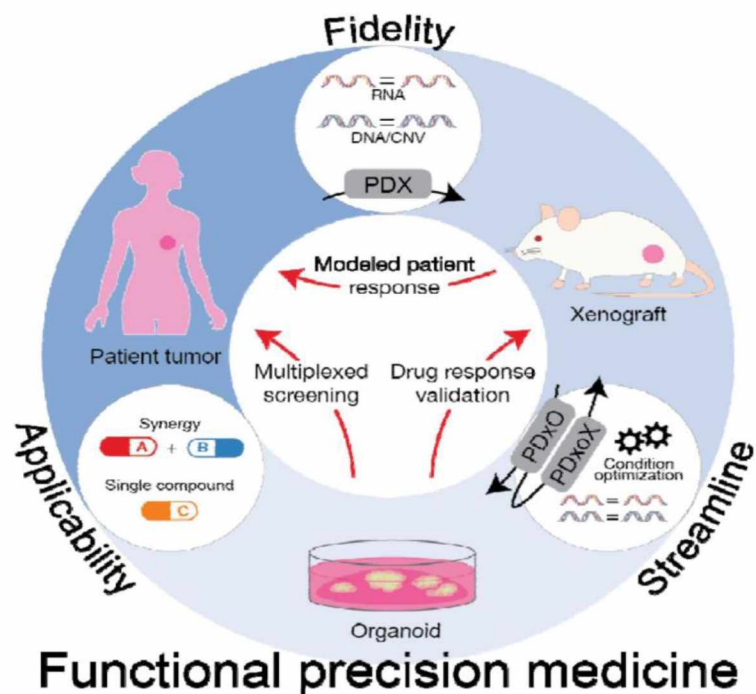




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΩΤΟΓΕΝΟΥΣ ΞΕΝΟΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ ΤΡΙΠΛΑ
ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

PHARMACOLOGICAL STUDY OF PRIMARY XENOGRRAFT IN TRIPLE NEGATIVE
BREAST CANCER

Ευαγγελία-Χριστίνα Κωνσταντίνου Μπουλούτσου
ΛΑΡΙΣΑ 2021

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Κωνσταντίνος Δήμας, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Ψαρρά Άννα-Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
- Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1. Γενικά.....	6
1.1. Τι είναι καρκίνος.....	6
1.2. Βιολογία του καρκίνου.....	9
1.2.1. Τύποι καρκίνου.....	9
1.2.2. Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων.....	9
1.2.3. Προϋποθέσεις για την ανάπτυξη καρκίνου.....	11
1.3. Επιδημιολογικά στοιχεία του καρκίνου.....	14
1.4. Καρκίνος του μαστού.....	15
1.4.1. Χαρακτηριστικά και μορφολογική περιγραφή φυσιολογικού μαστού.....	16
1.4.2. Επιδημιολογικά στοιχεία του καρκίνου του μαστού.....	17
1.4.3. Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού (BC).....	20
1.4.4. Ορισμός του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού.....	21
1.4.5. Μοριακοί υπότυποι TNBC.....	22
1.4.6. Βιοδείκτες που σχετίζονται με τον TNBC.....	24
1.4.7. Χημειοθεραπευτικά φάρμακα έναντι στο TNBC και αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς τους.....	27
1.4.8. Σύγχρονες μέθοδοι αντιμετώπισης για τον TNBC.....	36
1.4.9. Λιποβριθής καρκίνος του μαστού (LRBC).....	37
1.4.10. Βιοδείκτες που σχετίζονται με τον LRBC.....	39
1.4.11. Μέθοδοι αντιμετώπισης για τον LRBC.....	40
ΣΚΟΠΟΣ.....	42
2. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ.....	43
2.1. In vivo μεθοδολογία.....	43
2.1.2. Ξενομοσχευμάτα προερχόμενα από ασθενείς (PDX).....	45
2.1.3. Ανάπτυξη ξενομοσχευμάτων προερχόμενων από ασθενείς.....	45
2.1.4. Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα των PDX.....	46
2.1.5. Εγκαθίδρυση ξενομοσχευμάτων προερχόμενων από ασθενείς.....	47
2.1.6. Κρυοσυντήρηση.....	50
2.1.7. Απόψυξη κυττάρων.....	50
2.1.8. Χορήγηση φαρμάκου.....	50
2.2. Αξιολόγηση της δραστηριότητας ουσιών σε ζωικά πρότυπα.....	52

2.2.1. Αξιολόγηση της δραστικότητας της δοξορουβικίνης και του Doxil σε ζωικό πρότυπο καρκίνου.....	52
2.2.2. Αξιολόγηση της δραστικότητας της κυκλοφωσφαμίδης σε ζωικό πρότυπο καρκίνου.....	54
2.2.3. Αξιολόγηση της δραστικότητας της ντοσεταξέλης σε ζωικό πρότυπο καρκίνου.....	55
2.3. Στατιστική ανάλυση.....	57
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	58
3.1. Έλεγχος του ρυθμού ανάπτυξης ξενομοσχεύματος (PDX) σε ποντίκια τόσο του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid/J όσο και του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ.....	58
3.2. Έλεγχος δραστικότητας της Δοξορουβικίνης σε ζωικό πρότυπο καρκίνου.....	59
3.3. Έλεγχος δραστικότητας του Doxil σε ζωικό πρότυπο καρκίνου.....	64
3.4. Έλεγχος δραστικότητας της κυκλοφωσφαμίδης σε ζωικό πρότυπο καρκίνου.....	69
3.5. Έλεγχος δραστικότητας της ντοσεταξέλης σε ζωικό πρότυπο καρκίνου.....	71
ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ.....	74
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	76

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας Δρ. Δήμα Κωνσταντίνου. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εξοικειωθώ με τις απαιτητικές συνθήκες ενός ερευνητικού εργαστηρίου βιοεπισημών και για την αμέριστη υποστήριξη του καθ'όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Με τη δική του ουσιαστική συνεισφορά, απέκτησα γνώσεις και εμπειρίες που είμαι βέβαιη πως θα μου φανούν ιδιαίτερα χρήσιμες για τη μετέπειτα ερευνητική μου πορεία.

Στο σημείο αυτό αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής και πιο συγκεκριμένα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας Δρ. Ψαρρά Άννα-Μαρία και τον Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας Δρ. Μπαλατσό Νικόλαο για τις πολύτιμες συμβουλές και τις διορθώσεις τους στο κείμενο. Αδιαμφισβήτητα οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Διευθυντή του εργαστηρίου Φαρμακολογίας, Καθηγητή Φαρμακολογίας Δρ. Σακελλαρίδη Νικόλαο για το αμείωτο ενδιαφέρον που επέδειξε καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Δε θα μπορούσα βέβαια να μην ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Φαρμακολογίας για τη στήριξη και τη βοήθειά τους κατά τη διεξαγωγή της πτυχιακής μου εργασίας.

Ολοκληρώνοντας, θα ήθελα να εκφράσω το μεγαλύτερο ευχαριστώ στον πατέρα μου Κωνσταντίνο, τη μητέρα μου Αγγελική-Μαρία, τον αδερφό μου Φώτη και τους αγαπημένους μου παππούδες Ευαγγελία και Φώτιο καθώς και τους παππούδες μου Γεώργιο και Ελένη. Είναι δίπλα μου καθημερινά, με στηρίζουν σε όλες τις δύσκολες στιγμές και αποφάσεις της σταδιοδρομίας μου. Πάντα θα είμαι περιφανή για σας!!! Γιατί χωρίς εσάς τίποτα από όλα αυτά δεν θα ήταν εφικτό!!! Τέλος ένα τεράστιο ευχαριστώ, σε ένα ακόμη μέλος της οικογένειάς μου, τον σύντροφό μου, Δρ. Γεώργιο Στραβοδήμο, για την κατανόηση, την συνεχή ενθάρρυνση, τις επιστημονικές του συμβουλές και την καθημερινή βοήθεια που μου προσφέρει σε όλα τα επίπεδα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μετά τον καρκίνο του πνεύμονα (Lung Cancer, LC), ο καρκίνος του μαστού (Breast Cancer, BC) είναι η συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες, παγκοσμίως. Μέσω ανοσοϊστοχημικών δεικτών και μικροσυστοιχιών συμπληρωματικού DNA (cDNA) (Perou, C.M., et al., 2000) (Nielsen, T.O., et al., 2004) έχουν εντοπιστεί πέντε διαφορετικοί υπότυποι καρκίνου του μαστού, οι οποίοι όμως διαφέρουν στην πρόγνωση και στους θεραπευτικούς στόχους. Ο υπότυπος του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού (TNBC), που αποτελεί το 10-15% των περιπτώσεων καρκίνου στις γυναίκες, εμφανίζει τη χειρότερη πρόγνωση, είναι επιρρεπής σε υποτροπή και μετάσταση και έχει περιορισμένες επιλογές θεραπείας λόγω της έλλειψης κλινικά ενεργών στόχων (Gatti, V., et al., 2019). Το πλούσιο σε λιπίδια καρκίνωμα του μαστού (LRBC) αποτελεί μια εξίσου σπάνια παραλλαγή ιστολογικού φαινοτύπου καρκίνου του μαστού, που αντιστοιχεί στο 1-2% όλων των κακοηθών όγκων του μαστού (Guan, B., et al., 2011). Το 2003, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, ταξινομήθηκε ως μοναδικός τύπος όγκου του μαστού. Όλες οι περιπτώσεις καρκινωμάτων πλούσια σε λιπίδια ήταν αρνητικές για τους υποδοχείς στεροειδών, με εξαίρεση μία περίπτωση, και όλες ήταν θετικές ως προς το HER-2 (Sporikova, Z., et al., 2018). Τόσο ο TNBC όσο και ο LRBC παρουσιάζουν περιορισμένες επιλογές θεραπείας εξαιτίας της έλλειψης κλινικά ενεργών στόχων και της εμφάνισης επιθετικών φαινοτύπων. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, χρησιμοποιώντας μοντέλα ανάπτυξης ξενομοσχευμάτων προερχόμενων από ασθενείς (PDX), οι οποίοι είχαν νοσήσει από TNBC πλούσιο σε λιπίδια, μελετήθηκε για πρώτη φορά η δραστικότητα των αντικαρκινικών φαρμάκων: κυκλοφωσφαμίδη, δοξορουβικίνη, Doxil και δοσεταξέλη σε ποντίκια των στελεχών NOD.Cg-Prkdcscid/J και NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, στα οποία είχε πραγματοποιηθεί εμφώλευση του όγκου ασθενών με TNBC πλούσιο σε λιπίδια. Ενθαρρυντικά αποτελέσματα έδωσε η μελέτη της δραστικότητας του αντικαρκινικού φαρμάκου Doxil έναντι του συγκεκριμένου εξαιρετικά σπάνιου τύπου καρκίνου του μαστού, που συνδυάζει τους φαινοτύπους TNBC και LRBC.

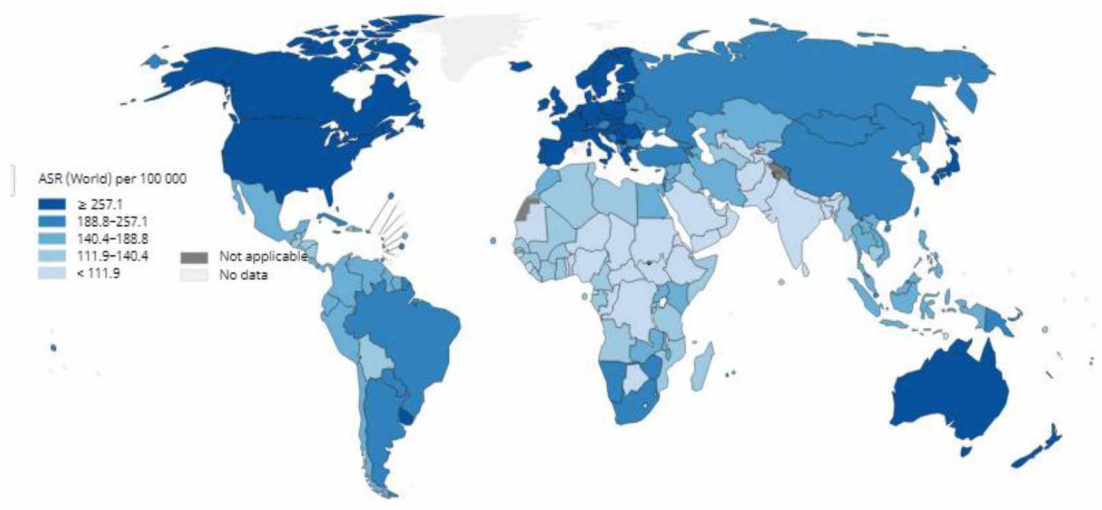
ABSTRACT

After lung cancer (Lung Cancer, LC), breast cancer (Breast Cancer, BC) is the most common cause of cancer death in women worldwide. Immunohistochemical markers and complementary DNA (cDNA) microarrays (Perou, CM, et al., 2000) (Nielsen, TO, et al., 2004) have identified five different subtypes of breast cancer but differ in prognosis and treatment targets. Triple-negative breast cancer subtype (TNBC), which accounts for 10-15% of cancer cases in women, has the worst prognosis, is prone to relapse and metastasis, and has limited treatment options due to a lack of clinically active targets (Gatti, V., et al., 2019). Lipid-rich breast cancer (LRBC) is an equally rare variant of the histological phenotype of breast cancer, accounting for 1-2% of all malignant breast cancers (Guan, B., et al., 2011). In 2003, the World Health Organization classified it as the only type of breast tumors. All cases of lipid-rich carcinomas were negative for steroid receptors, except for one case, and all were positive for HER-2 (Sporikova, Z., et al., 2018). Both TNBC and LRBC have limited treatment options due to a lack of clinically active targets and the emergence of aggressive phenotypes. In the present dissertation, using models of patient-derived xenografts (PDX) infected with lipid-rich TNBC, the activity of the anticancer drugs cyclophosphamide, doxorubicin, doxorubicin, Doxil and docetaxel was evaluated for the first time in NOD.Cg-Prkdcscid/J and NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ mice incubated with tumors of lipid-rich TNBC patients. Encouraging results were obtained by the study of the anti-cancer drug Doxil for this extremely rare type of breast cancer, which combines the TNBC and LRBC phenotypes.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Γενικά

Η παρατεταμένη έκθεση σε παράγοντες κινδύνου, σε συνδυασμό με τις αλλαγές που έχουν επέλθει στο τρόπο ζωής καθώς και την παράταση του προσδόκιμου της, αποτελούν τους κύριους παράγοντες αύξησης των μη μεταδοτικών ασθενειών. Μία από τις σημαντικότερες ασθένειες είναι ο καρκίνος. Η πολυπλοκότητα αυτής της νόσου συσχετίζεται με την πολυπαραγοντικότητα της φύσης του. Η αύξηση των περιπτώσεων καρκίνου παγκοσμίως σε συνδυασμό με πρόσφατες μελέτες, προβλέπουν ότι οι νέες περιπτώσεις καρκίνου σε όλον τον κόσμο θα φτάσουν τα 22 εκατομμύρια μέσα στις επόμενες δύο δεκαετίες (Εικόνα 1.1) (Ghoncheh, M. & Salehiniya, H., 2016).



Εικόνα 1.1: Εκτιμώμενα ποσοστά συχνότητας εμφάνισης καρκίνου ανά το κόσμο το 2020 και για τα δύο φύλα, σε όλες τις ηλικίες (<http://gco.iarc.fr/today>), WHO

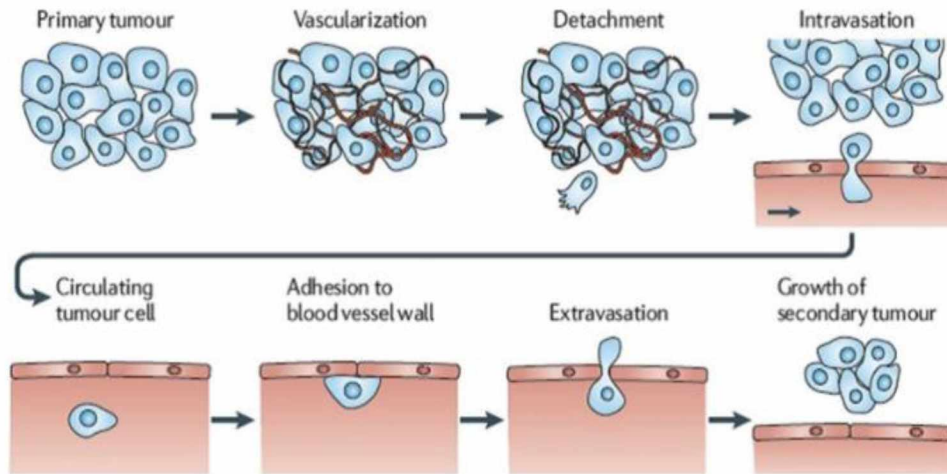
1.1 Τι είναι καρκίνος;

Η λέξη καρκίνος προέρχεται πριν από 2300 χρόνια από μία διαπίστωση του Ιπποκράτη. Η διαπίστωση, ανέφερε ότι οι καρκινικοί όγκοι του μαστού μαζί με το φλεβικό σύστημα που τους περικλείει μοιάζουν με τα άκρα του καβουριού (καρκίνος). Σύμφωνα με αυτό προήλθε η λέξη καρκίνωμα (carcinoma) στα ελληνικά και αργότερα η λέξη καρκίνος (cancer) στα λατινικά (National Institutes of Health (US) N. Understanding Cancer, Biological Sciences Curriculum Study. 2007). Με βάση το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου (NCI: National Cancer Institute) ο «καρκίνος» περιγράφει μια ομάδα διαταραχών που χαρακτηρίζονται από ταχέως

αναπτυσσόμενα κύτταρα που διαιρούνται ανεξέλεγκτα και εξαπλώνονται σε παρακείμενους ιστούς σχηματίζοντας μάζα κυττάρων-καρκινικοί όγκοι. Φυσιολογικά, τα κύτταρα έχουν την δυνατότητα να διαιρούνται και να αναπτύσσονται ελεγχόμενα κάτω από αυστηρούς μηχανισμούς, ώστε να ανταπεξέρχονται στις ανάγκες του οργανισμού και να διατηρείται η ομοιόσταση αυτού. Η ύπαρξη του καρκίνου οδηγεί σε απορρύθμιση των μηχανισμών ελέγχου ανάπτυξης με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Σήμερα γνωρίζουμε, χάρη στην ανάπτυξη των τεχνικών της μοριακής βιολογίας και τεχνικών που επέτρεψαν στους ερευνητές να διερευνήσουν και να περιγράψουν χαρακτηριστικά μεμονωμένων κυττάρων, πως ο καρκίνος είναι μια πολυπαραγοντική νόσος που είναι αποτέλεσμα γονιδιακών και μοριακών αλλαγών (Understanding Cancer, National Institutes of Health (US), Bethesda (MD), 2007). Ο καρκίνος μπορεί να αναπτυχθεί σε οποιονδήποτε όργανο ή ιστολογικό σύστημα του σώματος. Οι όγκοι, που παραμένουν στο ίδιο σημείο και έχουν περιορισμένη ανάπτυξη θεωρούνται καλοήθεις. Αντίθετα, οι πιο επικίνδυνες μορφές ή κακοήθεις υφίστανται όταν συμβαίνουν δύο περιπτώσεις:

1. Τα καρκινικά κύτταρα κατορθώνουν να κινούνται σε όλο το σώμα, χρησιμοποιώντας το αίμα ή τους λεμφαδένες και καταστρέφοντας τον υγιή ιστό με μία διαδικασία, που ονομάζεται εισβολή.
2. Τα καρκινικά κύτταρα διαιρούνται και αναπτύσσονται, δημιουργώντας νέα αιμοφόρα αγγεία, προκειμένου να τραφούν. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται αγγειογένεση.

Η διαδικασία, όπου ο όγκος εξαπλώνεται σε όλο το σώμα και αναπτύσσεται, εισβάλλοντας και καταστρέφοντας τους υγιείς ιστούς, ονομάζεται μετάσταση ή δευτεροπαθής εντόπιση (Εικόνα 1.2) και είναι ο κύριος λόγος που ο καρκίνος είναι μια τόσο σοβαρή νόσος με μεγάλη θνησιμότητα.

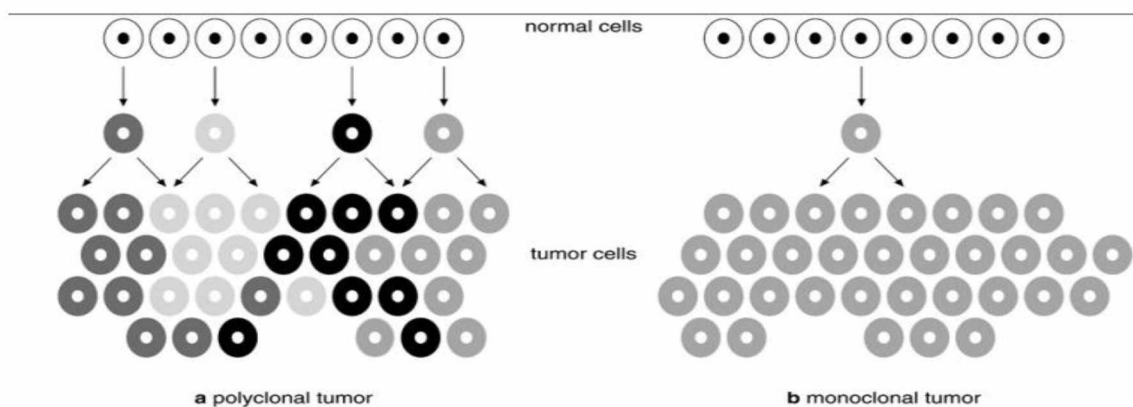


<https://kielcoloncancer.org/metastasis-colon-cancer-know-now/>

5

Εικόνα 1.2: Η διαδικασία, όπου ο όγκος εξαπλώνεται σε όλο το σώμα και αναπτύσσεται, εισβάλλοντας και καταστρέφοντας τους υγιείς ιστούς, ονομάζεται μετάσταση ή δευτεροπαθής εντόπιση ([Cancer metastasis causes, symptoms and metastasis survival rate \(healthjade.com\)](#)).

Ο αναπτυσσόμενος όγκος μπορεί να είναι είτε μονοκλωνικής προέλευσης, δηλαδή όλα τα κύτταρα του όγκου να προέρχονται από ένα μόνο προγονικό κύτταρο που μετατράπηκε από φυσιολογικό σε καρκινικό είτε πολυκλωνικής προέλευσης. Η πολυκλωνική προέλευση όγκου αναφέρεται στην ιδέα ότι δύο ή περισσότερα διαφορετικά προγονικά κύτταρα ή κλώνοι κυττάρων συνεργάζονται στη γένεση ενός όγκου (Εικόνα 1.3) (Parsons, B.L., 2008). Εδώ αξίζει να τονιστεί πως οι περισσότεροι κακοήθης όγκοι είναι μονοκλωνικής προέλευσης (Understanding Cancer, National Institutes of Health (US), Bethesda (MD), 2007).



Εικόνα 1.3: Δύο σχήματα που περιγράφουν πως μπορούν να αναπτυχθούν όγκοι. Οι περισσότεροι, αν όχι όλοι οι ανθρώπινοι καρκίνοι, φαίνεται να είναι μονοκλωνικοί (Understanding Cancer, National Institutes of Health (US), Bethesda (MD), 2007).

1.2. Βιολογία του καρκίνου

1.2.1. Τύποι καρκίνου

Κάθε τύπος καρκίνου έχει τα μοναδικά χαρακτηριστικά του ως προς τη γενετική του σύσταση, την αιτιολογία εμφάνισης, τα κλινικά του χαρακτηριστικά, την εξέλιξη και την κατάληξή του (Understanding Cancer, National Institutes of Health (US), Bethesda (MD), 2007). Οι κύριοι τύποι καρκίνου είναι πέντε:

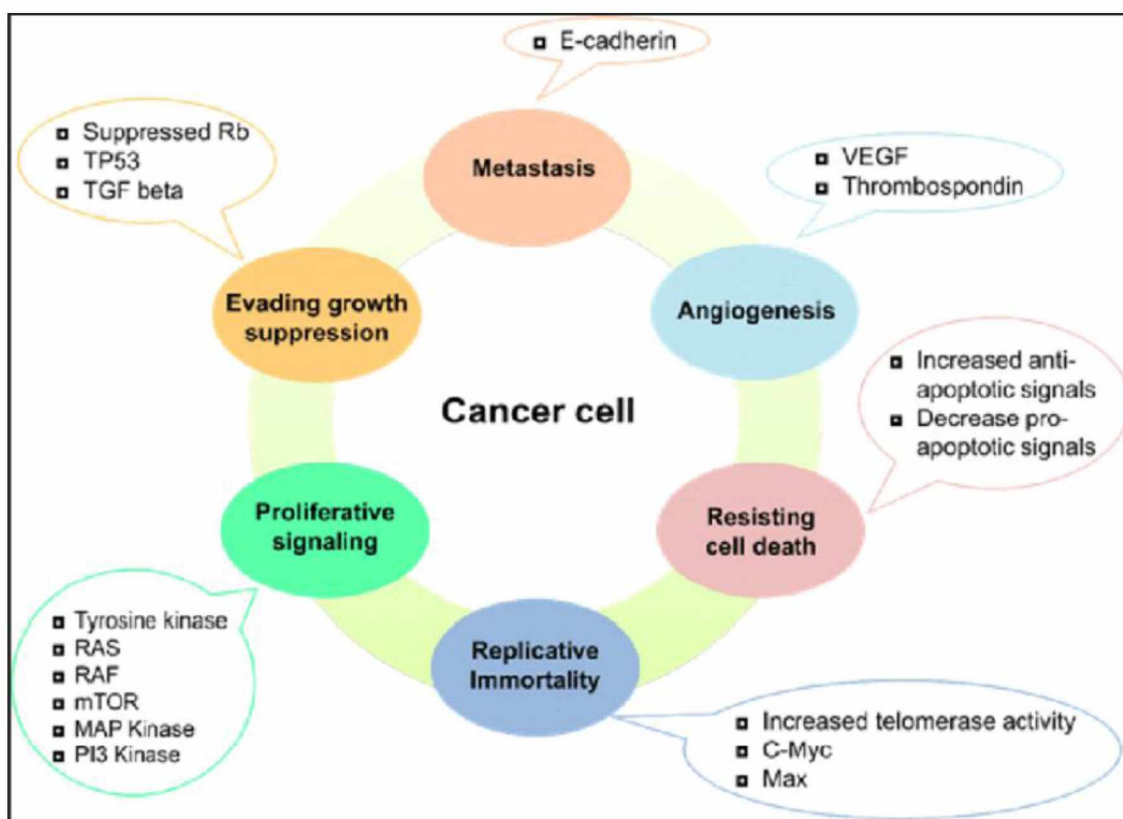
1. Τα καρκινώματα, καθορίζονται από τα κύτταρα που καλύπτουν εσωτερικά και εξωτερικά μέρη του σώματος, όπως είναι ο πνεύμονας, ο μαστός και το παχύ έντερο. Είναι ο πιο συχνά διαγνωσμένος τύπος καρκίνου και διακρίνεται στους ακόλουθους τύπους: αδενοκαρκίνωμα, βασικό καρκίνωμα και πλακώδες καρκίνωμα.
2. Τα σαρκώματα χαρακτηρίζονται από τα κύτταρα που βρίσκονται στο οστό, στο χόνδρο, στο λίπος, στο συνδετικό ιστό, στους μυς και άλλους υποστηρικτικούς ιστούς. Τα σαρκώματα αποτελούν περίπου το 1% των διαγνωσμένων καρκίνων.
3. Τα λεμφώματα είναι τύποι καρκίνου, που ξεκινούν από τους λεμφαδένες και τους ιστούς του ανοσοποιητικού συστήματος.
4. Οι λευχαιμίες είναι καρκίνοι, που ξεκινούν στο μυελό των οστών και συχνά συσσωρεύονται στην κυκλοφορία του αίματος.
5. Τέλος, τα αδενώματα είναι καρκίνοι που προκύπτουν στο θυρεοειδή, την υπόφυση, το επινεφρίδιο και άλλους αδενικούς ιστούς (Cormier, J.N. & Pollock, R.E., 2004).

1.2.2. Χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων

Ένα από τα έξι χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων (Hanahan, D. & Weinberg R.A., 2011) είναι ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός. Αυτό συμβαίνει επειδή τα καρκινικά κύτταρα σε αντίθεση με τα φυσιολογικά δεν εισέρχονται σε κατάσταση γήρανσης. Γεγονός που οφείλεται στην ενεργοποίηση της τελομεράσης η οποία προσθέτει τελομερή στα άκρα των μορίων DNA και με αποτέλεσμα το μήκος των τελομερών μετά το πέρας της αντιγραφής να μην μειώνεται και έτσι να μην σταματά ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Επίσης τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν αυτάρκεια σε αυξητικά σήματα καθώς τα αναπτυξιακά μονοπάτια φέρουν μία ή περισσότερες μεταλλάξεις, γεγονός που τους οδηγεί σε συνεχή πολλαπλασιασμό. Οι μεταλλάξεις αυτές συμβαίνουν σε προσδέτες ή σε υποδοχείς

προσδετών που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και σε ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μόρια (Vogelstein, B, et. al., 2013). Έχει βρεθεί ότι στο 25% των ανθρώπινων καρκίνων οι RAS πρωτεΐνες (ομάδα που αποτελείται από μονομερείς GTPάσες) είναι δομικά αλλαγμένες, με αποτέλεσμα τη συνεχή μεταγωγή σήματος στον πυρήνα και τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό (Cormier, J.N. & Pollock, R.E., 2004). Επιπλέον τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν αντοχή ενάντια σε αντι-αυξητικά σήματα. Πιο συγκεκριμένα μεταλλάξεις, είτε στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη RB (Retinoblastoma Protein), είτε στο γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη P16, απενεργοποιούν τη δράση της RB, ως αποτέλεσμα προκύπτει ο μεταγραφικός παράγοντας E2F να είναι συνεχώς ενεργός και να προκαλεί ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό (Amin, A.R.M.R., et. al., 2015). Φυσιολογικά όταν η πρωτεΐνη RB είναι υποφωσφορυλιωμένη είναι ενεργή και βρίσκεται σε σύμπλοκο με το μεταγραφικό παράγοντα E2F και αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Όμως, όταν η πρωτεΐνη RB φωσφορυλιώνεται καθίστανται ανενεργή και, έτσι, ο E2F ενεργοποιείται. Επιπρόσθετα άλλο ένα στοιχείο των καρκινικών κυττάρων είναι η αποφυγή της απόπτωσης. Φυσιολογικά κύτταρα με συσσωρευμένες βλάβες στο γονιδίωμά τους οδηγούνται σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο που ονομάζεται «απόπτωση». Τα καρκινικά κύτταρα δεν οδηγούνται σε απόπτωση εξαιτίας μεταλλάξεων στο γονίδιο P53 με αποτέλεσμα τα κύτταρα αυτά να διαιρούνται συνεχώς και να συγκεντρώνουν όλο και περισσότερες βλάβες. Το γονίδιο P53 είναι το συχνότερα μεταλλαγμένο γονίδιο σε διάφορους τύπους καρκίνου. Παράλληλα οι αυξημένες ανάγκες των καρκινικών κυττάρων για παροχή οξυγόνου και άλλων θρεπτικών συστατικών έχει ως αποτέλεσμα την αγγειογένεση πλησίον της περιοχής του όγκου (Pavlova, N.N., & Thompson, C.B., 2016) (Luengo, A., Gui, D.Y., & Vander Heiden, M.G., 2017). Αναλυτικότερα ενεργοποιούνται κάποιοι προ-αγγειογενετικοί παραγόντες - όπως ο VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), ο FGF1, ο FGF2 (Fibroblast Growth Factors 1 & 2) κ.α. οι οποίοι οδηγούν στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και, επομένως, του αγγειακού συστήματος που περιβάλλει τον όγκο (Hanahan, D. & Weinberg R.A., 2011). Τέλος ένα χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων το οποίο ελλοχεύει πολλούς κίνδυνους για την υγεία των ασθενών είναι ικανότητα διήθησης και μετάστασης. Προκειμένου να αποκτήσουν αυτή την

ικανότητα τα καρκινικά κύτταρα υπόκεινται σε σειρά αλλαγών οι οποίες αφορούν μόρια που είναι υπεύθυνα για τις διακυτταρικές συνδέσεις όπως η E-καντερίνη, τις αλληλεπιδράσεις κυττάρων-εξωκυττάριας ουσίας και αλλαγές που σχετίζονται με τις εξωκυτταρικές πρωτεάσες. Οι αλλαγές αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια της λειτουργικότητας της E-καντερίνης, άρα την απώλεια σύνδεσης και επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων και τη διατάραξη της λειτουργίας των πρωτεασών, με συνέπεια η εξωκυττάρια ουσία να χάνει τα βιοχημικά και δομικά της χαρακτηριστικά και έτσι τελικά να διευκολύνεται η διείσδυση των καρκινικών κυττάρων σε άλλους υγιείς ιστούς (Εικόνα 1.4).



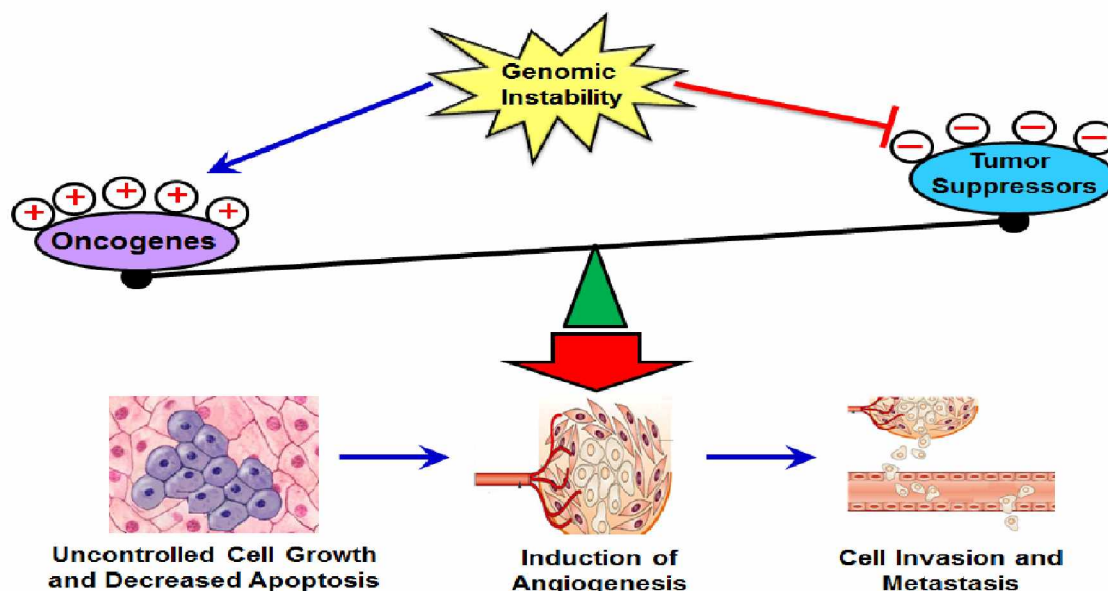
Εικόνα 1.4: Χαρακτηριστικά καρκινικών κυττάρων (Bhosale, P.B., et. al., 2020).

1.2.3 Προϋποθέσεις για την ανάπτυξη καρκίνου

Η διαδικασία με την οποία τα φυσιολογικά κύτταρα μετατρέπονται προοδευτικά σε καρκινικά οφείλεται σε μεταλλάξεις και γενετική αστάθεια, σε φλεγμονώδεις καταστάσεις και σε αλλαγές στον μεταβολισμό (Hanahan, D. & Weinberg R.A., 2011).

Μεταλλάξεις και γενετική αστάθεια: η διαδοχική απόκτηση μεταλλάξεων οφείλεται σε αδυναμία των επιδιορθωτικών ενζύμων να επιδιορθώσουν λάθη στο γενετικό

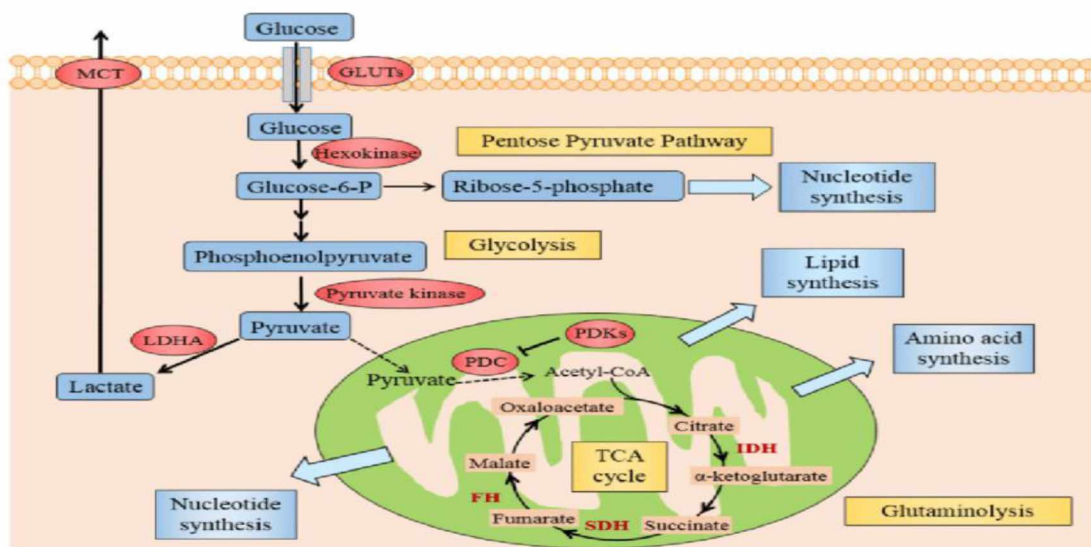
υλικό με αποτέλεσμα την συσσώρευση βλαβών και την δημιουργία καρκίνου. Ο καρκίνος δεν είναι μόνο το αποτέλεσμα μιας μόνο γενετικής δυσλειτουργίας αλλά μιας σειράς γονιδιακών μεταλλάξεων που απορυθμίζουν είτε τον κυτταρικό κύκλο-πολλαπλασιασμό είτε τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Η καρκινογένεση περιλαμβάνει από τη μία την ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων και από την άλλη την απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Εικόνα 1.5). Πιο αναλυτικά τα προϊόντα των ογκογονιδίων είναι είτε ενεργοποιητές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού είτε αναστολείς της απόπτωσης. Μεταλλάξεις σ' αυτά τα γονίδια μπορεί να προκληθούν από μεταλλαξιόγόνους παράγοντες και να μετατρέψουν τα πρωτο-ογκογονίδια σε ογκογονίδια με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Shortt J, Johnstone RW. *Oncogenes in cell survival and cell death. Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2012;4). Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια από την άλλη ρυθμίζουν την κυτταρική διαίρεση με αντίθετο τρόπο σε σχέση μ' αυτόν των πρωτο-ογκογονιδίων. Τα προϊόντα τους είναι πρωτεΐνες-ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου και της απόπτωσης. Έτσι, η αναστολή της δράσης των γονιδίων αυτών καθιστά αδύνατο τον έλεγχο των μηχανισμών πολλαπλασιασμού, κάτι που έχει ως συνέπεια την καρκινογένεση (Bertram, J. S., 2000).



Εικόνα 1.5: Η καρκινογένεση περιλαμβάνει από τη μία την ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων και από την άλλη την απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Nag, S., et. al., 2013)

Φλεγμονώδεις καταστάσεις: Τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος προκειμένου να καταστείλουν την ανάπτυξη του όγκου 'επιτίθενται' στα καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο τα φλεγμονώδη κύτταρα του όγκου προάγουν την ογκογένεση, τη διήθηση και τη μετάσταση, μεταβάλλοντας σημαντικά το μικροπεριβάλλον αυτού.

Αλλαγές στον μεταβολισμό: Ο κύριος μεταβολικός επαναπρογραμματισμός που εμφανίστηκε σε όγκους εντοπίστηκε για πρώτη φορά από τον Otto Warburg, ο οποίος ανακάλυψε ότι τα καρκινικά κύτταρα έχουν υψηλά επίπεδα αερόβιας γλυκόλυσης γεγονός που οδηγεί στη σύνθεση πρόδρομων μορίων, λιπιδίων, νουκλεοτιδίων και αμινοξέων και έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία νέων κυττάρων. Επιπλέον παρατήρησε την παραγωγή ATP ανεξάρτητα από τη διαθεσιμότητα οξυγόνου, γεγονός που βοηθά την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων κάτω από συνθήκες υποξίας. Τέλος διαπίστωσε πως η παραγωγή του γαλακτικού οξέος κατά την γλυκόλυση οδηγεί σε μείωση του PH, κατάσταση η οποία διευκολύνει την μετάσταση και την διήθηση του όγκου(Εικόνα 1.6). Οι παραπάνω παρατηρήσεις ομαδοποιήθηκαν ως φαινόμενο Warburg (Korpenol, W.H., Bounds, P.L., & Dang, C.V., 2011). Το φαινόμενο Warburg αποτέλεσε ορόσημο ώστε οι μελέτες για τη θεραπεία του καρκίνου να αρχίσουν να επικεντρώνονται στον μεταβολικό επαναπρογραμματισμό σε κρίσιμες μεταβολικές οδούς.

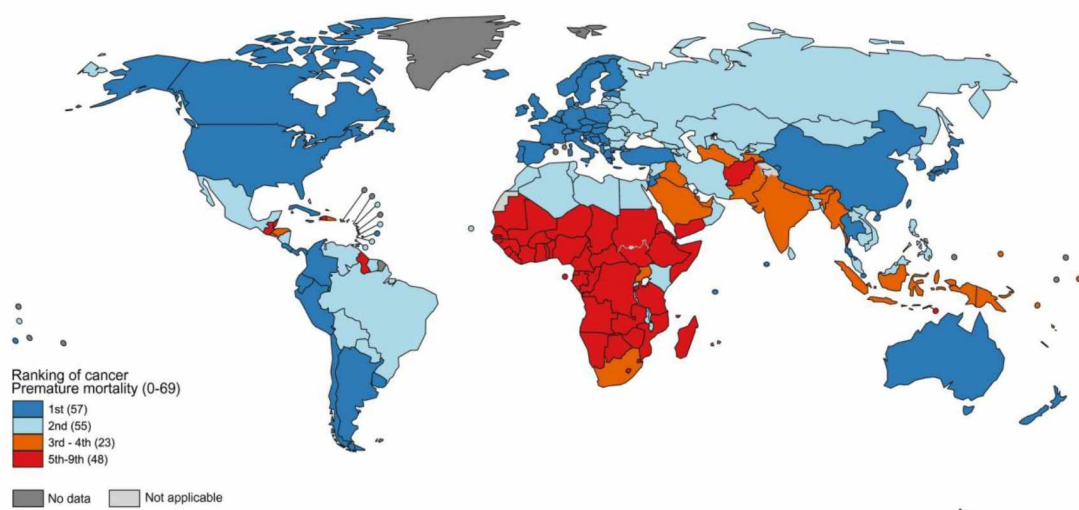


Εικόνα 1.6: Απεικόνιση της επίδρασης του Warburg στα καρκινικά κύτταρα. Το σχήμα δείχνει τις εξέχουσες πτυχές της επίδρασης του Warburg στα καρκινικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένης της γλυκόλυσης, της γαλακτικής ζύμωσης, του κύκλου TCA, της οδού πυροσταφυτικής πεντόζης, του μεταβολισμού της γλουταμίνης

και της χρήσης ενδιάμεσων κύκλων TCA για τη σύνθεση λιπιδίων, αμινοξέων και νουκλεοτιδίων. Οι κύριες μεταβολικές διαδρομές εμφανίζονται σε κίτρινα κουτιά και τα ένζυμα που ελέγχουν τα βασικά στάδια της γλυκόλυσης επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα. Συντομογραφίες: GLUT: μεταφορείς γλυκόζης. MCT: μεταφορέας μονοκαρβοξυλικού; PDC: σύμπλοκο πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης. PDKs: κινάσες πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης. LDHA: γαλακτική αφυδρογονάση A; HIF1: επαγωγίσιμος υποξία παράγοντας 1, IDH: ισοκιτρική αφυδρογονάση. SDH: ηλεκτρική αφυδρογονάση, FH: φουμαρική υδρατάση (Zhang, W., et al., 2015).

1.3. Επιδημιολογικά στοιχεία του καρκίνου

Παγκοσμίως, εκτιμάται ότι 19,3 εκατομμύρια νέα κρούσματα καρκίνου (18,1 εκατομμύρια εξαιρουμένου του καρκίνου του δέρματος χωρίς μελάνωμα) και σχεδόν 10,0 εκατομμύρια θάνατοι από καρκίνο (9,9 εκατομμύρια εξαιρουμένου του καρκίνου του δέρματος χωρίς μελάνωμα) εμφανίστηκαν το 2020. Ο γυναικείος καρκίνος του μαστού έχει ξεπεράσει τον καρκίνο του πνεύμονα ως τον πιο συχνά διαγνωσμένο καρκίνο με 2,3 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις (11,7%), ακολουθούμενες από καρκίνο του πνεύμονα (11,4%), του παχέος εντέρου (10,0%), του προστάτη (7,3%) και του στομάχου (5,6%). Ωστόσο, ο καρκίνος του πνεύμονα παρέμεινε η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο, με περίπου 1,8 εκατομμύρια θανάτους (18%), ακολουθούμενος από καρκίνο του παχέος εντέρου (9,4%), του ήπατος (8,3%), του στομάχου (7,7%) και του θηλυκού μαστού (6,9%). Η παγκόσμια επιβάρυνση για τον καρκίνο αναμένεται να είναι 28,4 εκατομμύρια περιπτώσεις το 2040, αύξηση 47% από το 2020 (Εικόνα 1.7) (Sung, H., et al., 2021).



Εικόνα 1.7: Εθνική κατάταξη του καρκίνου ως αιτία θανάτου σε ηλικίες <70 ετών το 2019 (Sung, H., et al., 2021)

1.4. Καρκίνος του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού (Breast Cancer, BC) διαθέτει τουλάχιστον 18 διακριτούς ιστολογικούς υπότυπους μετά την ταξινόμησή του από τον ΠΟΥ (2003), 17 εκ των οποίων ταξινομούνται ως «ειδικοί υπότυποι» και αντιπροσωπεύουν το 25% του συνόλου του καρκίνου του μαστού (Machalekova, K., et al., 2012). Λόγω της αυξημένης ετερογένειας της ασθένειας η αρχή γίνεται από μία υπερπλασία του γαλακτοφόρου πόρου η οποία εξελίσσεται είτε σε καλοήγη είτε σε κακοήγη όγκο. Στις περισσότερες περιπτώσεις πρόκειται για ένα μεταστατικό καρκίνο, με κύρια μεταστατικά όργανα να αποτελούν τα οστά, το ήπαρ, οι ωθήκες, οι πνεύμονες και ο εγκέφαλος (Sun, Y.S., et al., 2017).

Κατά τη διάρκεια των ετών και μετά από πολλές μελέτες έχουν καθιερωθεί αρκετοί παράγοντες πρόκλησης της ασθένειας όπως το οικογενειακό ιστορικό, η πρόωρη εμμηναρχή, η μεγάλη ηλικία πρώτου τοκετού, η έκθεση σε ακτινοβολία ως καταπολέμηση άλλων μορφών καρκίνου (κυρίως του πνεύμονα) και γενετικές μεταλλάξεις όπως αυτές των γονιδίων BRCA1/2. Από τους παράγοντες που έχουν διερευνηθεί άλλοι συσχετίζονται με μεγαλύτερο και άλλοι με μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Πρώτος και κύριος παράγοντας εμφάνισης θεωρείται το φύλο, μιας και οι γυναίκες εμφανίζουν 100 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού σε σύγκριση με τους άντρες. Εξίσου σημαντική φαίνεται να είναι και η ηλικία, καθώς σύμφωνα με έρευνες του 2016 παρουσιάστηκε μεγαλύτερο ποσοστό θανάτων σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού άνω των 40 ετών σε σχέση με γυναίκες μικρότερης ηλικίας. Επιπλέον και το οικογενειακό ιστορικό όπως προαναφέρθηκε παίζει ρόλο στην εμφάνιση της νόσου. Πιο συγκεκριμένα η κληρονομική ευαισθησία στον καρκίνο του μαστού αποδίδεται εν μέρει σε μεταλλάξεις γονιδίων, όπως το BRCA1 και BRCA2. Για παράδειγμα γυναίκες με μικρότερη ηλικία, φορείς όμως των μεταλλάξεων στο BRCA είναι αυτές

που εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά του καρκίνου του μαστού. Το συγκεκριμένο γεγονός αποτελεί εμφανής απόδειξη ότι το γονιδιακό υπόβαθρο έχει εξέχουσα σημασία για τη διαφοροποίηση της συγκεκριμένης ομάδας όγκων. Σημαντική επίδραση τέλος στην εμφάνιση καρκίνου του μαστού φαίνεται να έχουν ο σύγχρονος τρόπος ζωής, η αυξημένη πρόσληψη αλκοόλ, λιπαρών από τη διατροφή και τα ενδογενή και εξωγενή οιστρογόνα (Siegel, R., et al., 2017).

Τα τελευταία χρόνια η θνητότητα των γυναικών με καρκίνο του μαστού έχει μειωθεί αισθητά λόγω των σημαντικών εξελίξεων στους τομείς της διάγνωσης και νέων αποτελεσματικότερων και πιο ασφαλών θεραπειών (Alkabban, F.M., & Ferguson, T., 2021). Ωστόσο παρά το γεγονός αυτό, τα επτά τελευταία χρόνια, ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (TNBC) παραμένει ο υπότυπος καρκίνου του μαστού που εμφανίζει τη χειρότερη πρόγνωση αλλά και θεραπεία λόγω της έλλειψης κλινικά ενεργών στόχων (Gatti, V., et al., 2019).

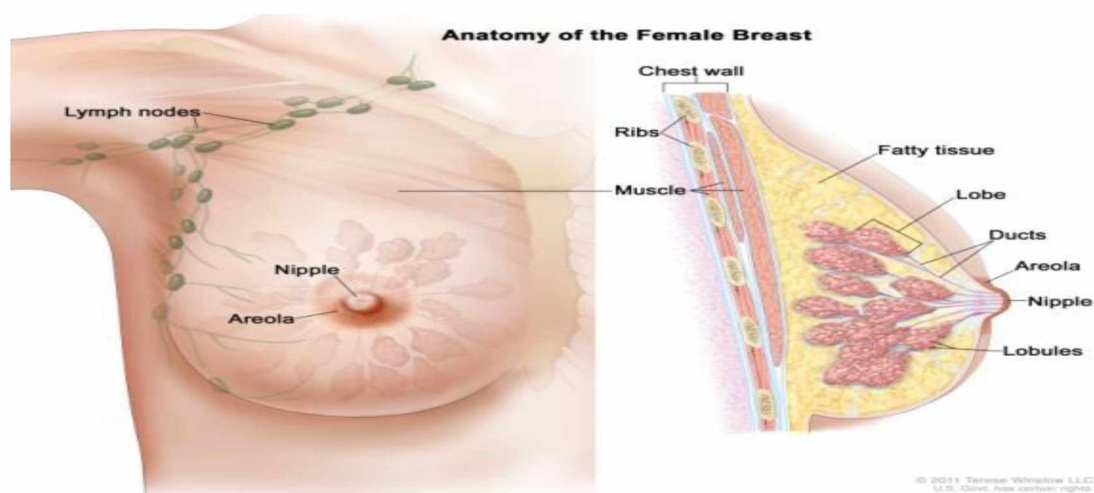
1.4.1. Χαρακτηριστικά και μορφολογική περιγραφή φυσιολογικού μαστού

Η ανατομία του μαστού είναι απαραίτητο να γίνει αντιληπτή, προκειμένου να μελετηθεί το σύνολο των διαταραχών που επηρεάζουν αυτό το όργανο και να αναπτυχθούν νέα σχέδια για μελλοντικές θεραπείες (Rivard, A.B., et al. 2021) (Jesinger, R.A., 2014).

Κάθε μαστός βρίσκεται μπροστά από το θωρακικό τοίχωμα και εκτείνεται από την 2η μέχρι την 7η πλευρά και από το έξω στερνικό χείλος μέχρι τη πρόσθια μασχαλιαία γραμμή. Ο μαζικός αδένας έχει σχήμα δισκοειδές εκτός από μία προεξοχή που σχηματίζεται στο άνω έξω τεταρτημόριο, η αποκαλούμενη ουρά του Spence. Περιβάλλεται από περιμαστικό λίπος και δέρμα και αποτελείται από 15-20 λοβούς. Κάθε λοβός εκβάλλει με δικό του εκφορητικό πόρο στη θηλή και υποδιαιρείται σε 20-40 λόβια. Περαιτέρω τα λόβια υποδιαιρούνται σε πόρους και αδενικά λοβίδια, το σύνολο των οποίων αποτελεί τη τελική πορολοβιακή μονάδα του μαζικού αδένου. Οι λοβοί χωρίζονται μεταξύ τους από συνδετικό ιστό ο οποίος συγκεντρώνεται σε ορισμένα σημεία και σχηματίζει τους καλούμενους συνδέσμους του Cooper που σε συνδυασμό με το πέταλο της επιπολής θωρακικής περιτονίας συμβάλλουν στη στήριξη των μαστών (Εικόνα 1.8)(Pandya, S., & Moore, R.G., 2011).

Ωστόσο, αυτοί οι σύνδεσμοι είναι εύκαμπτοι και επιτρέπουν κινήσεις του. Στις περισσότερες γυναίκες, οι σύνδεσμοι Cooper τεντώνονται με την πάροδο του χρόνου και της ηλικίας, με αποτέλεσμα τελικά ένα πτωτικό στήθος. Άλλες παραμορφώσεις μπορεί να περιλαμβάνουν τη κύφωση ή τη σκολίωση. Κατά την εξέταση του μαστού, παρατηρείται κάποιος βαθμός ασυμμετρίας στα περισσότερα στήθη

(Εικόνα 1.8). Λόγω της βαρύτητας, ο κάτω πόλος του είναι πληρέστερος από τον άνω πόλο (Rivard, A.B., et al. 2021) (Jesinger, R.A., 2014).

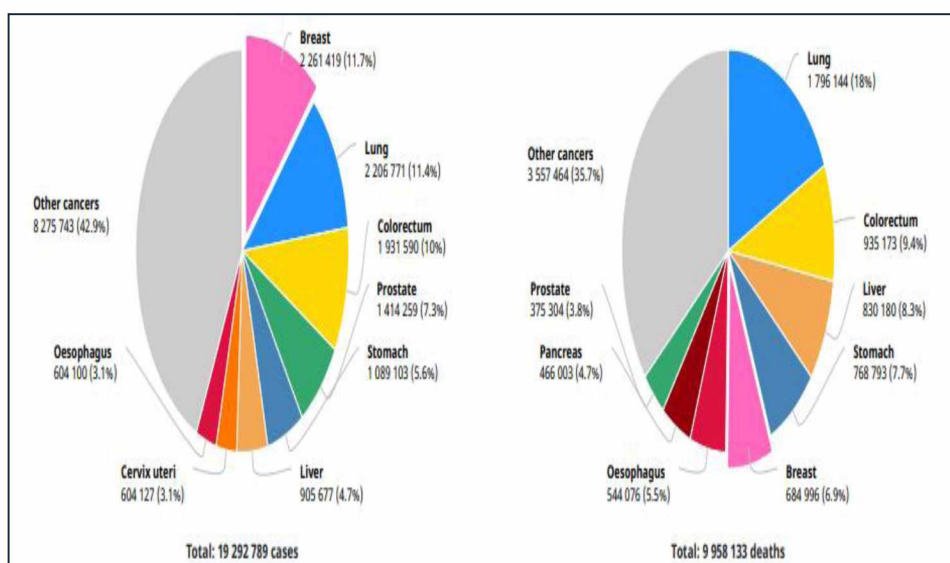


Εικόνα 1.8: Ανατομία του γυναικείου μαστού (Breast Cancer Treatment During Pregnancy (PDQ(R)): Patient Version, In PDQ Cancer Information Summaries, Bethesda (MD)

Τέλος αξίζει να σημειωθεί πως η πλειονότητα του μαστού αποτελείται από αδενικούς (γαλακτοπαραγωγούς) και λιπώδεις ιστούς (Jesinger, R.A., 2014). Η αναλογία του λίπους έναντι του αδενικού ιστού ποικίλλει μεταξύ των ατόμων και παρουσιάζει διακυμάνσεις αναλόγως της ηλικίας, μετά την εμμηνόπαυση, μετά τον τοκετό ή την κατάσταση της εγκυμοσύνης. Κατά την έναρξη της εμμηνόπαυσης, για παράδειγμα η μείωση των επιπέδων των οιστρογόνων οδηγεί σε μείωση του αδενικού ιστού και αύξηση του λιπώδους ιστού. Ωστόσο, το στήθος επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τα οιστρογόνα της σεξουαλικής ορμόνης. Καθώς πλησιάζει η εμμηνόπαυση, τα επίπεδα των οιστρογόνων μειώνονται, με αποτέλεσμα τη μείωση των αδένων. Η σταδιακή μείωση της πυκνότητας των μαστών έχει ως συνέπεια τη μεγαλύτερη ευαισθησία της μαστογραφίας στην ανίχνευση του καρκίνου.

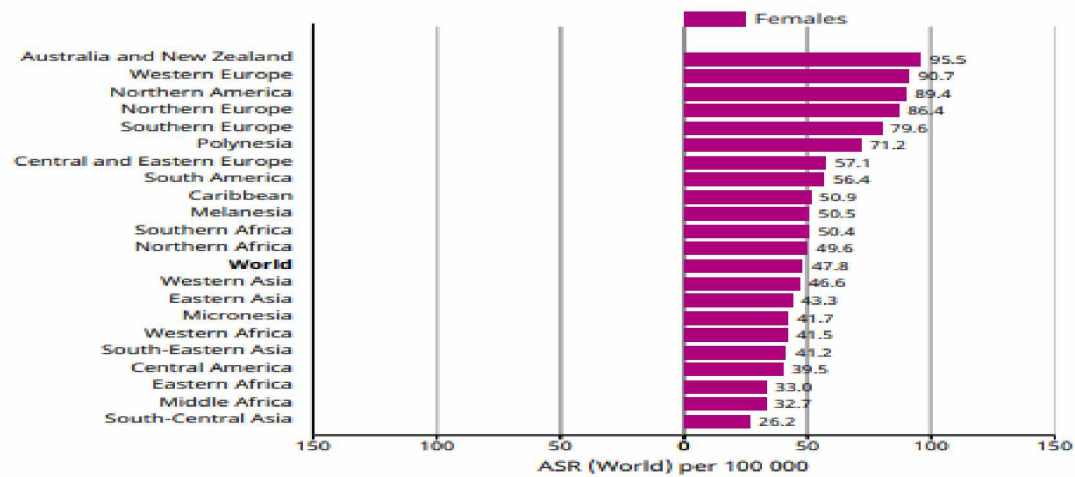
1.4.2. Επιδημιολογικά στοιχεία του καρκίνου του μαστού

Μετά τον καρκίνο του πνεύμονα (Lung Cancer, LC), ο καρκίνος του μαστού (Breast Cancer, BC) είναι η συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο στις γυναίκες, παγκοσμίως (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9: Αριθμός νέων περιστατικών καρκίνου, ανεξαρτήτως φύλου και ηλικίας κατά το έτος 2020 (αριστερά) - Αριθμός ανθρώπων που κατέληξαν από καρκίνο, ανεξαρτήτως φύλου και ηλικίας κατά το έτος 2020 (δεξιά) (<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheetpdf>)

Πρόκειται για έναν πολύ κοινό καρκίνο, που επηρεάζει κάθε χρόνο παγκοσμίως 2–2,5 εκατομμύρια γυναίκες. Περίπου 1 στις 8 γυναίκες θα αναπτύξουν επεμβατικό καρκίνο του μαστού καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Τα νέα περιστατικά καρκίνου του μαστού που εμφανίζονται κάθε χρόνο, υπολογίζονται στα 1,7 εκατομμύρια με ανησυχητικά υψηλά ποσοστά θνησιμότητας στις αναπτυγμένες χώρες (Ghoncheh, M., & Salehiniya, H., 2016) (Sun, Y.S., et al., 2017) (Hon, J. D., et al., 2016). Η συχνότητα εμφάνισης του παρουσιάζει διακυμάνσεις στις διάφορες ηπείρους με την Ανατολική Αφρική να εμφανίζει ποσοστό καρκίνου του μαστού 33 ανά 100.000 άτομα, ενώ στη Βόρεια Ευρώπη το ποσοστό να αυξάνεται σε 86,4 ανά 100.000 άτομα (The Global Cancer Observatory, 2020) (Εικόνα 1.10, 1.11). Στην Ινδία, ο BC είναι ο πιο διαδεδομένος καρκίνος στις γυναίκες και σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), εκτιμάται ότι νοσούν περίπου 170.000 γυναίκες από αυτόν, ποσοστό που είναι υψηλότερο κατά ~ 14% μεταξύ των συνολικών περιπτώσεων καρκίνου στη συγκεκριμένη χώρα (Machalekova, K., et al., 2012).



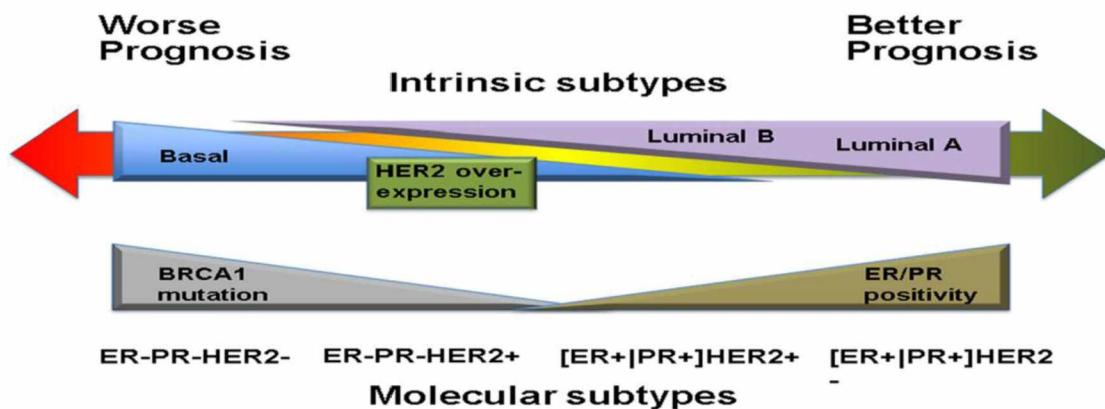
Εικόνα 1.10: Ποσοστά συχνότητας εμφάνισης καρκίνου του μαστού (<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheetpdf>)

	Incidence						Mortality					
	Both sexes		Males		Females		Both sexes		Males		Females	
	New cases	Cum. risk 0-74 (%)	New cases	Cum. risk 0-74 (%)	New cases	Cum. risk 0-74 (%)	Deaths	Cum. risk 0-74 (%)	Deaths	Cum. risk 0-74 (%)	Deaths	Cum. risk 0-74 (%)
Eastern Africa	45 709	3.57	-	-	45 709	3.57	24 047	1.99	-	-	24 047	1.99
Middle Africa	17 896	3.40	-	-	17 896	3.40	9 500	1.93	-	-	9 500	1.93
Northern Africa	57 128	5.12	-	-	57 128	5.12	21 524	1.89	-	-	21 524	1.89
Southern Africa	16 526	5.37	-	-	16 526	5.37	5 090	1.70	-	-	5 090	1.70
Western Africa	49 339	4.49	-	-	49 339	4.49	25 626	2.47	-	-	25 626	2.47
Caribbean	14 712	5.48	-	-	14 712	5.48	5 874	2.00	-	-	5 874	2.00
Central America	38 916	4.23	-	-	38 916	4.23	10 429	1.16	-	-	10 429	1.16
South America	156 472	6.14	-	-	156 472	6.14	41 681	1.50	-	-	41 681	1.50
Northern America	281 591	9.71	-	-	281 591	9.71	48 407	1.36	-	-	48 407	1.36
Eastern Asia	551 636	4.60	-	-	551 636	4.60	141 421	1.13	-	-	141 421	1.13
South-Eastern Asia	158 939	4.46	-	-	158 939	4.46	58 670	1.65	-	-	58 670	1.65
South-Central Asia	254 881	2.88	-	-	254 881	2.88	124 975	1.50	-	-	124 975	1.50
Western Asia	60 715	5.00	-	-	60 715	5.00	20 943	1.73	-	-	20 943	1.73
Central and Eastern Europe	158 708	6.28	-	-	158 708	6.28	51 488	1.75	-	-	51 488	1.75
Western Europe	169 016	9.69	-	-	169 016	9.69	43 706	1.65	-	-	43 706	1.65
Southern Europe	120 185	8.45	-	-	120 185	8.45	28 607	1.44	-	-	28 607	1.44
Northern Europe	83 177	9.35	-	-	83 177	9.35	17 964	1.45	-	-	17 964	1.45
Australia and New Zealand	23 277	10.41	-	-	23 277	10.41	3 792	1.28	-	-	3 792	1.28
Melanesia	2 215	5.37	-	-	2 215	5.37	1 121	2.90	-	-	1 121	2.90
Polynesia	261	7.42	-	-	261	7.42	83	2.44	-	-	83	2.44
Micronesia	120	4.20	-	-	120	4.20	48	1.59	-	-	48	1.59
Low HDI	109 572	3.88	-	-	109 572	3.88	58 586	2.21	-	-	58 586	2.21
Medium HDI	307 658	3.04	-	-	307 658	3.04	147 427	1.52	-	-	147 427	1.52
High HDI	825 438	4.57	-	-	825 438	4.57	247 486	1.36	-	-	247 486	1.36
Very high HDI	1 017 459	8.17	-	-	1 017 459	8.17	231 093	1.46	-	-	231 093	1.46
World	2 261 419	5.20	-	-	2 261 419	5.20	684 996	1.49	-	-	684 996	1.49

Εικόνα 1.11: Στατιστικά στοιχεία για τον καρκίνο και τη θνησιμότητα παγκοσμίως, αλλά και ανά περιοχή (<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheetpdf>)

1.4.3. Μοριακή ταξινόμηση του BC

Μέσω ανοσοϊστοχημικών δεικτών και μικροσυστοιχιών συμπληρωματικού DNA (cDNA) (Perou, C.M., et al., 2000) (Nielsen, T.O., et al., 2004) έχουν εντοπιστεί πέντε διαφορετικοί υπότυποι, οι οποίοι όμως διαφέρουν στην πρόγνωση και στους θεραπευτικούς στόχους και αντιστοιχούν σε συγκεκριμένες ιστοπαθολογικές κατηγορίες (Εικόνα 1.12). Αυτή η κατηγοριοποίηση βασίζεται στην εκτίμηση ότι υπάρχουν δύο τύποι επιθηλιακών κυττάρων στον ανθρώπινο μαστικό αδένα - αυχενικός και βασικός (και / ή μυοεπιθηλιακός). Αυτοί οι δύο τύποι κυττάρων μπορούν να διακριθούν ανοσοϊστοχημικά καθώς τα αυχενικά κύτταρα εκφράζουν ER και PR υποδοχείς και είναι θετικά για τις κερατίνες 8/18, ενώ τα βασικά κύτταρα είναι θετικά για τις κερατίνες 5/6 και 17 (Rakha, E.A., et al., 2006) (van de Rijn, M., 2002). Βάσει των παραπάνω υπάρχει η εξής μοριακή ταξινόμηση του TNBC:



Εικόνα 1.12: Η έκβαση της ασθένειας βασίζεται σε εγγενείς υποτύπους όγκου του μαστού (Dai, X., et al., 2015).

(1) λοβιακός τύπου A (Luminal A): αναπτύσσεται από τα κύτταρα του αυλού (θετικός σε ER ή / και θετικός σε PR και HER2 αρνητικό)-αντιστοιχεί στο 40% των περιπτώσεων και έχει πολύ καλή πρόγνωση

(2) λοβιακός τύπου B (Luminal B) (θετικό ER και / ή PR θετικό και HER2 θετικό)-αντιστοιχεί στο 20% των περιπτώσεων και έχει δυσκολότερη πρόγνωση από αυτού του τύπου A

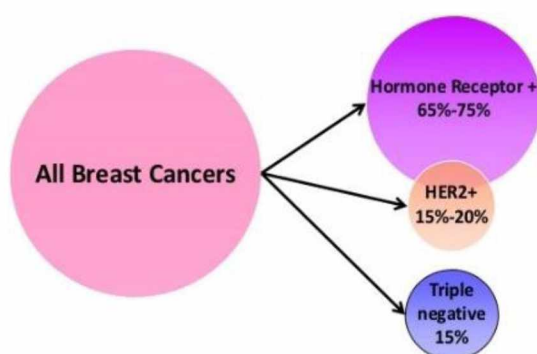
(3) Καρκίνος μαστού όπου παρατηρείται υπερέκφραση HER2/NEU (ER και PR αρνητικό, HER2 θετικό)-αντιστοιχεί στο 10-15% των περιπτώσεων και έχει κακή πρόγνωση

(4) Καρκίνος μαστού του τύπου των βασικών κυττάρων Basal like (τριπλά αρνητικός) (ER /PR/ HER2 αρνητικό, θετική κυτταροκερατίνη 5/6 και / ή επιδερμικό αυξητικό υποδοχέα θετικό)-αντιστοιχεί στο 10-15% των περιπτώσεων και έχει κακή πρόγνωση

(5) Τύπο φυσιολογικού μαστού-αντιστοιχεί στο 15% των περιπτώσεων και συχνά παρατηρούνται μεταλλάξεις του BRCA1 (Perou, C.M., et al., 2000) (Nielsen, T.O., et al., 2004) (Engelbrechten, O., et al., 2013) (Sorlie, T., et al., 2001) (Voduc, K.D., et al., 2010) (Krishnamurthy, S., et al., 2012).

1.4.4. Ορισμός του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού

Ο τριπλά-αρνητικός καρκίνος του μαστού (Triple-negative breast cancer, TNBC) είναι ο υπότυπος καρκίνου του μαστού, ο οποίος χαρακτηρίζεται από την: απουσία ανιχνεύσιμου υποδοχέα οιστρογόνων (ER), υποδοχέα προγεστερόνης (PR) και την έλλειψη ενίσχυσης του γονιδίου για τον υποδοχέα 2 του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (HER2). Χαρακτηρίζεται από ετερογένεια και αντιστοιχεί περίπου στο 10-20% του συνόλου των καρκίνων του μαστού (Dent, R., et al., 2007). Είναι μη ανταποκρινόμενος τόσο στην ενδοκρινική όσο και στη στοχευμένη θεραπεία με HER2 (Gluz, O., et al. 2009). Το ποσοστό των περιπτώσεων με TNBC κυμαίνεται περίπου από 7-28% σε διάφορες χώρες παγκοσμίως, με την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης TNBC στην Ινδία (Εικόνα 1.13)(Machalekova, K., et al., 2012).



Εικόνα 1.13: Σχηματική απεικόνιση της μοριακής ετερογένειας που παρουσιάζουν οι διάφοροι υπότυποι καρκίνου του μαστού (<https://www.komensandiego.org/triple-negative-breast-cancer-awareness-day-2/>).

Η ανάλυση του προφίλ της γονιδιακής έκφρασης ταξινομεί συχνά το TNBC ως υπότυπο βασικού τύπου καρκίνου του μαστού (Basal Like Breast Cancer). Πάνω από

το 80 % των κληρονομικών καρκίνων του μαστού που έχει μεταλλαχθεί το γονίδιο BRCA1 ταξινομούνται ως TNBC ή/και BLBC (Sporikova, Z., et al., 2018). Περίπου το 56% των προφίλ έκφρασης γονιδίων TNBC και BLBC αλληλεπικαλύπτονται. Ο λόγος επικάλυψης μπορεί να ανέρχεται σε ποσοστό 60-90% μεταξύ TNBC και BLBC, ενώ σε ποσοστό μόλις 11,5% μεταξύ μη TNBC και BLBC (Gluz, O., et al., 2009).

Αντιπροσωπεύει σχεδόν το 15% όλων των επεμβατικών καρκίνων του μαστού και έχει το υψηλότερο ποσοστό μεταστάσεων και τη χειρότερη πρόγνωση στην συνολική επιβίωση όλων των υποτύπων όγκων του μαστού (Dent, R., et al., 2007) (Gluz, O., et al., 2009) (Perou, C.M., et al., 2000) (Vona-Davis, L., 2008) (Carey, L.A., et al., 2006) (Rakha, E.A., et al., 2006).

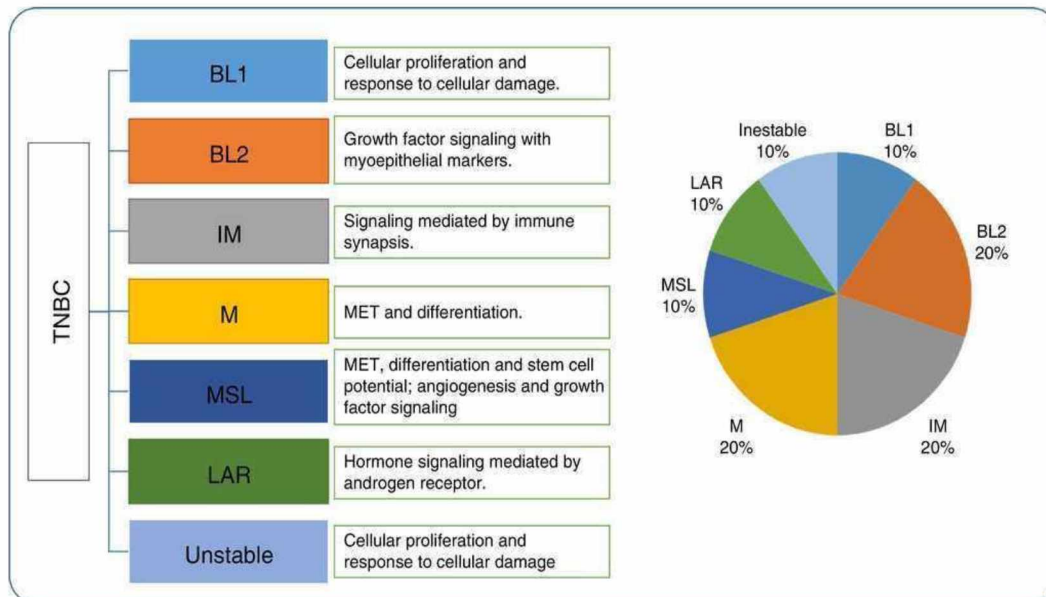
Είναι ο περισσότερος επιθετικός τύπος καρκίνου του μαστού και παρατηρούνται υψηλότερα ποσοστά υποτροπής και μειωμένη επιβίωση στη μεταστατική νόσο. Τα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά κατά τη διάγνυσή του εμφανίζουν υψηλό ποσοστό κακοήθειας, λεμφαδενική διήθηση και μεγαλύτερο μέγεθος όγκου (Gluz, O., et al., 2009). Παρ' όλα αυτά υπάρχει ένα υποσύνολο ασθενών που επιτυγχάνουν πλήρη παθολογοανατομική απόκριση (pathological complete response, pCR) μετά από προεγχειρητική χημειοθεραπεία (neoadjuvant), οι οποίοι έχουν ποσοστά επιβίωσης παρόμοια με νοσούντες άλλων υποτύπων καρκίνου του μαστού (Liedtke, C., et al., 2008).

1.4.5. Μοριακοί υπότυποι του TNBC

Οι μοριακοί υπότυποι φαίνεται να έχουν καίρια σημασία σε κλινικό επίπεδο. Ύστερα από μετα-ανάλυση που εξέτασε λεπτομερώς το προφίλ έκφρασης 587 ασθενών με TNBC χρησιμοποιώντας διττό (bimodal) φιλτράρισμα, με στόχο την απομάκρυνση των όγκων PR(+), ER(+) και HER(+) (Vona-Davis, L., et al., 2008), οι επιστήμονες διευκρίνισαν τουλάχιστον έξι διακριτούς μοριακούς υποτύπους TNBC με διαφορετικό βιολογικό υπόβαθρο οι οποίοι περιλαμβάνουν (Εικόνα 1.14):

- ένα μεσεγχυματικό υπότυπο (M),
- έναν ανοσοτροποποιητικό υπότυπο (IM),
- έναν υπότυπο μεσεγχυματικού-βλαστικού χαρακτήρα (mesenchymal stem, MSL)

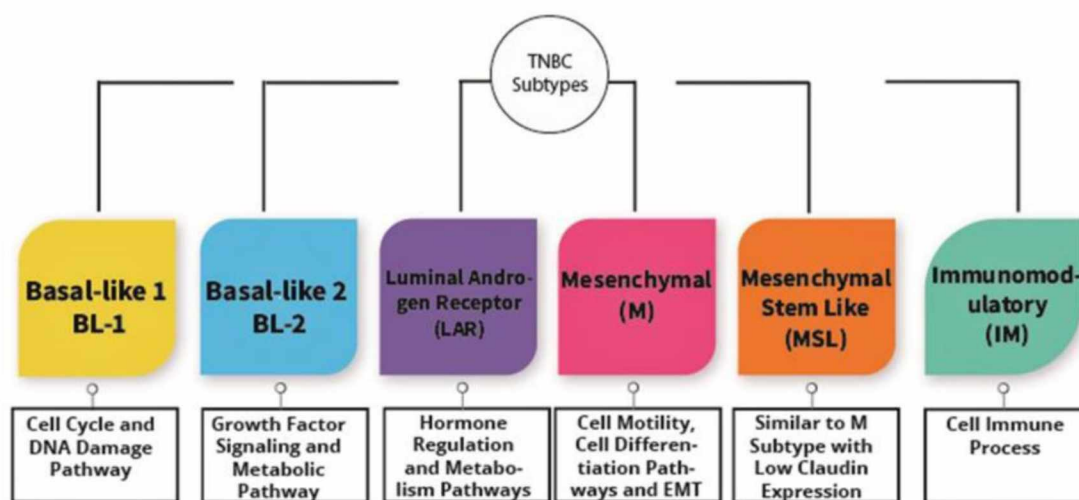
- έναν υπότυπο «τύπου υποδοχέα ανδρογόνων του αυλού» (Luminal androgen receptor, LAR) και
- δύο «βασικού τύπου» υποτύπους (BL1 και BL2) (Εικόνα 15) (Vona-Davis, L., et al., 2008).



Εικόνα 1.14: Η ταξινόμηση του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού Lehman, η οντολογία γονιδίων και η αναλογία. TNBC: τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού. BL1: βασικός τύπος 1, BL2: βασικός τύπος 2, IM: ανοσοτροποποιητικός υπότυπος, M: μεσεγχυματικός, MSL: υπότυπο μεσεγχυματικού-βλαστικού χαρακτήρα, LAR: τύπου υποδοχέα ανδρογόνων του αυλού (Uscanga-Perales, G. I., et al., 2016)

Ο υπότυπος BL1 χαρακτηρίζεται τόσο από συστατικά της μοριακής οδού της κυτταρικής διαίρεσης, όσο και της οδού απόκρισης στη βλάβη του DNA (ATR / BRCA οδοί). Ο υπότυπος BL2 περιλαμβάνει διαφορετικές οδούς σε σχέση με τον BL1, όπως οδούς μεταγωγής σήματος αυξητικών παραγόντων (IGF1R, Wnt / β-κατενίνη, MET, EGF και NGF), την έκφραση των μυοεπιθηλιακών δεικτών (TP63 και MME), τη γλυκονεογένεση και τη γλυκόλυση. Ο υπότυπος IM απαρτίζεται από σηματοδοτικές οδούς του ανοσοποιητικού συστήματος και ανοσολογικές κυτταρικές διεργασίες. Και τους δύο υπότυπους M και MSL, τους απαρτίζουν γονίδια που εμπλέκονται στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, σε μονοπάτια κυτταρικής διαφοροποίησης, στην κινητικότητα, και γονίδια που σχετίζονται με την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή (epithelial-mesenchymal transition, EMT). Ωστόσο ο υπότυπος MSL παρουσιάζει διαφορετικό προφίλ καθώς είναι εμπλουτισμένος σε γονίδια που σχετίζονται με τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα

και εκφράζει χαμηλά επίπεδα πολλαπλασιαστικών γονιδίων. Ο υπότυπος LAR απαρτίζεται από μεγαλύτερο ποσοστό γονιδίων που εμπλέκονται στη σύνθεση στεροειδών και το μεταβολισμό ανδρογόνων/οιστρογόνων (Εικόνα 1.15) (Engebraaten, O., et al., 2013).



Εικόνα 1.15: Οι υπότυποι του τριπλού αρνητικού καρκίνου του μαστού (Voduc, K.D., et al., 2010).

Στο Baylor College of Medicine διεξήχθη μια μελέτη 198 TNBC όγκων, η οποία βασίστηκε σε αναλύσεις προφίλ RNA-DNA και για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν 7 δημοσίως προσβάσιμες μελέτες (Vona-Davis, L., et al., 2008). Χρησιμοποιώντας τρεις παράγοντες όπως ο αριθμός αντιγράφων DNA, η ειδική για τη νόσο επιβίωση (disease-specific survival, DSS) και η ελεύθερη για τη νόσο επιβίωση (DFS) οδηγήθηκαν στη νεότερη ταξινόμηση τεσσάρων διακριτών υποτύπων TNBC:

- (1) μεσεγχυματικός (MES)
- (2) βασικού τύπου με ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού (BLIA)
- (3) βασικού τύπου με ανοσοκαταστολή (BLIS)
- (4) υπότυπος του αυλού-AR (LAR) (Vona-Davis, L., et al., 2008).

1.4.6. Βιοδείκτες που σχετίζονται με τον TNBC

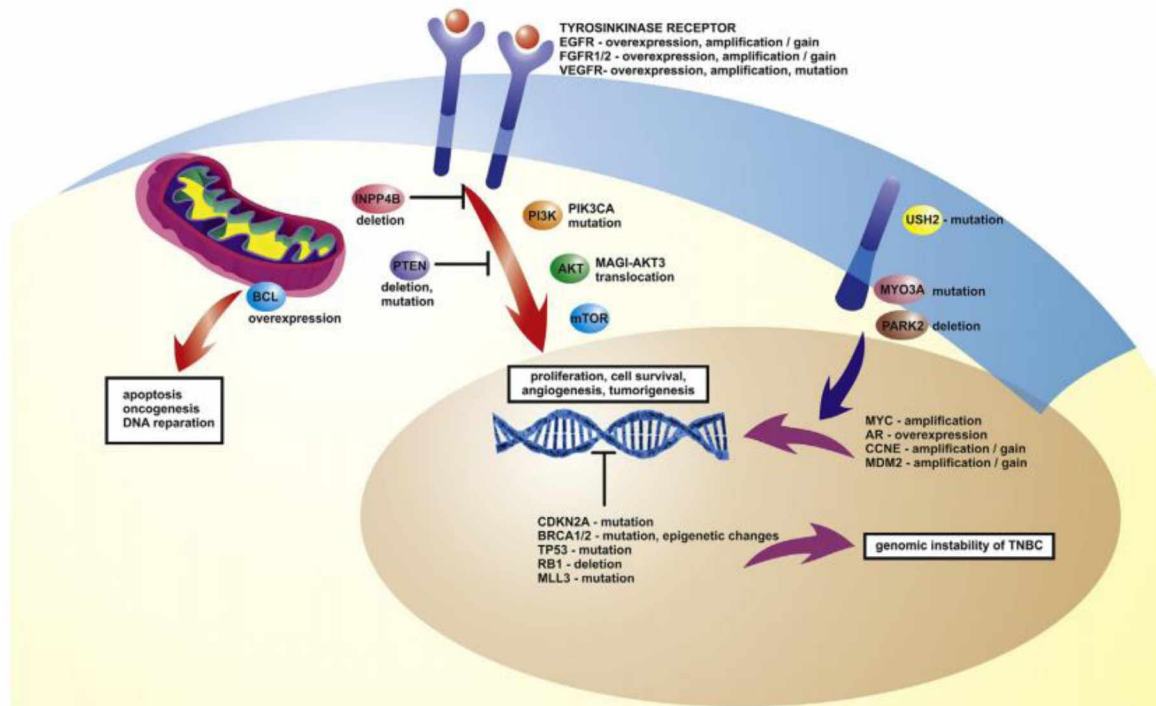
Οι βιοδείκτες είναι ουσίες που παράγονται από φυσιολογικά ή καρκινικά κύτταρα και εντοπίζονται σε βιολογικά υγρά (αίμα, ούρα, πτύελα) ή/και σε ιστούς. Υποδεικνύουν μια φυσιολογική ή παθολογική διαδικασία, μια κατάσταση ή μια νόσο. Διακρίνονται σε προγνωστικούς δείκτες (χαρακτηριστικά επιθετικότητας της

νόσου) και προβλεπτικούς δείκτες (προβλέπουν την αναμενόμενη ανταπόκριση του κάθε ασθενούς σε συγκεκριμένη θεραπευτική αγωγή – σύγχρονη «εξατομικευμένη θεραπεία»). Παρακάτω παρουσιάζονται οι βιοδείκτες που επηρεάζουν τόσο την πρόγνωση όσο και την πρόβλεψη της κατάλληλης θεραπείας του TNBC (Sporikona, Z., et al., 2018) (Εικόνα 1.16):

- **EGFR (Epidermal growth factor receptor):** Αποτελεί έναν από τους κύριους υποδοχείς κινάσης τυροσίνης ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του όγκου. Έχει αναφερθεί ως προβλεπτικός δείκτης για τη θεραπεία του TNBC καθώς εμπλέκεται σε διαδικασίες κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αγγειογένεσης, μετάστασης και αναστολής απόπτωσης.
- **VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor):** Κατατάσσεται στην οικογένεια υποδοχέων κινάσης τυροσίνης και είναι ο κύριος υποδοχέας του εμπλέκεται στην αγγειογένεση. Μπορεί να αποτελέσει προβλεπτικό δείκτη για τη θεραπεία του TNBC καθώς προκαλεί πολλαπλασιασμό και διατηρεί την ακεραιότητα του κυττάρου.
- **PARP {poly(ADP ribose) polymerase}:** Μια οικογένεια ενζύμων κυτταρικής σηματοδότησης. Έχουν ταυτοποιηθεί 18 πρωτεΐνες PARP. Είναι αισθητήρες βλάβης του DNA και παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωσή του, στις αντιδράσεις στη φλεγμονή, στην ισχαιμία και το οξειδωτικό στρες. Σε κύτταρα με μετάλλαξη BRCA, έχει βρεθεί πως η αναστολή των PARP συμβάλλει στον κυτταρικό θάνατο με απόπτωση. Άρα οι αναστολείς PARP είναι ένας ελπιδοφόρος προβλεπτικός δείκτης. Μάλιστα, το olaparib ένας αναστολέας PARP εγκρίθηκε από τον FDA των Ηνωμένων Πολιτειών για τη θεραπεία του τριπλά αρνητικά καρκίνου του μαστού με μετάλλαξη BRCA.
- **CDKs (Cyclin-dependent kinases):** διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και μεταβάλλονται σε σχεδόν σε όλους τους τύπους καρκίνου. Η έκφραση της κυκλίνης D, της κυκλίνης E, της CDK4/6 και της CDK2 είναι τροποποιημένη στον TNBC. Στον υπότυπο LAR του TNBC βρέθηκε πως η αναστολή του CDK4/6 εμποδίζει τη μετάσταση του όγκου του μαστού. Επομένως η στόχευση της αναστολής των CDKs μπορεί να αποτελέσει προβλεπτικό δείκτη για εξατομικευμένη θεραπεία για τον TNBC.

- **PI3K (Phosphoinositide 3-kinases)/AKT (Protein kinase B)/mTOR (mechanistic target of rapamycin):** Η δυσρύθμιση της οδού PI3K/AKT/mTOR προκαλεί τις αλλαγές στην επιβίωση των κυττάρων, την διαφοροποίηση ή/και το πολλαπλασιασμό γεγονός που παρατηρείται συχνά κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης. Η αυξημένη σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού PI3K/Akt/mTOR είναι πολύ συχνή σε όλους τους τύπους του καρκίνου του μαστού συμπεριλαμβανόμενου και του TNBC. Στον TNBC, η στόχευση του μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR αποτελεί έναν ελπιδοφόρο θεραπευτικό δείκτη.
- **P53:** κατασταλτική πρωτεΐνη σημαντική για τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την απόπτωση. Το TP53 είναι ένα από τα σημαντικότερα γονίδια που εμπλέκονται στη διατήρηση της ομοιόστασης και της γονιδιωματικής ακεραιότητας καθ' όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, της επιδιόρθωσης του DNA και της απόπτωσης. Η έκφραση του μεταλλαγμένου p53 συσχετίστηκε με το υψηλό ποσοστό πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, την πρόωρη υποτροπή ασθενειών και πρόωρο θάνατο στον TNBC. Το TP53 μεταλλάσσεται στην πλειονότητα των περιπτώσεων με TNBC ως εκ τούτου θα μπορούσε να είναι ένας πιθανός προγνωστικός παράγοντας.
- **Αντιγόνο Ki67 ή MKI67 (Marker Of Proliferation Ki-67):** Κατά τη διάρκεια της ενδιάμεσης φάσης, το αντιγόνο Ki-67 μπορεί να ανιχνευθεί αποκλειστικά μέσα στον πυρήνα των κυττάρων, ενώ στη μίτωση το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεΐνης μεταφέρεται στην επιφάνεια των χρωμοσωμάτων. Η πρωτεΐνη Ki-67 υπάρχει κατά τη διάρκεια όλων των ενεργών φάσεων του κυτταρικού κύκλου (G1, S, G2 και mitosis), αλλά απουσιάζει από τα κύτταρα στην φάση G0. Η έκφραση Ki67 σε φυσιολογικό μαστικό ιστό είναι <3%. Η ύπαρξη TNBC μπορεί να την ανεβάσει έως και 80%. Επομένως τα επίπεδα έκφρασης του Ki67 μπορούν να χρησιμεύσουν ως προγνωστικός δείκτης.
- **COX2 (Cyclooxygenase-2):** Το COX-2 απελευθερώνεται από ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο (CAFs), μακροφάγα κύτταρα τύπου 2 (M2) και καρκινικά κύτταρα στο μικροπεριβάλλον του όγκου. Προάγει τον

πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση, τη φλεγμονή, την εισβολή και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Η έκφρασή της σχετίζεται με δυσμενή πρόγνωση στον TNBC καθώς επάγει την υποξία στο μικροπεριβάλλον του όγκου και του προσδίδει αντοχή.

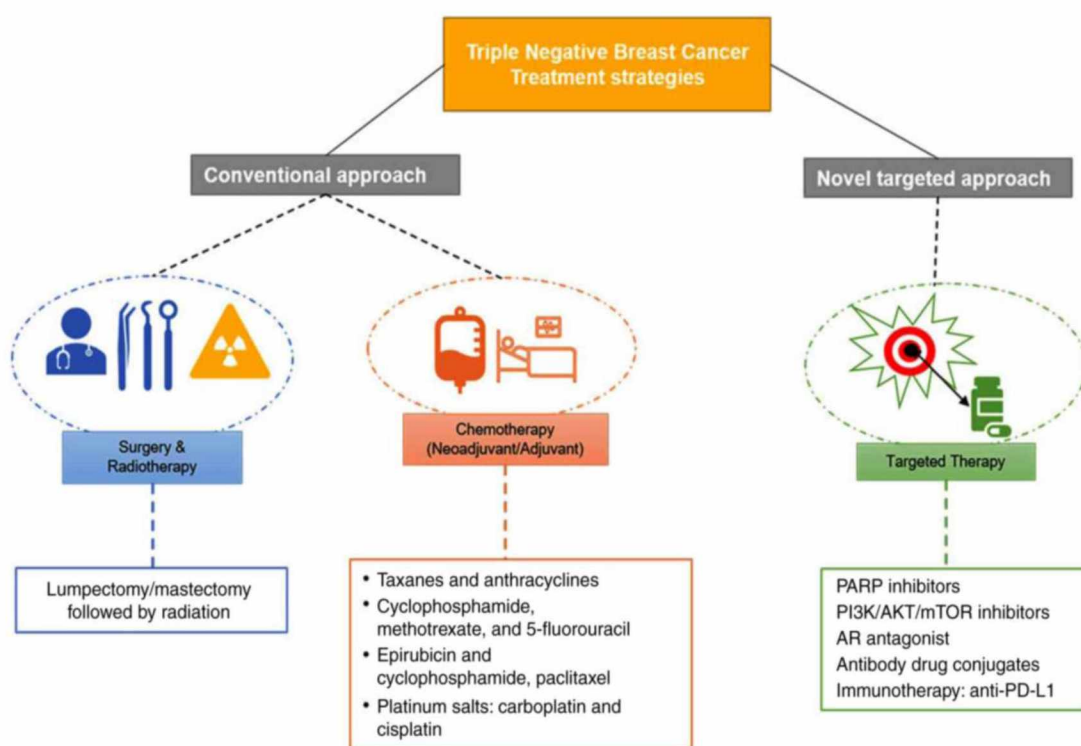


Εικόνα 1.16: Βιοδείκτες που επηρεάζουν την πρόγνωση ή / και την πρόβλεψη της κατάλληλης θεραπείας του TNBC (Sporikova, Z., et al., 2018).

1.4.7. Χημειοθεραπευτικά φάρμακα έναντι στο TNBC και αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς τους

Σε σύγκριση με άλλους τύπους καρκίνου του μαστού, ο TNBC έχει περιορισμένες επιλογές θεραπείας, είναι επιρρεπής σε υποτροπή και μετάσταση και έχει κακή πρόγνωση. Ο κύριος λόγος είναι ότι η έκφραση των ER, PR και HER2 είναι σε όλες τις περιπτώσεις αρνητική, καθιστώντας τις ενδοκρινικές και τις στοχευμένες θεραπείες αναποτελεσματικές. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, η χρήση πιο επιθετικής θεραπείας έχει επιφέρει μια σαφέστερη βελτίωση στην ποιότητα ζωής των ασθενών. Ωστόσο, υπάρχει μια άποψη, η οποία θεωρεί ότι θα ήταν αδύνατο να βελτιωθούν αυτά τα αποτελέσματα εάν αυτή η κυτταροτοξική θεραπεία παρέμεινε η μόνη επιλογή που προσφέρεται στους ασθενείς. Για αυτόν τον λόγο, υπάρχει η

επιθυμία να βρεθούν νέα «έξυπνα φάρμακα» ικανά να λύσουν τη χημειοαντοχή και να μειώσουν τους κινδύνους της χημειοθεραπείας σε ασθενείς που ανταποκρίνονται. Τα χημειοθεραπευτικά σχήματα που χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις υψηλού κινδύνου TNBC είναι ο συνδυασμός ανθρακυκλίνης-ταξάνης. Ομοίως, η 5-φθοριοουρακίλη, σχήματα κυκλοφωσφαμίδης ακολουθούμενα από docetaxel (DTX) ή paclitaxel (PTX) χρησιμοποιούνται επίσης σε περιπτώσεις μέτριου έως υψηλού κινδύνου ως επικουρικά χημειοθεραπευτικά σχήματα. Τέλος σχήματα με βάση το λευκόχρυσο όπως η σισπλατίνη, ενώσεις καρβοπλατίνης και ανθρακυκλίνης χρησιμοποιούνται ως νεοενισχυτική θεραπεία (Dent, R., et al., 2007) (Εικόνα 1.17).

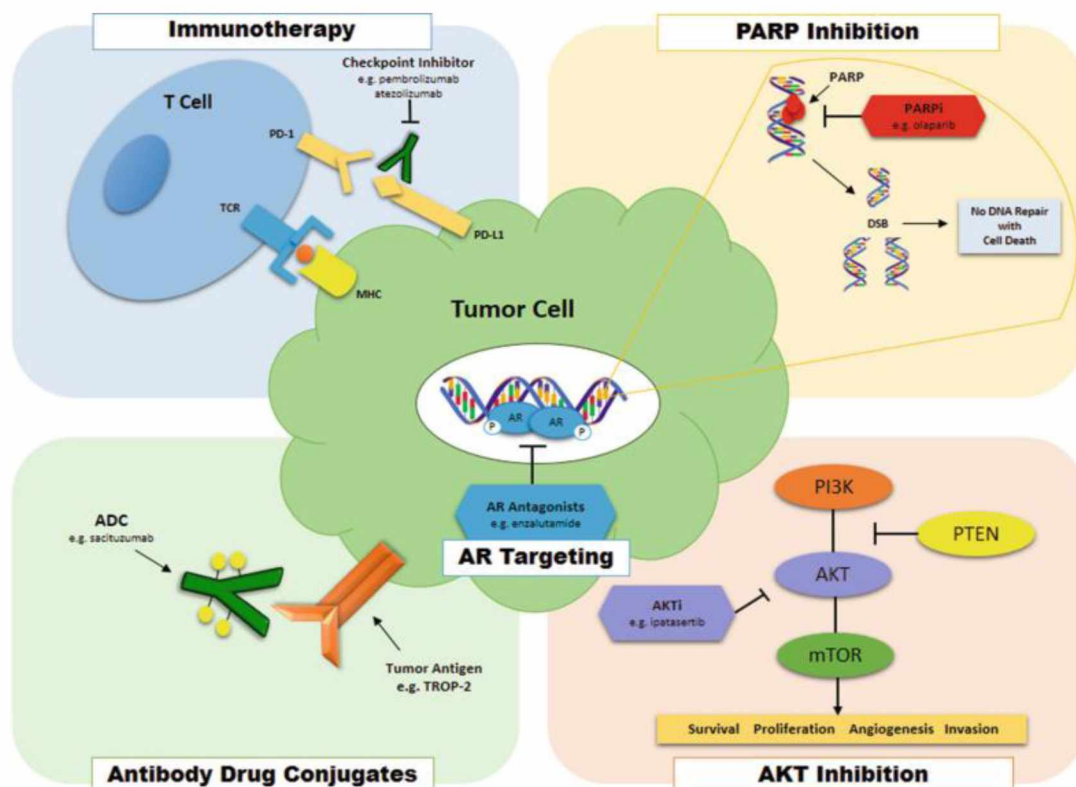


Εικόνα 1.17: Διαφορετικοί τρόποι θεραπείας που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία TNBC. Η παραδοσιακή μέθοδος θεραπείας του καρκίνου (χειρουργική επέμβαση και ακτινοθεραπεία) εξακολουθεί να είναι ο πρωταρχικός τρόπος αρχικής θεραπείας ακολουθούμενη από χημειοθεραπεία. Οι ταξάνες και οι ανθρακυκλίνες είναι συνήθεις χημειοθεραπευτικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία του TNBC μαζί με παράγοντες πλατίνης. Πρόσφατα, λόγω της ανάπτυξης της τεχνολογίας omics, η στοχευμένη θεραπεία έχει γίνει ένας νέος τρόπος αντιμετώπισης του καρκίνου. AR: υποδοχέας ανδρογόνων, PARP: πολυμεράση πολυ (ADP-ριβόζης), PD-L1: προγραμματισμένος συνδετήρας θανάτου 1, TNBC: τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (Manjunath, M., & Choudhary, B. 2021).

Οι διαφορετικοί τύποι φαρμάκων, μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τέσσερις κατηγορίες (Εικόνα 1.18):

1. παράγοντες που προκαλούν βλάβη στο DNA (π.χ. σισπλατίνη, κυκλοφωσφαμίδη),
2. παράγοντες που αναστέλλουν την πολυμεράση πολυ (ADP-ριβόζης) (αναστολείς PARP),
3. αναστολείς κινάσης-τυροσίνης και
4. παράγοντες που αναστέλλουν διαδρομές σηματοδότησης καταρράκτη PI3K/AKT/mTOR (κυρίως PI3K / AKT) (Uscanga-Perales, G.I., 2016)

Οι επιπτώσεις αυτών περιλαμβάνουν δυσφορία, ασθένεια, έμετο, απώλεια μαλλιών, διακυμάνσεις σε βάρος, κόπωση και νευρικήτητα (Jain, V., et al., 2020).



Εικόνα 1.18: τύποι φαρμάκων για τον TNBC (Lyons, T.G., & Traina, T.A., 2019)

Τα τελευταία χρόνια, μεγάλος αριθμός ανασκοπήσεων έχει δείξει ότι η χρήση θεραπευτικών προσεγγίσεων χημειοθεραπείας με τη νέα ανοσοενισχυτική θεραπεία στη καταπολέμηση του TNBC έχει σημαντικά υψηλότερο ποσοστό παθολογικής ύφεσης απ' ό,τι για τον καρκίνο του μαστού θετικό σε ορμονικούς υποδοχείς και μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την πρόγνωση των ασθενών με TNBC. Οι εθνικές ολοκληρωμένες οδηγίες για το δίκτυο καρκίνου προτείνουν τη χρήση συνδυαστικών θεραπειών με βάση τη ταξάνη, την ανθρακυκλίνη, τη κυκλοφωσφαμίδη, τη σισπλατίνη και τη φθοροουρακίλη. Προς το παρόν, τα προτιμώμενα σχήματα για τη καταπολέμηση του TNBC είναι (Yin, L., et al., 2020):

- ταξίλη / δοσεταξέλη + αδριαμυκίνη + κυκλοφωσφαμίδη (TAC), ντοσεταξέλη + κυκλοφωσφαμίδη (TC),
- αδριαμυκίνη + κυκλοφωσφαμίδη (AC), κυκλοφωσφαμίδη + μεθοτρεξάτη + φθοροουρακίλη (CMF),
- κυκλοφωσφαμίδη + αδριαμυκίνη + φλουφοραμίνη + η φθοροουρακίλη + πακλιταξέλη / δοσεταξέλη (CEF-T)

Αναλυτικότερα για τις ταξάνες, την ανθρακυκλίνη, τη κυκλοφωσφαμίδη, τη σισπλατίνη και τη φθοροουρακίλη ισχύει ότι:

✓ Ταξάνες

Οι ταξάνες αποτελούν μια ομάδα δραστικών ουσιών και είναι γνωστά ως τοξοειδή. Χρησιμοποιούνται στη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου και χρησιμεύουν ως χημειοθεραπευτικοί παράγοντες. Σε αυτό το πλαίσιο, μπορεί συχνά να βρεθούν σε συνδυασμούς με άλλα δραστικά συστατικά. Η πρώτη ταξάνη που ανακαλύφθηκε ήταν πακλιταξέλη. Το 1993 η πακλιταξέλη εγκρίθηκε στη Γερμανία ως φάρμακο για καρκίνο των ωοθηκών. Η αργότερα αναπτυχθείσα δοσεταξέλη είναι ένα παράγωγο της πακλιταξέλης

Ο μηχανισμός δράσης της ταξόλης είναι κυρίως μέσω της αναστολής του αποπολυμερισμού των μικροσωληνίσκων με αποτέλεσμα η κίνηση των ινιδίων να μην πραγματοποιείται σωστά κατά τη διάρκεια της μίτωσης, αναγκάζοντάς τα κύτταρα να σταματήσουν στην προμετάαση και αναστέλλοντας έτσι και τη

κυτταρική διαίρεση. Εκτός της αντιμιτωτικής της δράσης, η ταξόλη επίσης μεσολαβεί στην ενεργοποίηση των μακροφάγων κατά του όγκου. Η τοξικότητα της σχετίζεται επίσης με την ικανότητα της να προκαλεί απόπτωση καθώς εμποδίζει τον διπλασιασμό του κυττάρου.

Ο μηχανισμός στον οποίο βασίζεται η δράση της δοσεταξέλης είναι ο ίδιος με αυτόν της ταξόλης, αλλά στην ίδια τοξική δόση, η δοσεταξέλη έχει το διπλάσιο της επίδρασης αποπολυμερισμού κατά των μικροσωληνίσκων. Επίσης η δοσεταξέλη έχει ένα ευρύτερο φάσμα κατά των όγκων. Η ανάλυση του γονιδιακού προφίλ των μοριακών υποτύπων TNBC έδειξε ότι ο υπότυπος BL ο οποίος χαρακτηρίζεται από την ενεργή έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με πολλαπλασιασμό και την επιδιόρθωση του DNA, είναι ευαίσθητος σε αντιμιτωτικά φάρμακα (π.χ. ταξόλη ή δοσεταξέλη). Τέλος βρέθηκε ότι μετά την χημειοθεραπεία με βάση ταξάνη οι ασθενείς με υπότυπο βασικού τύπου (BL1 και BL2) είχαν τέσσερις φορές υψηλότερους ρυθμούς κλινικής ύφεσης σε σχέση με ασθενείς με υπότυπο μεσεγχυματικού-βλαστικού χαρακτήρα (mesenchymal stem, MSL) και υπότυπο «τύπου υποδοχέα ανδρογόνων του αυλού» (Luminal androgen receptor, LAR) (Yin, L., et al., 2020) (Bauer, J.A., et al., 2010) (Juul, N., et al., 2010).

✓ Ανθρακυκλίνες

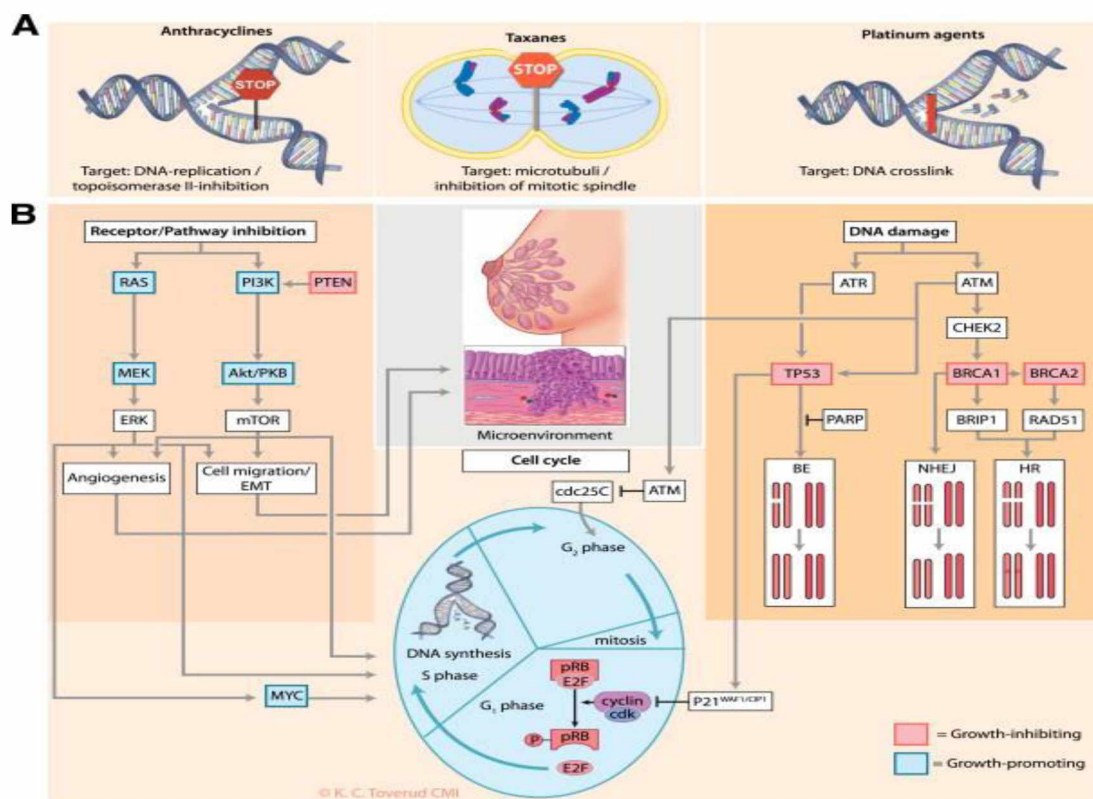
Οι ανθρακυκλίνες και τα αντιβιοτικά ανθρακυκλίνης προέρχονται από το στέλεχος του μύκητα *Streptomyces peucetius* var. *Caesius* και χρησιμοποιούνται εδώ και σχεδόν 40 χρόνια για τη θεραπεία πολλών κακοηθειών (Edwardson, D.W., et al., 2015). Κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου, εκατοντάδες ανάλογα των δύο πρώτων αντιβιοτικών ανθρακυκλίνης, δοξορουβικίνη και δαουνορουβικίνη, έχουν συνθέσει και αξιολογηθεί. Ο μηχανισμός δράσης των ανθρακυκλινών περιλαμβάνει: την αναστολή της τοποϊσομεράσης II του DNA, την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου και τη διέγερση της απόπτωσης. Τα υπάρχοντα σχήματα με βάση την ανθρακυκλίνη, όπως το FEC-100 (100 mg/m² επιρουβικίνης), μπορούν να μειώσουν τον κίνδυνο υποτροπής και θανάτου από καρκίνο του μαστού κατά 25-30% (Levine, M.N., et al., 2005). Μέσω ενός μεγάλου αριθμού κλινικών μελετών, οι ερευνητές έχουν αποκτήσει ικανοποιητική εικόνα σχετικά με τη δοσολογία των ανθρακυκλινών στη θεραπεία

για καρκίνο του μαστού: η βέλτιστη δόση δοξορουβικίνης είναι 60 mg/m² και αυτή της επιρουβικίνης είναι 100 mg/m² (Trudeau, M., et al., 2005). Δοκιμές με αύξηση των παραπάνω δόσεων δεν έδειξαν βελτίωση στο ποσοστό επιβίωσης ούτε μείωση στο ποσοστό υποτροπής (Henderson, I.C., et al., 2003). Σύμφωνα με κλινικά δεδομένα, μετά από 6 μήνες χημειοθεραπείας με ανθρακυκλίνες, το ποσοστό θνησιμότητας μειώθηκε περίπου 38% σε ασθενείς ηλικίας κάτω των 50 ετών και περίπου 20% σε ασθενείς ηλικίας 50 έως 69 ετών. Τέλος σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη από 130 ασθενείς με TNBC που έλαβαν ανθρακυκλίνη σε συνδυασμό με ταξάνη υπήρχαν σημαντικές διαφορές ανά υπότυπο: ο υπότυπος BL1 επέτυχε το υψηλότερο ποσοστό pCR (pathologic complete response) (52%), ενώ οι BL2, LAR και MSL υπότυποι είχαν τη φτωχότερη ανταπόκριση στον συνδυασμό (0%, 10% και 23%, αντίστοιχα) (Yin, L., et al., 2020).

✓ Παράγοντες πλατίνας

Η σισπλατίνη είναι ένας σημαντικός χημειοθεραπευτικός παράγοντας που χρησιμοποιείται ευρέως για τη θεραπεία ποικίλων κακοηθειών, συμπεριλαμβανομένου του μαστού, των όρχεων, των ωοθηκών, του τραχήλου της μήτρας, του προστάτη, της κεφαλής και του λαιμού, της ουροδόχου κύστης, των πνευμόνων και των πυρίμαχων λεμφωμάτων μη-Hodgkin (Tsimberidou, Braithe et al., 2009 · Dhar, Kolishetti et al., 2011). Τα φάρμακα με βάση την πλατίνα είναι η σισπλατίνη, η καρβοπλατίνη και η οξαλιπλατίνη. Η σισπλατίνη ενεργοποιείται μόλις εισέλθει στο κύτταρο. Στο κυτταρόπλασμα τα άτομα χλωρίου της σισπλατίνης μετατοπίζονται από μόρια νερού. Αυτό το υδρολυμένο προϊόν είναι ένα ισχυρό ηλεκτρόφιλο που μπορεί να αντιδράσει με οποιοδήποτε πυρηνόφιλο, συμπεριλαμβανομένων των σουλφυδρυλικών ομάδων σε πρωτεΐνες και άτομα αζώτου στα νουκλεϊκά οξέα. Η σισπλατίνη συνδέεται με το αντιδραστικό κέντρο N7 σε βάσης πουρίνης και ως εκ τούτου προκαλεί βλάβη στο DNA των καρκινικών κυττάρων, εμποδίζοντας την κυτταρική διαίρεση και με αποτέλεσμα τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο (Shaloam Dasari and Paul Bernard Tchounwou, Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action, PMC 2015). Ο Von Minckwitz χορήγησε θεραπεία που περιείχε καρβοπλατίνη σε 269 τυχαία επιλεγμένους ασθενείς με καρκίνο του μαστού και μια θεραπεία που δεν περιέχει

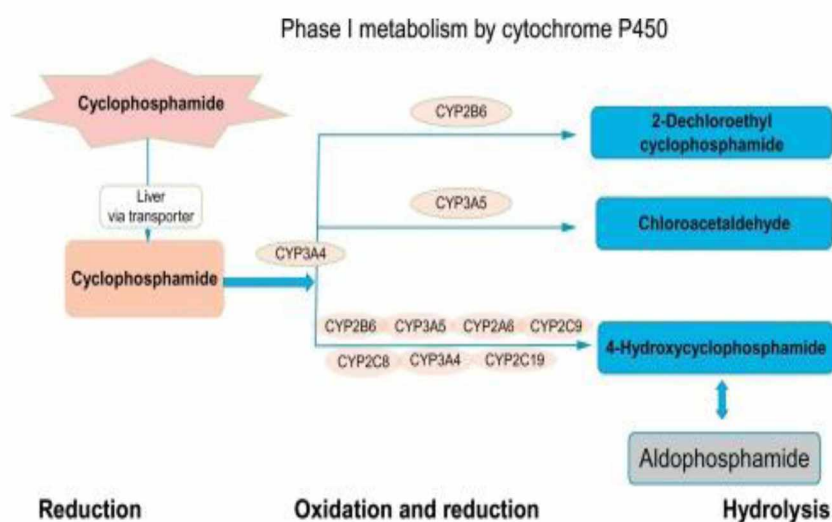
καρβοπλατίνη σε 299 ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Διαπίστωσε ότι η προσθήκη καρβοπλατίνης στη χημειοθεραπεία αύξησε σημαντικά το ποσοστό pCR σε ασθενείς με TNBC, αλλά αυτή η αύξηση δεν παρατηρήθηκε σε ασθενείς με θετικό σε HER2 καρκίνο του μαστού (von Minckwitz, G., et al., 2014). Η σισπλατίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε συνδυασμό με τη γεμισταβίνη (GP) ως θεραπεία πρώτης γραμμής για τον μεταστατικό TNBC (mTNBC). Σύμφωνα με το Zhang και τους συνεργάτες του ο συνδυασμός των δύο φαρμάκων είχε σημαντική δραστηριότητα και ήταν ασφαλέστερος για τους ασθενείς με μεταστατικό TNBC (mTNBC) (Zhang, J., et al., 2015).



Εικόνα 1.19: Χρησιμοποιούμενες θεραπείες και μοριακοί στόχοι που χρησιμοποιούνται στο τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (TNBC). Α: Περιλαμβάνει ανθρακυκλίνες, ταξάνες και παράγοντες με βάση την πλατίνα (συνήθως καρβοπλατίνη και σισπλατίνη). Υποδεικνύονται οι μηχανισμοί δράσης αλλά και συνδυασμοί αυτών των θεραπειών με νέες στοχευμένες αρχές θεραπείας που μπορεί να καταπολεμήσουν την ανθεκτικότητα στη θεραπεία και να αυξήσουν τη θεραπευτική αποτελεσματικότητα (π.χ., αντιαγγειογενετική θεραπεία και πλατίνα / PARPi). Β: Οι μοριακές στοχευμένες θεραπείες για το TNBC έχουν μελετηθεί με πολλαπλές οδούς, και οι φαρμακευτικοί στόχοι παρατίθενται στο σχήμα (Engebraaten, O., et al., 2013).

✓ Κυκλοφωσφαμίδη

Η κυκλοφωσφαμίδη είναι ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου. Ωστόσο δεν έχει αντικαρκινική δράση *in vitro*. Για να λειτουργήσει, μετατρέπεται πρώτα από το ήπαρ σε δύο χημικές ουσίες, την ακρολεΐνη και τη φωσφοραμίδη. Η ακρολεΐνη και το φωσφοραμίδιο είναι οι δραστικές ενώσεις και επιβραδύνουν την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων παρεμβαίνοντας στις βάσεις του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA) μέσα στα καρκινικά κύτταρα. Δυστυχώς, τα φυσιολογικά κύτταρα επηρεάζονται επίσης και αυτό έχει ως αποτέλεσμα σοβαρές παρενέργειες. Εκτός από την επιβράδυνση της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων, η κυκλοφωσφαμίδη καταστέλλει επίσης το ανοσοποιητικό σύστημα και αναφέρεται ως ανοσοκατασταλτικό. (Εικόνα 1.20).



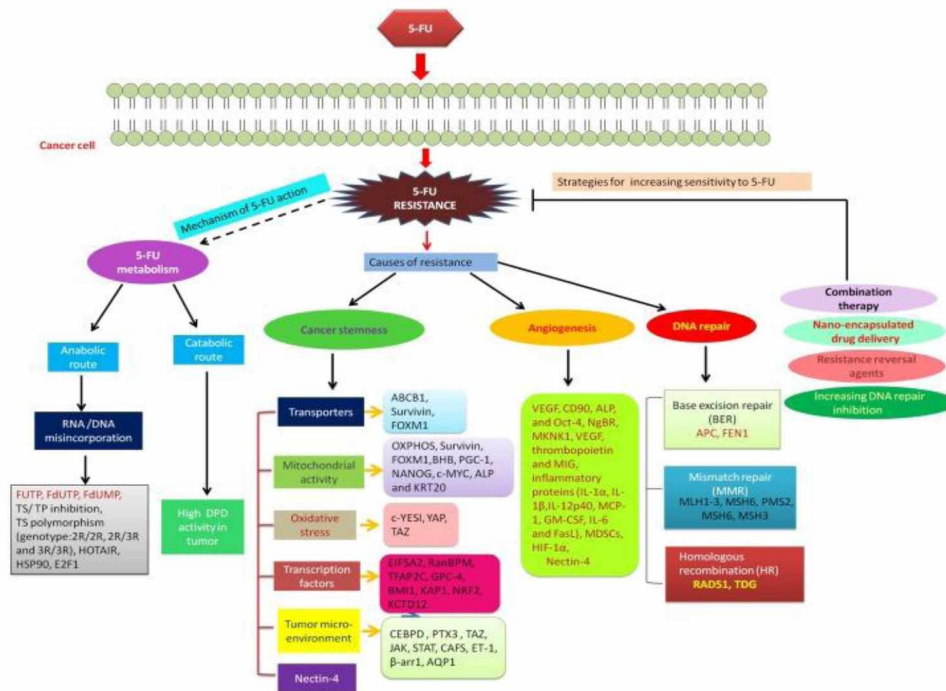
Εικόνα 1.20: Μεταβολισμός της κυκλοφωσφαμίδης (<https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/cyclophosphamide>)

Επί του παρόντος, η κυκλοφωσφαμίδη χρησιμοποιείται ως το τυπικό θεραπευτικό σχήμα για τον καρκίνο του μαστού HER2-αρνητικό. Ο Nakatsukasa και οι συνεργάτες του μελέτησαν 52 ασθενείς με καρκίνο του μαστού οι οποίοι είχαν ολοκληρώσει 4 κύκλους με κυκλοφωσφαμίδη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ασθενείς με Luminal A (ER +, δείκτης Ki-67 <20%, αρνητικός HER2) είχαν ποσοστό pCR 0% (0/12) και με Luminal B (ER +, δείκτης Ki67 > 20%, HER2 αρνητικός) είχαν ποσοστό pCR 4,3% (1/23). Ωστόσο οι ασθενείς με TNBC είχαν το μεγαλύτερο ποσοστό pCR 50,0% (7/14). (Nakatsukasa, K., et al., 2017). Σύμφωνα με τα παραπάνω κατέληξαν στο

συμπέρασμα ότι η χημειοθεραπεία με κυκλοφωσφαμίδη ήταν καταλληλότερη για τη θεραπεία του TNBC αλλά είχε περιορισμένη αποτελεσματικότητα στη θεραπεία άλλων υποτύπων καρκίνου του μαστού. Επίσης το 2014 ο Wu και οι συνεργάτες του διαπίστωσαν ότι η χορήγηση του σχήματος κυκλοφωσφαμίδη, μεθοτρεξάτη και φθοροουρακίλη μείωσαν αποτελεσματικά τον ρυθμό της υποτροπής και παρέτειναν την επιβίωση χωρίς ασθένειες (DFS) των ασθενών με TNBC (Wu, C.E., et al., 2014).

✓ Φθοριοουρακίλη

Το 5-Fluorouracil (5-Fu) είναι ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα κυτταροτοξικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ποικίλων κακοηθειών, ιδίως καρκίνων του γαστρεντερικού σωλήνα και καρκίνου του μαστού σε μεταγενέστερα στάδια. Χρησιμοποιείται συχνά σε τυπικά πρωτόκολλα χημειοθεραπείας για μια ποικιλία συμπαγών όγκων (συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού) σε συνδυασμό με άλλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα (Εικόνα 1.21). Ο συνδυασμός φαρμάκων με 5-Fu μπορεί επίσης να προκαλέσει απόπτωση στα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα μέσω της αναστολής της αυτοφαγίας (Ghosh, S., et al., 2019). Ωστόσο το 5-Fluorouracil (5-Fu) δεν έχει βιολογική δραστηριότητα. Μέσω της δράσης της φωσφοριβοσυλτρανσφεράσης του οροτικού, το 5-Fu μπορεί να μετατραπεί *in vivo* στους δραστικούς μεταβολίτες όπως η μονοφωσφορική φθοροουριδίνη και η μονοφωσφορική φθοροδεοξουριδίνη οι οποίοι διαταράσσουν τη σύνθεση DNA και RNA μέσω της θυμιδυλικής συνθάσης. Ως φάρμακο φθοροουρακίλης από του στόματος νέας γενιάς, είναι η καπεσιταβίνη η οποία δρα επιλεκτικά σε καρκινικά κύτταρα με υψηλή έκφραση φωσφορυλάσης θυμιδίνης. Εντούτοις η ίδια η καπεσιταβίνη δεν έχει κυτταροτοξικότητα και είναι πολύ αποτελεσματική αφού μετατραπεί *in vivo* σε κυτταροτοξική 5-Fu. Αυτή η διαδικασία καταλύεται από τη μεγάλη ποσότητα θυμιδυλικής φωσφορυλάσης στον όγκο, με αποτέλεσμα την παραγωγή περισσότερης 5-Fu και άρα ισχυρότερη αντικαρκινική δράση.



Εικόνα 1.21: Αντίσταση στη 5-Fluorouracil (5-FU). Η νέα στρατηγική για την ενίσχυση της ευαισθησίας κατά του καρκίνου: Επιπτώσεις της αναστολής της επιδιόρθωσης του DNA (Sethy, C., & Kundu, C.N., 2021).

Η καπεσιταβίνη έχει υψηλή αποτελεσματικότητα, χαμηλή τοξικότητα και εύκολη χορήγηση. Ο Li και οι συνεργάτες του διεξήγαγαν μελέτη φάσης II σχετικά με το συνδυασμό καπεσιταβίνης και σισπλατίνης στη θεραπεία ασθενών με mTNBC και διαπίστωσαν ότι ο συνδυασμός καπεσιταβίνης και σισπλατίνης είχε σημαντική δραστηριότητα και οι ανεπιθύμητες ενέργειες ήταν αποδεκτές (Li, Q., et al., 2015) (Yin, L., et al., 2020). Παρόλα αυτά με την εκτεταμένη εφαρμογή των ανθρακυκλινών και των ταξανών στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, ένας αυξανόμενος αριθμός ασθενών έχει αποδειχθεί πως αναπτύσσει αντίσταση σε αυτό τον συνδυασμό, γεγονός το οποίο δημιουργεί πρόβλημα στην κλινική πρακτική.

1.4.8. Σύγχρονες μέθοδοι αντιμετώπισης για τον TNBC

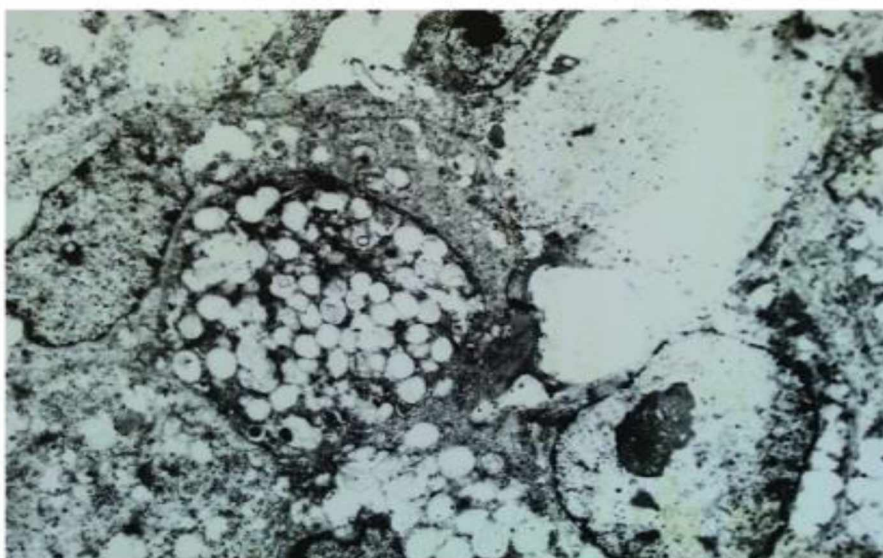
Λόγω του ειδικού μοριακού φαινοτύπου του, ο TNBC δεν παρουσιάζει ευαισθησία στην ενδοκρινική ή στη μοριακή στοχευμένη θεραπεία. Μέχρι πρόσφατα η βασική θεραπεία κατά του TNBC ήταν η κυτταροτοξική χημειοθεραπεία, δεδομένου της απουσίας εγκεκριμένης στοχευμένης θεραπείας (Foulkes, W.D., et al., 2010). Ωστόσο, πρόσφατα, για το TNBC του μαστού που σχετίζεται με τη μετάλλαξη της

βλαστικής γραμμής BRCA (gBRCAm-BC), έχουν παρουσιαστεί 3 εγκεκριμένες στοχευμένες θεραπείες που συμπεριλαμβάνουν τους αναστολείς της πολυμεράσης Poly (ADP-Ribose)-PARP (olaparib και talazoparib) και των αναστολέα σημείου ελέγχου (atezolizumab) σε συνδυασμό με το nabraclitaxel για τον προσδέτη του υποδοχέα προγραμματισμένου θάνατου- 1 (PD-L1). Η δέσμευση του PD-L1 με PD-1 στα T κύτταρα είναι ένας κύριος μηχανισμός ανοσοδιαφυγής όγκου. Το Atezolizumab είναι ένα τροποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα του IgG1 που συνδέεται επιλεκτικά με το PD-L1 σε ανοσοκύτταρα ή κύτταρα όγκου για την αποτροπή αλληλεπιδράσεων με τον υποδοχέα PD-1 (Thomas, R., et al., 2020). Ο αναστολέας σημείου ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, Bevacizumab, έχει χρησιμοποιηθεί επίσης σε συνδυασμό με άλλα χημειοθεραπευτικά φάρμακα για τη θεραπεία του TNBC σε ορισμένες χώρες. Εντούτοις, με τα παραπάνω σχήματα ο χρόνος επιβίωσης των ασθενών με TNBC δεν αυξήθηκε σημαντικά, τα ποσοστά υποτροπής παρέμειναν σχετικά υψηλά και οι όγκοι συνέχιζαν να αναπτύσσονται συχνά αντίσταση σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες (Yin, L., et al., 2020) (Foulkes, W.D., et al., 2010) (Carey, L.A., et al., 2007). Έτσι, λαμβάνοντας υπόψη τις περιορισμένες επιλογές θεραπείας και τους επιθετικούς φαινοτύπους του TNBC, είναι σημαντικό να βελτιώσουμε την κατανόησή μας για τα χαρακτηριστικά του TNBC και να ανακαλύψουμε πιθανούς θεραπευτικούς στόχους για να βοηθήσουμε στην ανάπτυξη αποτελεσματικών θεραπειών.

1.4.9. Λιποβριθής καρκίνος του μαστού (LRBC)

Το πλούσιο σε λιπίδια καρκίνωμα του μαστού αποτελεί μια σπάνια παραλλαγή, ιστολογικού φαινοτύπου καρκίνου του μαστού, που αντιστοιχεί σε 1-2% όλων των κακοηθών όγκων του μαστού (Guan, B., et al., 2011). Ο Aboumrad και οι συνεργάτες του το 1963 τον περιέγραψαν για πρώτη φορά ως καρκίνωμα που εκκρίνει λιπίδια. Ωστόσο, οι Ramos και Taylor τον μελέτησαν και τον μετονόμασαν ως καρκίνωμα μαστού πλούσιο σε λιπίδια (Ramos, C.V., & Taylor, H.B., 1974). Ταξινομήθηκε τελικά ως μοναδικός τύπος όγκου μαστού σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας το 2003. Ο ορισμός του πλούσιου σε λιπίδια καρκινώματος είναι αμφιλεγόμενος, καθώς δεν είναι σαφής ως προς τον αριθμό των κενοκυττάρων που πρέπει να υπάρχουν, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η

διάγνωση και η προέλευση των λιπιδίων στα νεοπλασματικά κύτταρα οπότε και παραμένει ασαφής (Umekita, Y., et al., 1998). Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι μεγαλύτερο από το 90% των νεοπλαστικών κυττάρων πρέπει να περιέχουν σταγονίδια λιπιδίων στο πλούσιο σε λιπίδια καρκίνωμα (Εικόνα 14) (Cong, Y., et al., 2015) (Moritani, S., et al., 2011). Η προέλευση των λιπιδίων στα νεοπλασματικά κύτταρα δεν είναι επίσης σαφής. Ωστόσο, η συνήθης διαφορική διάγνωση καρκινώματος πλούσιου σε λιπίδια περιλαμβάνει πλήθος κενοκυττάρων ή διαυγών κυττάρων και κυρίως καρκινώματα πλούσια σε γλυκογόνο (Kurisu, Y., et al., 2012). Ο όγκος παρουσιάζει επιθετική κλινική πορεία και κακή πρόγνωση (Shi, P., et al., 2008).



Εικόνα 1.22: Ανάλυση με ηλεκτρονική μικροσκοπία κυττάρων καρκινώματος πλούσια σε λιπίδια με μεγαλύτερα κενά λιπιδίων καθώς και με πολλά σταγονίδια λιπιδίων στο κυτταρόπλασμα (Machalekova, K., et al., 2012).

Σε πρόσφατες μελέτες οι καταγεγραμμένοι ασθενείς με πλούσιο σε λιπίδια καρκίνωμα κυμαίνονταν σε ηλικία από 33 έως 81 ετών, ενώ μόνο μία περίπτωση εμφανίστηκε σε άνδρα (Cong, Y., et al., 2015). Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, ο όγκος παρουσιάζεται ως μάζα μαστού ή τμήμα του προυπάρχοντος όγκου. Οι μάζες είναι όλες μονομερείς και εξίσου κατανεμημένες στο αριστερό και το δεξί στήθος, αλλά εντοπίζονται ως επί το πλείστον στο άνω εξωτερικό τεταρτημόριο (Umekita, Y., et al 1998). Τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα του μαστού μπορούν να συνθέσουν υδατάνθρακες και πρωτεΐνες, αλλά και λιπίδια (Kurisu, Y., et al.,

2012). Ορισμένες μελέτες έχουν υποθέσει ότι κακοήθη κύτταρα καρκινώματος πλούσια σε λιπίδια απελευθερώνουν λιπίδια σαν εκκριτικά προϊόντα και όχι ως αποτέλεσμα εκφυλισμού (Ramos, C.V., & Taylor, H.B. 1974) (Vera-Sempere, F., & Llombart-Bosch, A., 1985).

Η ανάλυση της δομής του πλούσιου σε λιπίδια καρκινώματος έχει πραγματοποιηθεί σε μικρό αριθμό περιπτώσεων, οδηγώντας σε διαφορετικά αποτελέσματα, ωστόσο σε όλες τις περιπτώσεις η παρουσία ενδοκυτταροπλασματικών λιπιδικών σταγονιδίων και σφαιριδίων που απομονώθηκαν από διακριτές μεμβράνες, περιβαλλόταν από ένα πυκνό κυτταροπλασματικό περίβλημα (Vera-Sempere, F., & Llombart-Bosch, A., 1985).

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν μόνο σποραδικές αναφορές περιπτώσεων καρκινωμάτων πλούσιων σε λιπίδια (Kurisu, Y., et al., 2012) (Reis-Filho, J.S., et al., 2003), με συνολικά ποσοστά επιβίωσης δύο και πέντε ετών 64,6 και 33,2%, αντίστοιχα. Ο μέσος χρόνος επιβίωσης κυμαίνεται μεταξύ 16 και 35 μηνών.

1.4.10. Βιοδείκτες που σχετίζονται με τον LRBC

Μία μελέτη ανέφερε τη θετικότητα της πρωτεΐνης S-100 ως δυνητικά χρήσιμο δείκτη στη διάγνωση καρκινώματος πλούσιου σε λιπίδια (Varga, Z., et al., 1998). Επίσης, σε προηγούμενες μελέτες για 17 καρκινώματα πλούσια σε λιπίδια, όλες οι περιπτώσεις ήταν αρνητικές για τους υποδοχείς στεροειδών, με εξαίρεση μία περίπτωση, και όλες ήταν θετικές ως προς το HER-2 (Sporikova, Z., et al., 2018). Σε άλλη μελέτη 49 περιπτώσεων όγκου, η θετικότητα ER και / ή PR βρέθηκε σε 5 από τις 49 (10,2%) περιπτώσεις, ενώ 35 από τις 49 (71,4%) περιπτώσεις ήταν θετικές στο HER-2 (Shi, P., et al., 2008). Ο Machalekova και οι συνεργάτες του ανέφεραν μια μοναδική περίπτωση καρκινώματος πλούσιου σε λιπίδια και διεισδυτικού καρκίνου του πόρου στον ίδιο μαστό. Αυτός ο ασθενής ήταν αρνητικός για υποδοχείς στεροειδών και εμφάνισε θετική χρώση για HER-2 και p53, με υψηλό δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67 (Machalekova, K., et al., 2012). Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι τα πλούσια σε λιπίδια καρκινώματα εμφανίζουν συνήθως θετικότητα για τον HER-2, αλλά είναι αρνητικά για ορμονικούς υποδοχείς. Η τάση των καρκινωμάτων πλούσιων σε λιπίδια για υψηλά επίπεδα έκφρασης HER-2 μπορεί να είναι υπεύθυνη

για τη σχετικά κακή πρόγνωση και τον σύντομο χρόνο επιβίωσης χωρίς ασθένειες (Kimura, A., et al., 2011). Ο υψηλός δείκτης πολλαπλασιασμού Ki-67 είναι επίσης σημαντικός όσον αφορά την πρόγνωση. Στις παρούσες περιπτώσεις, κατά μέσο όρο το 40% των καρκινικών κυττάρων εμφάνισαν πυρηνική χρώση για το Ki-67. Μια άλλη μελέτη έδειξε θετική πυρηνική χρώση για Ki-67 σε ποσοστό μεγαλύτερο του 30% των καρκινικών κυττάρων σε 27 από τους 49 (55,1%) ασθενείς, παρουσιάζοντας έτσι υψηλή δραστηριότητα πολλαπλασιασμού (Umekita, Y., et al., 1998). Τα κύτταρα όγκου μπορούν επίσης να εκφράσουν υποδοχέα προλακτίνης, δείχνοντας τη χρήση προλακτίνης στη γένεση αυτού του νεοπλασματος (Kimura, A., et al., 2011).

Τέλος παρά την περιορισμένη βιβλιογραφία σχετικά με τον λιποβριθή καρκίνου του μαστού η παρουσία θετικών μασχαλαίων λεμφαδένων είναι ένας σημαντικός δείκτης για κακή επιβίωση, ενώ η ηλικία, ο ιστολογικός βαθμός, το μέγεθος του όγκου, η έκφραση HER2 και το Ki-67 παραμένουν αμφιλεγόμενα (Cong, Y., et al., 2015). Λόγω της κακής πρόγνωσης του, απαιτείται σωστή διάγνωση για αυτό το εξαιρετικά σπάνιο νεόπλασμα. Επομένως, η έγκαιρη διάγνωση και η τυπική ογκολογική θεραπεία μπορεί να είναι χρήσιμα για την αύξηση της συνολικής επιβίωσης των ασθενών με καρκίνωμα πλούσιο σε λιπίδια (Levine, M.N., et al., 2005).

1.4.11. Μέθοδοι αντιμετώπισης για τον LRBC

Επί του παρόντος δεν υπάρχουν τυποποιημένες οδηγίες για τη θεραπεία του λιποβριθούς καρκινώματος του μαστού, ωστόσο, η χημειοθεραπεία θεωρείται η πιο αποτελεσματική μέθοδος. Παρόλο που η ριζική χειρουργική επέμβαση και οι συστηματικές θεραπείες χρησιμοποιούνται συχνά, το όφελος αυτών των θεραπευτικών προσεγγίσεων δεν έχει αποδειχθεί. Η εκτομή των μασχαλαίων λεμφαδένων είναι συνήθως απαραίτητη λόγω του υψηλού ρυθμού μετάστασης του. Το πλούσιο σε λιπίδια καρκίνωμα μπορεί να αναπτύξει μεταστάσεις αμέσως μετά τη χειρουργική επέμβαση και οι πιο συχνές μεταστατικές τοποθεσίες περιλαμβάνουν τους πνεύμονες, το ήπαρ και τα οστά. Επομένως, η έγκαιρη θεραπεία παίζει σημαντικό ρόλο στην καταπολέμησή του. Η ενδοκρινική θεραπεία

έχει περιορισμένη επίδραση στην αντιμετώπιση του, καθώς η πλειονότητα των όγκων είναι αρνητικοί για ER ή PR. Έτσι, η χημειοθεραπεία είναι το πιο σημαντικό όπλο για καρκινώματα πλούσια σε λιπίδια. Σε προϋπάρχουσες *in vitro* μελέτες, έγινε σαφές ότι ο πλούσιος σε λιπίδια όγκος ήταν πιο ευαίσθητος σε πλατίνα και φάρμακα που στοχεύουν στους μικροσωληνίσκους, όπως η πακλιταξέλη και η βινκριστίνη, σε σύγκριση με την αδριαμυκίνη (Umekita, Y., et al., 1998). Δεδομένου ότι η υπερέκφραση HER2 βρίσκεται στην πλειονότητα των πλούσιων σε λιπίδια όγκων, αυτοί οι ασθενείς μπορεί να επωφεληθούν από τη θεραπεία με εσεστίνη η οποία αναστέλλει τη δράση της πρωτεΐνης HER2 (Umekita, Y., et al., 1998).

ΣΚΟΠΟΣ

Σύμφωνα με τα επιδημιολογικά δεδομένα ο γυναικείος καρκίνος του μαστού έχει ξεπεράσει τον καρκίνο του πνεύμονα ως τον πιο συχνά διαγνωσμένο καρκίνο με 2,3 εκατομμύρια νέες περιπτώσεις. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια η θνητότητα των γυναικών με καρκίνο του μαστού έχει μειωθεί αισθητά λόγω των σημαντικών εξελίξεων στους τομείς της διάγνωσης και νέων αποτελεσματικότερων και πιο ασφαλών θεραπειών (Alkabban, F.M., & Ferguson, T., 2021). Παρά το γεγονός όμως αυτό, τα επτά τελευταία χρόνια, ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (TNBC) παραμένει ο υπότυπος καρκίνου του μαστού που εμφανίζει τη χειρότερη πρόγνωση, είναι επιρρεπής σε υποτροπή και μετάσταση και έχει περιορισμένες επιλογές θεραπείας, λόγω της έλλειψης κλινικά ενεργών στόχων (Gatti, V., et al., 2019). Επίσης το πλούσιο σε λιπίδια καρκίνωμα (LRBC) του μαστού αποτελεί και αυτό μια σπάνια παραλλαγή, ιστολογικού φαινοτύπου καρκίνου, που αντιστοιχεί σε 1-2% όλων των κακοηθών όγκων του μαστού (Guan, B., et al., 2011) και παρουσιάζει επιθετική κλινική πορεία και κακή πρόγνωση όπως ο TNBC. Λαμβάνοντας υπόψη τις περιορισμένες επιλογές θεραπείας και τους επιθετικούς φαινοτύπους τόσο του TNBC όσο και του LRBC, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να δοκιμάσει την αποτελεσματικότητα διάφορων αντικαρκινικών φαρμάκων σε κατάλληλη δόση, με το αντικαρκινικό φάρμακο Doxil να εφαρμόζεται για πρώτη φορά για την καταπολέμηση του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού πλούσιου σε λιπίδια, ώστε να αναπτυχθούν νέες αποτελεσματικότερες θεραπευτικές αγωγές και στόχοι για τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου.

2. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

Αντιδραστήρια

Φυσικό αλατούχο διάλυμα 0,9% w/v	<i>DEMO ABEE</i>
Τρυψίνη 1X	<i>Gibco</i>
RPMI 1640	<i>Gibco</i>
Εμβρυικό ορό μοσχαριού (FBS: Fetal Bovine Serum)	<i>Biosera</i>
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	<i>Applichem</i>
Δοξορουβικίνη	<i>Pfizer</i>
Κυκλοφωσφαμίδη	<i>Endoxan</i>
Ντοσεταξέλη	<i>Doxen</i>

Υλικά

Disposable Serological Pipette sterile 2 mL, 5 mL, 10 mL	<i>SPL</i>
Falcons (15 mL, 50 mL)	<i>Thermo Scientific</i>
Micro Tubes (1.5 mL)	<i>Thermo Scientific</i>
Tips (0.1-10 µL, 10-200 µL, 200-1000 µL)	<i>Gilson</i>
Βελόνα τύπου 19G, 21G	<i>BD Microlance</i>
Σύριγγα 1 mL	<i>NORM-JECT-F</i>
Style Dish-Cell Culture	<i>CORNING</i>
Κρυοφιαλίδια	<i>CORNING</i>

2.1. *In vivo* μεθοδολογία

2.1.1. Γενικά

Η προμήθεια των διαφόρων στελεχών ποντικών που αποτέλεσαν πειραματόζωα κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας έγινε από το Jackson Laboratory (The Jackson Laboratory 600Main Street Bar Harbor, Maine 04609 USA). Προκειμένου να ακολουθηθούν πρωτόκολλα που έχουν πραγματοποιηθεί επί σειρά ετών στο Εργαστήριο Φαρμακολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας τα ζώα διατηρήθηκαν σε συνθήκες ελεύθερες παθογόνων [specific pathogen free (SPF) conditions] σε κλωβούς τύπου ILL, στην πειραματική μονάδα του εργαστηρίου Φαρμακολογίας (EL42-BIO_Exp03, άδεια πρωτοκόλλου 5542/22806-30/11/2015) σε κλιματικά ρυθμιζόμενο περιβάλλον (21 ± 1 °C, 50-55% σχετική υγρασία) και φωτοπερίοδο 12h/12h (κύκλοι φωτός/σκότους) με ελεύθερη κατανάλωση νερού και φαγητού. Οι πειραματικοί χειρισμοί των ζώων που ακολουθήθηκαν ήταν σύμφωνα τόσο με την ελληνική νομοθεσία (PD 56/2013, εγκύκλιος 2215/117550/2013), όσο και με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (2013/63/EU). Στη παρούσα πτυχιακή εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη ποντικών: το NOD.Cg-Prkdc^{scid}/J (1303) και το NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ γνωστό με το όνομα NOD scid gamma (NSG™) (5557).

Στο στέλεχος NOD-SCID, τα ποντίκια είναι ομόζυγα για την μετάλλαξη του γονιδίου Prkdc (protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide), γεγονός που προκαλεί σοβαρό βαθμό ανοσοκαταστολής (Severe Combined Immunodeficiency). Το συγκεκριμένο στέλεχος δημιουργήθηκε με επαγωγή της μετάλλαξης που φέρουν τα άτομα του στελέχους SCID σε μη-παχύσαρκα, διαβητικά ποντίκια (NOD: Non Obese Diabetic). Χαρακτηρίζεται από απουσία λειτουργικών T και B κυττάρων, μειωμένη παρουσία αντιγόνων, μειωμένη δραστηριότητα των κυττάρων φυσικού φονέα (NKs: natural killer cells), αλλά και αρκετά μειωμένη πιθανότητα εκφύλισης. Ποντίκια του συγκεκριμένου στελέχους χρησιμοποιούνται συχνά για την ανάπτυξη ξενομοσχευμάτων ορισμένων τύπων καρκίνου, καθώς και για μελέτες αξιολόγησης της αντικαρκινικής δράσης διαφόρων παραγόντων.

Τα ποντίκια του στελέχους NOD scid gamma δεν εκφράζουν το γονίδιο Prkdc ούτε το γονίδιο Il2rg, που συνδέεται με το X. Είναι γόνιμα, φυσιολογικά σε μέγεθος και δεν εμφανίζουν συμπεριφορικές ανωμαλίες. Η ιστολογική εξέταση αυτού του στελέχους αποκαλύπτει ανεπάρκεια σε ώριμα B και T λεμφοκύτταρα. Επίσης η

κυτταροτοξική δραστικότητα κυττάρων φυσικού φονέα (NKs: Natural Killers) απουσιάζει. Αυτά τα ποντίκια αντιπροσωπεύουν ένα μοντέλο κατάλληλο για μελέτες που χρησιμοποιούν στρατηγικές ανάπτυξης ξενομοσχευμάτων από κύτταρα και όγκους.

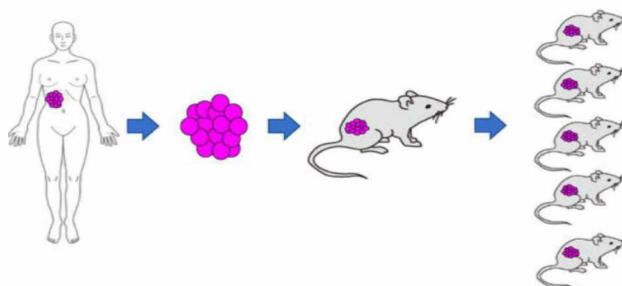
2.1.2. Ξενομοσχευμάτα προερχόμενα από ασθενείς (PDX)

Οι ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές και τα ζωικά πρότυπα καρκίνου που προέρχονται από αυτές (xenografts: ξενομοσχεύματα) χρησιμοποιούνται ευρέως στην έρευνα για τον καρκίνο. Παρόλα αυτά, οι καρκινικές κυτταρικές σειρές δεν αντιπροσωπεύουν την πραγματική κλινική εικόνα του όγκου, την ετερογένεια στο εσωτερικό του, τις ιδιότητες του στρώματός του και το μικροπεριβάλλον του. Παράμετροι οι οποίοι καθορίζουν τη διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων, τη μετανάστευσή τους, την υποτροπή της ασθένειας και την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα αντικαρκινικά φάρμακα. Μια εναλλακτική προσέγγιση προς την επίλυση των παραπάνω είναι η ανάπτυξη ξενομοσχευμάτων προερχόμενων από ασθενείς (PDX: Patient Derived Xenografts), με την απευθείας εμφύτευση όγκων ασθενών σε ανοσοκατασταλμένα στελέχη ποντικών. Πρόκειται για πολλά υποσχόμενα προκλινικά εργαλεία προκειμένου να αναπτυχθεί εξατομικευμένη θεραπεία για κάθε τύπο καρκίνου καθώς έχουν μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα με τον καρκίνο του ανθρώπου, προσομοιάζουν την ετερογένεια του όγκου και το μικροπεριβάλλον του.

2.1.3 Ανάπτυξη ξενομοσχευμάτων προερχόμενων από ασθενείς

Η ανάπτυξη των ξενομοσχευμάτων προερχόμενων από όγκους ασθενών (PDX), είτε πρωτοπαθών είτε μεταστατικών σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια, ακολουθεί μια βασική μεθοδολογία. Αναλυτικότερα, φρέσκα κομμάτια ιστού πρωτογενών ή μεταστατικών όγκων συλλέγονται με χειρουργική εξαίρεση ή με διαδικασίες βιοψίας. Οι όγκοι εμφωλεύονται είτε υποδόρια είτε στο ίδιο όργανο με αυτό του πρωτογενούς όγκου (ορθοτοπικά) σε ποντίκια ως μικρά τεμάχια όγκου ή σε

εναιωρήματα μονήρων κυττάρων είτε μεμονωμένων είτε αναμεμιγμένα με ειδικά υποστρώματα. Παρόλο που τα υποδόρια μοντέλα PDX είναι πολύ πιο εύκολο να αναπτυχθούν, πιο δημοφιλή είναι τα ορθοτοπικά τα οποία αντιπροσωπεύουν τον αρχικό όγκο και σε μεγάλο βαθμό δημιουργούν ένα μικροπεριβάλλον παρόμοιο με αυτό του πρωτογενούς όγκου. Μετά την επιτυχή ανάπτυξη του ξενομοσχεύματος, οι όγκοι εμφωλεύονται διαδοχικά σε άλλα ποντίκια (διαδοχικά «περάσματα») και η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρις ότου να αποκτηθεί επαρκής αριθμός ομάδων (Εικόνα 2.1) για περαιτέρω μελέτη και οι όγκοι να αποκτήσουν κάποια σταθερά χαρακτηριστικά όπως πχ ο ρυθμός διπλασιασμού. Τα στελέχη ποντικών που χρησιμοποιούνται για τη μεταμόσχευση όγκων ασθενών είναι τα περισσότερο ανοσοκατασταλμένα, όπως το NOD / SCID(NOD.CB17-Prkdcscid/J) ή το NOD/SCID/ IL2g-receptor null (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ, περισσότερο γνωστό ως NSG). Αυτά τα στελέχη είναι καλύτερα για την ανάπτυξη PDX, καθώς λόγω του μεγαλύτερου βαθμού ανοσοκαταστολής επιτρέπουν τον ταχύτερο ρυθμό ανάπτυξης των ξενομοσχευμάτων.



Εικόνα 2.1: Ανάπτυξη του ξενομοσχεύματος όπου οι όγκοι εμφωλεύονται διαδοχικά σε άλλα ποντίκια (διαδοχικά «περάσματα») και η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρις ότου να αποκτηθεί επαρκής αριθμός ομάδων ([PDX Mouse Models Match Genetics of Human Tumors - National Cancer Institute](#)).

2.1.4 Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα των PDX

Τα PDX χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο στην έρευνα για τον καρκίνο και θεωρούνται πολύτιμα εργαλεία στη μάχη έναντι του καρκίνου. Τα *in vitro* ευρήματα των PDX, που υποστηρίζονται και από *in vivo* αποτελέσματα, στοχεύουν στην αποσαφήνιση της βιολογίας του καρκίνου, την ανάπτυξη βιοδεικτών και τον έλεγχο φαρμάκων υπό το πρίσμα της ανάπτυξης εξατομικευμένων στρατηγικών

θεραπείας του καρκίνου. Αυτά τα ζωικά πρότυπα καρκίνου προερχόμενα από ασθενείς είναι στενά συνδεδεμένα τόσο με ορισμένα πλεονεκτήματα όσο και με μειονεκτήματα τα οποία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

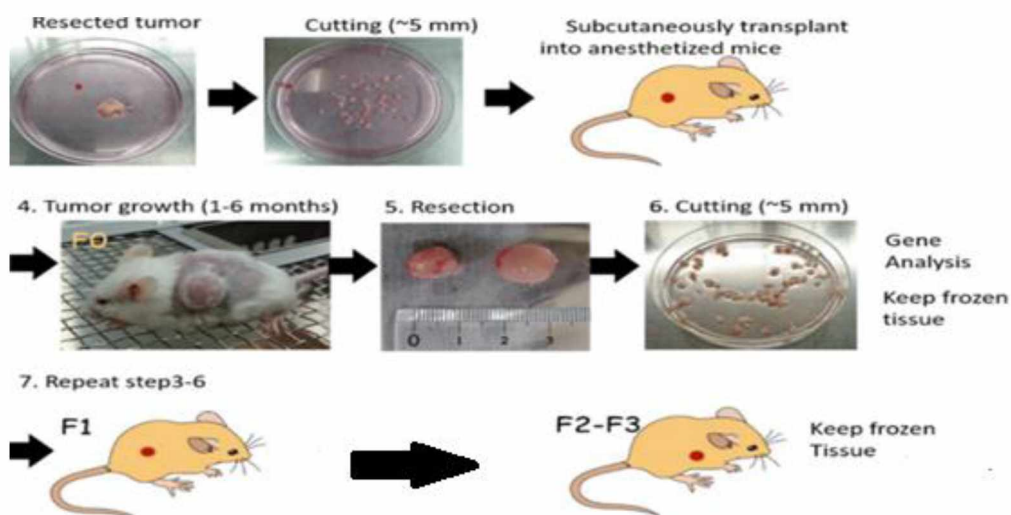
ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ	ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ
Διατήρηση των χαρακτηριστικών του πρωτογενή όγκου και της εσωτερικής του ετερογένειας	Έλλειψη τυποποίησης της μεθόδου λόγω διαφορετικών τεχνικών εμφώλευσης και χρήσης διαφορετικών στελεχών ζωικών μοντέλων
Διατήρηση των γενετικών και ιστολογικών χαρακτηριστικών του ασθενούς κατά τη διάρκεια διαδοχικών περασμάτων	Περιορισμένα ποσοστά επιτυχίας ανάπτυξης όγκων
Η ορθοτοπική μεταμόσχευση οδηγεί σε τοπική ανάπτυξη όγκων και μεταστάσεων, παρόμοιων με το μεταστατικό δυναμικό του ασθενούς	Αργή ανάπτυξη που επηρεάζει την εφαρμογή εξατομικευμένων θεραπειών σε πραγματικό χρόνο
Συσχέτιση μεταξύ απόκρισης σε μοντέλα PDX και κλινικής απόκρισης ασθενών. Πρόβλεψη απόκρισης των ασθενών στις θεραπείες με στόχο την εφαρμογή εξατομικευμένων θεραπευτικών πρακτικών	Αρνητική επίδραση στην ισχύ των φαρμάκων που στοχεύουν το στρώμα και τον όγκο, λόγω του ότι το ανθρώπινο στρώμα αντικαθίσταται από στρώμα ποντικού μετά από διαδοχικά περάσματα
Εισαγωγή ανθρώπινου στρώματος του όγκου στα PDX μοντέλα, αν και δεν είναι σαφές για πόσο διάστημα διατηρείται σ' αυτά το συγκεκριμένο πρότυπο	PDX που προέρχεται από ανθεκτικούς σε θεραπείες όγκους μπορεί να απολέσει την ανθεκτικότητά του και να γίνει ξανά ευαίσθητο
Αντανάκλαση του προφίλ ευαισθησίας των φαρμάκων και υψηλή προγνωστική αξία από την άποψη της ανίχνευσης αντικαρκινικών παραγόντων	Η έλλειψη λειτουργικού ανοσοποιητικού συστήματος των PDX έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μοντέλων που δεν αντικατοπτρίζουν με ακρίβεια την πρόοδο της νόσου και τη θεραπευτική απόκριση. Επίσης, περιορίζεται ο αριθμός των φαρμάκων που μπορούν να αξιολογηθούν, όπως ανοσορυθμιστές ή παράγοντες που δρουν ενεργοποιώντας το ανοσοποιητικό σύστημα
Παροχή απεριόριστων πηγών ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων για <i>in vivo</i> και <i>ex vivo</i> αξιολόγηση αντικαρκινικών φαρμάκων	Μικρή ποσότητα βιολογικού υλικού μπορεί να οδηγήσει σε ένα μη αντιπροσωπευτικό ξενομόσχευμα, όσον αφορά την ετερογένεια του πρωτογενούς όγκου
Απαιτείται μικρή ποσότητα βιολογικού υλικού	

Πίνακας 2.1: Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα των PDX (Ευαγγελία Σερέτη, 2019).

2.1.5 Εγκαθίδρυση ξενομοσχευμάτων προερχόμενων από ασθενείς

Με σκοπό την εγκαθίδρυση των PDX χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια του στελέχους NOD scid gamma (NSG™). Αναλυτικότερα, αμέσως μετά τη χειρουργική εξαίρεση, το δείγμα του όγκου εκπλένεται με PBS 1x και τεμαχίζεται μηχανικά σε μικρά κομμάτια

διαμέτρου 1-3 mm. Έπειτα επωάζεται σε ενζυμικό διάλυμα διάσπασης ιστών (TDS: Tissue Dissociation Solution), για 10 λεπτά (ή μέχρι να παρατηρηθεί η διάσπαση του ιστού σε μονήρη κύτταρα), στους 37 °C, σε αναλογία 1 ml διαλύματος/100 g ιστού. Το TDS είναι ένα μείγμα που περιλαμβάνει τα ένζυμα: υαλουρονιδάση (Sigma, Code: H3506) σε συγκέντρωση 1 mg/ml, κολλαγενάση IV (Sigma, Code: C5138) σε συγκέντρωση 1 mg/ml, DNάση (Sigma, Code: DN-25) σε συγκέντρωση 50 µg/ml. Τα ένζυμα διαλύονται σε διάλυμα HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, Thermo, Code: SH30588.01), εμπλουτισμένο με 10% FBS. Μετά την επώαση, το ελαιώδη που περνάει από σύριγγα διαμέτρου 16G απομονώνεται, φυγοκεντρείται (1.400 rpm, 10 min) και εκπλένεται με διάλυμα HBSS (1.200 rpm, 10 min, x2). Στο ελαιώδη περιλαμβάνονται μονήρη κύτταρα, συσσωματώματα κυττάρων καθώς και κομμάτια όγκου τα οποία δεν έχουν υποστεί πλήρη πέψη. Με τον τρόπο αυτό, το δείγμα διατηρεί ένα ικανοποιητικό ποσοστό της κυτταρικής του επιβίωσης και περιορίζεται η απώλεια των συστατικών του στρώματος και άλλων στοιχείων της αρχιτεκτονικής του όγκου. Ποσοστό του παραπάνω ελαιώδη προορίζεται για την ανάπτυξη ξενομοσχεύματος (PDX). Στην συνέχεια πραγματοποιείται υποδόρια εμφύτευση, στις δύο μασχालιαίες πλευρές των πίσω άκρων ανοσοκατεσταλμένων NSG ποντικών (γένους θηλυκού αντίστοιχο με το γένος της ασθενούς από την οποία προερχόνταν και οι όγκοι). Και αφού υπήρξε επιτυχής ανάπτυξη των ξενομοσχευμάτων (F0) εξαιρέθηκαν οι όγκοι και επεξεργάστηκαν προκειμένου να εμφυτευτούν εκ νέου σε ποντικά στελέχους NSG (F1). Υπήρξε επανάληψη της διαδικασίας από την Δρ. Ευαγγελία Σερέτη, άλλες δύο φορές (F2, F3). Στο σημείο αυτό η εγκαθίδρυση του ξενομοσχεύματος θεωρήθηκε επιτυχής (Εικόνα 2.2) .



Εικόνα 2.2: Διαδικασία εγκαθίδρυσης ξеноμοσχευμάτων προερχόμενων από ασθενείς (Okada, S., et. al., 2019).

Η επεξεργασία των όγκων προκειμένου να εμφυτευτούν εκ νέου σε ποντίκια στελέχους NSG έγινε ως εξής: τα ποντίκια υποβλήθηκαν σε αγωγή με αέριο ισοφλουράνιο ως αναισθητικό και στη συνέχεια ευθανατώθηκαν. Έπειτα, οι όγκοι εξαιρέθηκαν από αυτά χρησιμοποιώντας αποστειρωμένες λαβίδες. Εν συνεχεία πλύθηκαν με στείρο φυσικό αλατούχο διάλυμα 0,9% w/v (DEMO ABEE) και τεμαχίστηκαν σε μικρά κομμάτια με αποστειρωμένες λαβίδες. Τα κομμάτια των όγκων μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια τύπου Falcon (χωρητικότητα 15 mL, Thermo Scientific) με 5-7ml Τρυψίνης 1X (Gibco). Η τρυψίνη είναι ένα ένζυμο που χρησιμοποιείται για την ενζυμική διάσπαση των ιστών του όγκου προκειμένου να απομονωθούν όσο το δυνατόν περισσότερα καρκινικά κύτταρα. Η επώαση με την Τρυψίνη πραγματοποιήθηκε στους 37°C, για χρονικό διάστημα έως και μισή ώρα. Μετά την επώαση με Τρυψίνη, χρησιμοποιώντας βελόνα τύπου 19G, απομονώθηκε η τρυψίνη που περιέχει καρκινικά κύτταρα και μικρά μεγέθη θραυσμάτων όγκου και τα μεταφέρθηκε σε ένα νέο σωλήνα τύπου Falcon (χωρητικότητα 15 mL) προσθέτοντας επίσης κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού μέσου κυτταρικής καλλιέργειας RPMI 1640 (Gibco®, Code: 31870025), που περιέχει 5% εμβρυικό ορό μοσχαριού [FBS: Fetal Bovine Serum, (Biosera, Code: 1001G)]. Το FBS χρησιμοποιείται προκειμένου να επιτευχθεί αναστολή της περαιτέρω διάσπασης που προκαλείται από την Τρυψίνη. Ο σωλήνας αφέθηκε σε πάγο. Τέλος, προκειμένου να μεταμοσχευθεί ένας συγκεκριμένος αριθμός καρκινικών κυττάρων στα επόμενα ποντίκια, το διάλυμα κυττάρων και θραυσμάτων που απομονώθηκε

υποβάλλεται σε μέτρηση. Σε ένα σωλήνα τύπου erpendorf (Thermo Scientific), προτέθηκαν 90μl από το διάλυμα των κυττάρων και 10μl της βαφής Trypan Blue. Μετέπειτα πάρθηκαν 20μl του μίγματος και τα τοποθετήθηκαν σε πλακίδιο μέτρησης Neubauer και ξεκίνησε η μέτρηση των κύτταρων στο οπτικό μικροσκόπιο. Αφού υπολογίστηκε ο αριθμός των μεμονωμένων κυττάρων, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση του διαλύματος για 5-7 λεπτά στις 1200 rpm. Με το πέρας της φυγοκέντρησης απορρίφθηκε προσεκτικά το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, ακολούθησε σπάσιμο του σχηματισμένος ιζήματος και προσθήκη καθαρού RPMI 1640. Πρέπει να τονιστεί ότι η ποσότητα του RPMI 1640 καθορίζεται από τον αριθμό των ενέσεων και τον αριθμό των ποντικών που θα χρησιμοποιήσουμε για το πείραμα. Πιο συγκεκριμένα υπολογίζουμε 100μl του διαλύματος/ένεσης και 2 ενέσεις/ποντίκι. Οι ενέσεις είναι υποδόριες, στις δύο μασχालιαίες πλευρές των πίσω άκρων ανοσοκατεσταλμένων NSG ποντικών.

Τέλος μετά την επιτυχή εγκαθίδρυση του ξενομοσχεύματος (πέρασμα F3) με την διαδικασία που περιεγράφηκε παραπάνω από την Δρ. Ευαγγελία Σερέτη, όταν οι όγκοι έφτασαν στο κατάλληλο μέγεθος εξαιρέθηκαν και επεξεργάστηκαν κατάλληλα προς κρυοσυντήρηση. Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε ξεπάγωμα των όγκων, εμφώλευση τους εκ νέου σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια τόσο του στελέχους NOD SCID όσο και του στελέχους NSG με σκοπό την μελέτη της δραστηριότητας αντικαρκινικών φαρμάκων.

2.1.6. Κρυοσυντήρηση

Ακολουθούμε τα ίδια βήματα όπως προαναφέρθηκε στο παραπάνω εδάφιο μέχρι το σημείο που απορρίπτουμε το υπερκείμενο μετά τη φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια, σπάμε το ίζημα και προσθέτουμε το μέσο κατάψυξης, το οποίο αποτελείται από 90% FBS και 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO-AppliChem). Στη συνέχεια, τα κύτταρα και τα θραύσματα ιστού κατανέμονται σε κρυοφιαλίδια (CORNING) και καταψύχονται στους -80°C για επόμενη χρήση.

2.1.7. Απόψυξη κυττάρων

Θέλαμε να ελέγξουμε την ογκογονική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων μετά την απόψυξή τους. Για το σκοπό αυτό, ξεπαγώσαμε τα κύτταρα που κρυσταλλώσαμε στους -80°C . Πιο συγκεκριμένα για τη διαδικασία απόψυξης:

1. Αφαιρούμε το κρυοφιαλίδιο από τους -80°C και το τοποθετούμε απευθείας σε υδατόλουτρο, στους 37°C .
2. Σε αποστειρωμένο κλίβανο μεταφέρουμε το περιεχόμενο του κρυοφιαλιδίου σε σωλήνα τύπου Falcon, όπου προσθέτουμε απλό RPMI. Ο σωλήνας διατηρείται σε πάγο.
3. Μετράμε τα κύτταρα σε πλακίδιο μέτρησης Neubauer.
4. Εγχύουμε $2 \cdot 10^6$ ζωντανά κύτταρα ανά ποντίκι.

2.1.8. Χορήγηση φαρμάκου

Χορηγήσαμε τα ίδια χημειοθεραπευτικά φάρμακα που έλαβε και η ασθενής (δοξορουβικίνη, κυκλοφωσφαμίδη, ντοσεταξέλη) καθώς και το ίδιο μοτίβο χορήγησης, εκτός από το Doxil που ήταν εγκλωβισμένο σε λιπιδική σφαίρα (λιπόσωμα). Προσπαθήσαμε να παρατηρήσουμε καλύτερα θεραπευτικά και λιγότερο τοξικά αποτελέσματα σε σύγκριση με τη δοξορουβικίνη.

Η αγωγή των φαρμάκων που έλαβε η ασθενής ήταν:

- Δοξορουβικίνη: 60 mg/m^2 ($1,62 \text{ mg/kg}$) + Κυκλοφωσφαμίδη: 600 mg/m^2 ($16,2 \text{ mg/kg}$), τέσσερις κύκλοι κάθε τρεις εβδομάδες
- Ντοσεταξέλη: 100 mg/m^2 ($2,7 \text{ mg/kg}$), τέσσερις κύκλοι για τρεις εβδομάδες

Για να μετατρέψουμε τις δόσεις που έλαβε ο ασθενής σε δόσεις για τα ποντίκια, υπολογίσαμε την Ανθρώπινη Ισοδύναμη Δόση (HED). Για να μετατρέψουμε τη δόση από mg/m^2 σε mg/kg , διαιρούμε με τη ανθρώπινη σταθερά μάζας (K_m), η οποία ανέρχεται σε 37. Το HED ισούται με τη ζωική δόση (mg/kg) πολλαπλασιασμένο με την αναλογία K_m ζώου προς ανθρώπινο K_m .

$$\text{Human Equivalent Dose} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) = \text{Animal Dose} \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \right) * \frac{K_m(A)}{K_m(H)}$$

Είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί έλεγχος τοξικότητας πριν από τη χορήγηση των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων σε ποντίκια που φέρουν ξενομόσχευμα ασθενή. Για αυτή τη δοκιμή η Δρ. Σερέτη Ευαγγελία χρησιμοποίησε θηλυκά ποντίκια NSG, χωρίς όγκους. Ο πίνακας χορήγησης παρουσιάζεται παρακάτω.

Έλεγχος τοξικότητας	
1)	3 θηλυκά ποντίκια NSG-χορήγηση 20mg/kg δοξορουβικίνης και 200mg/kg κυκλοφωσφαμίδης, 1 ένεση την εβδομάδα για 3 εβδομάδες
2)	3 θηλυκά ποντίκια NSG-χορήγηση Docetaxel 33,3 mg/kg, 1 ένεση την εβδομάδα για 3 εβδομάδες

Πίνακας 2.2: Δοκιμάσαμε το ίδιο ακριβώς μοτίβο που ακολούθησε η ασθενής για τη θεραπεία της. Δύο ομάδες ποντικών, όπου η πρώτη ομάδα έλαβε συγκεκριμένες ποσότητες χημειοθεραπευτικών φαρμάκων Doxorubicin και Cyclophosphamide και η δεύτερη έλαβε συγκεκριμένες ποσότητες του χημειοθεραπευτικού φαρμάκου Docetaxel.

Πέντε ημέρες μετά τη πρώτη χορήγηση, όλα τα ποντίκια από την πρώτη ομάδα βρέθηκαν νεκρά. Στη δεύτερη ομάδα βρέθηκε νεκρό μόνο ένα ποντίκι. 9 ημέρες μετά την έναρξη της δοκιμής τοξικότητας, ένα άλλο ποντίκι βρέθηκε νεκρό από τη δεύτερη ομάδα. Με βάση τα αποτελέσματα της δοκιμής τοξικότητας, αποφασίστηκε να χωριστεί η δόση κάθε χημειοθεραπευτικού φαρμάκου σε δύο μισές δόσεις, δύο φορές την εβδομάδα. Η συνολική δόση την εβδομάδα παρέμεινε η ίδια. Αποφασίστηκε επίσης να πραγματοποιηθεί δοκιμή της δοξορουβικίνης και της κυκλοφωσφαμίδης χωριστά και όχι σε συνδυασμό. Το Doxil δοκιμάστηκε στην ίδια συγκέντρωση με τη Doxorubicin, καθώς είναι μια μορφή λιποσωμάτων της Doxorubicin. Έτσι, οι τελικές συγκεντρώσεις των χημειοθεραπευτικών φαρμάκων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Χημειοθεραπευτικά φάρμακα	Δόση ασθενών	Δόση ποντικών
DOXIL	-	10mg/Kg
DOXORUBICIN	60 mg/m ²	10mg/Kg
CYCLOPHOSPHAMIDE	600mg/m ²	100mg/kg
DOCETAXEL	100mg/m ²	16,5mg/Kg

2.2. Αξιολόγηση της δραστηριότητας ουσιών σε ζωικά πρότυπα

2.2.1. Αξιολόγηση της δραστηριότητας της δοξορουβικίνης και του Doxil σε ζωικό πρότυπο καρκίνου

Η δοξορουβικίνη (Pfizer, το φιαλίδιο περιέχει 10mg της δραστικής ουσίας Doxorubicin hydrochloride σε 5ml χλωριούχου νατρίου 0,9% w/v) χρησιμοποιεί διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς όπως η αναστολή του ενζύμου τοποϊσομεράση II, παρεμβολή στο DNA, διαταραχή της ομοιόστασης του ασβεστίου και παραγωγή ελεύθερων ριζών, για να προκαλέσει τοξικότητα και να σκοτώσει τα καρκινικά κύτταρα. Η δοξορουβικίνη έχει τόσο υδρόφιλες όσο και υδρόφοβες περιοχές και έτσι καθίσταται δυνατή η σύνδεσή της με πρωτεΐνες του πλάσματος, αλλά και με τις κυτταρικές μεμβράνες. Επίσης η αμφοτερική φύση της επιτρέπει στο φάρμακο να εισέλθει σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα, εξ' ου και η ευρεία χρήση της για τη θεραπεία ευρέος φάσματος καρκίνων όπως μαστού, λευχαιμίας και λεμφωμάτων. Αυτό το φάρμακο έχει συγγένεια με όξινα κυτταρικά οργανίδια όπως ο αυλός των ενδοσωμάτων, των πυρήνων και των λυσοσωμάτων και εισέρχεται στο κύτταρο μέσω παθητικής διάχυσης. Σε ενδοκυττάριο επίπεδο, παρεμβάλλεται με δύο νιτρικές βάσεις DNA νουκλεϊκού οξέος και έτσι αναστέλλει τη σύνθεση του DNA, καθώς και ορισμένων σημαντικών μακρομορίων. Μελέτες του Shrivastav και των συνεργατών του προτείνουν ότι τα αποτελέσματα της δοξορουβικίνης είναι τα πιο ισχυρά κατά τη διάρκεια της φάσης S ενός κυτταρικού κύκλου (Aniogo, E.C., et al., 2017). Στην παρούσα διπλωματική εργασία, ελέγχθηκε τόσο η δραστηριότητα της δοξορουβικίνης, όσο και του Doxil καθώς είναι μια μορφή λιποσωμάτων της Doxorubicin. Πιο συγκεκριμένα όσο αφορά τη Δοξορουβικίνη ανθρώπινα κύτταρα ασθενούς εγχύθηκαν υποδόρια ($1 \cdot 10^6$ κύτταρα/ένεση) στις οπίσθιες μασχαλιαίες περιοχές 20 θηλυκών ποντικών NOD.Cg-Prkdcscid/J ηλικίας 7 εβδομάδων με μέσο βάρος στα 20 gr το καθένα. Τα ζώα φιλοξενήθηκαν υπό ειδικές συνθήκες χωρίς παθογόνα (SPF), κάτω από έναν κύκλο φωτός 12 ωρών και θερμοκρασία μεταξύ 20-22°C και αφέθηκαν να έχουν *ad libitum* πρόσβαση σε τρόφιμα και νερό. Μόλις οι όγκοι έφτασαν σε έναν μέσο όγκο περίπου 250 mm³ έξω από το μέγεθος του όγκου (εξαιρέθηκαν εννέα ζώα σε αυτό το πείραμα), τα

ποντίκια τυχαιοποιήθηκαν σε δύο ομάδες (έξι και πέντε ποντίκια/ομάδα αντίστοιχα, δύο όγκοι/ποντίκια σύμφωνα με το βρετανικό σύστημα διμερών εμφυτευμάτων) και άρχισε η θεραπεία με τη δοξορουβικίνη. Η δραστηριότητα της δοξορουβικίνης ελέγχθηκε και σε ποντίκια του στελέχους NSG. Αναλυτικότερα ανθρώπινα κύτταρα ασθενούς εγχύθηκαν υποδόρια ($6 \cdot 10^5$ κύτταρα/ένεση) στις οπίσθιες μασχαλιαίες περιοχές 23 θηλυκών ποντικών ηλικίας 7 εβδομάδων με μέσο βάρος στα 20 gr το καθένα. Μόλις οι όγκοι έφτασαν σε έναν μέσο όγκο περίπου 200 mm^3 έξω από το μέγεθος του όγκου (εξαιρέθηκαν εννέα ζώα σε αυτό το πείραμα), τα ποντίκια τυχαιοποιήθηκαν σε δύο ομάδες (επτά ποντίκια/ομάδα αντίστοιχα, δύο όγκοι/ποντίκια σύμφωνα με το βρετανικό σύστημα διμερών εμφυτευμάτων) και άρχισε η θεραπεία με τη δοξορουβικίνη. Αντίστοιχα σχετικά με το Doxil ανθρώπινα κύτταρα ασθενούς εγχύθηκαν υποδόρια ($1 \cdot 10^6$ κύτταρα/ένεση) στις οπίσθιες μασχαλιαίες περιοχές 16 θηλυκών ποντικών NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ ηλικίας 7 εβδομάδων με μέσο βάρος στα 20 gr το καθένα. Μόλις οι όγκοι έφτασαν σε έναν μέσο όγκο περίπου 200 mm^3 έξω από το μέγεθος του όγκου (εξαιρέθηκαν πέντε ζώα σε αυτό το πείραμα), τα ποντίκια τυχαιοποιήθηκαν σε δύο ομάδες (έξι και πέντε ποντίκια/ομάδα αντίστοιχα, δύο όγκοι/ποντίκια σύμφωνα με το βρετανικό σύστημα διμερών εμφυτευμάτων) και άρχισε η θεραπεία με το Doxil. Η δραστηριότητα του Doxil δεν δοκιμάστηκε μόνο σε ποντίκια του στελέχους NSG αλλά και του στελέχους NOD SCID. Πιο συγκεκριμένα ανθρώπινα κύτταρα ασθενούς εγχύθηκαν υποδόρια ($1 \cdot 10^6$ κύτταρα/ένεση) στις οπίσθιες μασχαλιαίες περιοχές 10 θηλυκών ποντικών NOD.Cg-Prkdcscid/J ηλικίας 7 εβδομάδων με μέσο βάρος στα 20 gr το καθένα. Μόλις οι όγκοι έφτασαν σε έναν μέσο όγκο περίπου 250 mm^3 έξω από το μέγεθος του όγκου, τα ποντίκια τυχαιοποιήθηκαν σε δύο ομάδες (τέσσερα και έξι ποντίκια/ομάδα αντίστοιχα, δύο όγκοι/ποντίκια σύμφωνα με το βρετανικό σύστημα διμερών εμφυτευμάτων) και άρχισε η θεραπεία με το Doxil.

2.2.2. Αξιολόγηση της δραστηριότητας της κυκλοφωσφαμίδης σε ζωικό πρότυπο καρκίνου

Η κυκλοφωσφαμίδα (Endoxan, 500mg) είναι ένα είδος nitrogen mustard φαρμάκου που ασκεί τις επιδράσεις του μέσω της αλκυλίωσης του DNA. Το φάρμακο δεν είναι ειδικό για κάποια συγκεκριμένη φάση του κυτταρικού κύκλου και μεταβολίζεται σε

μια ενεργή μορφή ικανή να αναστείλει τη σύνθεση πρωτεϊνών μέσω της διασύνδεσης DNA και RNA. Η πλειοψηφία των αντινεοπλασματικών επιδράσεων της κυκλοφωσφαμίδης οφείλεται στη phosphoramidate mustard που σχηματίζεται από το μεταβολισμό του φαρμάκου από ηπατικά ένζυμα όπως το κυτόχρωμα P-450. Τα ηπατικά ένζυμα πρώτα μετατρέπουν την κυκλοφωσφαμίδα σε υδροξυκυκλοφωσφαμίδα και στη συνέχεια μεταβολίζονται σε αλδοφωσφαμίδα. Η αλδοφωσφαμίδα διασπάται στον δραστικό παράγοντα αλκυλίωσης phosphoramidate mustard και ακρολεΐνη. Ο μεταβολίτης φωσφοραμιδίου σχηματίζει διασταυρούμενους δεσμούς εντός και μεταξύ παρακείμενων κλώνων DNA στη θέση γουανίνης N-7. Αυτές οι τροποποιήσεις είναι μόνιμες και τελικά οδηγούν σε προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Εκτός από τα αντιμιτωτικά και αντινεοπλασματικά αποτελέσματα, η κυκλοφωσφαμίδα έχει ανοσοκατασταλτικές επιδράσεις και εκλεκτικότητα για τα T κύτταρα. Λόγω αυτών των επιδράσεων, η κυκλοφωσφαμίδα θεωρείται ως μια πολύτιμη προσθήκη στα πρωτόκολλα εμβολιασμού όγκων (Ogino, M.H., et al., 2021). Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε χορήγηση κυκλοφωσφαμίδης σε ζωικά μοντέλα. Αναλυτικότερα ανθρώπινα κύτταρα ασθενούς εγχύθηκαν υποδόρια (10^6 κύτταρα/ένεση) στις οπίσθιες μασχαλιαίες περιοχές 20 θηλυκών ποντικών NOD.Cg-Prkdc^{scid}/J ηλικίας 7 εβδομάδων με μέσο βάρος στα 20 gr το καθένα. Τα ζώα φιλοξενήθηκαν υπό ειδικές συνθήκες χωρίς παθογόνα (SPF), κάτω από έναν κύκλο φωτός 12 ωρών και θερμοκρασία μεταξύ 20-22°C και αφέθηκαν να έχουν ad libitum πρόσβαση σε τρόφιμα και νερό. Μόλις οι όγκοι έφτασαν σε έναν μέσο όγκο περίπου 200 mm³ έξω από το μέγεθος του όγκου (εξαιρέθηκαν οκτώ σε αυτό το πείραμα), τα ποντίκια τυχαιοποιήθηκαν σε δύο ομάδες (έξι ποντίκια/ομάδα, δύο όγκοι/ποντίκια σύμφωνα με το βρετανικό σύστημα διμερών εμφυτευμάτων) και άρχισε η θεραπεία.

2.2.3. Αξιολόγηση της δραστηριότητας της δοσεταξέλης σε ζωικό πρότυπο καρκίνου

Η ντοσεταξέλη (Doxen 20mg/0.5ml) είναι ένας χημειοθεραπευτικός παράγοντας δεύτερης γενιάς της οικογένειας των ταξανών. Αποτελεί παράγωγο της πακλιταξέλης, του πρώτου ταξανίου που κυκλοφόρησε στην αγορά, και ο κύριος μηχανισμός δράσης της δοσεταξέλης είναι η δέσμευση της β-τουμπουλίνης,

ενισχύοντας τον πολλαπλασιασμό της και σταθεροποιώντας τη διαμόρφωσή της. Με αυτόν τον τρόπο αναστέλλεται η σωστή συναρμολόγηση των μικροσωληνίσκων στο μιτωτικό άξονα, σταματώντας τον κυτταρικό κύκλο κατά τη διάρκεια του G2/M. Η δοσεταξέλη μειώνει επίσης την έκφραση του γονιδίου BCL2, ενός αντι-αποπτωτικού γονιδίου που συχνά υπερεκφράζεται από τα καρκινικά κύτταρα προσφέροντας αυξημένη επιβίωση. Με την μειωμένη έκφραση αυτού του γονιδίου, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να υποστούν πιο εύκολα απόπτωση (Farha, N.G., et al., 2021).

Αντίστοιχα με την δοξορουβικίνη, το Doxil και την κυκλοφωσφαμίδη στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε και έλεγχος της δραστηριότητας της δοσεταξάλης. Πιο συγκεκριμένα τα ανθρώπινα κύτταρα ασθενούς εγχύθηκαν υποδόρια (10^6 κύτταρα/ένεση) στις οπίσθιες μασχαλιαίες περιοχές 30 θηλυκών ποντικών NOD.Cg-Prkdc^{scid}/J ηλικίας 7 εβδομάδων με μέσο βάρος στα 20 gr το καθένα. Τα ζώα τα οποία έδωσαν όγκους ανέρχονταν σε 21. Τα ζώα φιλοξενήθηκαν υπό ειδικές συνθήκες χωρίς παθογόνα (SPF), κάτω από έναν κύκλο φωτός 12 ωρών και θερμοκρασία μεταξύ 20-22°C και αφέθηκαν να έχουν ad libitum πρόσβαση σε τρόφιμα και νερό. Επειδή στο συγκεκριμένο φαινότυπο η ανάπτυξη του όγκου παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία αρχικά χρησιμοποιήθηκαν τα οκτώ από τα είκοσι ένα ζώα. Μόλις οι όγκοι έφτασαν σε έναν μέσο όγκο περίπου 200 mm³ έξω από το μέγεθος του όγκου, τα ποντίκια τυχαιοποιήθηκαν σε δύο ομάδες (τέσσερα ποντίκια/ομάδα, δύο όγκοι/ποντίκια σύμφωνα με το βρετανικό σύστημα διμερών εμφυτευμάτων) και άρχισε η θεραπεία.

Και οι τρεις ουσίες χορηγήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά. Η δοξορουβικίνη, το Doxil και η δοσεταξέλη χρησιμοποιήθηκαν αυτούσιες, ενώ η κυκλοφωσφαμίδη διαλύθηκε σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου 0,9% w/v. Στα ζώα της ομάδας του Doxil έγινε χορήγηση ενδοπεριτοναϊκά του φαρμάκου σε συγκέντρωση 10 mg/kg (100μl/inj), δύο φορές την εβδομάδα για 2 εβδομάδες. Τα ζώα της ομάδας του doxel έλαβαν δόση ενδοπεριτοναϊκά του φαρμάκου στα 16,5 mg/kg (200 μl/inj), δύο φορές την εβδομάδα για 2 εβδομάδες. Τα ζώα της ομάδας της cyclophosphamide έλαβαν δόση του φαρμάκου σε συγκέντρωση 20 mg/kg (100μl/inj) δύο φορές την εβδομάδα

για 2 εβδομάδες και τα ζώα της ομάδας της Δοξορουβικίνης έλαβαν δόση του φαρμάκου σε συγκέντρωση 10 mg/kg μία φορά την εβδομάδα για 1 εβδομάδα

Όλες οι χορηγήσεις πραγματοποιήθηκαν μεταξύ 10-11 π.μ. σε διαστήματα 24 ωρών μεταξύ των ενέσεων στην πειραματική μονάδα που στεγάστηκε το ποντίκι. Οι διάμετροι των όγκων μετρήθηκαν με δαγκάνα. Ο όγκος του όγκου (V) υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τον τύπο $V = ab^2/2$, όπου 'a' υποδηλώνει μήκος (χιλιοστόμετρο) και 'b' υποδηλώνει πλάτος (χιλιοστόμετρο). Τα ζώα ζυγίστηκαν δύο φορές την εβδομάδα για να παρατηρήσουν οποιαδήποτε απώλεια βάρους ως ένδειξη καχεξίας και παρατηρήθηκαν για τυχόν σημάδια νοσηρότητας. Κανένα ζώο δεν παρουσίασε απώλεια βάρους άνω του 15% ή οποιαδήποτε άλλα μακροσκοπικά σημεία δυσφορίας και νοσηρότητας (πόνος, έλκη στους όγκους και αλλαγές στη συμπεριφορά, νευρολογία ή διατροφή). Μετά τον τερματισμό του πειράματος (το μέγεθος του όγκου δεν ξεπερνούσε το 10% του βάρους του ποντικιού σε κάθε περίπτωση) όλα τα ποντίκια, μετά από αναισθησία CO₂, ευθανατώθηκαν. Ο χειρισμός και ο πειραματισμός των ζώων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους ελληνικούς νόμους (ΠΔ 56/2013 και Εγκύκλιος 2215/117550/2013) και τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (2013/63/EE) βάσει εγκεκριμένου πρωτοκόλλου από την IACUC και ελληνικές αρχές (αρ. άδειας 5542/228006, IACUC). Τέλος, για τη διεξαγωγή της παρούσας διπλωματικής εργασίας υπήρξε άδεια από το επιστημονικό συμβούλιο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας για την πρόσβαση στο αρχείο της ασθενούς και έγκριση από την Κτηνιατρική υπηρεσία για τον χειρισμό των πειραματοζώων.

2.3. Στατιστική ανάλυση

Στην παρούσα μελέτη, η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Student's t-test.

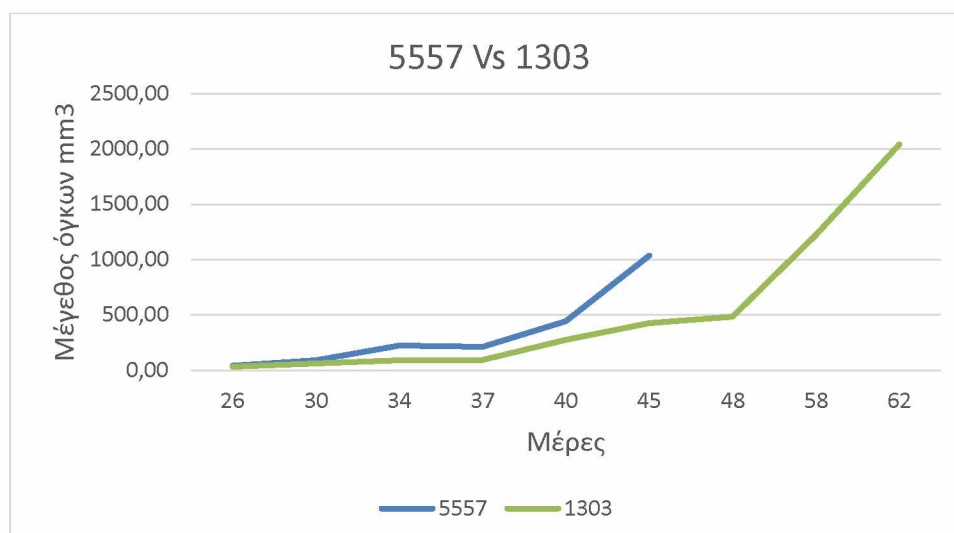
Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω του υπολογισμού της παραμέτρου z-score. Η τιμή z-score είναι μια μαθηματική τροποποίηση η οποία για κάθε τιμή ενός συνόλου τιμών αφαιρεί το μέσο όρο τους και διαιρεί με την τυπική τους απόκλιση, κανονικοποιώντας το εύρος κατανομής. Μπορεί να τοποθετηθεί σε μία καμπύλη κανονικής κατανομής με εύρος από -3 έως +3.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Έλεγχος του ρυθμού ανάπτυξης ξеноμοσχεύματος (PDX) σε ποντίκια τόσο του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid/J όσο και του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ

Οι δοκιμές για την δραστικότητα των φαρμάκων: δοξορουβικίνη, Doxil κυκλοφωσφαμίδη και ντοσεταξέλη στη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid/J (1303). Η δραστικότητα όμως της δοξορουβικίνης και του Doxil πραγματοποιήθηκε και σε ποντίκια του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (5557), γνωστά επίσης με το κωδικό όνομα NOD scid gamma (NSG™). Πέραν από τις διαφορές των δύο

στελεχών, για τις οποίες έγινε εκτενής αναφορά και στα υλικά-μεθόδους (βλέπε 2.1.1), πειραματικά εντοπίσαμε ότι η ανάπτυξη των ξενομοσχευμάτων στα ποντίκια του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid/J γίνεται με αργότερο ρυθμό σε σχέση με την ανάπτυξη των ξενομοσχευμάτων στα ποντίκια του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (Εικόνα 3.1):



Εικόνα 3.1: Ανάπτυξη των ξενομοσχευμάτων στα ποντίκια του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid/J (1303) σε σχέση με τα ποντίκια του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (5557).

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, το οποίο απεικονίζει την ανάπτυξη του ξενομοσχεύματος σε συνάρτηση με τον χρόνο τόσο στα ποντίκια του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid/J όσο και στα NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ παρατηρούμε ότι, στο στέλεχος NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ το μέγεθος του όγκου ανέρχεται στα 1000 mm³ μόλις στις 45 ημέρες ενώ στο στέλεχος NOD.Cg-Prkdcscid/J για να φτάσει η ανάπτυξη του ξενομοσχεύματος στο ίδιο μέγεθος απαιτούνται 58 ημέρες.

3.2. Έλεγχος δραστικότητας της Δοξορουβικίνης σε ζωικό πρότυπο καρκίνου:

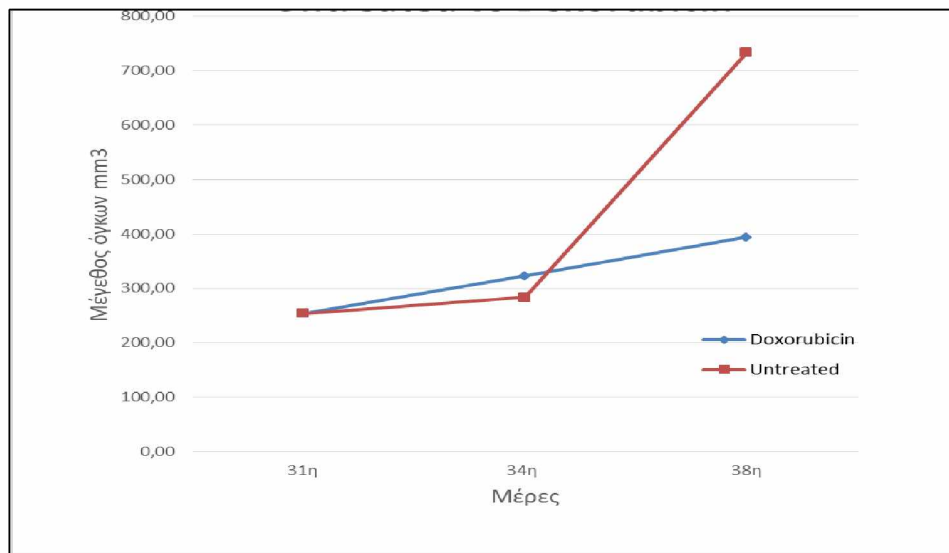
Η επίδραση τόσο της Δοξορουβικίνης, όσο και του Doxil (μορφή λιποσωμάτων της Δοξορουβικίνης), μελετήθηκαν στην ανάπτυξη ξενομοσχευμάτων ανθρώπινων κυττάρων μαστικού καρκίνου τόσο σε ζώα του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid/J (1303) όσο και του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ. Όσο αφορά τη δοκιμή της δραστικότητας της Δοξορουβικίνης στο στέλεχος NOD.Cg-Prkdcscid/J (1303) όταν το μέγεθος των όγκων έφτασε περίπου τα 250 mm³ τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε 2

ομάδα 2 και δεν έγινε χορήγηση του φαρμάκου. Το πείραμα τερματίστηκε την 39^η ημέρα καθώς όλα τα ζώα της ομάδας βρέθηκαν νεκρά. Ακολούθησε εξαγωγή των όγκων και μέτρηση του βάρους τους σε αναλυτικό ζυγό (Πίνακας 3.1). Το μέγεθος των όγκων την 38^η ημέρα, στην ομάδα αναφοράς, ανήλθε περίπου στα 683 mm³ και η καμπύλη ανάπτυξης των ξενομοσχευμάτων καταγράφηκε σε συνάρτηση με το χρόνο (Εικόνα 3.4).

ΟΜΑΔΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ		ΜΕΓΕΘΟΣ ΟΓΚΟΥ (gr)	ΒΑΡΟΣ ΖΩΩΝ (gr)
UM	Left leg	1	20
	Right leg	0,4	
1R	Left leg	0,4	20,6
	Right leg	0,7	
1L	Left leg	1,3	21,6
	Right leg	1,3	
1R/1L	Left leg	0,5	19,6
	Right leg	0,8	
2R	Left leg	0,5	22,1
	Right leg	1,2	
ΟΜΑΔΑ ΔΟΞΟΡΟΥΒΙΚΙΝΗΣ		ΜΕΓΕΘΟΣ ΟΓΚΟΥ (gr)	ΒΑΡΟΣ ΖΩΩΝ (gr)
UM	Left leg	<0,1	14
	Right leg	0,7	
1R	Left leg	<0,1	16,8
	Right leg	<0,1	
1L	Left leg	<0,1	16
	Right leg	0,5	
	Left leg	0,9	

1R/1L	Right leg	0,4	15,2
2R	Left leg	0,6	14,8
	Right leg	0,6	
2L	Left leg	0,4	14,6
	Right Leg	<0,1	

Πίνακας 3.1: Απεικόνιση του βάρους των όγκων τόσο στην ομάδα αναφοράς όσο και στην ομάδα της Δοξορουβικίνης την 39^η ημέρα σε ζώα του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid/J.



Εικόνα 3.4: Μεταβολές του μεγέθους των όγκων των ζώων συναρτήσει με το χρόνο.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.4, η συγκέντρωση της Δοξορουβικίνης που μελετήθηκε, στο στέλεχος NOD.Cg-Prkdcscid/J είναι δραστική αλλά εξίσου και πολύ τοξική σε σχέση με την ομάδα αναφοράς.

Εν συνεχεία σχετικά πραγματοποιήθηκε δοκιμή της δραστηριότητας της Δοξορουβικίνης στο στέλεχος NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ. Όταν το μέγεθος των όγκων έφτασε περίπου τα 200 mm³ τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε 2 ομάδες (επτά ποντίκια/ομάδα δύο όγκοι/ποντίκι σύμφωνα με το βρετανικό σύστημα διμερών εμφυτευμάτων) και ξεκίνησαν οι χορηγήσεις. Στη μία ομάδα χορηγήθηκε 100 μL/ζώο φυσιολογικός ορός 0,9% w/v και χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα αναφοράς

και στη δεύτερη ομάδα χορηγήθηκαν 10 mg/kg Δοξορουβικίνη ενδοπεριτοναϊκά. Η χορήγηση πραγματοποιήθηκε μια φορά όπως απεικονίζεται παρακάτω (Εικόνα 3.5).



Εικόνα 3.5: Απεικόνιση του σχήματος της Δοξορουβικίνης σε ζώα του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ.

Τα πέντε από τα ζώα που δέχτηκαν χορήγηση Δοξορουβικίνης 10mg/kg εντοπίστηκαν νεκρά δύο μέρες μετά, γι'αυτό και το πείραμα τερματίστηκε την 41^η. Ακολούθησε εξαγωγή των όγκων και μέτρηση του βάρους τους σε αναλυτικό ζυγό (Πίνακας 3.2). Το μέγεθος των όγκων την 41^η ημέρα, στην ομάδα αναφοράς, ανήλθε περίπου στα 163 mm³.

ΟΜΑΔΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ		ΜΕΓΕΘΟΣ ΟΓΚΟΥ (gr)	ΒΑΡΟΣ ΖΩΩΝ (gr)
UM	Left Leg	0,24	20,5
	Right Leg	0,34	
1R	Left Leg	0,22	20,2
	Right Leg	0,13	
1L	Left Leg	0,62	16,5
	Right Leg	0,35	
1R/1L	Left Leg	0,38	17,7
	Right Leg	0,36	
	Left Leg	0,14	

2R	Right Leg	0,25	17
2L	Left Leg	0,31	17,6
	Right Leg	0,18	
2R/L	Left Leg	0,2	21,6
	Right Leg	0,44	
ΟΜΑΔΑ ΔΟΞΟΡΟΥΒΙΚΙΝΗΣ		ΜΕΓΕΘΟΣ ΟΓΚΟΥ (gr)	ΒΑΡΟΣ ΖΩΩΝ (gr)
UM	Left Leg	0,5	20,5
	Right Leg	0,57	
1R	Left Leg	0,44	
	Right Leg	0,36	
1L	Left Leg	0,36	
	Right Leg	0,36	
1R/1L	Left Leg	0,12	
	Right Leg	0,46	
2R	Left Leg	0,25	
	Right Leg	0,38	
2L	Left Leg	0,42	
	Right Leg	0,6	
2R/L	Left Leg	0,03	17
	Right Leg	0,62	

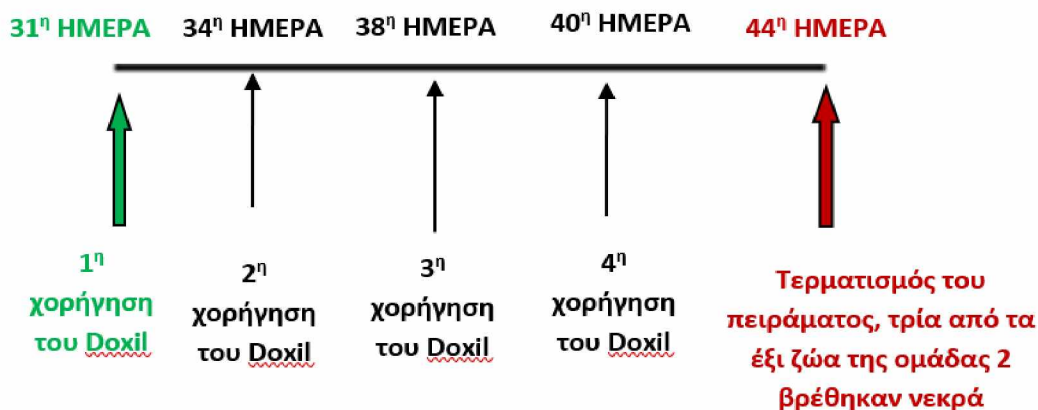
Πίνακας 3.2: Απεικόνιση του βάρους των όγκων τόσο στην ομάδα αναφοράς όσο και στην ομάδα της Δοξορουβικής την 41^η ημέρα σε ζώα του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ.

Η συγκέντρωση της Δοξορουβικής που μελετήθηκε, στο στέλεχος NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ είναι πολύ τοξική σε σχέση με την ομάδα αναφοράς

καθώς τα πέντε από τα ζώα που δέχτηκαν χορήγηση Δοξορουβικίνης 10mg/kg εντοπίστηκαν νεκρά δύο μέρες μετά. Παρόλα αυτά δεν παρατηρήθηκε μεγάλη μείωση στο μέγεθος των όγκων στο συγκεκριμένο στέλεχος σε σχέση με το στέλεχος NOD.Cg-Prkdcscid/J.

3.3. Έλεγχος δραστηριότητας του Doxil σε ζωικό πρότυπο καρκίνου:

Όσο αφορά τη δραστηριότητα του Doxil στα ποντίκια του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (5557), όπως περιγράφηκε παραπάνω (Βλ. Υλικά και Μέθοδοι) όταν το μέγεθος των όγκων έφτασε περίπου τα 200 mm³ τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε 2 ομάδες (έξι και πέντε ποντίκια/ομάδα αντίστοιχα, δύο όγκοι/ποντίκι σύμφωνα με το βρετανικό σύστημα διμερών εμφυτευμάτων) και ξεκίνησαν οι χορηγήσεις. Στη μία ομάδα χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός 0,9% w/v και χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα αναφοράς και στη δεύτερη ομάδα χορηγήθηκαν 10 mg/kg Doxil. Οι χορηγήσεις πραγματοποιήθηκαν δύο φορές τη βδομάδα για 2 εβδομάδες (Εικόνα 3.6) και ταυτόχρονα, καταγράφηκε η ανάπτυξη των ξενομοσχευμάτων σε συνάρτηση με τον χρόνο (Εικόνα 3.7)



Εικόνα 3.6: Απεικόνιση του σχήματος του Doxil σε ζώα του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ.

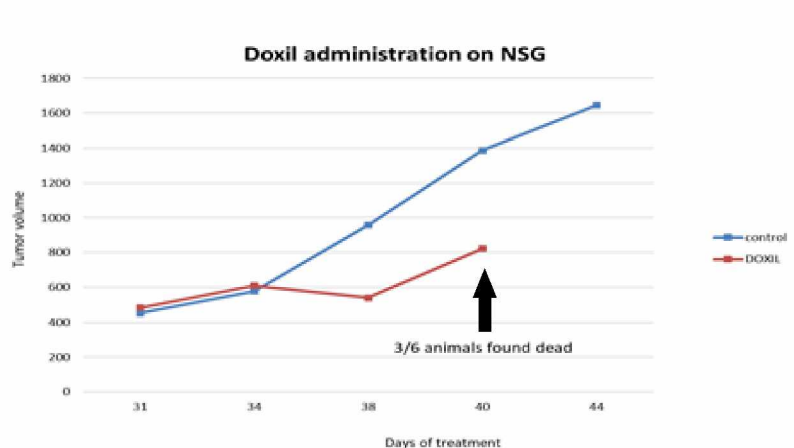
Σύμφωνα με την εικόνα 3.6 παρατηρούμε ότι το σχήμα του Doxil πραγματοποιήθηκε τέσσερις φορές μέσα σε δύο εβδομάδες αλλά στις αρχές της τρίτης εβδομάδας (44^η μέρα) τερματίστηκε το πείραμα καθώς τρία από τα έξι ζώα της ομάδας που δέχτηκαν χορήγηση του φαρμάκου βρέθηκαν νεκρά. Ακολούθησε εξαγωγή των όγκων και μέτρηση του βάρους τους σε αναλυτικό ζυγό (Πίνακας 3.3).

Το μέγεθος των όγκων την 44^η ημέρα, στην ομάδα αναφοράς, ανήλθε περίπου στα 1645 mm³ και η καμπύλη ανάπτυξης των ξενομοσχευμάτων καταγράφηκε σε συνάρτηση με το χρόνο (Εικόνα 3.7).

ΟΜΑΔΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ		ΜΕΓΕΘΟΣ ΟΓΚΟΥ (gr)	ΒΑΡΟΣ ΖΩΩΝ (gr)
UM	Left Leg	2,24	26,3
	Right Leg	2,17	
1R	Left Leg	1,64	26
	Right Leg	1,62	
1L	Left Leg	1,85	26,7
	Right Leg	1,74	
1R/1L	Left Leg	1,93	24,5
	Right Leg	1,74	
2R/L	Left Leg	2,02	28
	Right Leg	2,75	
ΟΜΑΔΑ DOXIL		ΜΕΓΕΘΟΣ ΟΓΚΟΥ (gr)	ΒΑΡΟΣ ΖΩΩΝ (gr)
UM	Left Leg	0,32	18
	Right Leg	0,33	
1R	Left Leg	0,58	18,4
	Right Leg	0,53	
1L	Left Leg	0,32	21
	Right Leg	0,59	
1R/1L	Left Leg	0,26	14,9
	Right Leg	0,6	

2R	Left Leg	0,26	14,8
	Right Leg	0,3	
2R/L	Left Leg	0,23	17
	Right Leg	0,38	

Πίνακας 3.3: Απεικόνιση του βάρους των όγκων τόσο στην ομάδα αναφοράς όσο και στην ομάδα του Doxil την 44^η ημέρα σε ζώα του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ.

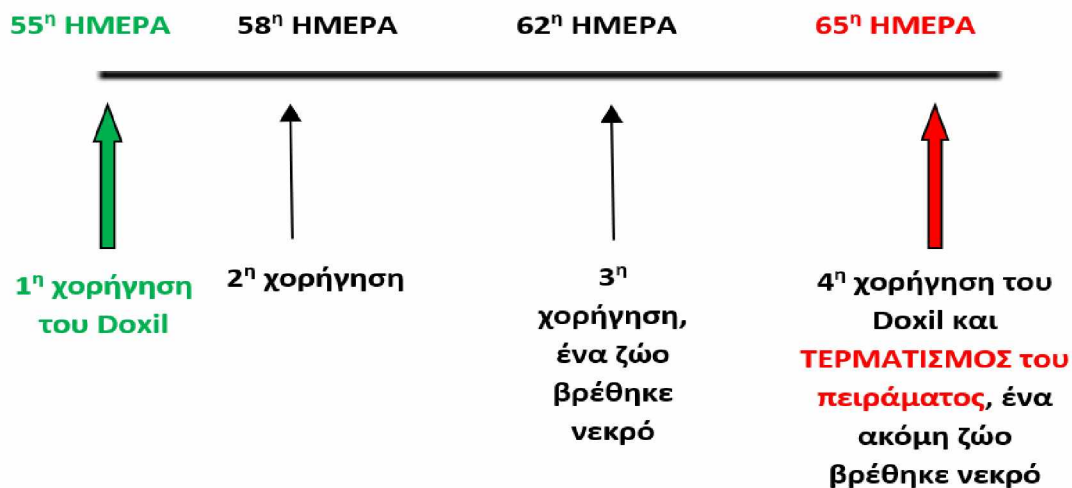


Εικόνα 3.7: Καμπύλη ανάπτυξης των ξενομοσχευμάτων καταγράφηκε σε συνάρτηση με το χρόνο.

Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 3.7, η συγκέντρωση του Doxil που μελετήθηκε είναι λιγότερο τοξική σε σχέση με την Δοξορουβικίνη στο αντίστοιχο στέλεχος και παρόλο που είναι δραστική απαιτείται περισσότερο διάστημα προκειμένου να εκδηλώσει τη δράση της σε σύγκριση με την Δοξορουβικίνη.

Πέραν όμως από τον έλεγχο της δράσης του Doxil σε ποντίκια του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ πραγματοποιήθηκε και έλεγχος της δραστηριότητας του στο στέλεχος NOD.Cg-Prkdcscid/J. Πιο συγκεκριμένα, όταν το μέγεθος των όγκων έφτασε περίπου τα 250 mm³ τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε 2 ομάδες (τέσσερα και έξι ποντίκια/ομάδα αντίστοιχα, δύο όγκοι/ποντίκι σύμφωνα με το βρετανικό σύστημα διμερών εμφυτευμάτων) και ξεκίνησαν οι χορηγήσεις. Στη μία ομάδα χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός 0,9% w/v και χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα αναφοράς και στη δεύτερη ομάδα χορηγήθηκαν 10 mg/kg Doxil. Οι χορηγήσεις πραγματοποιήθηκαν δύο φορές τη βδομάδα για 2 εβδομάδες (Εικόνα

3.8) και ταυτόχρονα, καταγράφηκε η ανάπτυξη των ξενομοσχευμάτων σε συνάρτηση με τον χρόνο (Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.8: Απεικόνιση του σχήματος του Doxil σε ζώα του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid/J

Σύμφωνα με την εικόνα 3.8 παρατηρούμε ότι το σχήμα του Doxil σε ποντίκια του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid/J πραγματοποιήθηκε τέσσερις φορές μέσα σε δύο εβδομάδες, στην τρίτη χορήγηση όμως εντοπίστηκε ένα ζώο της δεύτερης ομάδας (του Doxil) νεκρό. Το πείραμα τερματίστηκε το απόγευμα της 65^{ης} ημέρας καθώς μετά την χορήγηση του φαρμάκου εντοπίστηκε ένα ακόμη ζώο της δεύτερης ομάδας νεκρό. Ακολούθησε εξαγωγή των όγκων και μέτρηση του βάρους τους σε αναλυτικό ζυγό (Εικόνα 3.9) (Πίνακας 3.4). Το μέγεθος των όγκων την 65^η ημέρα στην ομάδα αναφοράς, ανήλθε περίπου στα 571 mm³ όπως απεικονίζεται και στην εικόνα 3.10 η οποία παρουσιάζει την ανάπτυξη των ξενομοσχευμάτων σε συνάρτηση με το χρόνο.

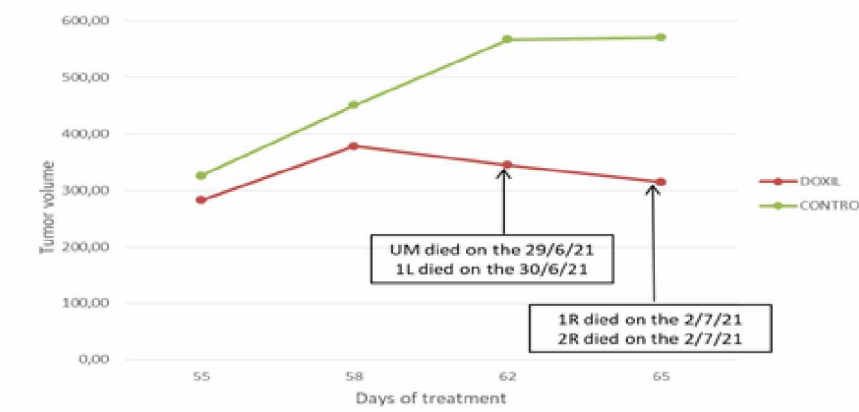


Εικόνα 3.9: Εξαγωγή των όγκων προς μέτρηση μετά το πέρας του πειράματος.

ΟΜΑΔΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ		ΜΕΓΕΘΟΣ ΟΓΚΟΥ (gr)	ΒΑΡΟΣ ΖΩΩΝ (gr)
1R	Left Leg	0,51	21,9
	Right Leg	-	
UM	Left Leg	0,96	24,9
	Right Leg	0,93	
1R/1L	Left Leg	0,92	23,1
	Right Leg	0,5	
1L	Left Leg	0,6	22,9
	Right Leg	-	
ΟΜΑΔΑ DOXIL		ΜΕΓΕΘΟΣ ΟΓΚΟΥ (gr)	ΒΑΡΟΣ ΖΩΩΝ (gr)
2L	Left Leg	0,14	18,8
	Right Leg	-	
2R	Left Leg	0,51	16,5
	Right Leg	-	
	Left Leg	0,78	

1R/1L	Right Leg	0,23	21,7
1R	Left Leg	-	14,8
	Right Leg	0,38	

Πίνακας 3.4: Απεικόνιση του βάρους των όγκων τόσο στην ομάδα αναφοράς όσο και στην ομάδα του Doxil την 65^η ημέρα σε ζώα του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid/J.



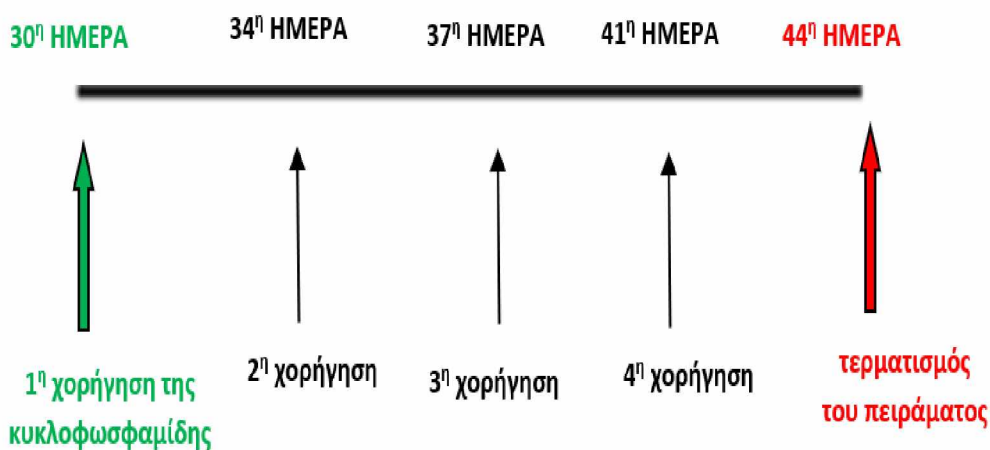
Εικόνα 3.10: Καμπύλη ανάπτυξης των ξеноμοσχευμάτων καταγράφηκε σε συνάρτηση με το χρόνο.

Παρατηρώντας την εικόνα 3.10 αντιλαμβανόμαστε ότι έχει αυξηθεί το θεραπευτικό αποτέλεσμα από τη δράση του Doxil και ταυτόχρονα έχει μειωθεί η προκαλούμενη τοξικότητα σε σχέση με τη Δοξορουβικίνη στο συγκεκριμένο στέλεχος. Αυτό μπορεί να αιτιολογηθεί καθώς στη χορήγηση του Doxil ακολουθήθηκε η προσέγγιση εγκλωβισμού σε δομές στοχευόμενης μεταφοράς φαρμάκων. Πιο συγκεκριμένα, η δοξορουβικίνη εγκλωβίζεται στο εσωτερικό λιποσωμάτων, που έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν φαρμακευτικές ουσίες εκλεκτικά στον καρκίνο και να προκαλούν λιγότερη τοξικότητα.

3.4. Έλεγχος δραστηριότητας της κυκλοφωσφαμίδης σε ζωικό πρότυπο καρκίνου:

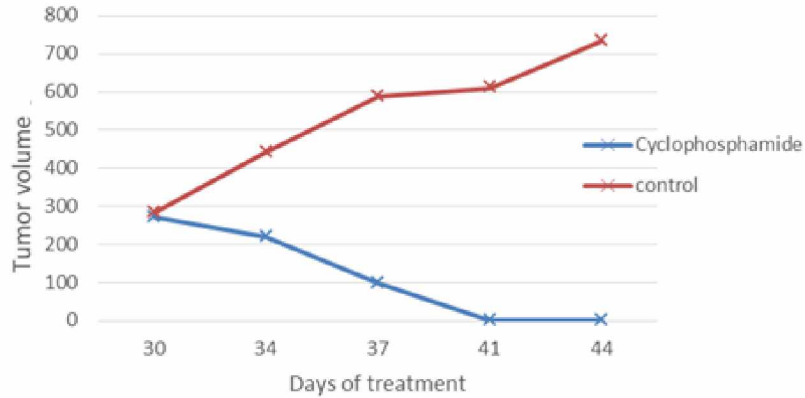
Η επίδραση της κυκλοφωσφαμίδης μελετήθηκε στην ανάπτυξη ξеноμοσχευμάτων ανθρώπινων κυττάρων μαστικού καρκίνου σε ζώα του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid/J (1303). Όπως περιγράφηκε προηγουμένως (βλ. Υλικά και Μέθοδοι) όταν το μέγεθος των όγκων έφτασε τα 200 mm³ τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε 2 ομάδες (έξι ποντίκια/ομάδα, δύο όγκοι/ποντίκια σύμφωνα με το βρετανικό σύστημα διμερών εμφυτευμάτων) και ξεκίνησαν οι χορηγήσεις. Στη μία ομάδα

χορηγήθηκε 100 μL/ζώο φυσιολογικός ορός 0,9% w/v και χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα αναφοράς και στη δεύτερη ομάδα χορηγήθηκαν 100 mg/kg κυκλοφωσφαμίδης ενδοπεριτοναϊκά. Οι χορηγήσεις πραγματοποιήθηκαν δύο φορές για 2 εβδομάδες (Εικόνα 3.11) και ταυτόχρονα οι μεταβολές στο μέγεθος των όγκων σε συνάρτηση με τον χρόνο (Εικόνα 3.12).



Εικόνα 3.11: Απεικόνιση του σχήματος της Κυκλοφωσφαμίδης σε ζώα του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid/J

Με βάση την εικόνα 3.11 παρατηρούμε ότι το σχήμα της κυκλοφωσφαμίδης πραγματοποιήθηκε τέσσερις φορές μέσα σε δύο εβδομάδες. Το πείραμα τερματίστηκε την 41^η ημέρα καθώς το μέγεθος των όγκων είχε μειωθεί δραματικά (οι όγκοι πλέον ήταν μόνο ψηλαφιστοί), γεγονός που υποδηλώνει την πολύ καλή αντικαρκινική δράση της κυκλοφωσφαμίδης στη συγκεκριμένη δόση αλλά και συνάμα φανερώνει και την μηδαμινή τοξικότητα αυτής καθώς κανένα ζώο δεν εντοπίστηκε νεκρό κατά την διάρκεια της δοκιμής. Εδώ πρέπει να επισημανθεί ότι δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική μεταβολή στο βάρος των ζώων κατά τις χορηγήσεις και τα ζώα δεν επέδειξαν κανένα σημάδι πόνου, νωχελικότητας και αδρού τριχώματος. Το μέγεθος των όγκων την 41^η ημέρα στην ομάδα αναφοράς, ανήλθε περίπου στα 610 mm³ όπως απεικονίζεται και στην εικόνα 3.12 η οποία παρουσιάζει την ανάπτυξη των ξеноμοσχευμάτων σε συνάρτηση με το χρόνο.

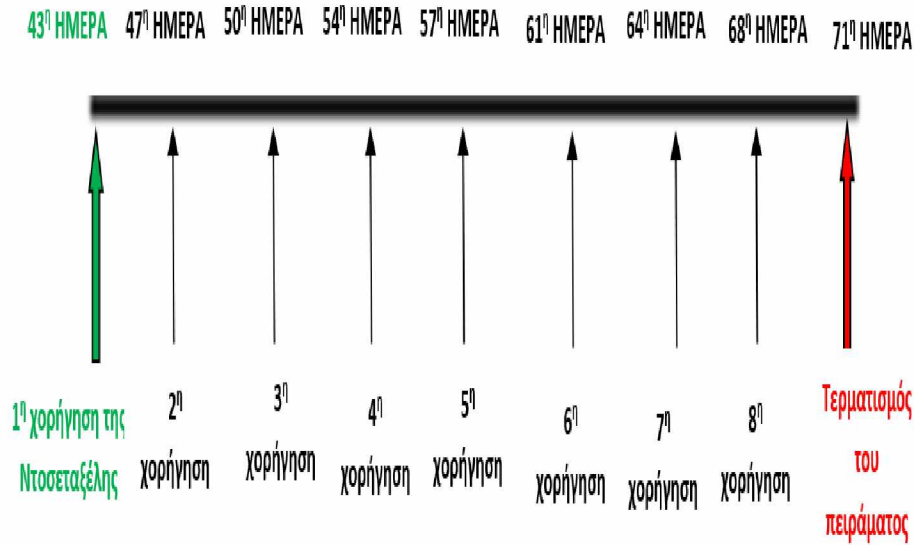


Εικόνα 3.12: Καμπύλη ανάπτυξης των ξενομοσχευμάτων που καταγράφηκε σε συνάρτηση με το χρόνο.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 3.12) παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση της κυκλοφωσφαμίδης που μελετήθηκε, είναι πολύ δραστική σε σχέση με την ομάδα αναφοράς αφού την 41^η ημέρα το μέγεθος των όγκων στην ομάδα που πραγματοποιήθηκε χορήγηση του φαρμάκου έφτασε στο 0, και καθόλου τοξική στη συγκεκριμένη δόση καθώς όπως προαναφέρθηκε κανένα ζώο δεν εντοπίστηκε νεκρό στη διάρκεια των χορηγήσεων.

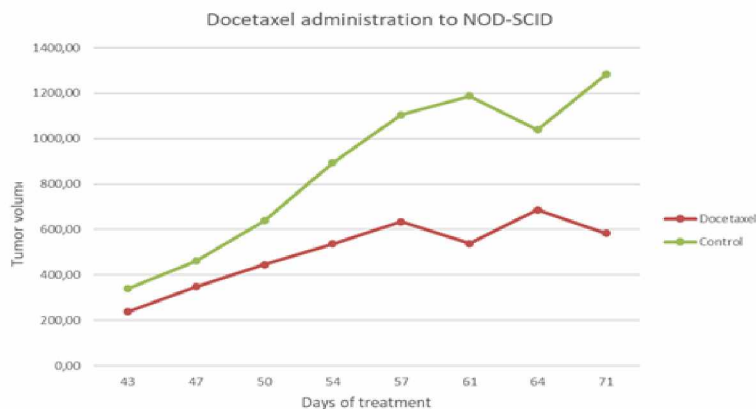
3.5. Έλεγχος δραστικότητας της ντοσεταξέλης σε ζωικό πρότυπο καρκίνου:

Η επίδραση της ντοσεταξέλης μελετήθηκε στην ανάπτυξη ξενομοσχευμάτων ανθρώπινων κυττάρων μαστικού καρκίνου σε ζώα του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid/J (1303). Όπως περιγράφηκε προηγουμένως (βλ. Υλικά και Μέθοδοι) όταν το μέγεθος των όγκων έφτασε τα 200 mm³ τα ζώα χωρίστηκαν τυχαία σε 2 ομάδες (τέσσερα ποντίκια/ομάδα, δύο όγκοι/ποντίκια σύμφωνα με το βρετανικό σύστημα διμερών εμφυτευμάτων) και ξεκίνησαν οι χορηγήσεις. Στη μία ομάδα χορηγήθηκε 200 μL/ζώο φυσιολογικός ορός 0,9% w/v και χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα αναφοράς και στη δεύτερη ομάδα χορηγήθηκαν 16.5 mg/kg ντοσεταξέλης ενδοπεριτοναϊκά. Οι χορηγήσεις πραγματοποιήθηκαν 8 φορές για 2 εβδομάδες (Εικόνα 3.13) και ταυτόχρονα, καταγράφηκαν οι μεταβολές στο μέγεθος των όγκων σε συνάρτηση με το χρόνο (Εικόνα 3.14).



Εικόνα 3.13: Απεικόνιση του σχήματος της ντοσεταξέλης σε ζώα του στελέχους NOD.Cg-Prkdcscid/J

Σύμφωνα με την εικόνα 3.13 παρατηρούμε ότι το σχήμα της χορηγήσεων ντοσεταξέλης πραγματοποιήθηκε οκτώ φορές μέσα σε δύο εβδομάδες. Το πείραμα τερματίστηκε την 71^η ημέρα καθώς τα ζώα παρουσίασαν σημάδια πόνου, νωχελικότητας και αδρού τριχώματος. Εδώ πρέπει να τονιστεί πως κανένα ζώο κατά την διάρκεια των χορηγήσεων δεν βρέθηκε νεκρό. Άρα η συγκεκριμένη δόση ντοσεταξέλης δεν είναι τοξική. Το μέγεθος των όγκων την 71^η ημέρα στην ομάδα αναφοράς, ανήλθε περίπου στα 1283 mm³ όπως απεικονίζεται και στην εικόνα 3.14 η οποία παρουσιάζει την ανάπτυξη των ξενομοσχευμάτων σε συνάρτηση με το χρόνο.



Εικόνα 3.14: Καμπύλη ανάπτυξης των ξενομοσχευμάτων καταγράφηκε σε συνάρτηση με το χρόνο.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα (Εικόνα 3.14), η συγκέντρωση της δοσεταξέλης που μελετήθηκε, είναι δραστική αφού την 71^η ημέρα το μέγεθος των όγκων στην ομάδα αναφοράς ήταν περίπου 1283 mm³ ενώ στην ομάδα που δέχτηκε χορήγηση του φαρμάκου κυμαινόταν περίπου στα 600 mm³. Επίσης δεν ήταν καθόλου τοξική η δόση της δοσεταξέλης καθώς όπως προαναφέρθηκε κανένα ζώο δεν εντοπίστηκε νεκρό στη διάρκεια των χορηγήσεων. Τέλος πρέπει να επισημανθεί ότι η δραστικότητα της σε σχέση με την δραστικότητα της κυκλοφωσφαμίδης είναι μικρότερη καθώς στη κυκλοφωσφαμίδη μετά από τέσσερις χορηγήσεις το μέγεθος των όγκων μειώθηκε εντελώς ενώ στη δοσεταξέλης χρειάστηκαν οκτώ χορηγήσεις και το μέγεθος των όγκων δεν μειώθηκε εντελώς. Επίσης στην δοκιμή για την δραστικότητα της δοσεταξέλης τα ζώα εμφάνισαν σημάδια πόνου, νωχελικότητας και αδρού τριχώματος, χαρακτηριστικά τα οποία δεν παρατηρήθηκαν κατά την δοκιμή της δραστικότητας της κυκλοφωσφαμίδης.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ:

Συμπερασματικά λοιπόν, καταλήγουμε στο ότι η κυκλοφωσφαμίδη ενδείκνυται ως το καλύτερο αντικαρκινικό φάρμακο για τον τριπλά αρνητικό πλούσιο σε λιπίδια καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με όλα τα υπόλοιπα φάρμακα που χορηγήθηκαν στα ζώα (δοξορουβικίνη, Doxil και δοσεταξέλης). Καθώς στην χορήγηση της κυκλοφωσφαμίδης το μέγεθος των όγκων μειώθηκε δραματικά, τα ζώα δεν εμφάνισαν κανένα σημάδι πόνου, νωχελικότητας, αδρού τριχώματος και μέχρι το τέλος του σχήματος κανένα ποντίκι δεν εντοπίστηκε νεκρό. Εδώ αξίζει να σημειωθεί πως η φαρμακολογική μελέτη προσομοιάζει αυτή της ασθενούς και πως το Doxil εφαρμόστηκε πρώτη φορά για τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου δίνοντας ενθαρρυντικά αποτελέσματα καθώς σε σχέση με την Δοξορουβικίνη η τοξικότητα μειώθηκε αισθητά. Όλα τα σχήματα που δοκιμάστηκαν αποτελούν σημαντικούς λίθους για την δημιουργία αποτελεσματικών θεραπειών στον TNBC πλούσιο σε λιπίδια και δίνουν το ελπιδοφόρο μήνυμα της καταπολέμησης αυτού του εξαιρετικά σπάνια και συνάμα δύσκολου ως προς την αντιμετώπιση καρκίνου του μαστού.

Τα μοντέλα PDX που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, είναι μια πολύ ελπιδοφόρα νέα προσέγγιση, που βοηθούν στο να αξιολογηθούν οι περιορισμοί που αφορούν κυρίως τη διατήρηση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και της ετερογένειάς του, ειδικά στην έρευνα για τον TNBC πλούσιο σε λιπίδια, δεδομένου του μικρού αριθμού των διαθέσιμων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων και βιοδεικτών. Ωστόσο, ένα ζήτημα που πρέπει να εξεταστεί στο μέλλον είναι ο χρόνος που απαιτείται για την ανάπτυξη ενός PDX μοντέλου, δεδομένου ότι συνήθως χρειάζονται τέσσερις έως οκτώ μήνες, διάστημα το οποίο είναι περιοριστικό για την δοκιμή της αποτελεσματικότητας πολλών αντικαρκινικών φαρμάκων ώστε να δημιουργηθεί εξατομικευμένη θεραπεία για κάθε ασθενή. Επιπλέον απαιτούνται πρόσθετες μελέτες για τη βελτίωση των μεθόδων εμφύτευσης και την επιτυχή ανάπτυξη των ξενομοσχευμάτων. Καθώς παρατηρούνται διαφορές στην ανάπτυξη των όγκων και στην ανταπόκριση στα σχήματα οι οποίες μπορεί να οφείλονται στο ότι η ορθοτοπική εμφύτευση δίνει το πλεονέκτημα στον όγκο να αναπτύσσεται στο ίδιο μικροπεριβάλλον και, έτσι, το ορθοτοπικό ζωικό πρότυπο καρκίνου διατηρεί κρίσιμες πτυχές της νόσου του ανθρώπου (Go, K.L., et al., 2017) (Hoffman, R.M. 2015). Τέλος ένας άλλος θεμελιώδης περιορισμός στα μοντέλα PDX είναι η ανάγκη χρήσης ανοσοκατασταλμένων στελεχών ποντικών για την εμφύλευση και την ανάπτυξη όγκων. Αυτά τα ποντίκια στερούνται κυττάρων του ανοσοποιητικού τους συστήματος προκειμένου να μην απορρίψουν τον εμφωλευμένο ανθρώπινο όγκο. Όμως, αυτή η κατάσταση περιορίζει τον αριθμό των φαρμάκων που μπορούν να αξιολογηθούν, όπως οι ανοσορυθμιστές ή παράγοντες που δρουν μέσω της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος. Επομένως, τα μοντέλα PDX δεν μπορούν να αναπαράξουν τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων του όγκου, του στρώματός του και του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος. Για το λόγο αυτό είναι ανάγκη να καθιερωθούν PDX μοντέλα με ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα («εξανθρωπισμένα μοντέλα»), προκειμένου να επιτραπεί η προκλινική αξιολόγηση των ανοσολογικών θεραπευτικών προσεγγίσεων στον καρκίνο και ειδικά στον TNBC πλούσιο σε λιπίδια ο οποίος αποτελεί μια σπάνια και ίσως την δυσκολότερη περίπτωση καρκίνου του μαστού καθώς έχει περιορισμένες επιλογές θεραπείας, λόγω της έλλειψης κλινικά ενεργών στόχων (Lai, Y. et al., 2017).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Alkabban, F. M., and Ferguson, T. (2021) Breast Cancer, In StatPearls, Treasure Island (FL).
- Amin A.R.M.R., Karpowicz, P.A., Carey, T.E., Arbiser, J., Nahta, R., Chen, Z.G., Dong, J.T., Kucuk, O., Khan, G.N., Huang, G.S., Mi, S., Lee, H.L., Reichrath, J., Honoki, K., Georgakilas, A.G., Amedei, A., Amin, A., Helferich, B., Boosani, C.S., Ciriolo, M.R., Chen, S., Mohammed, S.I., Azmi, A.S., Keith, W.N., Bhakta, D., Halicka, D., Niccolai, E., Fujii, F., Aquilano, K., Ashraf, S.S., Nowsheen, S., Yang, X., Bilslund, A., Shin, D.M. (2015) Evasion of anti-growth signaling: A key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds, *Semin Cancer Biol* 35 Suppl:S55-S77.
- Aniogo EC, George BPA, Abrahamse H. Phthalocyanine induced phototherapy coupled with Doxorubicin; a promising novel treatment for breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2017;17(8):693-702.
- Bauer, J. A., Chakravarthy, A. B., Rosenbluth, J. M., Mi, D., Seeley, E. H., De Matos Granja-Ingram, N., Olivares, M. G., Kelley, M. C., Mayer, I. A., Meszoely, I. M., Means-Powell, J. A., Johnson, K. N., Tsai, C. J., Ayers, G. D., Sanders, M. E., Schneider, R. J., Formenti, S. C., Caprioli, R. M., and Pietenpol, J. A. (2010) Identification of markers of taxane sensitivity using proteomic and genomic analyses of breast tumors from patients receiving neoadjuvant paclitaxel and radiation, *Clin Cancer Res* 16, 681-690.
- Bertram, J. S. (2000) The molecular biology of cancer, *Mol Aspects Med* 21, 167-223.
- Bhosale, P.B., Ha, S.E., Vetrivel, P., Kim, H.H., Kim, J.A., Park, K., Kim, S.M., Kim, G.S. (2020) Flavonoid-induced apoptotic cell death in human cancer cells and its mechanisms, *J Biomed Transl Res* 21(2):50-58.
- Bonnetterre, J., Roche, H., Kerbrat, P., Bremond, A., Fumoleau, P., Namer, M., Goudier, M. J., Schraub, S., Fargeot, P., and Chappelle-Marcillac, I. (2005) Epirubicin increases long-term survival in adjuvant chemotherapy of patients with poor-prognosis, node-positive, early breast cancer: 10-year follow-up results of the French Adjuvant Study Group 05 randomized trial, *J Clin Oncol* 23, 2686-2693.
- Breast Cancer Treatment During Pregnancy (PDQ(R)): Patient Version, In PDQ Cancer Information Summaries, Bethesda (MD)(2002).
- Carey, L. A., Dees, E. C., Sawyer, L., Gatti, L., Moore, D. T., Collichio, F., Ollila, D. W., Sartor, C. I., Graham, M. L., and Perou, C. M. (2007) The triple negative

paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes, *Clin Cancer Res* 13, 2329-2334.

- Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., Karaca, G., Troester, M. A., Tse, C. K., Edmiston, S., Deming, S. L., Geradts, J., Cheang, M. C., Nielsen, T. O., Moorman, P. G., Earp, H. S., and Millikan, R. C. (2006) Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study, *JAMA* 295, 2492-2502.
- Cong, Y., Lin, J., Qiao, G., Zou, H., Wang, X., Li, X., Li, Y., and Zhu, S. (2015) Lipid-rich carcinoma of the breast: A report of two cases and a literature review, *Oncol Lett* 9, 1729-1732.
- Cormier, J.N., Pollock, R. E. (2004) Soft tissue sarcomas, *CA Cancer J Clin*, Mar-Apr 2004;54(2):94-109.
- Dai, X., Li, T., Bai, Z., Yang, Y., Liu, X., Zhan, J., and Shi, B. (2015) Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends, *Am J Cancer Res* 5, 2929-2943.
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., Lickley, L. A., Rawlinson, E., Sun, P., and Narod, S. A. (2007) Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence, *Clin Cancer Res* 13, 4429-4434.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials, (2005) *Lancet* 365, 1687-1717.
- Edwardson, D. W., Narendrula, R., Chewchuk, S., Mispel-Beyer, K., Mapletoft, J. P., and Parissenti, A. M. (2015) Role of Drug Metabolism in the Cytotoxicity and Clinical Efficacy of Anthracyclines, *Curr Drug Metab* 16, 412-426.
- Engebraaten, O., Vollan, H. K. M., and Borresen-Dale, A. L. (2013) Triple-negative breast cancer and the need for new therapeutic targets, *Am J Pathol* 183, 1064-1074.
- Farha NG, Kasi A. Docetaxel. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2021.
- Foulkes, W. D., Smith, I. E., and Reis-Filho, J. S. (2010) Triple-negative breast cancer, *N Engl J Med* 363, 1938-1948.
- G.I. Uscanga-Peralesa, S. K. S.-F., R. Ortiz-López. (2016) Triple negative breast cancer: Deciphering the biology and heterogeneity, *Medicina Universitaria* 18, 105-114.
- Gatti, V., Bongiorno-Borbone, L., Fierro, C., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Melino, G., and Peschiaroli, A. (2019) p63 at the Crossroads between Stemness and Metastasis in Breast Cancer, *Int J Mol Sci* 20.
- Ghoncheh, M., and Salehiniya, H. (2016) Inequality in the Incidence and Mortality of All Cancers in the World, *Iran J Public Health* 45, 1675-1677.

- Ghosh, S., Pal, A., and Ray, M. (2019) Methylglyoxal in combination with 5-Fluorouracil elicits improved chemosensitivity in breast cancer through apoptosis and cell cycle inhibition, *Biomed Pharmacother* 114, 108855.
- Gluz, O., Liedtke, C., Gottschalk, N., Pusztai, L., Nitz, U., and Harbeck, N. (2009) Triple-negative breast cancer--current status and future directions, *Ann Oncol* 20, 1913-1927.
- Go, K.L., Delitto, D., Judge, S.M., Gerber, M.H., George, T.J., Jr., Behrns, K.E., et al. (2017) Orthotopic Patient-Derived Pancreatic Cancer Xenografts Engraft Into the Pancreatic Parenchyma, Metastasize, and Induce Muscle Wasting to Recapitulate the Human Disease. *Pancreas*. 46(6):813-9.
- Guan, B., Wang, H., Cao, S., Rao, Q., Wang, Y., Zhu, Y., Shi, Q., Yin, H., Wang, X., and Zhou, X. (2011) Lipid-rich carcinoma of the breast clinicopathologic analysis of 17 cases, *Ann Diagn Pathol* 15, 225-232.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 144(5):646-74.
- Henderson, I. C., Berry, D. A., Demetri, G. D., Cirincione, C. T., Goldstein, L. J., Martino, S., Ingle, J. N., Cooper, M. R., Hayes, D. F., Tkaczuk, K. H., Fleming, G., Holland, J. F., Duggan, D. B., Carpenter, J. T., Frei, E., 3rd, Schilsky, R. L., Wood, W. C., Muss, H. B., and Norton, L. (2003) Improved outcomes from adding sequential Paclitaxel but not from escalating Doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer, *J Clin Oncol* 21, 976-983.
- Hoffman, R.M. (2015) Patient-derived orthotopic xenografts: better mimic of metastasis than subcutaneous xenografts. *Nature reviews Cancer* 15(8):451-2.
- Hon, J. D., Singh, B., Sahin, A., Du, G., Wang, J., Wang, V. Y., Deng, F. M., Zhang, D. Y., Monaco, M. E., and Lee, P. (2016) Breast cancer molecular subtypes: from TNBC to QNBC, *Am J Cancer Res* 6, 1864-1872.
- Jain, V., Kumar, H., Anod, H. V., Chand, P., Gupta, N. V., Dey, S., and Kesharwani, S. S. (2020) A review of nanotechnology-based approaches for breast cancer and triple-negative breast cancer, *J Control Release* 326, 628-647.
- Jesinger, R. A. (2014) Breast anatomy for the interventionalist, *Tech Vasc Interv Radiol* 17, 3-9.
- Jovanovic, B., Mayer, I. A., Mayer, E. L., Abramson, V. G., Bardia, A., Sanders, M. E., Kuba, M. G., Estrada, M. V., Beeler, J. S., Shaver, T. M., Johnson, K. C., Sanchez, V., Rosenbluth, J. M., Dillon, P. M., Forero-Torres, A., Chang, J. C., Meszoely, I. M., Grau, A. M., Lehmann, B. D., Shyr, Y., Sheng, Q., Chen, S. C., Arteaga, C. L., and Pietenpol, J. A. (2017) A Randomized Phase II Neoadjuvant Study of Cisplatin, Paclitaxel With or Without Everolimus in Patients with Stage II/III Triple-Negative Breast Cancer (TNBC): Responses and Long-term

Outcome Correlated with Increased Frequency of DNA Damage Response Gene Mutations, TNBC Subtype, AR Status, and Ki67, *Clin Cancer Res* 23, 4035-4045.

- Juul, N., Szallasi, Z., Eklund, A. C., Li, Q., Burrell, R. A., Gerlinger, M., Valero, V., Andreopoulou, E., Esteva, F. J., Symmans, W. F., Desmedt, C., Haibe-Kains, B., Sotiriou, C., Pusztai, L., and Swanton, C. (2010) Assessment of an RNA interference screen-derived mitotic and ceramide pathway metagene as a predictor of response to neoadjuvant paclitaxel for primary triple-negative breast cancer: a retrospective analysis of five clinical trials, *Lancet Oncol* 11, 358-365.
- Kimura, A., Miki, H., Yuri, T., Hatano, T., and Tsubura, A. (2011) A case report of lipid-rich carcinoma of the breast including histological characteristics and intrinsic subtype profile, *Case Rep Oncol* 4, 275-280.
- Koppenol, W. H., Bounds, P. L., and Dang, C. V. (2011) Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism, *Nat Rev Cancer* 11, 325-337.
- Krishnamurthy, S., Poornima, R., Challa, V. R., and Goud, Y. G. (2012) Triple negative breast cancer - our experience and review, *Indian J Surg Oncol* 3, 12-16.
- Kundranda, M. N., and Niu, J. (2015) Albumin-bound paclitaxel in solid tumors: clinical development and future directions, *Drug Des Devel Ther* 9, 3767-3777.
- Kurisu, Y., Tsuji, M., Shibayama, Y., Takahashi, Y., and Nohara, T. (2012) Intraductal lipid-rich carcinoma of the breast with a component of glycogen-rich carcinoma, *J Breast Cancer* 15, 135-138.
- Lai, Y., Wei, X., Lin, S., Qin, L., Cheng, L., Li, P. (2017) Current status and perspectives of patient-derived xenograft models in cancer research. *J Hematol Oncol*. 10(1):106.
- Levine, M. N., Pritchard, K. I., Bramwell, V. H., Shepherd, L. E., Tu, D., Paul, N., and National Cancer Institute of Canada Clinical Trials, G. (2005) Randomized trial comparing cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in premenopausal women with node-positive breast cancer: update of National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Trial MA5, *J Clin Oncol* 23, 5166-5170.
- Li, Q., Li, Q., Zhang, P., Yuan, P., Wang, J., Ma, F., Luo, Y., Fan, Y., Cai, R., and Xu, B. (2015) A phase II study of capecitabine plus cisplatin in metastatic triple-negative breast cancer patients pretreated with anthracyclines and taxanes, *Cancer Biol Ther* 16, 1746-1753.
- Liedtke, C., Mazouni, C., Hess, K. R., Andre, F., Tordai, A., Mejia, J. A., Symmans, W. F., Gonzalez-Angulo, A. M., Hennessy, B., Green, M., Cristofanilli, M., Hortobagyi, G. N., and Pusztai, L. (2008) Response to

neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer, *J Clin Oncol* 26, 1275-1281.

- Luengo, A., Gui, D. Y., and Vander Heiden, M. G. (2017) Targeting Metabolism for Cancer Therapy, *Cell Chem Biol* 24, 1161-1180.
- Lyons, T. G., and Traina, T. A. (2019) Emerging Novel Therapeutics in Triple-Negative Breast Cancer, *Adv Exp Med Biol* 1152, 377-399.
- Machalekova, K., Kajo, K., and Bencat, M. (2012) Unusual occurrence of rare lipid-rich carcinoma and conventional invasive ductal carcinoma in the one breast: case report, *Case Rep Pathol* 2012, 387045.
- Manjunath, M., and Choudhary, B. (2021) Triple-negative breast cancer: A run-through of features, classification and current therapies, *Oncol Lett* 22, 512.
- Moritani, S., Ichihara, S., Hasegawa, M., Endo, T., Oiwa, M., Shiraiwa, M., Nishida, C., Morita, T., Sato, Y., Hayashi, T., and Kato, A. (2011) Intracytoplasmic lipid accumulation in apocrine carcinoma of the breast evaluated with adipophilin immunoreactivity: a possible link between apocrine carcinoma and lipid-rich carcinoma, *Am J Surg Pathol* 35, 861-867.
- Nag, S., Qin, J.J., Srivenugopal, K., Wang, M., Zhang, R. (2013) The MDM2-p53 pathway revisited, *Journal of Biomedical Research* 27(4):254-271
- Nakatsukasa, K., Koyama, H., Oouchi, Y., Imanishi, S., Mizuta, N., Sakaguchi, K., Fujita, Y., Fujiwara, I., Kotani, T., Matsuda, T., Fukuda, K., Morita, M., Kawakami, S., Kadotani, Y., Konishi, E., Yanagisawa, A., and Taguchi, T. (2017) Docetaxel and cyclophosphamide as neoadjuvant chemotherapy in HER2-negative primary breast cancer, *Breast Cancer* 24, 63-68.
- Nielsen, T. O., Hsu, F. D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-Boussard, T., Livasy, C., Cowan, D., Dressler, L., Akslen, L. A., Ragaz, J., Gown, A. M., Gilks, C. B., van de Rijn, M., and Perou, C. M. (2004) Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma, *Clin Cancer Res* 10, 5367-5374.
- Ogino, M.H., Tadi, P. Cyclophosphamide. *StatPearls. Treasure Island (FL)2021.*
- Okada, S., Vaeteewoottacharn, K., Kariya, R. (2019) Application of Highly Immunocompromised Mice for the Establishment of Patient-Derived Xenograft (PDX) Models, *Cells* 13;8(8):889.
- Pandya, S., and Moore, R. G. (2011) Breast development and anatomy, *Clin Obstet Gynecol* 54, 91-95.
- Parsons, B.L. (2008) Many different tumor types have polyclonal tumor origin: evidence and implications, *Mutat Res* 659(3):232-47.
- Pavlova, N. N., and Thompson, C. B. (2016) The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism, *Cell Metab* 23, 27-47.

- Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lonning, P. E., Borresen-Dale, A. L., Brown, P. O., and Botstein, D. (2000) Molecular portraits of human breast tumours, *Nature* 406, 747-752.
- Rakha, E. A., El-Rehim, D. A., Paish, C., Green, A. R., Lee, A. H., Robertson, J. F., Blamey, R. W., Macmillan, D., and Ellis, I. O. (2006) Basal phenotype identifies a poor prognostic subgroup of breast cancer of clinical importance, *Eur J Cancer* 42, 3149-3156.
- Rakha, E. A., Putti, T. C., Abd El-Rehim, D. M., Paish, C., Green, A. R., Powe, D. G., Lee, A. H., Robertson, J. F., and Ellis, I. O. (2006) Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation, *J Pathol* 208, 495-506.
- Ramos, C. V., and Taylor, H. B. (1974) Lipid-rich carcinoma of the breast. A clinicopathologic analysis of 13 examples, *Cancer* 33, 812-819.
- Reis-Filho, J. S., Fulford, L. G., Lakhani, S. R., and Schmitt, F. C. (2003) Pathologic quiz case: a 62-year-old woman with a 4.5-cm nodule in the right breast. Lipid-rich breast carcinoma, *Arch Pathol Lab Med* 127, e396-398.
- Rivard, A. B., Galarza-Paez, L., and Peterson, D. C. (2021) Anatomy, Thorax, Breast, In *StatPearls*, Treasure Island (FL).
- Sethy, C., and Kundu, C. N. (2021) 5-Fluorouracil (5-FU) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: Implication of DNA repair inhibition, *Biomed Pharmacother* 137, 111285.
- Shi, P., Wang, M., Zhang, Q., and Sun, J. (2008) Lipid-rich carcinoma of the breast. A clinicopathological study of 49 cases, *Tumori* 94, 342-346.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., and Jemal, A. (2017) Cancer Statistics, 2017, *CA Cancer J Clin* 67, 7-30.
- Sorlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lonning, P. E., and Borresen-Dale, A. L. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10869-10874.
- Sporikova, Z., Koudelakova, V., Trojanec, R., and Hajduch, M. (2018) Genetic Markers in Triple-Negative Breast Cancer, *Clin Breast Cancer* 18, e841-e850.
- Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y., Shi, W., Jiang, J., Yao, P. P., and Zhu, H. P. (2017) Risk Factors and Preventions of Breast Cancer, *Int J Biol Sci* 13, 1387-1397.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA Cancer J Clin* 71, 209-249.

- Thomas, R., Al-Khadairi, G., and Decock, J. (2020) Immune Checkpoint Inhibitors in Triple Negative Breast Cancer Treatment: Promising Future Prospects, *Front Oncol* 10, 600573.
- Trimmer, E. E., and Essigmann, J. M. (1999) Cisplatin, *Essays Biochem* 34, 191-211.
- Trudeau, M., Charbonneau, F., Gelmon, K., Laing, K., Latreille, J., Mackey, J., McLeod, D., Pritchard, K., Provencher, L., and Verma, S. (2005) Selection of adjuvant chemotherapy for treatment of node-positive breast cancer, *Lancet Oncol* 6, 886-898.
- Umekita, Y., Yoshida, A., Sagara, Y., and Yoshida, H. (1998) Lipid-Secreting Carcinoma of the Breast: A Case Report and Review of the Literature, *Breast Cancer* 5, 171-173.
- Understanding Cancer, National Institutes of Health (US), Bethesda (MD) (2007).
- van de Rijn, M., Perou, C. M., Tibshirani, R., Haas, P., Kallioniemi, O., Kononen, J., Torhorst, J., Sauter, G., Zuber, M., Kochli, O. R., Mross, F., Dieterich, H., Seitz, R., Ross, D., Botstein, D., and Brown, P. (2002) Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome, *Am J Pathol* 161, 1991-1996.
- Varga, Z., Robl, C., Spycher, M., Burger, D., and Caduff, R. (1998) Metaplastic lipid-rich carcinoma of the breast, *Pathol Int* 48, 912-916.
- Vera-Sempere, F., and Llombart-Bosch, A. (1985) Lipid-rich versus lipid-secreting carcinoma of the mammary gland, *Pathol Res Pract* 180, 553-558.
- Voduc, K. D., Cheang, M. C., Tyldesley, S., Gelmon, K., Nielsen, T. O., and Kennecke, H. (2010) Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse, *J Clin Oncol* 28, 1684-1691.
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., Kinzler, K.W. (2013) Cancer genome landscapes, *Science* 339(6127):1546-58.
- von Minckwitz, G., Schneeweiss, A., Loibl, S., Salat, C., Denkert, C., Rezai, M., Blohmer, J. U., Jackisch, C., Paepke, S., Gerber, B., Zahm, D. M., Kummel, S., Eidtmann, H., Klare, P., Huober, J., Costa, S., Tesch, H., Hanusch, C., Hilfrich, J., Khandan, F., Fasching, P. A., Sinn, B. V., Engels, K., Mehta, K., Nekljudova, V., and Untch, M. (2014) Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial, *Lancet Oncol* 15, 747-756.
- Vona-Davis, L., Rose, D. P., Hazard, H., Howard-McNatt, M., Adkins, F., Partin, J., and Hobbs, G. (2008) Triple-negative breast cancer and obesity in a rural Appalachian population, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17, 3319-3324.
- Weiss, R. B., Donehower, R. C., Wiernik, P. H., Ohnuma, T., Gralla, R. J., Trump, D. L., Baker, J. R., Jr., Van Echo, D. A., Von Hoff, D. D., and Leyland-

- Jones, B. (1990) Hypersensitivity reactions from taxol, *J Clin Oncol* 8, 1263-1268.
- Wu, C. E., Chen, S. C., Lin, Y. C., Lo, Y. F., Hsueh, S., and Chang, H. K. (2014) Identification of patients with node-negative, triple-negative breast cancer who benefit from adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil chemotherapy, *Anticancer Res* 34, 1301-1306.
 - Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W., and Yu, S. C. (2020) Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress, *Breast Cancer Res* 22, 61.
 - Zhang, J., Wang, Z., Hu, X., Wang, B., Wang, L., Yang, W., Liu, Y., Liu, G., Di, G., Hu, Z., Wu, J., and Shao, Z. (2015) Cisplatin and gemcitabine as the first line therapy in metastatic triple negative breast cancer, *Int J Cancer* 136, 204-211.
 - Zhang, W., Zhang, S.L., Hu, X., Tam, KY. (2015) Targeting Tumor Metabolism for Cancer Treatment: Is Pyruvate Dehydrogenase Kinases (PDKs) a Viable Anticancer Target?, *Int J Biol Sci* 11(12):1390-400.
 - Ευαγγελία Σερέτη (2019) Σίγμα Υποδοχείς: Μελέτη του ρόλου τους στην καρκινογένεση και στην ανάπτυξη νέων έξυπνων στοχευμένων αντικαρκινικών θεραπειών, Διδακτορική Διατριβή, Ιατρική Σχολή, Π.Θ.