genetic variations in immunomodulatory pathways to predict survival in patients with locoregional gastric cancer. *Pharmacogenomics J* **17**, 528–534 (2017).