



Διπλωματική εργασία

“Μελέτη της περιφερικής ανοσολογικής απάντησης σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού με τη χρήση της υγρής βιοψίας”

(Investigation of the peripheral immune response in patients with metastatic breast cancer using liquid biopsy)

Παπαδάκη Ελένη

Πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών :

«Ογκολογία: από την ογκογένεση έως τη θεραπεία»

Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης - Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Εργαστήριο Μεταφραστικής Ογκολογίας

Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Επιβλέπων διπλωματικής εργασίας: Αγγελάκη Σοφία

Καθηγήτρια Παθολογικής Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Τριμελής επιτροπή:

Αγγελάκη Σοφία, Καθηγήτρια Παθολογικής Ογκολογίας

Βεργίνης Παναγιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας

Κουτσόπουλος Αναστάσιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής

Ευχαριστίες

Με το κλείσιμο των μεταπτυχιακών μου σπουδών, θα ήθελα να ευχαριστήσω κάποια άτομα που μου συμπαραστάθηκαν σε όλη την πορεία αυτών των δύο χρόνων. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Σοφία Αγγελάκη, Καθηγήτρια Παθολογικής Ογκολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής μου εργασίας και τον κύριο Δημήτρη Μαυρουδή, Διευθυντή του Εργαστηρίου Μεταφραστικής Ογκολογίας, μέσω της έγκρισης του οποίου έγινα δεκτή στην ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου. Όσον αφορά το προσωπικό του εργαστηρίου, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υπεύθυνη για την εργαστηριακή μου εκπαίδευση, μεταδιδακτορική ερευνήτρια Μαρία Παπαδάκη, η οποία πέρα από την πληθώρα γνώσεων που μου μετέδωσε, ήταν πάντα διαθέσιμη να με βοηθήσει σε ότι προέκυπτε σχετικά με την εργαστηριακή πρακτική. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Χαρά Παπαδάκη, η οποία ήταν επίσης υπεύθυνη για την εργαστηριακή μου εκπαίδευση και μέσα από την άψογη συνεργασία μας έμαθα πολλά καινούργια πράγματα. Παρομοίως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Χαρούλα Κουτουλάκη, διδακτορική ερευνήτρια και την Κλείτα Μιχαηλίδου, μεταδιδακτορική ερευνήτρια, οι οποίες μου προσέφεραν τις συμβουλές τους ανά πάσα στιγμή σε ότι μπορεί να είχα ανάγκη. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω με ιδιαίτερη συγκίνηση τις συναδέλφους και φίλες μου Αλεξία Μοναστηριώτη, διδακτορική ερευνήτρια, και Δέσποινα Αγγουράκη, επιστημονική συνεργάτιδα, οι οποίες πέρα από την πολύτιμη βοήθεια τους στο κομμάτι των πειραμάτων, με την παρουσία τους συνέβαλαν πλήρως στη διατήρηση ενός ευχάριστου κλίματος καθημερινά, το οποίο ήταν ένα κίνητρο για να συνεχίζω την εργασία μου. Επιπροσθέτως, θέλω να ευχαριστήσω και όλο το υπόλοιπο προσωπικό του εργαστηρίου για όλη την υποστήριξη και βοήθεια που εισέπραξα από εκείνους κατά την παραμονή μου εκεί. Φυσικά, δεν γίνεται να παραλείψω να αναφέρω τους συμφοιτητές μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών, με τους οποίους μοιραστήκαμε πολλές απορίες, άγχη και φυσικά όμορφες στιγμές. Τέλος, ευχαριστώ θερμά την οικογένειά μου και τους φίλους μου, οι οποίοι με στήριξαν καθ' όλη αυτή την περίοδο των μεταπτυχιακών μου σπουδών, καθώς έδιναν το παρόν σε κάθε προβληματισμό και άγχος μου.

Περιεχόμενα

1. Περίληψη.....	5
2. Εισαγωγή.....	7
2.1. Καρκίνος του μαστού (ΚΜ).....	7
2.1.1. Επιδημιολογικά στοιχεία.....	8
2.1.2. Πρόγνωση.....	9
2.1.3. Διάγνωση.....	9
2.2. Μεταστατικός καρκίνος του μαστού.....	13
2.2.1. Επιδημιολογικά στοιχεία.....	13
2.2.2. Θέσεις μετάστασης.....	14
2.2.3. Θεραπεία μεταστατικού ΚΜ.....	16
2.3. Μηχανισμός μετάστασης.....	20
2.3.1. Απόδραση από τον όγκο και διήθηση γειτονικού ιστού.....	21
2.3.2. Ενδοαγγείωση.....	22
2.3.3. Επιβίωση των ΚΚΚ στην κυκλοφορία.....	22
2.3.4. Εξαγγείωση και δημιουργία μικρομετάστασης.....	23
2.3.5. Καρκινικός λήθαργος.....	23
2.4. Ανοσοποιητικό σύστημα και καρκίνος.....	24
2.4.1. Ανοσοδιαμόρφωση του καρκίνου (cancer immunoediting).....	24
2.4.2. Ανοσοδιαφυγή στον ΚΜ.....	28
2.5. Σύστημα Fas/FasL.....	29
2.5.1. Ο ρόλος των Fas/FasL στο ανοσοποιητικό σύστημα.....	29
2.5.2. Αποπτωτικό μονοπάτι FAS/FASL.....	29
2.5.3. Μη τυπικές λειτουργίες του συστήματος Fas/FasL στο ανοσοποιητικό σύστημα.....	31
2.5.4. Σηματοδότηση Fas/FasL στον καρκίνο.....	32
2.5.5. Ευρήματα για το ρόλο του Fas/FasL σε στερεούς όγκους.....	34
2.5.6. Διατάραξη της αποπτωτικής λειτουργίας στον ΚΜ.....	34
2.6. Υγρή βιοψία.....	35
2.6.1. Η ανάγκη για την εφαρμογή της υγρής βιοψίας.....	35
2.6.2. Τα στοιχεία της υγρής βιοψίας.....	36
2.6.3. Η χρησιμότητα της υγρής βιοψίας στον ΚΜ.....	38
3. Σκοπός.....	39
4. Υλικά και μέθοδοι.....	40
4.1. Ασθενείς και εθελοντές αιμοδότες.....	40
4.2. Καρκινική σειρά.....	40
4.2.1. Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς.....	40

4.3.	Απομόνωση μονοπύρηνων κύτταρων περιφερικού αίματος (ΜΚΠΑ) μέσω φυγοκέντρησης με διαβαθμισμένη πυκνότητα φικόλης	41
4.4.	Επίστρωση κυττάρων σε αντικειμενοφόρους πλάκες	42
4.5.	Τριπλός ανοσοφθορισμός	43
4.6.	Στατιστική ανάλυση	45
5.	Αποτελέσματα	46
5.1.	Χαρακτηριστικά των ασθενών και της νόσου.....	46
5.2.	Συχνότητα ανίχνευσης ΚΚΚ σε ασθενείς με μεταστατικό ΚΜ.....	47
5.3.	Συχνότητα έκφρασης Fas στα ΚΚΚ ασθενών με μεταστατικό ΚΜ.....	48
5.4.	Συχνότητα FasL στα ΚΚΚ ασθενών με μεταστατικό ΚΜ.	49
5.5.	Συν-έκφραση Fas και FasL στα ΚΚΚ ασθενών με μεταστατικό ΚΜ.	50
5.6.	Συχνότητα έκφρασης Fas και FasL στα ΜΚΠΑ ασθενών με μεταστατικό ΚΜ. 51	
5.7.	Συσχέτιση της έκφρασης των μορίων Fas και FasL στα ΚΚΚ και τα ΜΚΠΑ. 52	
5.8.1.	Συσχέτιση με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά.....	53
5.8.2.	Συσχέτιση με ανταπόκριση στη θεραπεία.....	54
5.8.3.	Συσχέτιση με την επιβίωση	54
6.	Συζήτηση.....	57
7.	Συμπεράσματα.....	64
8.	Βιβλιογραφία	65

1. Περίληψη

Το ανοσοποιητικό σύστημα κατέχει σημαντικό ρόλο στην επιτήρηση και την ανοσοδιαμόρφωση του καρκίνου. Ειδικότερα, μέσω του μηχανισμού της ανοσοδιαφυγής, τα καρκινικά κύτταρα ξεφεύγουν από την ανοσοεπιτήρηση και ξεκινούν να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα, οδηγώντας τελικά στην ογκογένεση. Η ανοσολογική απάντηση κατά του όγκου είναι μία δυναμική και συνεχώς μεταβαλλόμενη διαδικασία, ενώ έχει βρεθεί ότι συχνά διαφέρει μεταξύ του πρωτοπαθούς όγκου και της περιφέρειας. Επομένως η ανάλυση του πρωτοπαθούς όγκου δεν αρκεί για την σε βάθος διερεύνηση των μηχανισμών που διέπουν την ανοσολογική απάντηση αλλά και την ανοσοδιαφυγή του όγκου. Στα πλαίσια αυτά, θα μπορούσε να φανεί χρήσιμη η «υγρή βιοψία», η οποία εμπεριέχει την μελέτη των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (ΚΚΚ) στο περιφερικό αίμα των ασθενών. Πρόκειται για μία απλή και με δυνατότητα επανάληψης σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μέθοδο, που αντικατοπτρίζει το προφίλ του όγκου σε πραγματικό χρόνο. Πράγματι, πρόσφατα δεδομένα υποστηρίζουν τη συμβολή της μεθόδου στη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ των ανοσοκυττάρων και των καρκινικών κυττάρων σε πραγματικό χρόνο, με στόχο την καλύτερη κατανόηση της ανοσολογικής απάντησης και των μηχανισμών ανοσοδιαφυγής του καρκίνου.

Στην παρούσα εργασία θα χρησιμοποιηθεί η υγρή βιοψία για τη μελέτη μορίων και μονοπατιών που εμπλέκονται στην ανοσολογική απάντηση, σε ασθενείς με υποτροπιάζοντα ή εξαρχής μεταστατικό καρκίνο του μαστού, οι οποίοι πρόκειται να λάβουν πρώτης γραμμής θεραπεία. Ειδικότερα, θα μελετηθεί το μονοπάτι Fas/FasL (FS-7-associated surface antigen/Fs-7-associated surface antigen ligand), το οποίο ενέχεται στη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου και αποτελεί σημαντικό μηχανισμό για τη διατήρηση της ανοσολογικής ομοιόστασης, αλλά και για την ανοσοδιαφυγή του καρκίνου τόσο από την έμφυτη όσο και την προσαρμοστική ανοσία. Η έκφραση των μορίων Fas και FasL θα διερευνηθεί παράλληλα στα ΚΚΚ και στα φυσιολογικά μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος (ΜΚΠΑ) των ασθενών μέσω ανοσοκυτταροχημείας και παρατήρησης με μικροσκοπία φθορισμού. Η παρούσα μελέτη αναμένεται να συμβάλει στην έως τώρα υπάρχουσα γνώση γύρω από τους μηχανισμούς της ανοσοδιαφυγής στον καρκίνο του μαστού, να αναδείξει πιθανούς νέους στόχους ανοσοθεραπείας και να διερευνήσει περαιτέρω τη σημασία της υγρής βιοψίας στο εν λόγω πεδίο έρευνας.

Λέξεις κλειδιά : Καρκίνος μαστού, ανοσοδιαφυγή, κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, σύστημα Fas/FasL, ανοσοφθορισμός.

Abstract

The role of the immune system in cancer immunosurveillance and immunoeediting is vital. In particular, cancer cells exploit the mechanism of “immunoescape” to evade the immunosurveillance, which can lead to uncontrollable proliferation and finally to oncogenesis. While the immune response is a dynamic and constantly changeable biological process, its definition and characterization is limited by the conventional immunohistochemical analysis of the tumor. Therefore, “liquid biopsy” demonstrates great usefulness in this framework, as it involves the investigation of circulating tumor cells (CTCs) in the peripheral blood of cancer patients. It is a simple process with the choice of repetition in different time points, picturing the tumor profile in real time circumstances. Recent data claim the contribution of liquid biopsy in the investigation of the interactions between immune and cancer cells in real time, for the purpose of a better understanding regarding the immune response and the tumor immunoescape mechanisms.

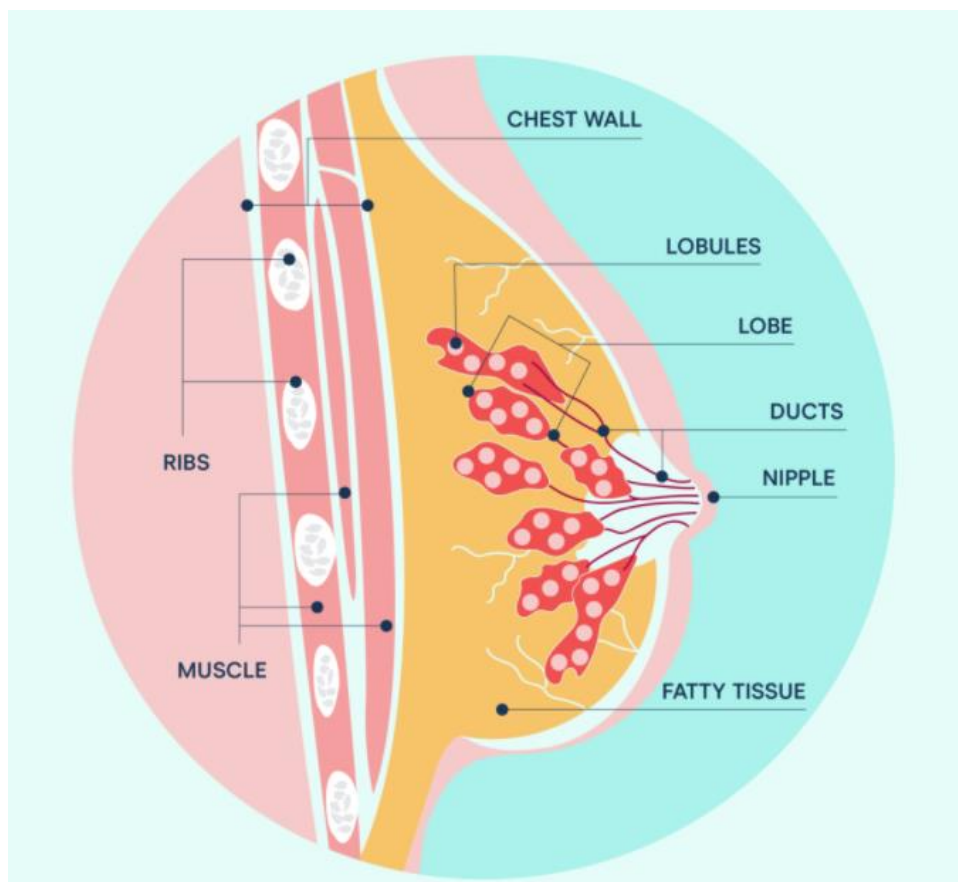
In the present study, molecules and pathways associated with the immune response will be investigated using the tool of liquid biopsy in breast cancer patients, of recurrent or de novo metastatic profile, about to receive their first line therapy. Specifically, the current study is focused on the pathway of Fas/FasL (FS-7-associated surface antigen/FS-7-associated surface antigen ligand) which is involved in the regulation of immune homeostasis, but also in tumor immunoescape, participating in both the innate and adaptive immunity. The expression of Fas and FasL molecules will be investigated simultaneously in CTCs and normal peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients' blood with the use of immunocytochemistry and microscopic observation. The present study is expected to contribute to the existing knowledge about the mechanisms of immunoescape in breast cancer, to highlight possible new goals of immunotherapy and to further explore the importance of liquid biopsy in this field of research.

Keywords: breast cancer, immune escape, circulating tumor cells, Fas/FasL system, immunofluorescence.

2. Εισαγωγή

2.1. Καρκίνος του μαστού (ΚΜ)

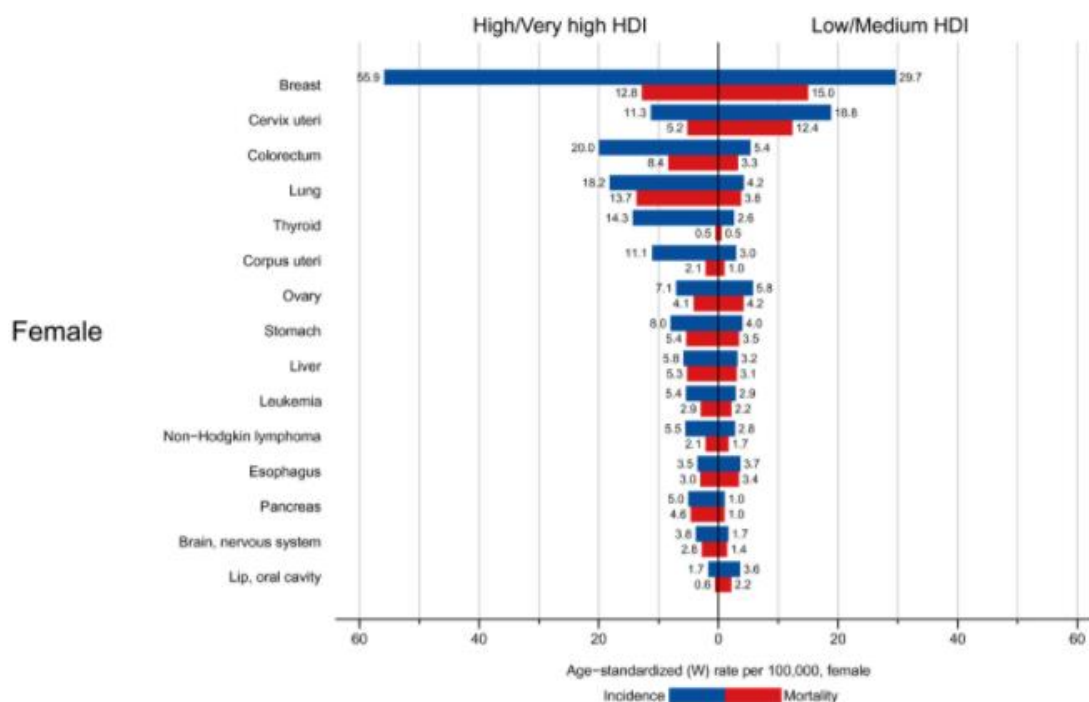
Ο καρκίνος του μαστού (ΚΜ) είναι μια ασθένεια κατά την οποία τα κύτταρα του μαστού πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα. Ο τύπος του ΚΜ εξαρτάται από το είδος των μαστικών κυττάρων τα οποία μετατρέπονται σε καρκινικά. Συγκεκριμένα, ένας μαστός αποτελείται από τους λοβούς, οι οποίοι είναι αδένες που εμπλέκονται στην παραγωγή γάλακτος, τους αγωγούς για τη μεταφορά του γάλακτος στη θηλή και συνδετικό ιστό, ο οποίος αποτελείται από ινώδη και λιπώδη ιστό. Οι περισσότεροι όγκοι στο μαστό ξεκινούν από τους αγωγούς ή τους λοβούς.¹ Ο ΚΜ εξελίσσεται με το χρόνο και μπορεί να διέλθει από μία “in situ” φάση, στην οποία τα καρκινικά κύτταρα έχουν αναπτυχθεί μόνο στην επένδυση των αγωγών και δεν έχουν εξαπλωθεί σε άλλα μέρη του μαστού. Παρόλα αυτά, την πλειονότητα των όγκων κατέχει ο διηθητικός τύπος, όπου η κακοήθεια έχει επεκταθεί στους γύρω ιστούς και λεμφαδένες πέρα από τους αγωγούς και τους αδένες του μαστού.²



Εικόνα 1. Απεικόνιση της ανατομίας του μαστού.³

2.1.1. Επιδημιολογικά στοιχεία

Τη χρονιά του 2020, διαγνώσθηκαν παγκοσμίως με ΚΜ 2.3 εκατομμύρια γυναίκες και καταγράφηκαν 685.000 θάνατοι. Επιπλέον, μέχρι το τέλος του 2020 συνολικά 7.8 εκατομμύρια εν ζωή γυναίκες καταγράφηκαν με διάγνωση ΚΜ, όσον αφορά το διάστημα των τελευταίων πέντε ετών, καθιστώντας τη συγκεκριμένη κακοήθεια την πιο συχνή στον κόσμο. Ο ΚΜ εμφανίζεται σε κάθε χώρα του κόσμου σε γυναίκες οποιασδήποτε ηλικίας, μετά την εφηβεία, αλλά με αυξανόμενα ποσοστά σε μεγαλύτερες ηλικίες.⁴ Με βάση τις δημοσιευμένες μελέτες, το ποσοστό εμφάνισης ΚΜ ποικίλλει σημαντικά ανάλογα τη φυλή και την εθνικότητα και είναι υψηλότερο στις ανεπτυγμένες χώρες, σε αντίθεση με το ποσοστό θνησιμότητας το οποίο είναι υψηλότερο στις αναπτυσσόμενες.⁵



Εικόνα 2. Ποσοστά επίπτωσης και θνησιμότητας διάφορων τύπων καρκίνου, με τον ΚΜ πρώτο σε θέση, σε γυναίκες σε χώρες με υψηλό/πολύ υψηλό δείκτη ανθρώπινης ανάπτυξης [Human Development Index (HDI)] σε σύγκριση με χώρες με χαμηλό/μέτριο HDI για το 2020. (GLOBOCAN 2020).⁶

2.1.2. Πρόγνωση

Όσον αφορά τους προγνωστικούς παράγοντες για τον ΚΜ αυτοί ποικίλουν. Αρχικά, το ποσοστό της επίπτωσης του ΚΜ αυξάνεται σημαντικά με την ηλικία και φτάνει στο αποκορύφωμά του κατά την εμμηνόπαυση, όπου στη συνέχεια σταδιακά μειώνεται ή παραμένει σταθερό.⁷ Ωστόσο, οι όγκοι του μαστού που διαγιγνώσκονται σε νεότερες γυναίκες τείνουν να εμφανίζονται σε μεγαλύτερο μέγεθος και πιο προχωρημένα στάδια, με θετικούς λεμφαδένες και συνήθως χειρότερη επιβίωση.⁸ Δεύτερον, αν και αρκετοί γενετικοί παράγοντες συμβάλλουν στη συχνότητα εμφάνισης του ΚΜ, περίπου το 40% των κληρονομικών περιπτώσεων συμβαίνουν λόγω μεταλλάξεων στα γονίδια BRCA1 και BRCA2 που κληρονομούνται με επικρατή αυτοσωμικό τρόπο.⁹ Έρευνες έχουν δείξει ότι 55-65% των φορέων της BRCA1 και 45% των φορέων της BRCA2 μετάλλαξης αναπτύσσουν ΚΜ μέχρι την ηλικία των 70 ετών.¹⁰ Τέλος, όσον αφορά τον τρόπο ζωής, η παχυσαρκία και το ενεργό κάπνισμα, ειδικά σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΚΜ.¹¹

2.1.3. Διάγνωση

2.1.3.1. Προληπτικός έλεγχος

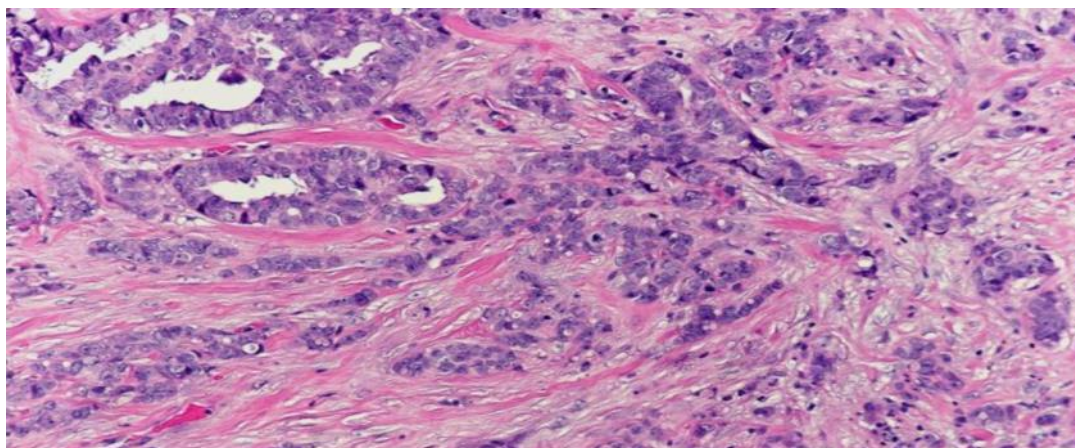
Ο ΚΜ διαγιγνώσκεται είτε μέσω του προληπτικού ελέγχου (screening) είτε λόγω εκδήλωσης ενός συμπτώματος (π.χ. πόνος ή ψηλαφητή μάζα) που χρήζει εξέτασης από ειδικό. Η εφαρμογή του screening σε υγιείς γυναίκες αποσκοπεί στην πρόωμη ανίχνευση όγκων που ιδανικά ανιχνεύονται με μικρότερο μέγεθος όγκου, με χαμηλότερες πιθανότητες μετάστασης και είναι πιο σπάνιο να οδηγήσουν σε ολική αφαίρεση του μαστού, σε εκτεταμένη μασχαλιαία χειρουργική επέμβαση και χημειοθεραπεία, δηλαδή έχουν μειωμένη νοσηρότητα.¹²

Η μαστογραφία κατέχει την πρώτη θέση όσον αφορά τη μείωση της θνησιμότητας λόγω ΚΜ. Συγκεκριμένα, ο μαστογραφικός έλεγχος οδηγεί σε συνολική μείωση της θνησιμότητας κατά 19%, με μικρότερο όφελος για τις γυναίκες ηλικίας 40 ετών (15%) και μεγαλύτερο όφελος για τις γυναίκες ηλικίας 60 ετών (32%). Συνεπώς, η έναρξη της εφαρμογής της μαστογραφίας συνιστάται από την ηλικία των 45 ετών ή νωρίτερα σε ειδικές περιπτώσεις κληρονομικότητας.¹³ Παράλληλα, για τις γυναίκες όπου ο κίνδυνος για ΚΜ είναι πάνω από 20%, συνιστάται η μαγνητική τομογραφία συνδυαστικά με τη μαστογραφία. Επιπρόσθετα, η χρήση υπερήχων αποτελεί

επιλογή εξέτασης για γυναίκες υψηλού κινδύνου οι οποίες είναι μη κατάλληλες για μαγνητική τομογραφία ή γυναίκες ενδιάμεσου κινδύνου με πυκνούς μαστούς.¹⁴

2.1.3.2. Παθολογική αξιολόγηση

Στην κλινική πράξη, ο παθολογικός ιστός συνήθως λαμβάνεται με βιοψία διά λεπτής βελόνης ή βιοψία με λήψη ιστοτεμαχίου ή με χειρουργική εκτομή. Για τη διάκριση των μορφολογιών χρησιμοποιούνται βοηθητικές ανοσοϊστοχημικές και μοριακές εξετάσεις. Παρόλα αυτά, ο χειρισμός του δείγματος, η μονιμοποίηση και η επεξεργασία του είναι κρίσιμα στοιχεία για την ποιότητα των ιστολογικών τομών και την περαιτέρω χρήση τους για αξιολόγηση με ανοσοϊστοχημεία, *in situ* υβριδοποίηση και μοριακή ανάλυση.¹⁵



Εικόνα 3. Διθητικό λοβιακό καρκίνωμα του μαστού, Grade 2. (Ανοσοϊστοχημεία)¹⁶





2.1.3.3. Προγνωστικοί δείκτες

Συχνά, οι θεραπευτικές αποφάσεις για τον ΚΜ λαμβάνονται βάση έκφρασης κάποιων πρωτεϊνών οι οποίες είναι ανεξάρτητες των μορφολογικών χαρακτηριστικών του όγκου. Συγκεκριμένα, η ανοσοϊστοχημική ανάλυση (IHC) τομών παραφίνης συνήθως πραγματοποιείται για την αξιολόγηση της έκφρασης του υποδοχέα οιστρογόνου (estrogen receptor, ER), του υποδοχέα προγεστερόνης (progesterone receptor, PR) και του Her-2/neu (human epidermal growth factor receptor-2). Η μελέτη της έκφρασης σε επίπεδο RNA ή DNA είναι επίσης μία συχνή μέθοδος για δείγματα από ιστό και ο *in situ* υβριδισμός χρησιμοποιείται συνήθως για την συμπληρωματική ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης του HER2. Επιπλέον, υπάρχει μεγάλο

ενδιαφέρον για την ανίχνευση γονιδίων στα πλαίσια της ιατρικής ακριβείας με τη χρήση τεχνικών αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS).¹⁷ Συγκεκριμένα, οι μικροσυστοιχίες DNA και η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης υψηλής απόδοσης για πολλαπλά γονίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατηγοριοποίηση των περιπτώσεων ΚΜ σε προγνωστικές ομάδες. Συνεπώς, αυτές οι γονιδιακές τεχνικές χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη της υποτροπής στον πρώιμο ΚΜ και συχνά καθορίζουν την επιλογή της συστηματικής θεραπείας.¹⁸

2.1.3.4. Σταδιοποίηση

Η φυσική εξέταση, η μαστογραφία ή η υπερηχοτομογραφία συνήθως επαρκούν για την τοπική σταδιοποίηση ενός πρόσφατα διαγνωσμένου όγκου στο μαστό. Παράλληλα, μια ακτινογραφία θώρακος και οι συνήθεις εργαστηριακές εξετάσεις αίματος επαρκούν για τη σταδιοποίηση των κλινικών σταδίων I ή II, όπου δεν υπάρχουν ενδείξεις μεταστατικής νόσου. Αντίθετα, όταν υπάρχει υποψία προχωρημένης νόσου (στάδιο IIIB/C ή IV), οι εθνικές οδηγίες προτείνουν είτε την υπολογιστική τομογραφία (CT) θώρακα, κοιλιάς και λεκάνης ή CT θώρακα σε συνδυασμό με μαγνητική τομογραφία κοιλιάς και λεκάνης, καθώς και τη σάρωση οστών ή PET/CT με φθοριούχο νάτριο.¹⁹

Tumor size	Tumor size < 2 cm	Tumor size 2-5 cm	Tumor size > 5 cm	Tumor extends to skin or chest wall
T	 T1	 T2	 T3	 T4
Lymph Nodes	N0 No lymph node metastasis	N1 Metastasis to ipsilateral, movable, axillary LNs	N2 Metastasis to ipsilateral fixed axillary, or IM LNs	N3 Metastasis to infraclavicular/supraclavicular LN, or to axillary and IM LNs
Metastasis	M0 No distant metastasis	M1 Distant metastasis	LNs= Lymph Nodes; IM= Internal Mammary	
M				

Εικόνα 4. Σταδιοποίηση ΚΜ βάση συστήματος TNM (tumor, nodes, metastasis).²⁰

2.1.3.5. Μοριακοί υπότυποι του ΚΜ

Ο ΚΜ χαρακτηρίζεται από τέσσερις μοριακούς υπότυπους, που ορίζονται από την έκφραση των υποδοχέων ορμονών (HR) και άλλων πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα οι υπότυποι είναι ο Luminal A ή HR+/HER2-, Luminal B ή HR+/HER2+, Triple-negative (TNBC) ή HR-/HER2- και HER2-θετικός.

Luminal A

Οι όγκοι που ανήκουν στην κατηγορία Luminal A, τον πιο συχνό μοριακό τύπο, τείνουν να αναπτύσσονται με πιο αργό ρυθμό συγκριτικά με τους υπόλοιπους τύπους. Ονομάζονται HR-θετικοί, καθώς ορίζονται από τη θετικότητά τους στους ορμονικούς υποδοχείς και συγκεκριμένα των ER και PR. Ένας όγκος ο οποίος είναι ER+ και/ή PR+ αναπτύσσεται λόγω της ύπαρξης των οιστρογόνων και/ή της προγεστερόνης στο μικροπεριβάλλον του, με αποτέλεσμα οι θεραπείες που μειώνουν τα επίπεδα αυτών των ορμονών να είναι αποτελεσματικές στη θεραπεία του. Επιπλέον, ο υπότυπος Luminal A περιγράφεται και ως HER2-αρνητικός. Το HER2 είναι μία πρωτεΐνη που παράγεται φυσιολογικά στον οργανισμό και παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την επιδιόρθωση των κυττάρων του μαστού. Ένας όγκος με φυσιολογική ποσότητα πρωτεΐνης HER2 θεωρείται HER2-αρνητικός.

Luminal B

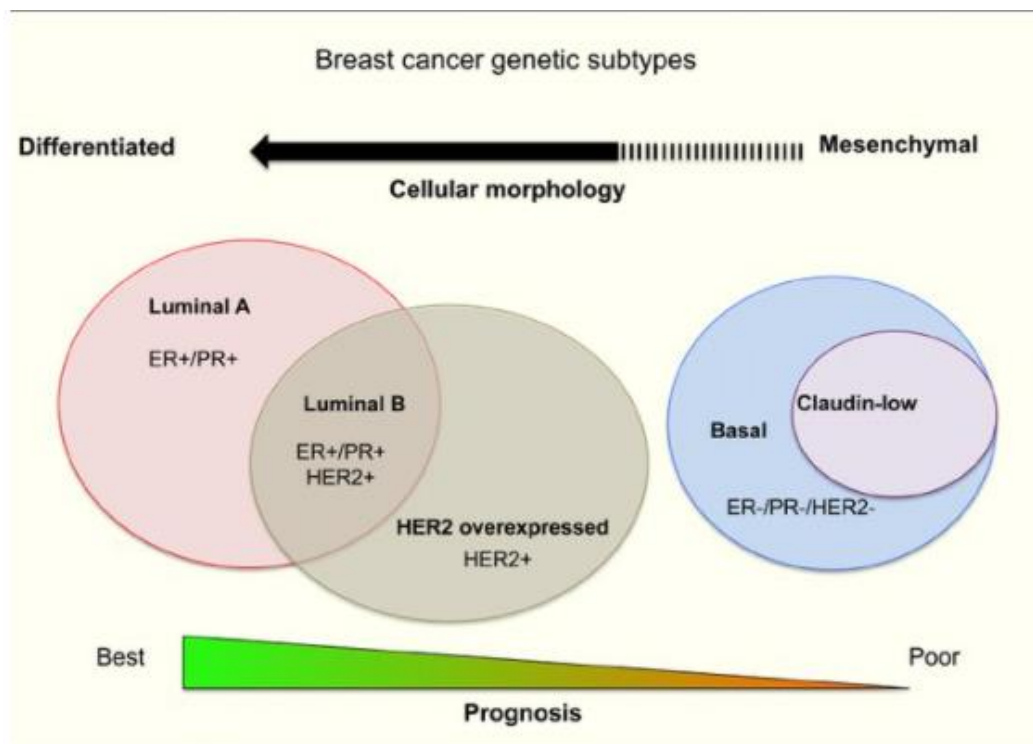
Τα καρκινικά κύτταρα του τύπου Luminal B τείνουν να αναπτύσσονται γρηγορότερα από τον Luminal A και θεωρούνται πιο επιθετικά. Είναι επίσης θετικά για τους ορμονικούς υποδοχείς και κάποιες φορές και για το HER2.

Triple-negative (τριπλά αρνητικός)

Σε αυτόν τον τύπο ΚΜ, τα κύτταρα δεν εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς ή HER2 και συνήθως πρόκειται για διηθητικό καρκίνωμα που ξεκινάει στους αγωγούς του μαστού. Ενώ στον ΚΜ θετικό για ορμονικούς υποδοχείς και για HER2 υπάρχουν στοχεύουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις, όπως η ορμονοθεραπεία και η anti-HER2 θεραπεία (trastuzumab, Herceptin®) αντίστοιχα, στον τριπλά αρνητικό ΚΜ αυτές δεν έχουν εφαρμογή. Συνεπώς, η χημειοθεραπεία, η ακτινοθεραπεία και οι στοχεύουσες θεραπείες, διαφορετικές της anti-HER2 προσέγγισης, αποτελούν τις θεραπευτικές επιλογές.

HER2-θετικός/HER2-εμπλουτισμένος

Ένας στους πέντε διηθητικούς τύπους ΚΜ είναι θετικός ως προς το HER2, καθιστώντας τον υπότυπο αυτό έναν από τους πιο συχνούς. Συγκεκριμένα, οι HER2-θετικοί όγκοι είναι πάντα ER- και PR-αρνητικοί. Ανάλογα με το στάδιο, οι θεραπευτικές επιλογές για τον HER2-θετικό ΚΜ μπορεί να περιλαμβάνουν τον συνδυασμό χειρουργικής επέμβασης, ακτινοθεραπείας, χημειοθεραπείας και/ή χορήγησης στοχεύουσας θεραπείας όπως το μονοκλωνικό αντίσωμα trastuzumab.²¹



Εικόνα 5. Σύνοψη των υπότυπων ΚΜ, Luminal A, Luminal B, TNBC και HER2+ σε συνάρτηση με την πρόγνωση και την κυτταρική μορφολογία.

2.2. Μεταστατικός καρκίνος του μαστού

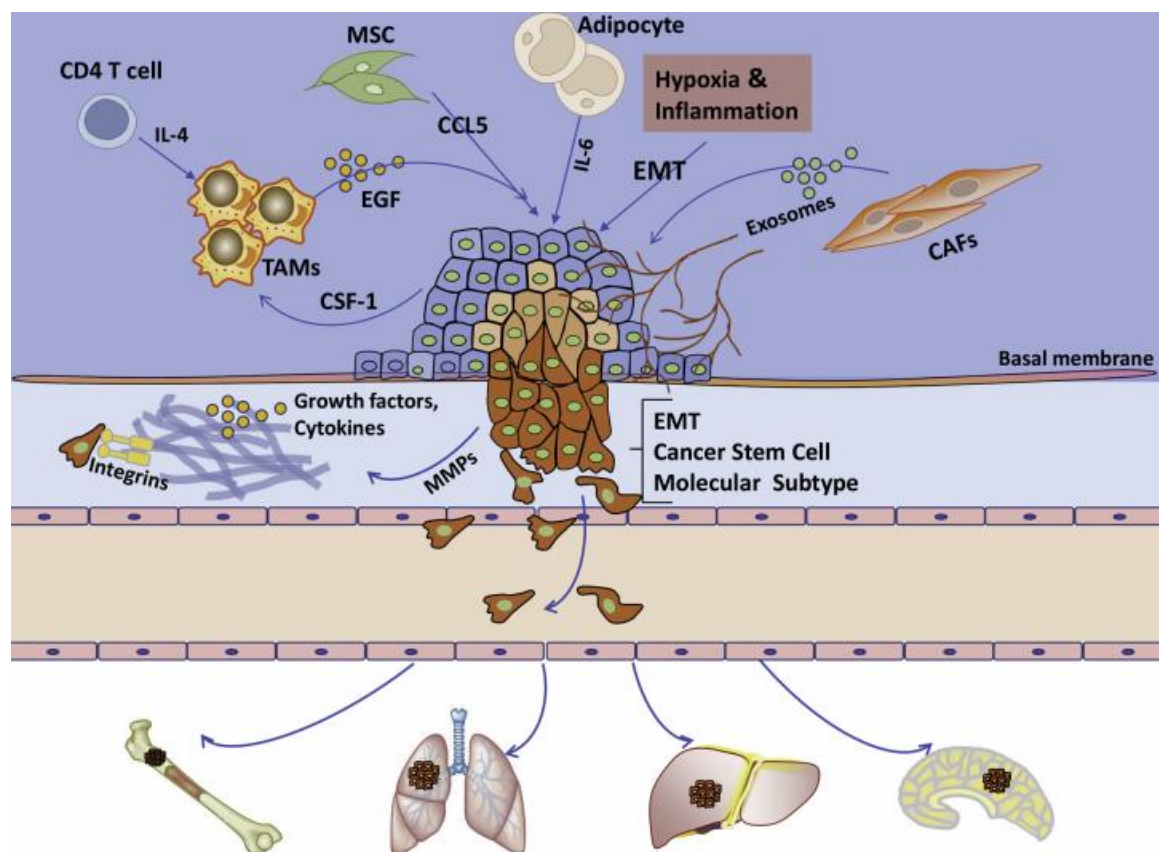
2.2.1. Επιδημιολογικά στοιχεία

Δυστυχώς, το ποσοστό εμφάνισης μεταστάσεων είναι αρκετά υψηλό όσον αφορά των ΚΜ. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι το 20-30% των ασθενών με ΚΜ μπορεί να αναπτύξουν μεταστάσεις μετά τη διάγνωση και τη θεραπεία του πρωτογενούς όγκου, ενώ το 6-10% των διαγνώσεων είναι εξ αρχής σταδίου IV, το οποίο ονομάζεται εξ' αρχής (de novo) μεταστατική νόσος. Επιπλέον, περίπου το 90% των θανάτων που σχετίζονται με τον ΚΜ αποδίδονται σε εκδήλωση μετάστασης.²² Το συνολικό ποσοστό 5ετούς επιβίωσης είναι μεγαλύτερο από 80% όσον αφορά τον πρώιμο ΚΜ

χωρίς μεταστάσεις. Ωστόσο, η ύπαρξη μακρινής μετάστασης μπορεί να οδηγήσει σε δραματική μείωση αυτού του ποσοστού περίπου στο 25%.²³

2.2.2. Θέσεις μετάστασης

Η μεταστατική νόσος εκδηλώνεται σε διακριτά όργανα, όπου τα συχνότερα είναι τα οστά, οι πνεύμονες, το ήπαρ και ο εγκέφαλος. Αυτή η μεταστατική ετερογένεια έχει ως επακόλουθο τις ποικίλες αποκρίσεις στη θεραπεία και την πρόγνωση του ασθενούς. Η μετάσταση στα οστά αντιπροσωπεύει περίπου το 75% των μεταστατικών περιπτώσεων και το συνολικό ποσοστό επιβίωσης σε διάστημα 5 ετών είναι 22,8%.²⁴ Οι πνεύμονες είναι η δεύτερη πιο συχνή περιοχή μετάστασης με τη συνολική επιβίωση διαστήματος 5 ετών να φτάνει το 16,8%, ενώ η εμφάνιση μετάστασης στο ήπαρ ακολουθεί, με το ποσοστό επιβίωσης να είναι χαμηλότερο και να αγγίζει το 8,5%.²⁵ Επιπροσθέτως, περίπου το 15-30% των ασθενών με μεταστατικό ΚΜ μπορεί να αναπτύξουν εγκεφαλικές μεταστάσεις, το οποίο στην πλειοψηφία των ασθενών επιφέρει σημαντικούς περιορισμούς όσον αφορά την ποιότητα και το προσδόκιμο ζωής, δεδομένης της εξαιρετικά μικρότερης επιβίωσης.²⁶



Εικόνα 6. Το διάγραμμα ροής της μετάστασης ΚΜ πρώιμου σταδίου.

Η μετάσταση στον ΚΜ είναι μία διαδικασία αποτελούμενη από πολλαπλά βήματα, στα οποία συμπεριλαμβάνονται η διείσδυση της βασικής μεμβράνης, η ενδαγγείωση στο κυκλοφορικό σύστημα, η εξαγγείωση στο όργανο στόχο και ο αποικισμός του. Εκτός από την αρχική μεταλλαξιγένεση, τα στρωματικά κύτταρα στο μικροπεριβάλλον βοηθούν τα καρκινικά κύτταρα να αποκτήσουν ικανότητα εισβολής σε απομακρυσμένα όργανα.²⁷

2.2.2.1. Μετάσταση στα οστά

Με βάση τα ιστολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά τους, οι οστικές μεταστάσεις μπορούν να ταξινομηθούν σε οστεολυτικές, οστεοσκληρωτικές ή μικτές. Η μετάσταση στα οστά πραγματοποιείται σε πολλά διαδοχικά στάδια με το μικροπεριβάλλον του όγκου και ειδικά τους ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο (Cancer Associated Fibroblasts, CAFs) να αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες.²⁸

2.2.2.2. Μετάσταση στους πνεύμονες

Τα καρκινικά κύτταρα του μαστού μπορούν να επαναπρογραμματίσουν το μικροπεριβάλλον του πνεύμονα για να δημιουργήσουν προ-μεταστατικές θέσεις, να επάγουν την περαιτέρω εξαγγείωση, τον αποικισμό και τη μεταστατική ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, τα εκκρινόμενα, από τα καρκινικά κύτταρα μόρια που βρίσκονται στην κυκλοφορία και τα στρατολογημένα μονοκύτταρα οδηγούν σε αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα και ενισχύουν την εξαγγείωση των καρκινικών κυττάρων.²⁹

2.2.2.3. Μετάσταση στο ήπαρ

Τα καρκινικά κύτταρα του μαστού εκκρίνουν διάφορα μόρια για να ενισχύσουν την αγγειακή διαπερατότητα και να ρυθμίσουν την έκφραση επιφανειακών δεικτών, με σκοπό τη διευκόλυνση της προσκόλλησης τους στο ενδοθήλιο και την εξαγγείωση. Τα στρωματικά κύτταρα κατέχουν καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της ενσωμάτωσης των καρκινικών κυττάρων στο παρέγχυμα του ήπατος. Επιπλέον, η μεσεγγυματική σε επιθηλιακή μετάπτωση (Mesenchymal–epithelial transition, MET) είναι ένας μηχανισμός που συντονίζει την επαφή των καρκινικών κυττάρων με τα ηπατοκύτταρα και ενισχύει τη μετατροπή των μεσεγγυματικών κυττάρων σε CAFs.²⁷

2.2.2.4. Μετάσταση στον εγκέφαλο

Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός (blood–brain barrier, BBB) χαρακτηρίζεται από την επιλεκτική διάχυση στο επίπεδο του μικροαγγειακού εγκεφαλικού ενδοθηλίου. Ένα από τα σημαντικότερα εμπόδια για τον αποικισμό του εγκεφάλου από τα καρκινικά κύτταρα είναι η μειωμένη ικανότητα εξαγγείωσης σε όλο τον BBB. Παρόλα αυτά, μόρια όπως ο VEGF (vascular endothelial growth factor)/VEGFR και πολλά άλλα εμπλέκονται στην εξαγγείωση των καρκινικών κυττάρων και στη διάσπαση του BBB. Τα καρκινικά κύτταρα αλληλεπιδρούν με τα εγκεφαλικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ενός πλήθους διαφορετικών ογκογόνων σηματοδοτικών μονοπατιών.²⁷

2.2.3. Θεραπεία μεταστατικού ΚΜ

Ο μεταστατικός ΚΜ έχει μία μοναδική παθοφυσιολογία που τον ξεχωρίζει από τους υπόλοιπους τύπους καρκίνου. Η κλινική εκδήλωση της νόσου μπορεί να εμφανιστεί δεκαετίες μετά την διάγνωση του πρώιμου ΚΜ, το οποίο καθιστά την χειρουργική εκτομή μη εφαρμόσιμη θεραπευτική επιλογή, με την πρόοδο νόσου να είναι αναπόφευκτη. Ενώ η πρόγνωση της νόσου έχει βελτιωθεί τα τελευταία 30 χρόνια, τα ποσοστά επιβίωσης παραμένουν χαμηλά με μόνο το 2–5% των ασθενών που διαγνώστηκαν με μεταστατικό ΚΜ να επιβιώνουν σε διάστημα 10 χρόνων.³⁰ Επί του παρόντος, ο μεταστατικός ΚΜ θεωρείται ανίατη ασθένεια και η θεραπεία του επικεντρώνεται στην παράταση της ζωής του ασθενούς και στην ανακούφιση των συμπτωμάτων που σχετίζονται με τη νόσο. Εξάιρεση από αυτή τη γενική αρχή αποτελεί ένα μικρό υποσύνολο ασθενών που παρουσιάζουν ολιγομεταστατική νόσο που χαρακτηρίζεται από μονές ή πολύ λίγες μεταστατικές εναποθέσεις.

2.2.3.1. Τοπικές θεραπείες

Χειρουργική θεραπεία

Εκτιμάται ότι λιγότερο από το 10% των ασθενών που παρουσιάζουν μεταστατικό ΚΜ είναι κατάλληλοι για χειρουργική αφαίρεση. Επίσης, η αποτελεσματικότητα της χειρουργικής εκτομής έχει αναδειχθεί κυρίως σε ασθενείς με ηπατικές μεταστάσεις, καθώς έχει συσχετιστεί με ευνοϊκότερη μακροχρόνια επιβίωση, με ποσοστά επιβίωσης 86% και 61% για διαστήματα 2 και 5 ετών, αντίστοιχα. Επιπλέον, η ηπατική χειρουργική επέμβαση έχει επιτρέψει τη διακοπή της χημειοθεραπείας στο

46% των περιπτώσεων μεταστατικού ΚΜ, παρατείνοντας τελικά τη συνολική επιβίωση.³¹

Ακτινοθεραπεία

Η ακτινοθεραπεία χρησιμοποιεί ακτινοβολία υψηλής ενέργειας η οποία στοχεύει στην καταστροφή του DNA των καρκινικών κυττάρων, με αποτέλεσμα τη νέκρωση, απόπτωση ή επιταχυνόμενη γήρανσή τους. Η ακτινοβολία είναι πιο αποτελεσματική σε περιπτώσεις όπου υπάρχουν σχετικά λίγα κακοήθη και με επαρκή αγγείωση κύτταρα. Ως εκ τούτου, η ακτινοθεραπεία έχει αποδειχθεί ότι είναι πιο κατάλληλη για κύτταρα στην περιφέρεια του όγκου, σε αντίθεση με το κέντρο του όπου υπάρχει μεγάλος όγκος κυττάρων που βρίσκονται συνήθως σε υποξικές συνθήκες.³² Ωστόσο, η ακτινοθεραπεία σε μεταστατικές ασθένειες προορίζεται σχεδόν αποκλειστικά για την ανακούφιση των συμπτωμάτων, με συχνότερη περίπτωση τις οστικές μεταστάσεις. Παρόλα αυτά, έχει δυνητικά έναν θεραπευτικό ρόλο στη θεραπεία των μεταστάσεων του ΚΝΣ. Οι εγκεφαλικές μεταστάσεις εμφανίζονται σε περίπου 10–16% των περιπτώσεων μεταστατικού ΚτΜ, συνήθως σε γυναίκες με μεγαλύτερους όγκους και πιο επιθετικούς ιστολογικούς υπότυπους. Η ακτινοβολία ολόκληρου του εγκεφάλου και η στερεοτακτική ακτινοβολία αποτελούν επί του παρόντος το πρότυπο φροντίδας για μεταστάσεις του ΚΝΣ.³³

2.2.3.2. Συστηματικές θεραπείες

Ορμονική θεραπεία

Μετά τη χειρουργική επέμβαση, η ορμονική θεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετη θεραπευτική επιλογή εφόσον κριθεί κατάλληλη για τον ασθενή. Τα καρκινικά κύτταρα αναφέρονται ως ορμονοθετικά εάν εκφράζουν τον ER και/ή PR. Για τον ορμονοθετικό ΚΜ, η ορμονική θεραπεία είναι η πρώτη επιλογή θεραπείας υπό τον όρο ότι ο ασθενής δεν πάσχει από μεταστατική ασθένεια που απειλεί τη λειτουργία των σπλαχνικών οργάνων. Τυχασιοποιημένες μελέτες έχουν δείξει ότι η έναρξη της ορμονικής θεραπείας αποδίδει συγκρίσιμα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα με τη χημειοθεραπεία, αποφεύγοντας παράλληλα τις αρνητικές παρενέργειες. Η ορμονική θεραπεία επιδρά με σκοπό τη διακοπή ή την καθυστέρηση της εξέλιξης των ορμονοευαίσθητων όγκων, είτε εμποδίζοντας την ικανότητα του σώματος να παράγει ορμόνες είτε παρεμβαίνοντας στην δράση αυτών των ορμονών στα καρκινικά κύτταρα του μαστού.³⁴

Οι αγωνιστές εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών εμποδίζουν τη λειτουργία των ωοθηκών παρεμβαίνοντας σε υποφυσιακά σήματα που διεγείρουν την παραγωγή οιστρογόνων στις ωοθήκες. Εναλλακτικά, η παραγωγή οιστρογόνων μπορεί να αποκλειστεί μέσω αναστολέων αρωματάσης, το ένζυμο που χρησιμοποιείται από τους περιφερικούς ιστούς για την παραγωγή οιστρογόνων. Οι επιλεκτικοί ρυθμιστές των υποδοχέων οιστρογόνων είναι συνθετικά μόρια που συνδέονται με ER, αποτρέποντας τη δέσμευση των οιστρογόνων. Σε αυτήν την κατηγορία ρυθμιστών ανήκει η ταμοξιφαίνη, η οποία εμποδίζει τις επιδράσεις των οιστρογόνων στον ιστό του μαστού (δρώντας ως ανταγωνιστής οιστρογόνων), αλλά στη μήτρα και στα οστά έχει παρόμοια συμπεριφορά με τα οιστρογόνα (δρα ως αγωνιστής οιστρογόνου).³⁵

Χημειοθεραπεία

Η χημειοθεραπεία χορηγείται είτε ως νέο-συμπληρωματική θεραπεία, πριν από τη χειρουργική επέμβαση, έτσι ώστε να απαιτείται η αφαίρεση λιγότερου ιστού, είτε ως συμπληρωματική θεραπεία μετά τη χειρουργική επέμβαση. Τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα για τον μεταστατικό ΚΜ περιλαμβάνουν τις ταξάνες, ανθρακυκλίνες και αντιμεταβολίτες. Οι ταξάνες, όπως η δοσεταξέλη και η πακλιταξέλη, είναι αναστολείς μικροσωληνίσκων και είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι αντικαρκινικοί παράγοντες για το μεταστατικό ΚΜ. Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει ένας αυξανόμενος αριθμός κλινικών δοκιμών που τονίζουν τα πλεονεκτήματα που έχουν οι ταξάνες όσον αφορά στην επιβίωση χωρίς πρόοδο νόσου σε μεταστατική ασθένεια. Επιπλέον, η θεραπεία με βάση την ταξάνη είναι επί του παρόντος η κύρια επιλογή θεραπείας για ασθενείς που είχαν προηγουμένως υποβληθεί σε θεραπεία με ανθρακυκλίνες και αντιμετώπισαν πρόοδο ή υποτροπή της νόσου.³⁶

Στοχεύουσες θεραπείες

Το HER2 υπερεκφράζεται σε περίπου 30% των περιπτώσεων ΚΜ. Όταν το HER2 ενισχύεται, ο διαμεμβρανικός γλυκοπρωτεϊνικός υποδοχέας HER2 εκφράζεται σε αφύσικα υψηλά επίπεδα στα κακοήθη κύτταρα. Τα HER2+ κύτταρα συσχετίζονται με πιο κλινικά επιθετική νόσο και χειρότερη πρόγνωση λόγω μικρότερου διαστήματος ελεύθερου νόσου και ολικής επιβίωσης. Οι HER2+ όγκοι αντιμετωπίζονται συνήθως με παράγοντες κατά του HER2 όπως το trastuzumab. Το trastuzumab είναι ένα ανασυνδυασμένο μονοκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει και στοχεύει μια εξωκυτταρική περιοχή του P185HER2.³⁷ Ένα άλλο μονοκλωνικό αντίσωμα που

χρησιμοποιείται ως στοχεύουσα θεραπεία είναι το bevacizumab, το οποίο αναγνωρίζει τον VEGF. Ο VEGF είναι γνωστό ότι προάγει την αγγειογένεση και εμπλέκεται στο μηχανισμό μετάστασης.³⁸

Ανοσοθεραπεία

Το ταχέως αναδυόμενο πεδίο της ανοσοθεραπείας αποτελεί μια πιθανή θεραπευτική προσέγγιση για την αύξηση της μακροχρόνιας επιβίωσης στον μεταστατικό ΚΜ. Τα σημεία ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος (immune checkpoints) είναι σημαντικά ρυθμιστικά μονοπάτια που έχουν ανασταλτική ή διεγερτική επίδραση στη λειτουργία του. Όσον αφορά την εξέλιξη του όγκου, τα καρκινικά κύτταρα είναι σε θέση να παραβιάζουν αυτά τα σημεία ελέγχου και να αναστέλλουν την αντικαρκινική δράση των Τ κυττάρων προς όφελός τους. Η διερεύνηση των αναστολέων σημείων ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος έχει δείξει ότι οι πιο υψηλά μεταλλαξιγόνοι καρκίνοι, δηλαδή, εκείνοι που είναι λιγότερο πιθανό να ανταποκριθούν σε τυπικές στοχεύουσες θεραπείες με βάση τις κινάσες, είναι πιο πιθανό να ανταποκριθούν σε θεραπεία με στόχευση των CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) ή PD-1 / PD-L1.³⁹

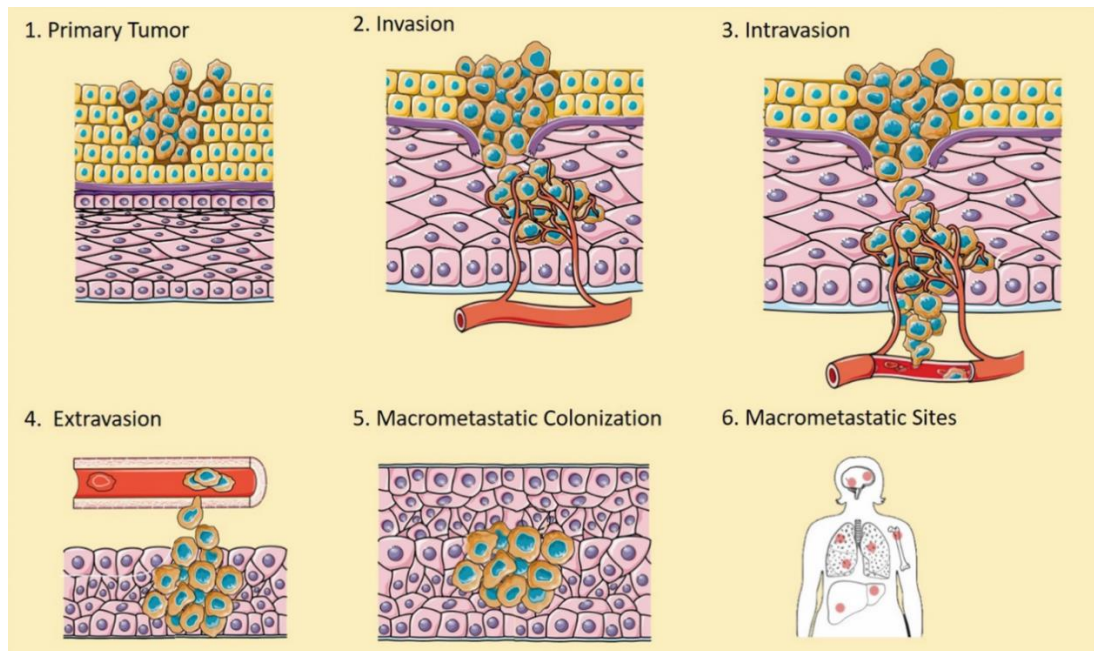
Το CTLA-4 είναι ένα σημαντικό σημείο ελέγχου του ανοσοποιητικού το οποίο εκφράζεται στα Τ-κύτταρα και ρυθμίζει την ενεργοποίησή τους, αποτρέποντας την έναρξη μιας υπερβολικά εντατικής Τ απόκρισης. Η αναστολή της δραστηριότητας των Τ-κυττάρων από το CTLA-4 αδρανοποιεί τις αντικαρκινικές δράσεις των κυτταροτοξικών Τ-κυττάρων, οπότε και ο αποκλεισμός του CTLA-4, ως μέσου για την ενίσχυση της αντικαρκινικής απόκρισης των ενεργοποιημένων Τ-κυττάρων, έχει προταθεί ως πιθανή θεραπεία. Ωστόσο, απαιτούνται πρόσθετες μελέτες σχετικά με τις εφαρμογές της αναστολής του CTLA-4 για τη θεραπεία του μεταστατικού ΚΜ.⁴⁰

Ένα δεύτερο σημείο ελέγχου του ανοσοποιητικού συστήματος είναι ο PD-1 υποδοχέας. Σε υγιείς ιστούς, το συγκεκριμένο μόριο εμπλέκεται στη μείωση της ενεργοποίησης των Τ-κυττάρων κατά τη διάρκεια μιας φλεγμονώδους απόκρισης για την πρόληψη της αυτοανοσίας. Ο μηχανισμός δράσης περιλαμβάνει τη δέσμευση του συνδέτη PD-1 (PDL-1), που βρίσκεται στην κυτταρική επιφάνεια, στον υποδοχέα PD-1, ο οποίος βρίσκεται στα Τ-κύτταρα. Έχει παρατηρηθεί υπερ-έκφραση του PDL-1 σε διάφορους τύπους όγκων, ειδικά στον τριπλά αρνητικό ΚΜ. Παρόλα αυτά, απαιτούνται πρόσθετες κλινικές μελέτες για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας της στόχευσης αυτών των μορίων στο μεταστατικό ΚΜ.⁴¹

2.3. Μηχανισμός μετάστασης

Η καρκινογένεση στο μαστό είναι μια πολύπλοκη διαδικασία στην οποία τα επιθηλιακά κύτταρα αποκτούν γενετικές αλλοιώσεις που τους επιτρέπουν να προχωρήσουν στη δημιουργία ενός κακοήθους όγκου και στη συνέχεια να μετασταθούν σε απομακρυσμένα όργανα. Ο δημιουργούμενος όγκος φέρει μοριακή και φαινοτυπική ετερογένεια, τόσο εντός του όσο και εκτός του. Επιπλέον, οι κλωνικοί πληθυσμοί των καρκινικών κυττάρων μπορεί να βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις εντός του ίδιου όγκου, μία ιδιότητα γνωστή ως «χωρική ετερογένεια», καθώς και να εξελίσσονται με την πάροδο του χρόνου, διαφοροποιώντας τον πρωτογενή όγκο από μία μεταγενέστερη υποτροπή, μία ιδιότητα γνωστή ως «χρονική ετερογένεια». Αυτή η υψηλή ετερογένεια συχνά επηρεάζει την αποδοτικότητα της θεραπείας, εξηγώντας εν μέρει την περιορισμένη αποτελεσματικότητα των στοχευουσών θεραπειών.⁴²

Παρά τον μεγάλο αριθμό καρκινικών κυττάρων που διοχετεύονται καθημερινά στην κυκλοφορία, πειραματικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι μόνο ένα μικρό κλάσμα αυτών των κυττάρων είναι ικανό να σχηματίσει μακροσκοπικές μεταστάσεις, υποδεικνύοντας ότι η μετάσταση είναι μια αναποτελεσματική διαδικασία. Ο βασικός λόγος για αυτήν την αναποτελεσματικότητα είναι η καταστροφή των ΚΚΚ από την επίθεση από το ανοσοποιητικό σύστημα. Συνεπώς, θα δημιουργήσουν με επιτυχία μεταστάσεις μόνο τα καρκινικά κύτταρα που έχουν την ικανότητα να επιβιώσουν στην κυκλοφορία του αίματος, να προσαρμοστούν στον απομακρυσμένο ιστό και στο νέο μικροπεριβάλλον και να προκαλέσουν αγγειογένεση.⁴³



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση του μεταστατικού καταρράκτη. Μετά τον σχηματισμό του πρωτογενούς όγκου (1), τα κακοήθη κύτταρα εισβάλλουν στο μικροπεριβάλλον του όγκου και στο στρώμα (2), εισχωρούν στο αίμα και / ή τα λεμφικά αγγεία (3) εξαγγειώνονται σε μια μακρινή θέση (4) και δημιουργούν μακρομεταστατικές αποικίες (5) με αποτέλεσμα την ανάπτυξη μεταστατικών εστιών σε συγκεκριμένα μέρη του σώματος, ιδίως στον εγκέφαλο, τους πνεύμονες, το ήπαρ και τα οστά (6).⁴⁴

2.3.1. Απόδραση από τον όγκο και διήθηση γειτονικού ιστού

Στα πρώτα βήματα της μετάστασης, τα κύτταρα είτε μεμονωμένα είτε σε συστάδες, αποσπώνται από τον πρωτογενή όγκο και εισβάλλουν στον περιβάλλοντα ιστό. Για να συμβεί αυτό, τα καρκινικά κύτταρα επιθηλιακής προέλευσης χάνουν την πολικότητά τους και τροποποιούν τις δυνάμεις προσκόλλησης, έτσι ώστε να αποφύγουν τη διαδικασία της απόπτωσης. Οι μοριακές και δομικές αλλαγές που απαιτούνται για την εισβολή των καρκινικών κυττάρων μεσολαβούνται από μία διαδικασία διαφοροποίησης που ονομάζεται επιθηλιακή σε μεσεγχυματική μετάπτωση (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT). Αυτή περιλαμβάνει το γενετικό αναπρογραμματισμό των επιθηλιακών κυττάρων ώστε να αποκτήσουν μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά και ιδιότητες που προσομοιάζουν τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (Cancer Stem Cells, CSCs). Εκτός από την εισβολή στον περιβάλλοντα ιστό, τα χαρακτηριστικά που αποκτούν τα καρκινικά κύτταρα μέσω του EMT είναι επίσης σημαντικά για την εισβολή στην κυκλοφορία του αίματος και για την

ενεργοποίηση πρωτεασών που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση του εξωκυττάριου χώρου (Extracellular Matrix, ECM).⁴⁵

2.3.2. Ενδοαγγείωση

Τα εισβάλλοντα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να διεισδύουν στη βασική μεμβράνη, στα ενδοθηλιακά τοιχώματα και τα λεμφικά αγγεία, προκειμένου να εξαπλωθούν σε μακρινές θέσεις για τον σχηματισμό μεταστάσεων. Για να ολοκληρωθεί αυτή η διαδικασία, απαιτείται προηγουμένως η αγγειογένεση ή/και λεμφαγγειογένεση. Τα αγγεία που δημιουργούνται από τον όγκο παρουσιάζουν ασθενείς συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων, το οποίο διευκολύνει την εισβολή και την παθητική απόρριψη των ΚΚΚ στην κυκλοφορία. Ωστόσο, η διατάραξη της ενδοθηλιακής ακεραιότητας αυξάνει τον αριθμό των κυττάρων που εισέρχονται στο αίμα ή στα λεμφικά αγγεία και ως εκ τούτου αυξάνει το μεταστατικό δυναμικό. Επιπλέον, η λεμφική διασπορά παίζει σημαντικό ρόλο στην εξάπλωση των κυττάρων στον ΚΜ. Ο προσδιορισμός του κατά πόσο η νόσος έχει εξαπλωθεί στους περιφερικούς λεμφαδένες είναι κρίσιμος για τη σταδιοποίηση ενός νεοδιαγνωσθέντος ασθενούς και αποτελεί ισχυρό προγνωστικό παράγοντα υποτροπής και επιβίωσης. Τα κύτταρα του όγκου που διασπείρονται στους λεμφαδένες, τελικά εξέρχονται μέσω των εκφυλισμένων λεμφικών αγγείων και χρησιμοποιούν το αιματογενές σύστημα που αρδεύει τους λεμφαδένες, με σκοπό να φθάσουν στην κυκλοφορία του αίματος και να εξαπλωθούν σε δευτερογενή όργανα.⁴⁶

2.3.3. Επιβίωση των ΚΚΚ στην κυκλοφορία

Κατά τη διέλευση τους στην κυκλοφορία, τα ΚΚΚ έρχονται αντιμέτωπα με διάφορα εμπόδια, όπως τις συγκρούσεις με τα κύτταρα του αίματος, την επίθεση από το ανοσοποιητικό σύστημα και το οξειδωτικό στρες, τα οποία επηρεάζουν την επιβίωσή τους και την ικανότητά τους να δημιουργούν μεταστατικές εστίες. Έχει μεγάλο ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα ΚΚΚ που υποβλήθηκαν σε EMT είναι πιο ανθεκτικά από τα επιθηλιακά ΚΚΚ και η εύρεση των μεσεγχυματικών χαρακτηριστικών στο αίμα των ασθενών είναι πιο συχνή.⁴⁷ Επίσης, τα ΚΚΚ επιβιώνουν στην κυκλοφορία χωρίς να εξαρτώνται από τις αλληλεπιδράσεις προσκόλλησης που συμμετέχουν στην πολλαπλασιαστική σηματοδότηση, ενώ παράλληλα αποκτούν μηχανισμούς

αντίστασης στην απόπτωση. Όσον αφορά την επίθεση από το ανοσοποιητικό σύστημα, αυτό επιτυγχάνεται ιδιαίτερα από τα φυσικά κύτταρα φονείς (Natural Killer Cells, NK). Επιπροσθέτως, προκειμένου να αποφύγουν την ανοσολογική επιτήρηση, τα ΚΚΚ συνεργάζονται με τα αιμοπετάλια προκαλώντας τη συσσωμάτωσή τους, η οποία λειτουργεί ως φυσική ασπίδα προστασίας.⁴⁸ Συμπερασματικά, όλες αυτές οι «δυσκολίες» ευθύνονται για το χαμηλό ποσοστό επιβίωσης των ΚΚΚ στην κυκλοφορία του αίματος, καθιστώντας τη μετάσταση μια σχετικά μη αποτελεσματική διαδικασία.

2.3.4. Εξαγγείωση και δημιουργία μικρομετάστασης

Τα ΚΚΚ τελικά εξαγγειώνονται και εγκαταλείπουν το κυκλοφορικό σύστημα. Για να γίνει αυτό, τα κύτταρα περνάνε σε μικρά τριχοειδή αγγεία, προσκολλώνται στην επένδυση του ενδοθηλίου των αιμοφόρων αγγείων και τελικά υποβάλλονται σε διαενδοθηλιακή μετανάστευση. Κατά την εξαγγείωση, τα ΚΚΚ για να επανακτήσουν την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα πρέπει να υποβληθούν σε μεσεγγυματική σε επιθηλιακή μετάπτωση (MET), με σκοπό την επιστροφή τους σε επιθηλιακό φαινότυπο, και να αποδράσουν από την επιτήρηση του ανοσοποιητικού συστήματος, κυρίως από τα Τ και τα ΝΚ κύτταρα.⁴⁹ Η επιτυχία της δημιουργίας της μετάστασης καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό τη θέση της μεταστατικής εστίας, το οποίο προσδιορίζει τις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρκινικών κυττάρων, των κυττάρων της θέσης (π.χ. οστεοβλάστες στα οστά, ηπατοκύτταρα στο ήπαρ, αστροκύτταρα στον εγκέφαλο), του ECM και των ανοσοκυττάρων. Παράλληλα, τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να δημιουργήσουν μια «προ-μεταστατική κατάσταση» κατά την οποία οι πρωτοπαθείς όγκοι απελευθερώνουν σήματα (κυτοκίνες, εξωσώματα, κ.ά) που δημιουργούν ένα πιο ανεκτικό και φιλικό μικροπεριβάλλον ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού.⁵⁰

2.3.5. Καρκινικός λήθαργος

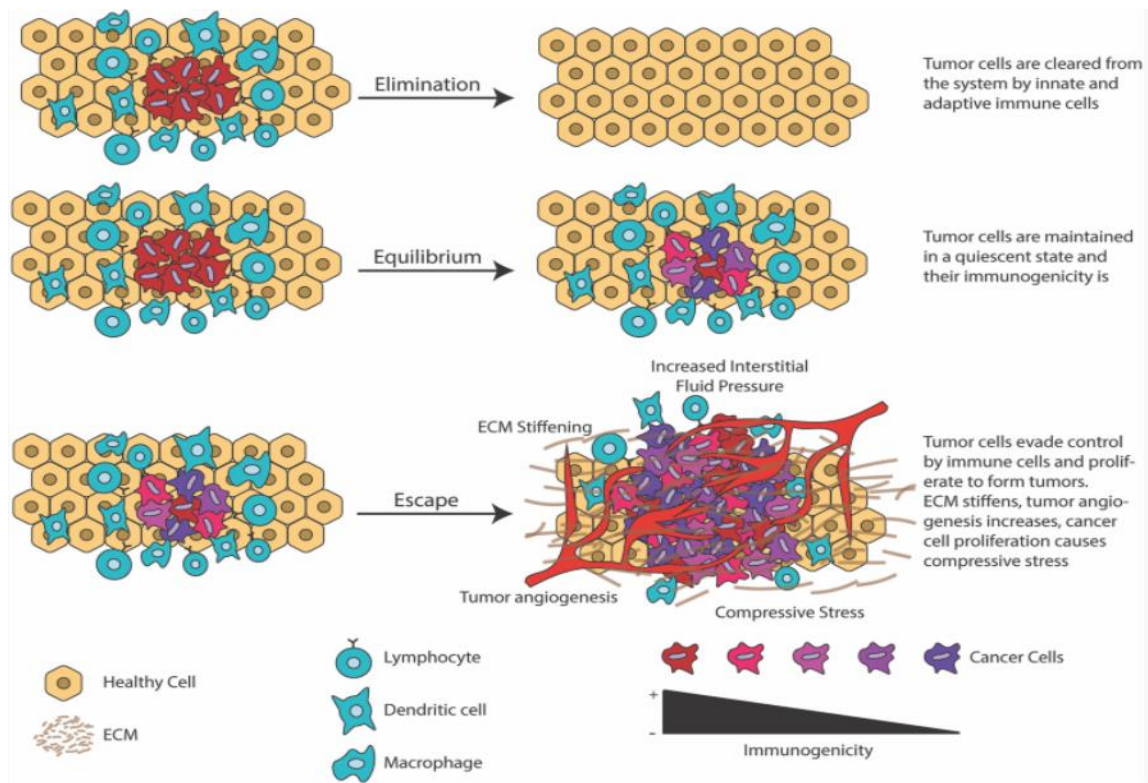
Στον ΚΜ η αρχική διασπορά των καρκινικών κυττάρων λαμβάνει χώρα στο λεμφικό σύστημα, όπου αφού φτάσουν στο λεμφαδένα φρουρό, περνάνε στην κυκλοφορία με την έξοδό τους από τα λεμφικά αγγεία. Όπως προαναφέρθηκε, ο συγκεκριμένος τύπος καρκίνου έχει κάποιες οργανο-ειδικές προτιμήσεις όσον αφορά τη θέση στην

οποία θα μετασταθεί, το οποίο φαίνεται να οφείλεται σε μοριακές αλληλεπιδράσεις και πράγματι, έχουν αναγνωρισθεί αρκετά γονίδια που θεωρούνται υπεύθυνα για την «κλίση» των καρκινικών κυττάρων του μαστού για τα οστά, τους πνεύμονες, το ήπαρ και τον εγκέφαλο. Η ανίχνευση των μεταστάσεων μπορεί να συμβεί πολλά χρόνια ή και δεκαετίες μετά την χειρουργική εκτομή του πρωτοπαθούς όγκου, το οποίο υποδεικνύει ότι τα πλέον διασπειρώμενα ΚΚΚ μπορούν να μείνουν σε μία αδρανή κατάσταση, γνωστή ως καρκινικό λήθαργο. Στον ΚΜ, το 20% των ασθενών υποτροπιάζουν 7-25 χρόνια μετά τη μαστεκτομή, υποδηλώνοντας την ύπαρξη φαινομένων πρώιμης διασποράς. Πράγματι, τα πειραματικά στοιχεία και οι κλινικές παρατηρήσεις δείχνουν ότι καρκινικά κύτταρα ανιχνεύονται στο μυελό των οστών σε άτομα χωρίς ενδείξεις μεταστατικής νόσου.⁵¹

2.4. Ανοσοποιητικό σύστημα και καρκίνος

2.4.1. Ανοσοδιαμόρφωση του καρκίνου (cancer immunoediting)

Η έννοια της ανοσοδιαμόρφωσης του καρκίνου έχει αναπτυχθεί τις τελευταίες δεκαετίες για να περιγράψει τον διπλό ρόλο της προσαρμοστικής και έμφυτης ανοσίας στη διαδικασία της ανάπτυξης του καρκίνου. Η ανοσοδιαμόρφωση του καρκίνου περιλαμβάνει τρεις φάσεις: την εξάλειψη των καρκινικών κυττάρων από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (elimination), την ισορροπία (equilibrium), όπου το ανοσοποιητικό σύστημα επιτηρεί τα καρκινικά κύτταρα διατηρώντας τα ανενεργά, και την ανοσοδιαφυγή (escape), η οποία έχει ως τελικό αποτέλεσμα την ανάπτυξη κακοήθων όγκων.⁵²



Εικόνα 8. Απεικόνιση των τριών σταδίων της ανοσοδιαμόρφωσης του καρκίνου. Εξάλειψη: τα καρκινικά κύτταρα απομακρύνονται από τον οργανισμό με τη δράση της έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας. Ισορροπία: τα καρκινικά κύτταρα διατηρούνται σε κατάσταση αδράνειας και το μέγεθος του όγκου παραμένει σταθερό. Διαφυγή: τα καρκινικά κύτταρα παραβιάζουν την ανοσολογική επιτήρηση και αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα. Επιπλέον, το ECM σκληραίνει, η αγγειογένεση του όγκου αυξάνεται και ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός προκαλεί πίεση στο εσωτερικό του όγκου. Σε μεταγενέστερα στάδια, τα καρκινικά κύτταρα μεταναστεύουν συλλογικά και εισβάλλουν σε γειτονικούς ιστούς και τελικά εισέρχονται στο αγγειακό σύστημα για να σχηματίσουν μετάσταση σε απομακρυσμένα όργανα.⁵²

2.4.1.1. Εξάλειψη

Η εξάλειψη αποτελεί το βασικό κομμάτι της ανοσοδιαμόρφωσης για τον επιτυχή αφανισμό των αναπτυσσόμενων καρκινικών κυττάρων. Στο στάδιο αυτό περιλαμβάνονται ανοσολογικές αντιδράσεις της έμφυτης και της προσαρμοστικής ανοσίας. Όσον αφορά την έμφυτη ανοσία, αρκετά κύτταρα τελεστές όπως τα NK και τα γδ T κύτταρα ενεργοποιούνται από φλεγμονώδεις κυτοκίνες, οι οποίες εκκρίνονται από τα μακροφάγα, τα κύτταρα του όγκου και τα στρωματικά κύτταρα που τα περικλείουν. Συγκεκριμένα, οι εκκρινόμενες κυτοκίνες στρατολογούν περισσότερα ανοσοκύτταρα τα οποία παράγουν με τη σειρά τους άλλες φλεγμονώδεις κυτοκίνες

όπως η IL-12 και η IFN- γ . Επιπροσθέτως, ο κυτταρικός θάνατος στα καρκινικά κύτταρα, ο οποίος μεσολαβείται από περφορίνη, FasL ή TRAIL, απελευθερώνει καρκινικά αντιγόνα, γεγονός το οποίο οδηγεί σε ανταπόκριση της προσαρμοστικής ανοσίας.⁵³ Κατά την αλληλεπίδραση μεταξύ των NK και των δενδριτικών κυττάρων (DCs), τα πρώτα προάγουν την ωρίμανση των δεύτερων. Επιπλέον, επάγουν τη μετανάστευσή τους σε λεμφαδένες που συνδέονται με τον όγκο, το οποίο οδηγεί στην ενίσχυση της αντιγονικής παρουσίασης στα T κύτταρα με σκοπό την κλωνική επέκταση των κυτταροτοξικών T κυττάρων. Τα ειδικά για τα καρκινικά αντιγόνα T λεμφοκύτταρα στρατολογούνται στη θέση του πρωτοπαθούς όγκου και απευθείας επιτίθενται και σκοτώνουν τα καρκινικά κύτταρα με την παραγωγή της κυτταροτοξικής IFN- γ .⁵²

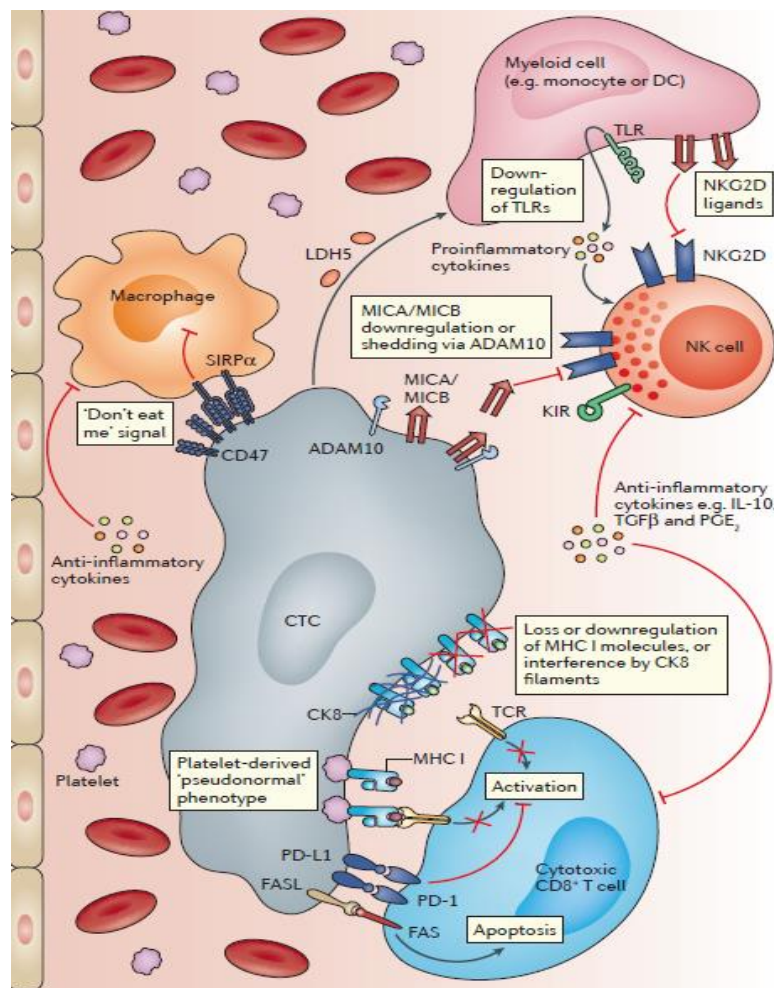
2.4.1.2. Ισορροπία

Το επόμενο στάδιο της ανοσοδιαμόρφωσης του καρκίνου προχωράει με τη φάση της ισορροπίας κατά την οποία πραγματοποιείται μία συνεχής σμίλευση των καρκινικών κυττάρων που εμφανίζουν αντίσταση στα κύτταρα τελεστές του ανοσοποιητικού συστήματος. Κατά τη διάρκεια της, πολλές παραλλαγές του όγκου εξαλείφονται, αλλά ταυτόχρονα εμφανίζονται νέες παραλλαγές που φέρουν διαφορετικές μεταλλάξεις και αυξάνουν την αντίστασή τους στην επίθεση από το ανοσοποιητικό σύστημα. Αυτή η διαδικασία οδηγεί το ανοσοποιητικό σύστημα να επιλέγει τα καρκινικά κύτταρα που χαρακτηρίζονται από μειωμένη ανοσογονικότητα, τα οποία είναι πιο ικανά να επιβιώσουν σε ένα ανοσοεπαρκές περιβάλλον. Αν και μπορεί να συμβαίνουν τυχαίες γονιδιακές μεταλλάξεις στους όγκους με σκοπό να προκληθεί αστάθεια, αυτές είναι λιγότερο ανοσογόνες και η πίεση της ανοσολογικής επιλογής ευνοεί την ανάπτυξη τέτοιων κλώνων κυττάρων με μη ανοσογόνους φαινότυπους.⁵⁴

2.4.1.3. Διαφυγή

Κατά τη διάρκεια της φάσης της διαφυγής, τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται ανεξέλεγκτα δημιουργώντας κλινικά ανιχνεύσιμους όγκους. Τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν τρεις κύριες οδούς για να περάσουν από τη φάση της ισορροπίας και να καταφέρουν να ξεφύγουν. Είτε αποκτούν την ικανότητα να παρακάμπτουν την ανίχνευση από το ανοσοποιητικό σύστημα, είτε γίνονται πιο ανθεκτικά στις κυτταροτοξικές επιδράσεις από τα ανοσοκύτταρα, είτε αναπτύσσουν μηχανισμούς

ανοσοκαταστολής που αναστέλλουν τη φυσιολογική λειτουργία των B, T και NK κυττάρων. Στη φάση της διαφυγής πραγματοποιούνται αλλαγές στο μικροπεριβάλλον του όγκου που συμβάλλουν στον κακοήγη μετασχηματισμό των κυττάρων και στην ενδεχόμενη ανάπτυξη του όγκου. Η αυξημένη τάση, η σκλήρυνση του ECM, η υψηλότερη διάμεση ροή και πίεση υγρών, συμβάλλουν στην αλλαγή της φυσιολογικής συμπεριφοράς των στρωματικών κυττάρων που περιβάλλουν τα καρκινικά κύτταρα.⁵⁵



Εικόνα 9. Πιθανοί μηχανισμοί ανοσοδιαφυγής ΚΚΚ στο περιφερικό αίμα.

Το σχήμα απεικονίζει τους πιθανούς μηχανισμούς ανοσολογικής διαφυγής των ΚΚΚ και τις αλληλεπιδράσεις τους με τα ανοσοκύτταρα στο περιφερικό αίμα. Απεικονίζονται τρεις διαφορετικές στρατηγικές διαφυγής από την αναγνώριση από τα T και NK κύτταρα: παρεμβολή στην αναγνώριση του TCR των μορίων MHC I από κυτταροκερατίνες δεσμευμένες στην κυτταρική επιφάνεια (CK8, CD18 και CK19) (1), απόκτηση ενός «ψευδο-φυσιολογικού» φαινοτύπου που προκύπτει από τη μεμβρανική μεταφορά από τα αιμοπετάλια στα ΚΚΚ (2) και μείωση ή απώλεια έκφρασης MHC I (3). Κάποιοι πρόσθετοι μηχανισμοί ανοσοδιαφυγής

περιλαμβάνουν την έκφραση της ανασταλτικής πρωτεΐνης PD-L1, το σήμα «don't eat me» του υποδοχέα CD47 και μια τροποποιημένη έκφραση των αποπτωτικών πρωτεϊνών FAS και/ή FASL.⁵⁶

2.4.2. Ανοσοδιαφυγή στον ΚΜ

Μόλις πρόσφατα, η διαφυγή από την επιτήρηση του ανοσοποιητικού συστήματος έχει αναγνωριστεί ως χαρακτηριστικό του ΚΜ. Οι υποκείμενοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν τη μειωμένη έκφραση του MHC I, την έκφραση συνδιευεργετικών μορίων, την απώλεια καρκινικών αντιγόνων και την αυξημένη έκφραση ανοσοκατασταλτικών παραγόντων, καθώς και άλλων κυτοκινών και μεταβολίτων.⁵⁷ Συγκεκριμένα, σε κάποια καρκινικά κυττάρα προκαλείται αρνητική ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών του MHC I, μέσω του οποίου πραγματοποιείται η αναγνώριση των κυττάρων αυτών από τα κυτταροτοξικά κύτταρα. Εναλλακτικά, τα κύτταρα μπορούν να διαφύγουν της ανοσοεπιτήρησης μέσω της έκφρασης απενεργοποιημένων μορφών υποδοχέων θανάτου οι οποίες χαρακτηρίζονται από πολλές μεταλλάξεις. Λόγω αυτών των αλλαγών και της επίδρασης της ανοσίας του ξενιστή, οι όγκοι αναπτύσσουν χαμηλή ανοσογονικότητα και δημιουργείται ένα ισχυρό ανοσοκατασταλτικό μικροπεριβάλλον, όπου δεν προκαλούνται προσαρμοστικές ανοσολογικές αποκρίσεις. Συγκεκριμένα, σε ένα τέτοιο μικροπεριβάλλον η συχνότητα των CD4+ και των CD8+ T λεμφοκυττάρων είναι χαμηλή και ο φαινότυπός τους συχνά σχετίζεται με ανοσολογική εξάντληση.⁵⁸ Παράλληλα, μια τέτοια ανοσοκατασταλτική κατάσταση μπορεί να διεκπεραιωθεί είτε από τα καρκινικά κύτταρα που εκκρίνουν ανοσοκατασταλτικές κυτοκίνες (π.χ. VEGF, TGF-β) είτε με τη στρατολόγηση συγκεκριμένων ανοσοκατασταλτικών πληθυσμών λευκοκυττάρων (π.χ., ρυθμιστικά T κύτταρα, μυελοειδή κατασταλτικά κύτταρα).⁵⁹

Τέλος, τα καρκινικά κύτταρα εκμεταλλεύονται τα μονοπάτια που εμπλέκονται στον έλεγχο της ανοσολογικής απάντησης προκειμένου να διαφύγουν της ανοσολογικής επιτήρησης. Τυπικό παράδειγμα αποτελούν τα μονοπάτια FAS/FASL και PD-1/PD-L1. Πληθώρα δεδομένων δείχνουν τη συμμετοχή των δύο αυτών μονοπατιών στην ανοσοδιαφυγή στον ΚΜ, ωστόσο η έως τώρα γνώση προκύπτει από την ανάλυση των όγκων (πρωτοπαθών ή μεταστατικών), ενώ υπάρχουν ελάχιστα ή καθόλου δεδομένα σχετικά με το ρόλο των συγκεκριμένων μονοπατιών στην ανοσοδιαφυγή του καρκίνου σε επίπεδο κυκλοφορίας.⁵⁶

2.5. Σύστημα Fas/FasL

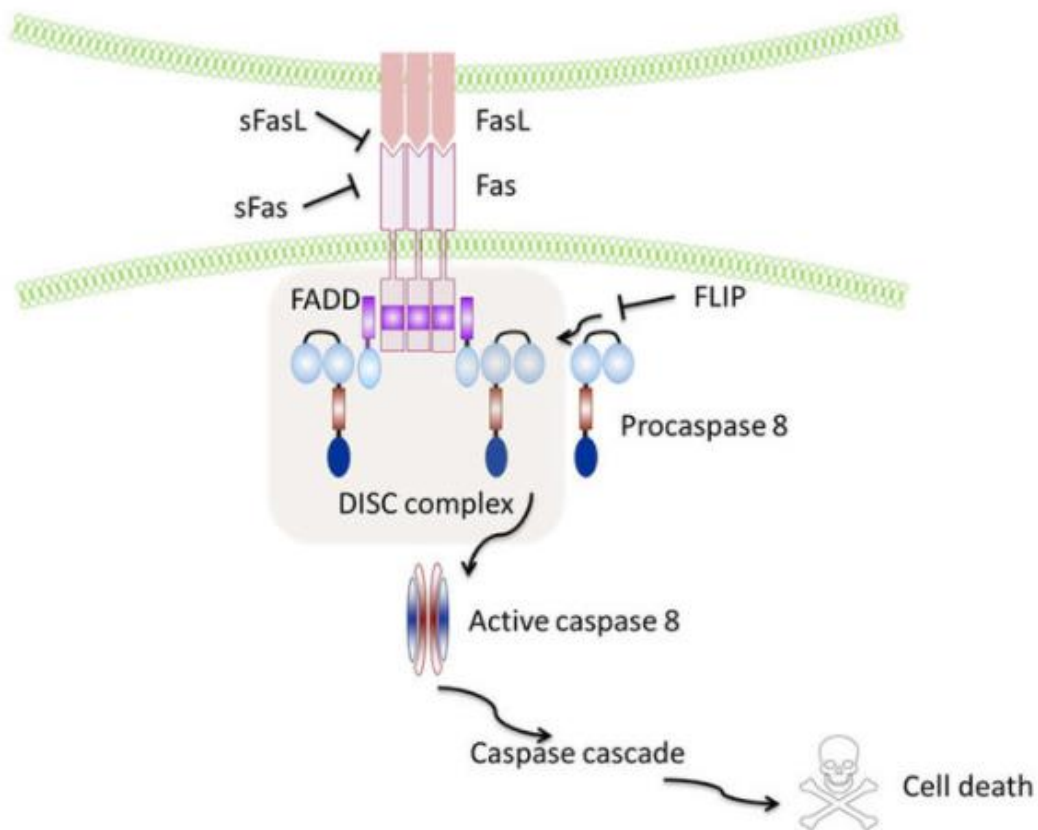
2.5.1. Ο ρόλος των Fas/FasL στο ανοσοποιητικό σύστημα

Ο Fas (CD95) είναι ένας υποδοχέας θανάτου που βρίσκεται στην επιφάνεια διάφορων κυττάρων και πυροδοτεί ένα σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί στην απόπτωση. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του Fas και του συνδέτη FasL (CD95L) ρυθμίζει διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές διαδικασίες οι οποίες μεσολαβούνται από τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.

Τα ποντίκια MRL-lpr/lpr φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον Fas και αποτελούν ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο μοντέλο για τη μελέτη αυτοάνοσων ασθενειών, όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (SLE), ρευματοειδής αρθρίτιδα (RA), σύνδρομο Sjögren (SS) και αυτοάνοσο λεμφοπλασματοειδές σύνδρομο (ALPS). Η διαμεσολαβούμενη από τον Fas απόπτωση των περιφερικών T κυττάρων, που αντιπροσωπεύει έναν βασικό μηχανισμό διατήρησης της ανοσολογικής ανοχής, είναι δυσλειτουργική σε αυτούς τους ποντικούς. Αυτός ο μηχανισμός, γνωστός ως κυτταρικός θάνατος που προκαλείται από ενεργοποίηση (activation induced cell death, AICD), εξαλείφει τα υπερενεργοποιημένα ή αυτοαντιδραστικά T κύτταρα στην περιφέρεια. Συγκεκριμένα, ο AICD είναι ελαττωματικός στους ποντικούς MRL-lpr/lpr, οδηγώντας σε αυξημένα αυτοαντιδραστικά T κύτταρα που επάγουν τη δημιουργία αυτοάνοσων αλλοιώσεων σε πολλά όργανα.⁶⁰ Αντίθετα, η έκφραση FasL από τα T κύτταρα σχετίζεται με την ενεργοποίησή τους. Όταν ο διαλυτός (sFasL) συνδέεται με τον Fas, προκαλείται ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και όχι η απόπτωση. Τα ποντίκια με γονότυπο *gld/gld* φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο που κωδικοποιεί το FasL και χρησιμοποιούνται ευρέως ως μοντέλο μελέτης αυτοάνοσων νόσων. Επιπλέον υπάρχουν μεταλλάξεις του γονιδίου που κωδικοποιεί τον FasL σε ασθενείς με ALPS και η έκφραση του σε κύτταρα που βρίσκονται σε «ανοσο-προνομιούχα τοποθεσία» τα προστατεύει από την καταστροφή τους από ενεργοποιημένα ή αυτοαντιδραστικά λεμφοκύτταρα.⁶¹

2.5.2. Αποπτωτικό μονοπάτι FAS/FASL

Οι υποδοχείς θανάτου (death receptors, DRs), οι οποίοι ανήκουν στην υπερ-οικογένεια των TNF (tumor necrosis factor), συνδέονται με μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη προσαρμογέα, η οποία για τον Fas ονομάζεται FADD (Fas-associated protein with death domain). Στο συγκεκριμένο μονοπάτι, η πρόσδεση του FasL στον Fas οδηγεί στην συσπείρωση του Fas και την πρόσδεσή του στο FADD. Το FADD στρατολογεί τις κασπάσες 8 και 10 για να σχηματίσουν το σύμπλοκο DISC (death-inducing signaling complex). Το DISC μεσολαβεί την αυτοκαταλυτική επεξεργασία και ενεργοποίηση της κασπάσης-8 και της κασπάσης-10, οι οποίες εκπέμπουν σήματα θανάτου μέσω πρωτεόλυσης των κασπάσων 3, 6 και 7. Στα θυμοκύτταρα, η επεξεργασία των κασπάσων είναι αρκετή για να προκληθεί απόπτωση. Αντίθετα, σε κύτταρα όπως τα Β, η απόπτωση απαιτεί τη σύνδεση της κασπάσης 8 με τον Bid (BH3-interacting domain death agonist), που προκαλεί τη διαπερατότητα των μιτοχονδριακών εξωτερικών μεμβρανών και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c. Κατά την απελευθέρωση από τα μιτοχόνδρια, το κυτόχρωμα c δρα ως συμπαράγοντας για τη συναρμολόγηση ενός συμπλόκου ενεργοποίησης κυτοσολικής κασπάσης που ονομάζεται αποπτόσωμα.⁶²

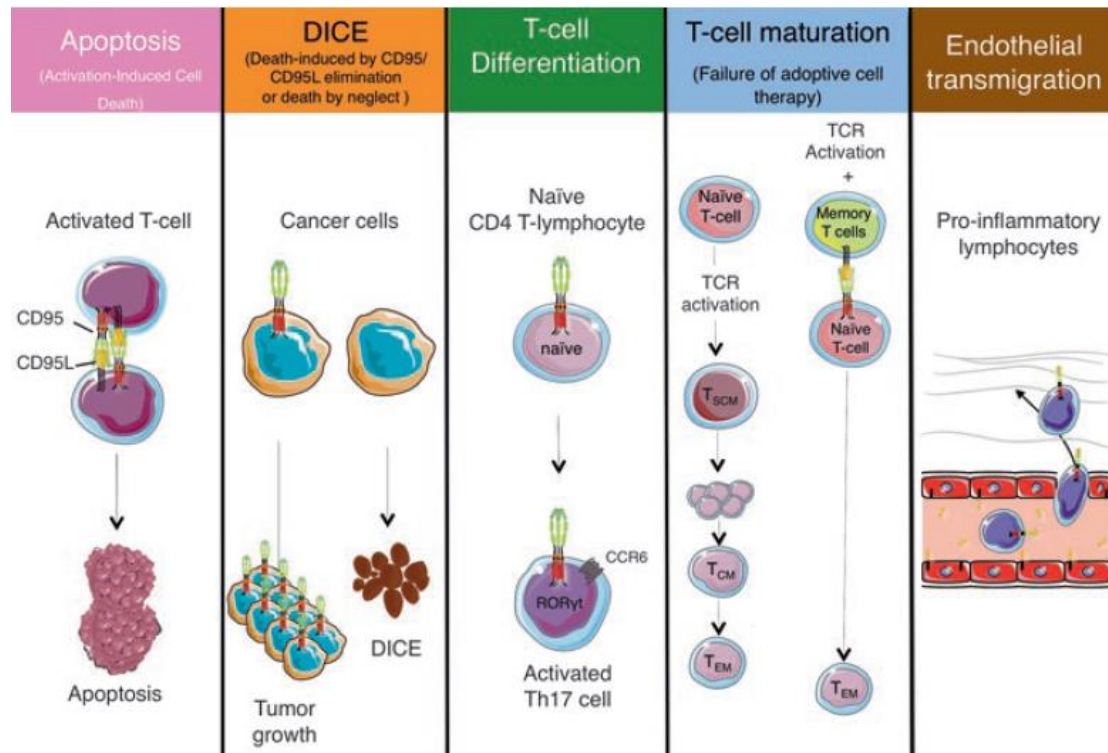


Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού Fas/FasL. Η πρόσδεση του Fas οδηγεί στη στρατολόγηση και ενεργοποίηση της προκασπάσης-8 μέσω της πρωτεΐνης FADD και στη δημιουργία του σύμπλοκου DISC. Η ενεργή κασπάση-8 αμέσως διασπά την κασπάση-3 και ξεκινάει ο καταρράκτης κασπασών ο οποίος οδηγεί τελικά στον κυτταρικό θάνατο. Ο διαλυτός Fas και ο FasL προσδένονται στους αντίστοιχους συνδέτες και καταστέλλουν την ενεργοποίηση του μονοπατιού. Επίσης, η FLIP, μία αντι-αποπτωτική πρωτεΐνη, καταστέλλει την ενεργοποίηση της κασπάσης-8.⁶³

2.5.3. Μη τυπικές λειτουργίες του συστήματος Fas/FasL στο ανοσοποιητικό σύστημα

Πέρα από την επαγωγή της απόπτωσης τα μόρια Fas και FasL φαίνεται να ενέχονται στην επαγωγή του πολλαπλασιασμού σε κάποιες κατηγορίες ανοσοκυττάρων. Αυτή η «διπολική» συμπεριφορά ίσως συσχετίζεται με τη διατήρηση της συλλογικότητας, όπου δηλαδή τα μόρια που προκαλούν αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού είναι επίσης υπεύθυνα για την αναστολή της αντίδρασης αυτής και το θάνατο των κυττάρων. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των αποπτωτικών και των μη αποπτωτικών οδών σηματοδότησης είναι ακόμα ελάχιστα κατανοητή και ο χαρακτηρισμός του μοριακού μηχανισμού αυτών των σημάτων μπορεί να παρέχει κομβικά δεδομένα για την ευαισθητοποίηση του καρκινικού κυττάρου όσον αφορά την απόπτωση και για τη διατήρηση του ελέγχου των T-κυττάρων όταν αυξάνεται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός ή/και μειώνεται ο κυτταρικός θάνατος.⁶⁴ Πράγματι, πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι, παράλληλα με το αποπτωτικό σήμα, τα προς απόπτωση καρκινικά κύτταρα που εκτίθενται στο FasL ενεργοποιούν μια διαδρομή σηματοδότησης που εξαρτάται από το c-IAP1/2 και προάγει τη σύνθεση προφλεγμονωδών διαμεσολαβητών.⁶⁵ Η παραγωγή αυτών των κυτοκινών όχι μόνο προάγει τη χημειοταξία των φαγοκυττάρων, αλλά επίσης διεγείρει την ικανότητά τους να φαγοκυτταρώνουν και να καθαρίζουν τα αποπτωτικά κύτταρα και στη συνέχεια να επάγουν μια προσαρμοστική ανοσοαπόκριση. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του Fas σε ανώριμα DCs προκαλεί την ωρίμανσή τους, συμπεριλαμβανομένης της έκφρασης των μορίων MHC II και B7 και την έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών. Όσον αφορά τα T κύτταρα, η ενεργοποίηση του TCR σχετίζεται επίσης με την ταχεία διάσπαση της κασπάσης-8, η οποία έχει προταθεί ως ουσιαστικό βήμα στην ενεργοποίηση των T-κυττάρων. Αυτή η ενεργοποίηση της κασπάσης-8 εμφανίζεται μέσω εμπλοκής του Fas, εγείροντας την υπόθεση ότι, κατά τη διαδικασία ενεργοποίησης, τα T-κύτταρα μπορούν να πολλαπλασιαστούν μόνο εάν ο

αποπτωτικός μηχανισμός τους είναι λειτουργικός.⁶⁶ Τέλος, σε μικτούς πληθυσμούς T κυττάρων, τα T κύτταρα μνήμης επιταχύνουν την ωρίμανση των ανώριμων T-κυττάρων που εκτίθενται σε αντιγόνα μέσω επαγωγής της διαδρομής σηματοδότησης PI3K που εξαρτάται από τον Fas. Αυτή η μη-αποπτωτική απόκριση Fas επιταχύνει τη διαδικασία διαφοροποίησης/ωρίμανσης στα ανώριμα T-κύτταρα.⁶⁷



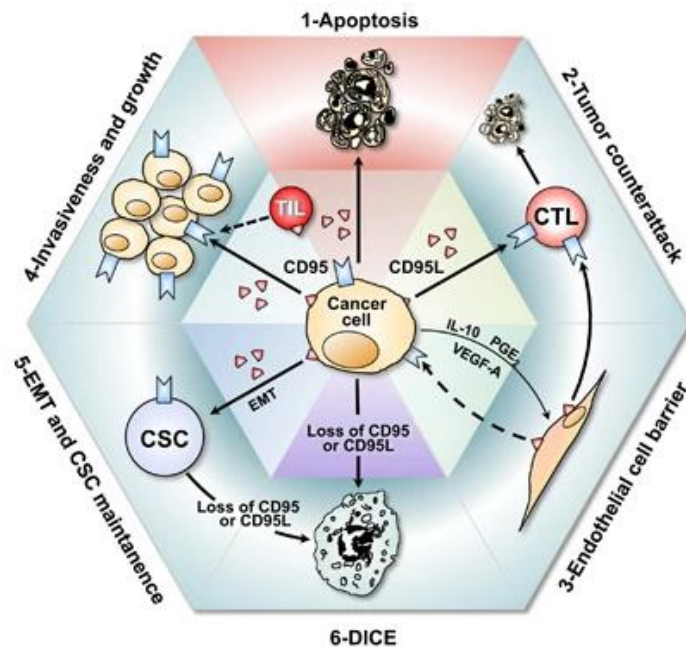
Εικόνα 11. Ανοσολογικοί ρόλοι των Fas/FasL. Η παρουσία ή απουσία του Fas μπορεί να επάγει προ-αποπτωτικές ή υπέρ της επιβίωσης οδούς σηματοδότησης, ανάλογα με τη μορφή του FasL (διαμεμβρανικός ή διαλυτός), το κύτταρο και/ή το μικροπεριβάλλον. 1) Το σύστημα Fas/FasL επάγει την απόπτωση. 2) Η έκφραση του Fas προκαλεί την έκκριση σημάτων επιβίωσης και έτσι η απώλεια του οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο. 3,4) Ο Fas ενορχηστρώνει τη διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων Th17 και την ωρίμανση των T-κυττάρων μνήμης. 5) Ο διασπασμένος από μεταλλοπρωτεάση FasL μπορεί να προωθήσει τη μεταφορά κυττάρων που εκφράζουν την IL-17 σε φλεγμονώδη όργανα ασθενών με συστηματικό ερυθηματώδη λύκο.⁶⁴

2.5.4. Σηματοδότηση Fas/FasL στον καρκίνο

Ο Fas εντοπίζεται κυρίως στην κυτταρική επιφάνεια, όπου έχει αποδειχθεί ότι δημιουργεί ομοτριμερή. Η πιο καθιερωμένη δραστηριότητα του Fas είναι η εμπλοκή του στη διαδικασία του κυτταρικού θανάτου είτε κυττάρων μολυσμένων από ιούς είτε καρκινικών κυττάρων όταν αυτά εμπλέκονται με κάποιο CD8+ κυτταροτοξικό

λεμφοκύτταρο. Εκτός το μονοπάτι περφορίνης/granzyme και κάποιους έμμεσους μηχανισμούς που περιλαμβάνουν κυτοκίνες όπως ο TNF-α και η ιντερφερόνη-γ, το σύστημα Fas/FasL χρησιμοποιείται τόσο από τα CD8+ όσο και από τα CD4+ T κύτταρα για την εξάλειψη των νεοπλασματικών κυττάρων.⁶⁸ Παρόλα αυτά, η έκφραση των Fas και FasL από τα καρκινικά κύτταρα συνεπάγεται ότι είναι τα ίδια ανθεκτικά στην απόπτωση που προκαλείται από τον Fas. Πράγματι, τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα είναι ανθεκτικά στην απόπτωση που προκαλείται από τον Fas ακόμη και με υψηλά επίπεδα Fas στην επιφάνειά τους.

Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να αποκτήσουν ανθεκτικότητα σε μια πιθανή αποπτωτική προσβολή που προκαλείται από τον Fas με πολλούς τρόπους. Ένας κοινός μηχανισμός που χρησιμοποιούν τα καρκινικά κύτταρα είναι η ρύθμιση της έκφρασης του υποδοχέα στην κυτταρική επιφάνεια. Το αποπτωτικό σήμα μπορεί επίσης να ανασταλεί στο επίπεδο του συμπλόκου DISC μέσω της αυξημένης έκφρασης του cFLIP, το οποίο μπορεί να αναστέλλει τις αλληλεπιδράσεις της κασπάσης-8 και -10 με το DISC, ή μέσω μειωμένης έκφρασης του FADD ή της κασπάσης-8. Η απώλεια της αποπτωτικής σηματοδότησης μέσω Fas/FasL μπορεί επίσης να είναι συνέπεια της απορρύθμισης της έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας Bcl-2 ή των αναστολέων αποπτωτικών πρωτεϊνών, ευνοώντας έτσι την επιβίωση του όγκου.⁶⁹



Εικόνα 12. Ο ρόλος του Fas/FasL στον καρκίνο.

Μαζί με την ογκοκατασταλτική πυροδότησης της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα (1), ο FasL έχει ένα εύρος ογκογόνων δρασικότητων. Κάποιες από αυτές είναι έμμεσες, όπως η καταστολή της ανοσολογικής απάντησης στο μικροπεριβάλλον του όγκου (2) ή η έκκριση παραγόντων είτε από τα καρκινικά είτε από τα ενδοθηλιακά κύτταρα (3). Κάποιες άλλες δρασικότητες είναι άμεσες, όπως η προαγωγή της ανάπτυξης και της διεισδυτικότητας του όγκου (4) ή η απόκτηση CSCs φαινοτύπου (5). Είναι σημαντικό το ότι για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων απαιτείται ένα χαμηλό βασικό επίπεδο σηματοδότησης Fas/FasL. Η εξάλειψη της σηματοδότησης οδηγεί σε έναν μη αναστρέψιμο και αποτελεσματικό τύπο κυτταρικού θανάτου, τον DICE, ο οποίος επηρεάζει κυρίως τα CSCs (6).⁷⁰

2.5.5. Ευρήματα για το ρόλο του Fas/FasL σε στερεούς όγκους

Κάποιες ιστοπαθολογικές αναλύσεις έχουν δείξει ότι ο FasL εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα σε μεταστατικούς σε σύγκριση με πρωτοπαθείς όγκους, σε ασθενείς με μελάνωμα ή καρκίνο του παχέος εντέρου. Επιπλέον, σε ασθενείς με KM, η αυξημένη έκφραση του FasL έχει συσχετιστεί με την αυξημένη απόπτωση των T κυττάρων.⁷¹ Η έκφραση του FasL στα καρκινικά κύτταρα μπορεί, ως εκ τούτου, να επάγει ενεργά την απόπτωση στα ανοσοκύτταρα. Αντίστροφα, τα καρκινικά κύτταρα που εκφράζουν τον Fas πιθανότατα θα είναι ευάλωτα στην απόπτωση που προκαλείται από ανοσοκύτταρα που στοχεύουν τον όγκο, τα οποία εκφράζουν αντίστοιχα τον FasL. Έτσι, η ταυτόχρονη απώλεια ή μείωση της έκφρασης του Fas και η αύξηση της έκφρασης του FasL στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να συμβάλλει στην ανοσοδιαφυγή και να αυξήσει το μεταστατικό δυναμικό.⁵⁶ Επιπλέον, άλλες έρευνες έχουν δείξει ότι τα Fas+/CD8+ κυτταροτοξικά κύτταρα ανιχνεύονται πολύ πιο συχνά σε ασθενείς με KM από ό,τι σε υγιείς άτομα.⁷² Συνεπώς, τα ευρήματα αυτά αναδεικνύουν καθοριστικό ρόλο της οδού Fas/FasL στην ανοσοδιαφυγή του καρκίνου.

2.5.6. Διατάραξη της αποπτωτικής λειτουργίας στον KM

Η ελάττωση της απόπτωσης αντιπροσωπεύει μία σημαντική στρατηγική για την διαφυγή από την ανοσολογική απόκριση κατά την ανάπτυξη του καρκίνου. Αυτή η διαδικασία, περιλαμβάνει την τροποποιημένη έκφραση του Fas και του συνδέτη του FasL.⁷³ Το σύστημα Fas/FasL μπορεί να ενεργοποιήσει την αποπτωτική σηματοδότηση στα κύτταρα. Συγκεκριμένα, τα αυξημένα επίπεδα FasL στα καρκινικά

κύτταρα στο μαστό προκαλούν το θάνατο των T λεμφοκυττάρων τελεστών, με αποτέλεσμα τη διαφυγή τους από την ανοσολογική επιτήρηση. Επιπλέον, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να γίνουν ανθεκτικά στην απόπτωση που προκαλείται από τον Fas με τη σίγαση ή την αρνητική ρύθμιση των οδών σηματοδότησης Fas/FasL, το οποίο έχει αναφερθεί ότι σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση στον ΚΜ. Αξίζει να σημειωθεί, ότι ο FasL πέρα από διαμεμβρανική μορφή ανιχνεύεται και σε διαλυτή μορφή (sFasL) λόγω της διάσπασης του από μεταλλοπρωτεάσες. Ο sFasL έχει ανιχνευτεί στον ορό ασθενών με TNBC και έχει συσχετιστεί με την προαγωγή της μετάστασης.⁷⁴

2.6. Υγρή βιοψία

2.6.1. Η ανάγκη για την εφαρμογή της υγρής βιοψίας

Η ανάλυση των γενετικών αλλοιώσεων του καρκίνου είναι πολύ σημαντική όσον αφορά τη διαχείριση των ασθενών και την επιλογή θεραπείας. Η αξιολόγηση του προφίλ μεταλλάξεων πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ένα ιστοτεμάχιο του πρωτογενούς όγκου ή της μεταστατικής εστίας. Ωστόσο, σε αυτή τη διαδικασία προκύπτουν αρκετοί περιορισμοί.⁷⁵ Αρχικά, η λήψη βιοψίας ιστού απαιτεί χειρουργική επέμβαση, το οποίο περιορίζει σε μεγάλο βαθμό την πιθανότητα τελικά να πραγματοποιηθεί η δειγματοληψία. Ανάλογα με την εντόπιση του όγκου, η προσβασιμότητα στον ιστό αποτελεί επίσης ένα πρόβλημα. Επιπλέον, η ετερογένεια εντός του όγκου, ιδιαίτερα η χωρική, συχνά οδηγεί σε αναξιόπιστα αποτελέσματα ανίχνευσης βιοδεικτών, ιδίως όταν αναλύεται μόνο ένα ιστοτεμάχιο.⁷⁶ Επιπροσθέτως, η παρουσία πολλαπλών εστιών περιπλέκει τον χαρακτηρισμό της νόσου και ο έλεγχος των αρχικών δειγμάτων που λήφθηκαν μπορεί να μην αποτελεί τη βέλτιστη επιλογή, λόγω της περαιτέρω χρονικής εξέλιξης του όγκου. Δεδομένου ότι είναι απαραίτητο να πραγματοποιείται παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου, η επαναλαμβανόμενη λήψη βιοψιών δεν είναι πάντα εφικτή. Επομένως, υπάρχει μια έντονη ανάγκη για τη χρήση πιο προσιτών υλικών που συνεπάγονται με μη ή ελάχιστα επεμβατικές διαδικασίες που επιτρέπουν τη συστηματική και σε πραγματικό χρόνο παρακολούθηση των μοριακών αλλοιώσεων του καρκίνου. Η υγρή βιοψία αποτελεί την ιδανική διαδικασία για τέτοιες εφαρμογές. Αρχικά, η διαδικασία αναφερόταν κυρίως στην ανάλυση των κυκλοφορούντων καρκινικών κυττάρων (ΚΚΚ), όμως πλέον η υγρή βιοψία επεκτείνεται στην ανάλυση πολλών συστατικών

που απελευθερώνονται από τον όγκο στα σωματικά υγρά (κυρίως στο αίμα), συμπεριλαμβανομένων των ελεύθερων κυττάρων κυκλοφορούντων νουκλεϊκών οξέων (DNA, mRNA, non-coding RNA όπως micro-RNA ή long non-coding RNA), εκπαιδευμένων από τον όγκο αιμοπεταλίων (TEPs), εξωσωμάτων και ΜΚΠΑ.

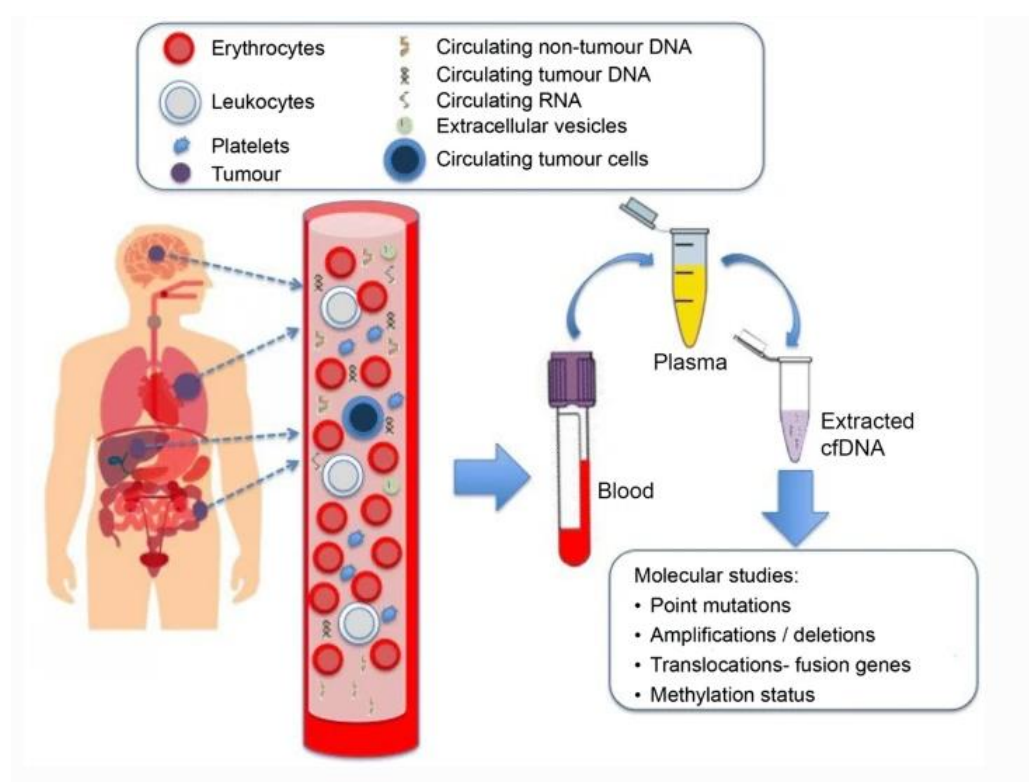
2.6.2. Τα στοιχεία της υγρής βιοψίας

2.6.2.1. Κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (ΚΚΚ)

Τα ΚΚΚ αποσπώνται από τον πρωτογενή όγκο ή/και τις μεταστατικές εστίες και ταξιδεύουν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος σε άλλα μέρη του σώματος με εκτιμώμενο χρόνος ημιζωής 1-22 ώρες. Μπορούν να απομονωθούν από το αίμα των ασθενών ως μεμονωμένα κύτταρα ή συσσωματώματα. Η συγκέντρωσή τους είναι χαμηλή (<10 κύτταρα /mL αίματος) ακόμη και σε μεταστατική νόσο και ποικίλλει μεταξύ των τύπων των όγκων. Για την απομόνωσή τους έχει αναπτυχθεί ένα μεγάλο εύρος τεχνολογιών που βασίζονται είτε στην παρουσία είτε στην απουσία συγκεκριμένων δεικτών, όπως το μόριο προσκόλλησης επιθηλιακών κυττάρων (epithelial cell adhesion molecule, EPCAM) ή οι κυτταροκερατίνες (CKs) για θετική επιλογή ή το μόριο CD45 για αρνητική επιλογή ή σε βιοφυσικές ιδιότητες (μέγεθος, παραμόρφωση). Είναι σημαντικό ότι ο αριθμός και ο φαινότυπος των ΚΚΚ που απομονώνονται ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την κατανόηση της πραγματικής κλινικής σημασίας τους. Επιπλέον, στα ΚΚΚ μπορούν να πραγματοποιηθούν κυτταρολογικές και μοριακές αναλύσεις, το οποίο ανοίγει δυναμικά τη δυνατότητα για εφαρμογές σε κλινικό επίπεδο όσο και για περαιτέρω κατανόηση των θεμελιωδών διαδικασιών της ανάπτυξης του καρκίνου.⁷⁷

Η παρουσία ΚΚΚ έχει περιγραφεί ως ένας ισχυρός προγνωστικός δείκτης σε διάφορους τύπους καρκίνου⁷⁸ και ως προβλεπτικός δείκτης απόκρισης στη θεραπεία.⁷⁹ Ο αριθμός των ανιχνευθέντων ΚΚΚ έχει συσχετιστεί με την αποτελεσματικότητα της θεραπείας και τη συνολική επιβίωση. Ακόμη και αν έχει αναπτυχθεί μεγάλο εύρος μεθόδων για την ανίχνευσή τους, μόνο το σύστημα CellSearch είναι εγκεκριμένο από τον FDA. Η δυνατότητα απαρίθμησης των ΚΚΚ των ασθενών στα πλαίσια της παρακολούθησής τους είναι κάτι που προτείνεται ήδη, ωστόσο, ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός αυτών των ΚΚΚ προτείνεται επίσης για την ανάλυση του γονιδιακού προφίλ έκφρασης. Για παράδειγμα, μπορεί να

χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση της ετερογένειας του όγκου ή για τον εντοπισμό συγκεκριμένων γονιδιακών αλλαγών, καθώς και για την αξιολόγηση της παρουσίας δεικτών που σχετίζονται με τη θεραπεία (όπως ο PD-L1 στην ανοσοθεραπεία). Ωστόσο, λόγω των πολυάριθμων μεθόδων που έχουν αναπτυχθεί για την απομόνωσή τους, αλλά και λόγω της χαμηλής ανίχνευσής τους σε μη μεταστατικές νόσους, η χρήση τους παραμένει αμφιλεγόμενη και πολλές πρωτοβουλίες προσπαθούν τώρα να αξιολογήσουν την κλινική χρησιμότητά τους. Τέλος, μεγάλες κλινικές μελέτες στοχεύουν στην κατανόηση της επιρροής που ασκεί η παρουσία των ΚΚΚ στην επιβίωση του ασθενούς και στη λήψη απόφασης θεραπείας.⁸⁰



Εικόνα 13. Γραφική περιγραφή της διαδικασίας της υγρής βιοψίας.⁸¹

2.7.1.2. Μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος (ΜΚΠΑ)

Τα ΜΚΠΑ αποτελούνται από ανοσοκύτταρα και συγκεκριμένα από λεμφοκύτταρα (Τ, Β και ΝΚ κύτταρα) και μονοκύτταρα και ανήκουν στην γραμμή άμυνας του ξενιστή. Η ανάπτυξη και η επιβίωση των όγκων είναι μία περίπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση μεταξύ καρκινικών κυττάρων, φυσιολογικών στρωματικών κυττάρων και ανοσοκυττάρων. Παράλληλα, ο μηχανισμός της

ανοσοδιαφυγής έχει επίσης βασικό ρόλο στην ανάπτυξη και επιβίωση του όγκου, με την ανοσοκαταστολή στο μικροπεριβάλλον του όγκου να αποτελεί τη βασικότερη διαδικασία. Καθώς η ανοσοδιαφυγή μεσολαβείται από CD4+, CD25+, FoxP3+, ρυθμιστικά T και άλλα κατασταλτικά κύτταρα, η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης των ΜΚΠΑ έχει προοπτικές να συμβάλει στην πρώιμη ανίχνευση καρκίνου.⁸² Τα ΜΚΠΑ μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ένας τρόπος παρακολούθησης της εξέλιξης του όγκου, όταν είναι δύσκολη η βιοψία, και ως ένας τρόπος ελέγχου της κατάστασης του οργανισμού, καθώς αυτά μπορούν να μεταναστεύουν και να διαπερνάνε διάφορους ιστούς. Σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά αυτών των κυττάρων, μπορεί να πραγματοποιηθεί η ανάπτυξη διαγνωστικών δοκιμασιών με βάση την έκφραση γονιδίων για την έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου. Η λογική της χρήσης του μεταγραφώματος των ΜΚΠΑ για την παρακολούθηση των στερεών όγκων βασίζεται στον μηχανισμό με τον οποίο η κακοήθης ανάπτυξη προκαλεί χαρακτηριστικές αλλαγές στο αιματολογικό βιοχημικό περιβάλλον, ο οποίος επηρεάζουν τα μοτίβα έκφρασης αρκετών γονιδίων στα κύτταρα του αίματος. Συνεπώς, η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης στο περιφερικό αίμα μπορεί να προσφέρει πιθανούς προβλεπτικούς ή/και προγνωστικούς βιοδείκτες που θα συμβάλλουν στην κλινική πράξη.⁸³

2.6.3. Η χρησιμότητα της υγρής βιοψίας στον ΚΜ

Η πολύπλοκη βιολογική και κλινική φύση του ΚΜ μπορεί να θέσει πολλές προκλήσεις όσον αφορά τη θεραπευτική προσέγγιση της νόσου, κυρίως λόγω των ελλείψεων στις γνώσεις σχετικά με το μοριακό υπόβαθρο και τους μηχανισμούς της. Η ανάπτυξη εξατομικευμένων και στοχευουσών θεραπειών, απαιτεί μία καλύτερη κατανόηση της ετερογένειας του όγκου. Η υγρή βιοψία έχει τη δυνατότητα να αντιμετωπίσει την ανάγκη για ένα προσαρμοσμένο screening των όγκων μέσω μιας μη επεμβατικής προσέγγισης. Ως αποτέλεσμα, διάφορα καρκινικά συστατικά στο αίμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πιο αποτελεσματική διάγνωση, πρόβλεψη της πρόγνωσης, στοχεύουσα θεραπεία και ανίχνευση της ανάπτυξης αντίστασης σε θεραπείες. Αυτή η προσέγγιση, πέρα από τη σε βάθος μελέτη των μηχανισμών της μετάστασης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των πιο αποτελεσματικών θεραπειών, καθώς και για την διαρκή παρακολούθηση της απόκρισης στη θεραπεία.⁸⁴

3. Σκοπός

Με βάση τα παραπάνω, σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της περιφερικής ανοσολογικής απόκρισης, εστιασμένης στα μόρια Fas/FasL, με τη χρήση της μεθόδου της υγρής βιοψίας για τη μελέτη τους στο περιφερικό αίμα ασθενών με μεταστατικό ΚΜ, οι οποίοι πρόκειται να λάβουν θεραπεία πρώτης γραμμής. Για την επίτευξη αυτής της ερευνητικής διαδικασίας, θα πραγματοποιηθεί απομόνωση των ΚΚΚ από το περιφερικό αίμα των ασθενών, τα οποία στη συνέχεια θα αξιολογηθούν ως προς την έκφραση των μορίων Fas και FasL, τα οποία ενέχονται στο μονοπάτι του κυτταρικού θανάτου και έχουν βασικό στην ανοσολογική απάντηση του οργανισμού (έμφυτη και επίκτητη ανοσία). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι τα μόρια αυτά συμβάλλουν ενεργά στην ανοσοδιαφυγή του καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του ΚΜ. Συνεπώς, θα πραγματοποιηθεί ανίχνευση των ΚΚΚ και καταγραφή των φαινοτύπων έκφρασης αναφορικά με τα μόρια Fas και FasL στο σύνολο των ασθενών που προαναφέρθηκε. Εκτός από αυτό, παράλληλα θα πραγματοποιηθεί η μελέτη της έκφρασης των ίδιων μορίων στα ΜΚΠΑ των ίδιων ασθενών με σκοπό την σύγκρισή και συσχέτισή με την έκφραση στα ΚΚΚ. Τέλος, οι παραπάνω καταγραφές στα ΚΚΚ και ΜΚΠΑ θα διερευνηθούν περαιτέρω όσον αφορά την πιθανή τους κλινική σημασία, δηλαδή θα συσχετιστούν με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά και την έκβαση των ασθενών. Η παρούσα μελέτη αναμένεται να συμβάλει στην έως τώρα υπάρχουσα γνώση γύρω από τους μηχανισμούς της ανοσοδιαφυγής στον ΚΜ και να διερευνήσει περαιτέρω τη σημασία της υγρής βιοψίας στο εν λόγω πεδίο έρευνας.

4. Υλικά και μέθοδοι

4.1. Ασθενείς και εθελοντές αιμοδότες

Στην παρούσα μελέτη εντάχθηκαν 98 ασθενείς με μεταστατικό ΚΜ που επρόκειτο να λάβουν θεραπεία πρώτης γραμμής στην Ογκολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου (ΠΑΓΝΗ).

4.2. Καρκινική σειρά

Η κυτταρική σειρά H1975 προέρχεται από αδenoκαρκίνωμα πνεύμονα και χρησιμοποιήθηκε ως κυτταρική σειρά ελέγχου για την ανάπτυξη της τεχνικής του τριπλού ανοσοφθορισμού Fas/FasL/CK. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε σε θρεπτικό υλικό υψηλής γλυκόζης GlutaMAX™ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO-BRL Co, MD, USA) με προσθήκη 10% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO-BRL) και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (GIBCO-BRL).

4.2.1. Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς

4.2.1.1. Απόψυξη κυττάρων

Τα κύτταρα φυλάσσονται στην κατάψυξη (-80°C) σε διάλυμα με DMSO και FBS σε cryovials. Κατά την απόψυξη, αρχικά τα κύτταρα τοποθετούνται σε θερμοκρασία δωματίου και αφού ξεπαγώσει το διάλυμα τους, μεταφέρονται απευθείας σε falcon το οποίο περιέχει 5 ml κατάλληλου θρεπτικού μέσου. Στη συνέχεια, ακολουθεί φυγοκέντρηση του κυτταρικού εναιωρήματος για 5 λεπτά στα 1200 rpm, με σκοπό την απομάκρυνση του DMSO, το οποίο είναι τοξικό όταν παραμένει στα κύτταρα. Πραγματοποιείται επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος που έχει σχηματιστεί σε 1 ml θρεπτικού και γίνεται η προσθήκη επιπλέον θρεπτικού μέσου μέχρι τον τελικό όγκο των 5 ml. Τέλος, το εναιώρημα των κυττάρων ενίθεται σε φλάσκα η οποία τοποθετείται σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C με παροχή 5% CO_2 .

4.2.1.2. Ανάπτυξη κυττάρων

Μετά την απόψυξη τους, τα κύτταρα ελέγχονται την επόμενη ημέρα ως προς την πυκνότητα τους στη φλάσκα. Επίσης, πραγματοποιείται ανανέωση του θρεπτικού μέσου με την απόχυση του παλιού, το οποίο περιέχει κύτταρα μη προσκολλημένα

στη φλάσκα, συνήθως νεκρά, και γίνεται προσθήκη 6ml νέου θρεπτικού. Στη συνέχεια, η ανανέωση του θρεπτικού μέσου πραγματοποιείται ανά δύο ημέρες.

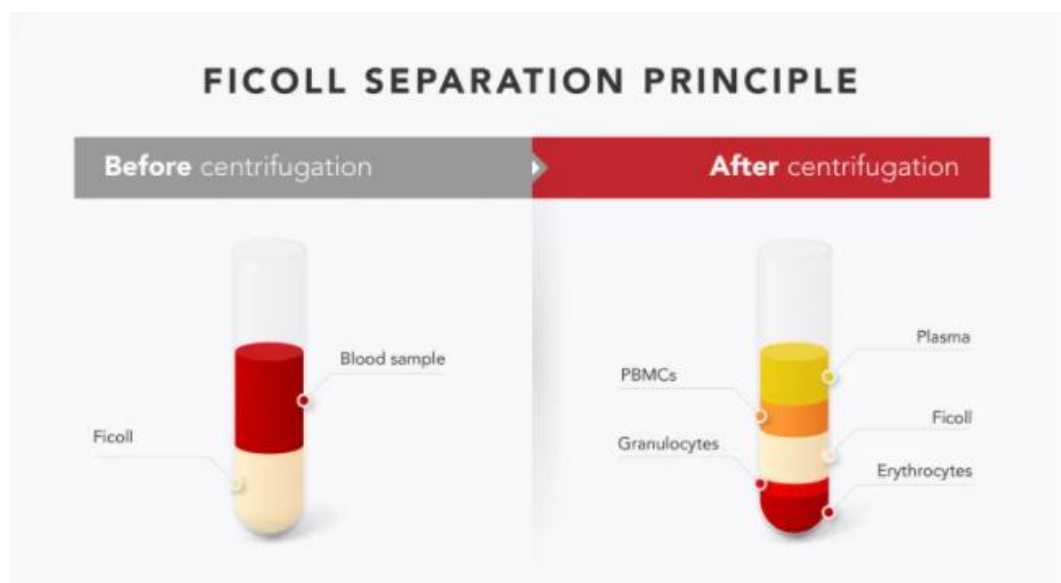
4.2.1.3. Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Όταν επιτευχθεί επικάλυψη του 70-80% της επιφάνειας της φλάσκας από τα κύτταρα, πραγματοποιείται η διαδικασία της ανακαλλιέργειας του υπάρχοντος κυτταρικού πληθυσμού. Συγκεκριμένα, αφαιρείται το υπάρχον θρεπτικό μέσο από τη φλάσκα και πραγματοποιούνται δύο πλύσεις της φλάσκας με 5ml PBS (1X) (Life Technologies) με σκοπό τη βέλτιστη απομάκρυνση των κατάλοιπων του θρεπτικού μέσου. Στη συνέχεια, προστίθεται διάλυμα τρυψίνης 0,05% (Trypsin-EDTA 0,05%, ThermoFisher) από 0,5ml έως 1ml στη φλάσκα, ανάλογα το ρυθμό με τον οποίο τα κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να αποκολλώνται από την επιφάνεια της φλάσκας. Έπειτα, η φλάσκα τοποθετείται στον κλίβανο στους 37°C, όπου αναδεικνύεται η μέγιστη ενεργότητα του ενζύμου και όταν παρατηρηθεί η πλήρης αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνειά της, γίνεται προσθήκη θρεπτικού μέσου, μέχρι τον τελικό όγκο των 5ml, ώστε να απενεργοποιηθεί πλήρως η ενζυμική δράση της τρυψίνης. Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται στη συνέχεια σε falcon όπου φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στα 1200 rpm με σκοπό την απομάκρυνση του θρεπτικού όπου περιέχεται η τρυψίνη. Πραγματοποιείται επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος που δημιουργήθηκε σε 1ml θρεπτικού υλικού και στη συνέχεια προστίθεται επιπλέον θρεπτικό μέχρι τον τελικό όγκο των 6ml για τη συνέχιση της καλλιέργειας.

4.3. Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (ΜΚΠΑ) μέσω φυγοκέντρωσης με διαβαθμισμένη πυκνότητα φικόλης

Αρχικά, πραγματοποιείται συλλογή ολικού αίματος 15ml από κάθε ασθενή όγκου σε κατάλληλα φιαλίδια στα οποία έχει προστεθεί ποσότητα διαλύματος EDTA, ενός αντιπηκτικού παράγοντα. Στη συνέχεια, το δείγμα αραιώνεται με ισότονο διάλυμα 0,9% Sodium Chloride σε αραιώση 1:1 και προστίθεται σταδιακά σε falcon των 50 ml όπου περιέχονται 15 ml φικόλης, με ιδιαίτερη προσοχή για την αποφυγή της ανάμιξης των διαλυμάτων. Πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για 45 λεπτά στους 18°C στα 400g. Δημιουργείται ένας δακτύλιος μεταξύ του κλάσματος της φικόλης και του πλάσματος, στον οποίο περιέχονται τα μονοπύρηννα κύτταρα αλλά και τα ΚΚΚ.

Συνεπώς, γίνεται η λήψη μόνο αυτού του δακτυλίου με τη χρήση πιπέτας των 5ml, αποφεύγοντας την αναρρόφηση φικόλης η οποία έχει κυτταροτοξική δράση, και μεταφορά σε falcon των 50ml με προσθήκη 40ml PBS. Έπειτα, πραγματοποιείται ανάδευση των κυτάρων με ελαφριά κίνηση και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στους 18°C στα 400g, προκειμένου να εκλυθεί το δείγμα. Ακολουθεί η απόχυση του υπερκειμένου και η επαναδιάλυση του δημιουργούμενου ιζήματος με προσθήκη 40ml PBS. Επαναλαμβάνεται η ανάδευση των κυτάρων με ελαφριά κίνηση και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στους 18°C στα 400g. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται απόχυση του υπερκειμένου και επαναδιαλύεται το δημιουργούμενο ίζημα με την προσθήκη 1ml PBS και στη συνέχεια με περαιτέρω προσθήκη PBS μέχρι τα 10ml. Τέλος, λαμβάνονται 10μl δείγματος και τα κύτταρα καταμετρούνται με τη μέθοδο του Trypan Blue (90μl Trypan Blue) σε οπτικό μικροσκόπιο με αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.



Εικόνα 14. Η τεχνική διαχωρισμού με Ficoll-Paque για την απομόνωση των ΜΚΠΑ. (Αριστερά) Δείγμα πριν από τη φυγοκέντρηση. (Δεξιά) Δείγμα μετά τη φυγοκέντρηση με διαχωρισμένα κυτταρικά στρώματα με βάση την πυκνότητα.⁸⁵

4.4. Επίστρωση κυτάρων σε αντικειμενοφόρους πλάκες

Επιστρώνεται η κατάλληλη ποσότητα δείγματος από κάθε ασθενή σε 10 αντικειμενοφόρους πλάκες έτσι ώστε κάθε πλάκα να διαθέτει συνολικά 1.000.000 απομονωμένα κύτταρα. Στη συνέχεια, οι αντικειμενοφόροι πλάκες φυγοκεντρούνται για 2 λεπτά στα 2000rpm με σκοπό την προσκόλληση των κυτάρων στην επιφάνεια

τους. Τέλος, οι πλάκες τοποθετούνται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου να στεγνώσουν τα κύτταρα στην επιφάνεια τους και αποθηκεύονται στους -80°C . Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, αναλύθηκαν 2 αντικειμενοφόρες πλάκες για την ανίχνευση ΚΚΚ και τον χαρακτηρισμό τους ως προς το Fas και το FasL για κάθε ασθενή.

4.5. Τριπλός ανοσοφθορισμός

Η χρώση των κυττάρων στις αντικειμενοφόρους πλάκες έγινε για τους δείκτες CK, Fas και FasL. Σε κάθε πείραμα με δείγματα ασθενών συμπεριελήφθησαν και 3 δείγματα με κύτταρα της καρκινικής σειράς H1975 ως δείγματα ελέγχου, προκειμένου να καθοριστεί το κατώφλι θετικότητας για την έκφραση των δύο μορίων στα ΚΚΚ και στα ΜΚΠΑ. Για τον έλεγχο της ποιότητας της χρώσης πραγματοποιείται προεργασία 3 δειγμάτων H1975, εκ των οποίων το ένα σημαίνεται και για τους τρεις δείκτες (CK+, Fas+, FasL+), ενώ τα άλλα δύο λειτουργούν ως αρνητικοί μάρτυρες για τους δείκτες FAS και FASL αντίστοιχα, δηλαδή σε αυτά δεν προστίθεται το αντίσωμα του δείκτη για τον οποίο είναι αρνητικά. Ο αριθμός των 30 δειγμάτων αποτελεί τον μέγιστο αριθμό με τον οποίο μπορεί να εφαρμοστεί το πειραματικό πρωτόκολλο με βέλτιστο τρόπο χωρίς προβλήματα διαχείρισης.

Αρχικά, πραγματοποιείται απόψυξη των δειγμάτων (αντικειμενοφόροι πλάκες) των ασθενών σε θερμοκρασία δωματίου (5-10 λεπτά). Ακολουθεί η εναπόθεση υδρόφιλου υλικού, που περιέχεται στο στυλό Dakoren, περιμετρικά των αντικειμενοφόρων πλακών, ώστε να αποτραπεί η διαρροή των υγρών κατά την πειραματική διαδικασία. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται σε κασετίνες όπου και θα πραγματοποιηθεί η διαδικασία της χρώσης. Εκεί ακολουθεί η μονιμοποίηση των κυττάρων στις πλάκες με προσθήκη διαλύματος φορμαλδεΰδης 3,7% και επώαση για 15 λεπτά. Μετά από τρεις πλύσεις με PBS(1X) διάρκειας τριών λεπτών ακολουθεί η διαπερατοποίηση των κυτταρικών μεμβρανών για την εισχώρηση των αντισωμάτων με τη χρήση του διαλύματος Triton X-100 0,1%. Αφού πραγματοποιηθούν τρεις πλύσεις με PBS διάρκειας τριών λεπτών ακολουθεί το blocking των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων με την προσθήκη του διαλύματος FBS (fetal bovine serum, GIBCO-BRL) 5% σε PBS για 2 ώρες. Έπειτα, γίνεται η προσθήκη των αντισωμάτων anti-FAS σε αραιώση 1:100, anti-FASL σε αραιώση 1:75 και τα δύο anti-CK, AE1/AE3 σε αραιώση 1:100 και C11 σε 1:175 στους 4°C σε συνθήκες υγρασίας για 16 ώρες (overnight).

Την επόμενη ημέρα, πραγματοποιούνται αρχικά τέσσερις των τριών λεπτών πλύσεις με FBS 5% και προστίθεται το φθοριόχρωμα Alexa-555 anti-rabbit σε αραιώση 1:300 για 45 λεπτά. Αφού πραγματοποιηθούν τέσσερις πλύσεις των τριών λεπτών με FBS 5% τοποθετείται μία σταγόνα χρωστικής Dapi-anti-fade σε κάθε πλάκα και κλείσιμο αυτής με ειδική καλυπτρίδα. Στη συνέχεια, οι αντικειμενόφοροι πλάκες παραμένουν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να στεγνώσουν επαρκώς και φυλάσσονται στους -20°C. Τέλος, πραγματοποιείται η αξιολόγηση του τριπλού ανοσοφθορισμού με ένα ημι-αυτοματοποιημένο σύστημα μικροσκοπίας ανοσοφθορισμού (ARIOL, Leica).



Εικόνα 15. Η διαδικασία του blocking.

Διάλυμα	Συγκέντρωση	Διαλύτης
PBS(1X)	1tablet/500ml	Water for injection
Φορμαλδεΐδη	3,7%	PBS(1X)
Triton X-100	0,1%	PBS(1X)
Blocking buffer-FBS/PBS	5%	PBS(1X)

Πίνακας 1. Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στον τριπλό ανοσοφθορισμό.

Αντίσωμα	Αραίωση	Εταιρία	Διαλύτης

Mouse anti-FAS Receptor, DyLight 650 Mab	1:10 0	Novus	FBS 5% / PBS
anti-FASLG Purified MaxPab	1:75	Abnova	FBS 5% / PBS
Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit	1:30 0	Life technologies	FBS 5% / PBS
Mouse anti-Cytokeratin, pan (C-11), Alexa Fluor 488 mAB	1:20 0	Novus	FBS 5% / PBS
Anti-Pan Cytokeratin, AE1/AE3, Alexa Fluor 488	1:10 0	Invitrogen	FBS 5% / PBS
ProLong Gold antifade reagent with DAPI	-	Invitrogen	-

Πίνακας 2. Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στον τριπλό ανοσοφθορισμό.

Αξίζει να σημειωθεί ότι προκειμένου να προκύψουν οι βέλτιστες συνθήκες και συγκεντρώσεις του τριπλού ανοσοφθορισμού έναντι των μορίων Fas/FasL/CK σε δείγματα ασθενών, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές στην κυτταρική σειρά H1975. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι όταν τα συγκεκριμένα αντισώματα και το φθοριόχρωμα τους όταν χρησιμοποιήθηκαν με την προαναφερόμενη διαδικασία, σειρά και αραίωση έδωσαν το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα ως προς την ένταση του φθορισμού.

4.6. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το στατιστικό πρόγραμμα SPSS software package, έκδοση 22.0 (SPSS Inc. Chicago IL, USA).

5. Αποτελέσματα

5.1. Χαρακτηριστικά των ασθενών και της νόσου.

Στην παρούσα μελέτη εντάχθηκαν 98 ασθενείς με μεταστατικό ΚΜ οι οποίοι επρόκειτο να λάβουν θεραπεία πρώτης γραμμής. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών (n=98) με μεταστατικό ΚΜ, καθώς και τα χαρακτηριστικά της νόσου συνοψίζονται στον πίνακα 3.

Ασθενείς με μεταστατικό ΚΜ (n= 98)	<i>n (%)</i>
Ηλικία, χρόνια; Μέσος όρος (εύρος)	59 (29-84)
Δείκτης γενικής κατάστασης κατά ECOG*	
0–1	92 (93,9)
2-3	3 (3,1)
Άγνωστο	3 (3,1)
Εμμηνοπαυσιακή κατάσταση	
Προ-εμμηνοπαυσιακή	27 (27,6)
Μετά-εμμηνοπαυσιακή	69 (70,4)
Άγνωστο	2 (2)
Ιστολογία	
Πορογενές	81 (82,7)
Λοβιακό	9 (9,2)
Μικτό	5 (5,1)
Άγνωστο	3 (3,1)
Στάδιο κατά τη διάγνωση	
I–III	70 (71,4)
IV	28 (28,6)
Υπότυπος	
ER+ και/ή PR+/HER2-	63 (64,3)
HER2+	23 (23,5)
Τριπλά αρνητικός	12 (12,2)

Προηγούμενη επικουρική	
θεραπεία	
Ναι	66 (67,3)
Όχι	30 (30,6)
Άγνωστο	2 (2)
Επηρεαζόμενα όργανα	
Λεμφαδένες	39 (39,8)
Πνεύμονες	41 (41,8)
Οστά	38 (38,8)
Ήπαρ	35 (35,7)
Κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ)	9 (9,2)
Δέρμα	6 (6,1)
Εστίες	
1–2	62 (63,3)
>2	33 (33,7)
Άγνωστο	3 (3,1)
Θεραπεία πρώτης γραμμής	
Βασιζόμενη στην ταξάνη	67(68,4)
Βασιζόμενη στην ανθρακυκλίνη	5(5,1)
Βασιζόμενη στην ταξάνη/ανθρακυκλίνη	9(9,2)
Άλλο	17(17,3)
Ανταπόκριση στη θεραπεία κατά την πρώτη εκτίμηση	
Μερική ανταπόκριση (PR)	38 (38,8)
Σταθερή νόσος (SD)	34 (34,7)
Πρόοδος νόσου (PD)	19 (19,4)
Μη αξιολογήσιμο	7 (7,1)

Πίνακας 3. Χαρακτηριστικά ασθενών και μεταστατικού ΚΜ.

*ECOG= Eastern Cooperative Oncology Group

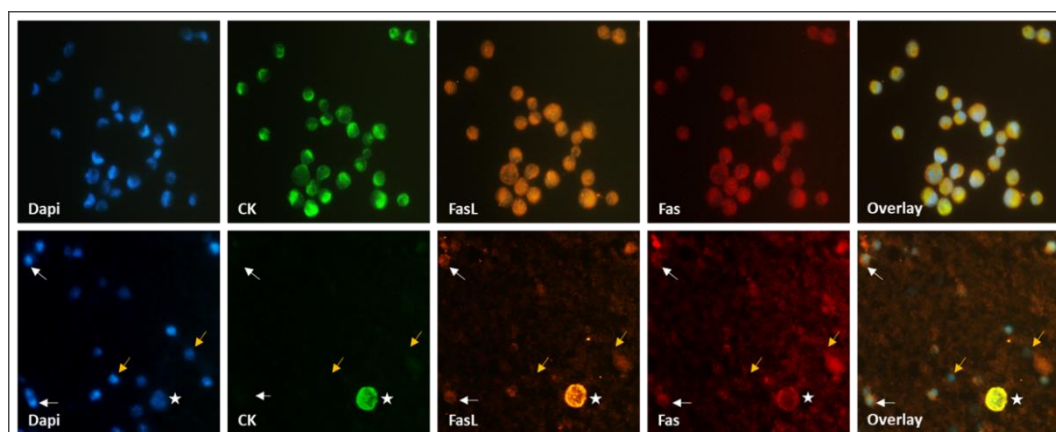
5.2. Συχνότητα ανίχνευσης ΚΚΚ σε ασθενείς με μεταστατικό ΚΜ.

Αρχικά, διερευνήθηκε η συχνότητα ανίχνευσης των ΚΚΚ (CK-θετικών κυττάρων) στους ασθενείς με μεταστατικό ΚΜ πριν την έναρξη θεραπείας πρώτης γραμμής. Όπως φαίνεται στον πίνακα 4, στο σύνολο των 98 ασθενών βρέθηκαν 26 ασθενείς

(26,5%) θετικοί για την ύπαρξη ΚΚΚ, με τον συνολικό αριθμό των κυττάρων που ανιχνεύθηκαν να ανέρχεται στα 70.

Συχνότητα ανίχνευσης ΚΚΚ	
Θετικότητα σε ΚΚΚ, αρ. (%) ασθενών	26 (26,5%)
Συνολικός αρ. ΚΚΚ	70

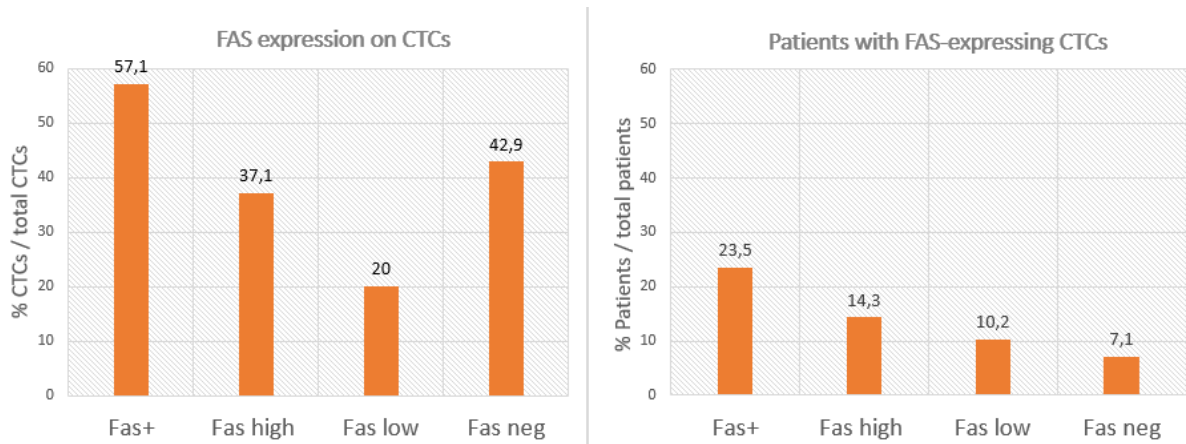
Πίνακας 4. Συχνότητα ανίχνευσης ΚΚΚ σε ασθενείς με μεταστατικό ΚΜ.



Εικόνα 16. Φωτογραφίες από ARIOL system (x400). (Πάνω σειρά) Κυτταρική σειρά H1975. (Κάτω σειρά) ΜΚΠΑ και ΚΚΚ ασθενή. [Αστερίσκος: ΚΚΚ ($Fas^{high}/FasL^{high}$) / Κίτρινο βέλος: διπλά αρνητικά ($Fas-/FasL-$) ΜΚΠΑ / Λευκό βέλος: διπλά θετικά ($Fas+/FasL+$) ΜΚΠΑ]

5.3. Συχνότητα έκφρασης Fas στα ΚΚΚ ασθενών με μεταστατικό ΚΜ.

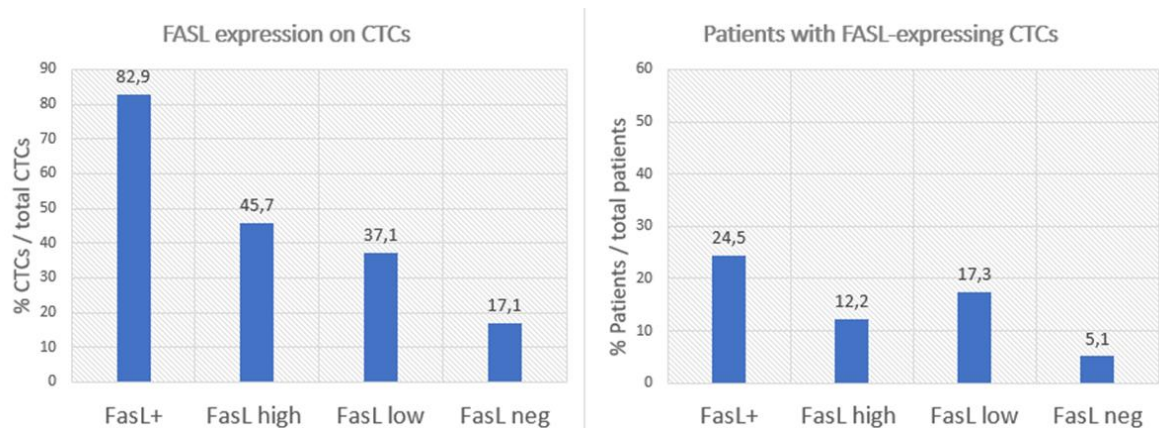
Στο γράφημα 2Α απεικονίζονται τα ποσοστά έκφρασης του υποδοχέα Fas στο σύνολο των ΚΚΚ που ανιχνεύθηκαν. Έκφραση του Fas ανιχνεύτηκε στο 57,1% των ΚΚΚ, όπου συγκεκριμένα το 37,1% αφορά σε υψηλή (Fas^{high}) και το 20% σε χαμηλή (Fas^{low}) έκφραση του υποδοχέα. Όσον αφορά στους ασθενείς (γράφημα 2B), ΚΚΚ θετικά για Fas ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 23,5%, ενώ Fas^{high} ΚΚΚ και Fas^{low} ΚΚΚ ανιχνεύτηκαν στο 14,3% και 10,2% των ασθενών, αντίστοιχα. Τέλος, τα ΚΚΚ αρνητικά στην έκφραση του υποδοχέα αντιπροσωπεύουν το 42,9% των συνολικών ΚΚΚ και ανιχνεύονται στο 7,1% των ασθενών.



Γράφημα 2. Α) Ποσοστό ΚΚΚ με έκφραση Fas επί του συνόλου των ΚΚΚ. Β) Ποσοστό ασθενών με έκφραση Fas επί του συνόλου των ασθενών.

5.4. Συχνότητα FasL στα ΚΚΚ ασθενών με μεταστατικό ΚΜ.

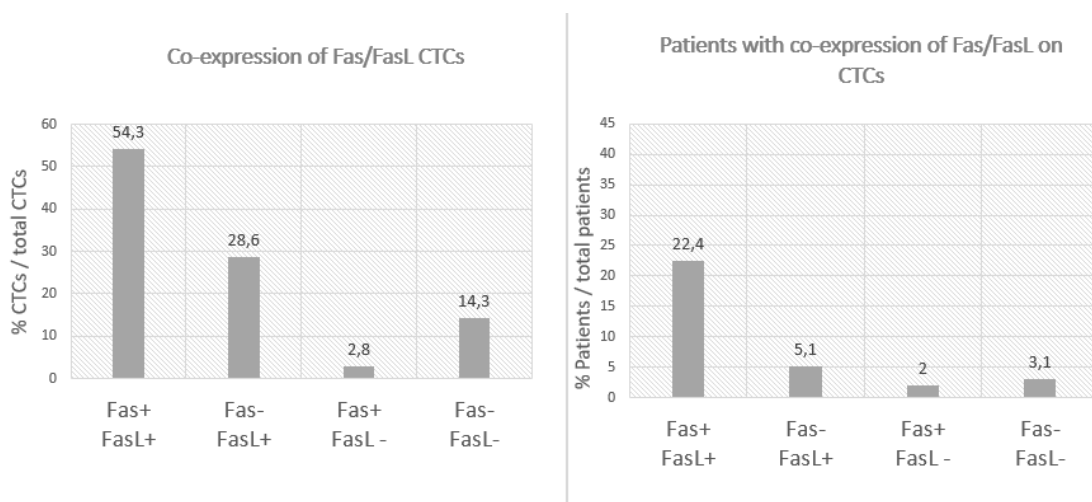
Στο γράφημα 3Α απεικονίζονται τα ποσοστά έκφρασης του συνδέτη FasL στο σύνολο των ΚΚΚ που ανιχνεύθηκαν. Έκφραση του FasL ανιχνεύτηκε στο 82,9% των ΚΚΚ, όπου συγκεκριμένα το 45,7% αφορά σε υψηλή (FasL^{high}) και το 37,1% σε χαμηλή (FasL^{low}) έκφραση του συνδέτη. Όσον αφορά στους ασθενείς (γράφημα 3Β), ΚΚΚ θετικά για FasL ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό 24,5%, ενώ FasL^{high} ΚΚΚ και FasL^{low} ΚΚΚ ανιχνεύθηκαν στο 12,2% και 17,3% των ασθενών, αντίστοιχα. Τέλος, ΚΚΚ αρνητικά στην έκφραση του υποδοχέα αντιπροσωπεύουν το 17,1% των συνολικών ΚΚΚ και ανιχνεύονται στο 5,1% των ασθενών.



Γράφημα 3. Α) Ποσοστό ΚΚΚ με έκφραση FasL επί του συνόλου των ΚΚΚ. Β) Ποσοστό ασθενών με έκφραση FasL επί του συνόλου των ασθενών.

5.5. Συν-έκφραση Fas και FasL στα ΚΚΚ ασθενών με μεταστατικό ΚΜ.

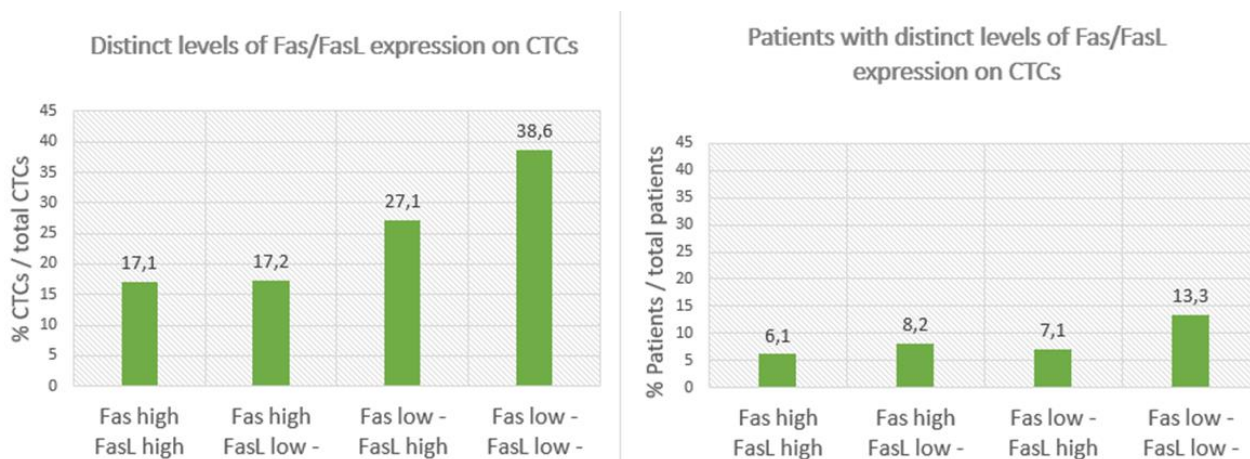
Στη συνέχεια αξιολογήθηκε η συν-έκφραση των δύο μορίων στο ίδιο κύτταρο. Αρχικά, όσον αφορά την θετικότητα, προέκυψαν 4 φαινότυποι, οι Fas+/FasL+, Fas-/FasL+, Fas+/FasL- και Fas-/FasL- (Γράφημα 4A, B). Το μεγαλύτερο ποσοστό ανίχνευσης κατείχε ο φαινότυπος Fas+/FasL+ όσον αφορά το ποσοστό ΚΚΚ επί του συνόλου των ΚΚΚ, καθώς και το ποσοστό ασθενών επί του συνόλου των ασθενών, με ποσοστά 54,3% και 22,4%, αντίστοιχα. Στη συνέχεια ακολουθούν οι φαινότυποι Fas-/FasL+ με ποσοστό ΚΚΚ επί του συνόλου των ΚΚΚ και ποσοστό ασθενών επί του συνόλου των ασθενών 28,6% και 5,1%, αντίστοιχα και Fas-/FasL- με 14,3% και 3,1%, αντίστοιχα. Επιπροσθέτως, το 2% των φαινοτύπων των ΚΚΚ των ασθενών αντιστοιχεί στο Fas+/FasL-, ο οποίος παρατηρήθηκε μόλις σε δύο ασθενείς με ποσοστό ΚΚΚ επί του συνόλου των ΚΚΚ 2,8%, το οποίο αποτελεί μειοψηφία και στα δύο επίπεδα.



Γράφημα 4. Α) Ποσοστό ΚΚΚ με συν-έκφραση Fas και FasL επί του συνόλου των ΚΚΚ. Β) Ποσοστό ασθενών με συν-έκφραση Fas και FasL επί του συνόλου των ασθενών.

Επιπλέον, έπειτα από την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των δύο μορίων, προέκυψαν οι εξής διαφορετικοί συνδυασμοί: Fas^{high}/FasL^{high}, Fas^{high}/FasL^{low/neg}, Fas^{low/neg}/FasL^{high} και Fas^{low/neg}/FasL^{low/neg}. (Γράφημα 5A, B) Ο φαινότυπος Fas^{low}/FasL^{low} είναι ο επικρατέστερος, καθώς εκφράζεται στο 38,6% των ΚΚΚ (γράφημα 5A) και στο 13,3% των ασθενών (γράφημα 5B). Ο δεύτερος σε συχνότητα φαινότυπος στα ΚΚΚ είναι ο Fas^{low}/FasL^{high} με ποσοστό 27,1% και ακολουθούν οι Fas^{high}/FasL^{high} και Fas^{high}/FasL^{low} με 17,1% και 17,2%, αντίστοιχα. Σε επίπεδο ασθενών, όπως προκύπτει από το γράφημα 5B, οι φαινότυποι

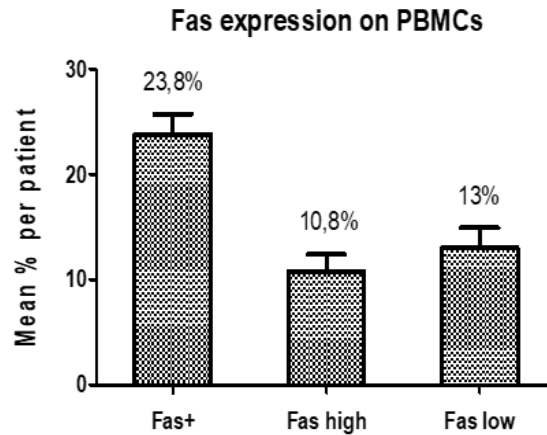
Fas^{high}/FasL^{low} και Fas^{low}/FasL^{high} ανιχνεύονται σε ποσοστά 8,2% και 7,1% αντίστοιχα και ο Fas^{high}/FasL^{high}, αποτελεί τη σπανιότερη περίπτωση, καθώς ανιχνεύτηκε στο 6,1% των ασθενών.



Γράφημα 5. Α) Ποσοστό ΚΚΚ με συγκεκριμένους φαινοτύπους που αφορούν την συν-έκφραση Fas και FasL επί του συνόλου των ΚΚΚ. Β) Ποσοστό ασθενών με συγκεκριμένους φαινοτύπους που αφορούν την συν-έκφραση Fas και FasL επί του συνόλου των ασθενών.

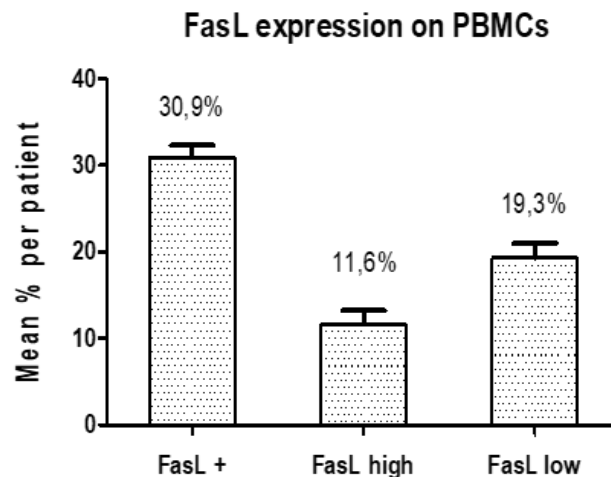
5.6. Συχνότητα έκφρασης Fas και FasL στα ΜΚΠΑ ασθενών με μεταστατικό ΚΜ.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός των ΜΚΠΑ ως προς την έκφραση των δεικτών Fas και FasL σε 91 ασθενείς με μεταστατικό ΚΜ. Το μέσο ποσοστό έκφρασης του Fas στα ΜΚΠΑ για κάθε ασθενή ανέρχεται στο 23,8% (απόκλιση μέσης τιμής: $\pm 1,9$). Επιπλέον το μέσο ποσοστό έκφρασης των Fas^{high} και Fas^{low} φαινοτύπων στα ΜΚΠΑ είναι 10,8% (απόκλιση μέσης τιμής: $\pm 1,6$) και 13% (απόκλιση μέσης τιμής: $\pm 1,8$), αντίστοιχα. (Γράφημα 6)



Γράφημα 6. Μέσο ποσοστό έκφρασης του Fas στα ΜΚΠΑ.

Το μέσο ποσοστό έκφρασης του FasL στα ΜΚΠΑ για κάθε ασθενή ανέρχεται στο 30,9% (απόκλιση μέσης τιμής: $\pm 1,4$). Επιπλέον το μέσο ποσοστό έκφρασης των FasL^{high} και FasL^{low} φαινοτύπων στα ΜΚΠΑ είναι 11,6% (απόκλιση μέσης τιμής: $\pm 1,6$) και 19,3% (απόκλιση μέσης τιμής: $\pm 1,7$), αντίστοιχα. (Γράφημα 7)



Γράφημα 7. Μέσο ποσοστό έκφρασης του FasL στα ΜΚΠΑ.

5.7. Συσχέτιση της έκφρασης των μορίων Fas και FasL στα ΚΚΚ και τα ΜΚΠΑ.

Ακολούθως, διερευνήθηκε το ενδεχόμενο να υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των μορίων Fas και FasL στα ΚΚΚ και τα ΜΚΠΑ του ίδιου ασθενούς.

Είναι αρκετά ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι ασθενείς που είχαν Fas^{high}/FasL^{high} ΚΚΚ, είχαν επίσης αυξημένο ποσοστό Fas^{high} ΜΚΠΑ (mean rank: 76,8% έναντι 44,6%; $p=0,002$, Mann Whitney U test). Παράλληλα, αυξημένο ποσοστό FasL^{high} ΜΚΠΑ καταγράφηκε επίσης σε ασθενείς με Fas^{high}/FasL^{high} ΚΚΚ (mean rank: 70,6% έναντι 44%; $p=0,021$, Mann Whitney U test), καθώς και σε ασθενείς με Fas^{low}/FasL^{high} ΚΚΚ (mean rank: 66% έναντι 44%; $p=0,038$, Mann Whitney U test).

PBMC phenotype (Mean %)	Detection of distinct CTC subsets					
	Fas ^{high} /FasL ^{high}			Fas ^{low.neg} /FasL ^{high}		
	yes	no	p value	yes	no	p value
Fas ^{high} PBMCs	76.8	44.6	0.002	51.8	45.1	0.500
FasL ^{high} PBMCs	70.6	44	0.021	66	44	0.038

Πίνακας 5. Συσχέτιση της έκφρασης Fas και FasL στα ΚΚΚ και τα ΜΚΠΑ.

5.8. Κλινική σημασία της έκφρασης των Fas και FasL στα ΚΚΚ και ΜΚΠΑ των ασθενών με μεταστατικό ΚΜ.

5.8.1. Συσχέτιση με κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά

ΚΚΚ

Αρχικά, παρατηρήθηκε διαφορετική κατανομή των ΚΚΚ σε ασθενείς με εξ' αρχής μεταστατική και σε ασθενείς με υποτροπιάζουσα νόσο. Συγκεκριμένα, η συχνότητα ανίχνευσης ΚΚΚ ήταν μεγαλύτερη σε ασθενείς με εξ' αρχής μεταστατική νόσο (21,4% έναντι 2,9% των ασθενών, $p=0,006$).

Επιπλέον, συσχετίστηκε η ύπαρξη μεταστάσεων στα οστά με την ανίχνευση των ΚΚΚ, καθώς και συγκεκριμένων φαινοτύπων για Fas και FasL σε αυτά. Συγκεκριμένα, η συχνότητα ανίχνευσης ΚΚΚ ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς με οστικές μεταστάσεις (39,5% έναντι 17,2% των ασθενών, $p=0,015$). Επιπλέον, οι ασθενείς με οστικές μεταστάσεις είχαν επίσης συχνότερα Fas^{high} ΚΚΚ (26,3% έναντι 6,9%, $p=0,016$). Όσον αφορά την ύπαρξη μεταστάσεων στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), αυτή επίσης συσχετίστηκε με την εντόπιση Fas^{high} (44,4% έναντι 11,5%, $p=0,024$) και Fas^{high}FasL^{low/neg} (33,3% έναντι 5,7%, $p=0,026$) ΚΚΚ.

ΜΚΠΑ

Δεν προέκυψε κάποια συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των Fas ή/και FasL στα ΜΚΠΑ και των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των ασθενών.

5.8.2. Συσχέτιση με ανταπόκριση στη θεραπεία

ΚΚΚ

Όσον αφορά την ανταπόκριση στη θεραπεία πρώτης γραμμής, η ανίχνευση αποκλειστικά FasL^{high} ΚΚΚ παρατηρήθηκε κυρίως σε ασθενείς με πρόοδο νόσου (progressive disease, PD) σε σχέση με εκείνους που εμφάνισαν σταθερή νόσο (stable disease, SD), ενώ παρόμοια παρατήρηση δεν έγινε σε κανένα ασθενή με μερική απόκριση στη θεραπεία (partial response, PR) (15,8% έναντι 8,8% έναντι 0%, αντίστοιχα, $p=0,039$). Επιπροσθέτως, τα Fas^{high}/FasL^{high} ΚΚΚ καταγράφηκαν συχνότερα σε ασθενείς με πρόοδο νόσου σε σχέση με αυτούς με που είχαν ή σταθερή νόσο ή μερική απόκριση στη θεραπεία (PD έναντι SD έναντι PR = 15,8% έναντι 5,9% έναντι 0%, $p=0,035$).

ΜΚΠΑ

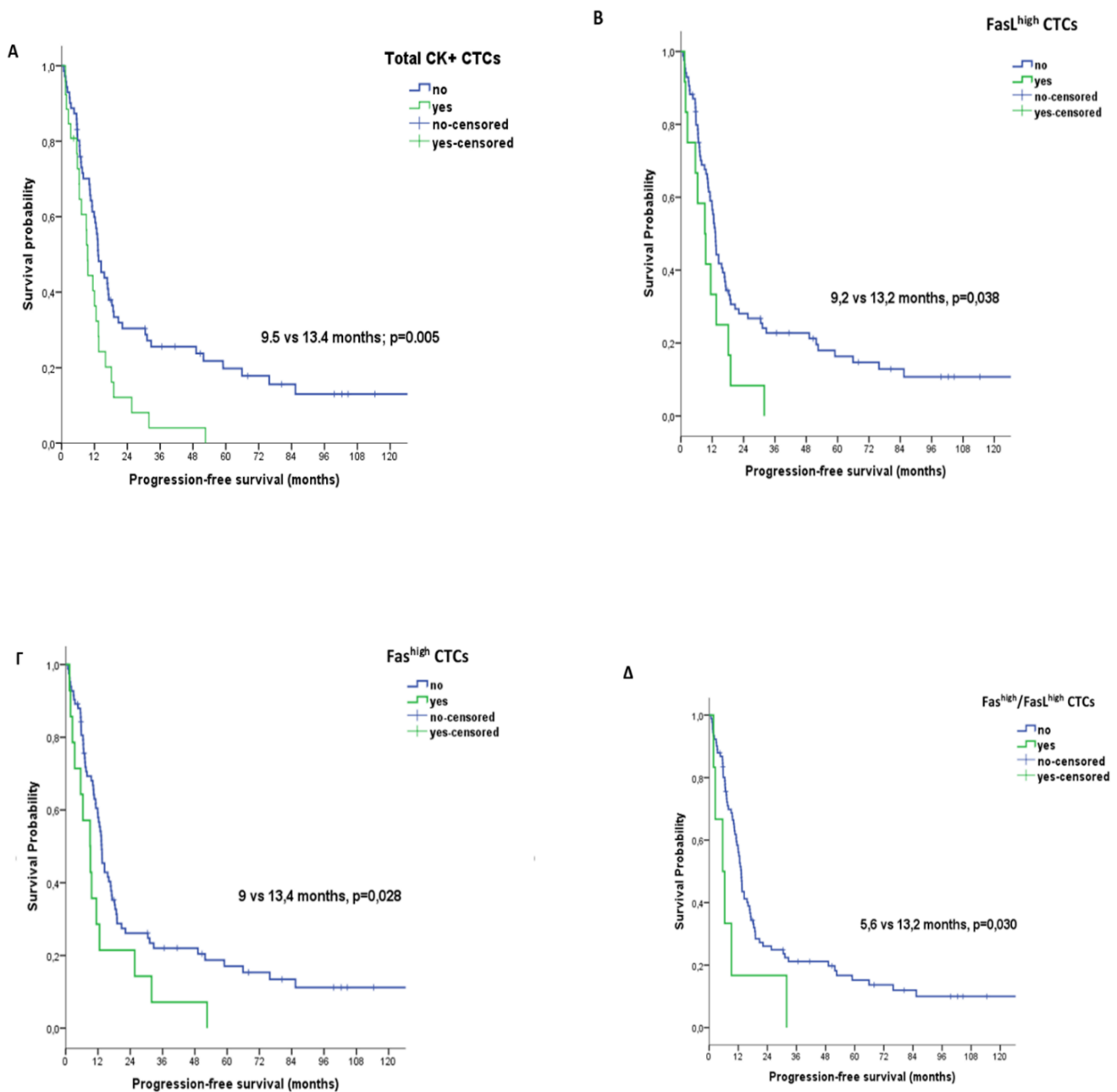
Δεν προέκυψε κάποια συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των Fas ή/και FasL στα ΜΚΠΑ και της ανταπόκρισης στη θεραπεία πρώτης γραμμής.

5.8.3. Συσχέτιση με την επιβίωση

Επιβίωση έως την πρόοδο (progression-free survival, PFS)

ΚΚΚ

Η ανίχνευση του συνολικού αριθμού των ΚΚΚ στους ασθενείς με μεταστατικό ΚΜ συσχετίστηκε με μειωμένη επιβίωση έως την πρόοδο (9,5 έναντι 13,4 μήνες, $p = 0,005$) (γράφημα 8Α). Επίσης, οι ασθενείς με FasL^{high} ΚΚΚ και εκείνοι με Fas^{high} ΚΚΚ είχαν μικρότερο PFS (9,2 έναντι 13,2 μήνες, $p = 0,038$ και 9 έναντι 13,4 μήνες, $p = 0,028$ αντίστοιχα) (γράφημα 8Β, Γ). Ειδικότερα, οι ασθενείς με Fas^{high}/FasL^{high} ΚΚΚ είχαν αρκετά μικρότερο PFS (5,6 έναντι 13,2 μήνες, $p = 0,03$) (γράφημα 8Δ).



Γράφημα 10. Καμπύλη Kaplan–Meier για το PFS αναφορικά με την παρουσία και τον φαινότυπο των ΚΚΚ. Α) PFS αναφορικά με την ανίχνευση των συνολικών ΚΚΚ. Β) PFS αναφορικά με την ανίχνευση των FasL^{high} ΚΚΚ. Γ) PFS αναφορικά με την ανίχνευση των Fas^{high} ΚΚΚ. Δ) PFS αναφορικά με την ανίχνευση των Fas^{high}/FasL^{high} ΚΚΚ.

ΜΚΠΑ

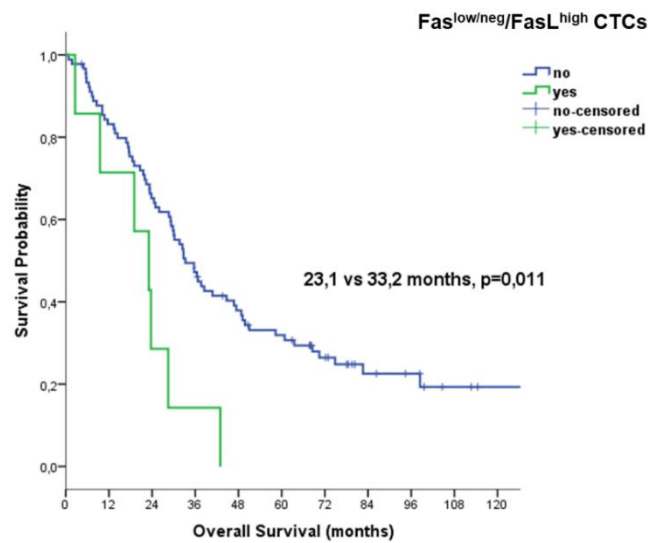
Δεν προέκυψε κάποια συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των Fas ή/και FasL στα ΜΚΠΑ και της επιβίωσης των ασθενών.

Συνολική επιβίωση (overall survival, OS)

ΚΚΚ

Οι ασθενείς με Fas^{low/neg}/FasL^{high} ΚΚΚ είχαν σημαντικά μειωμένη συνολική επιβίωση

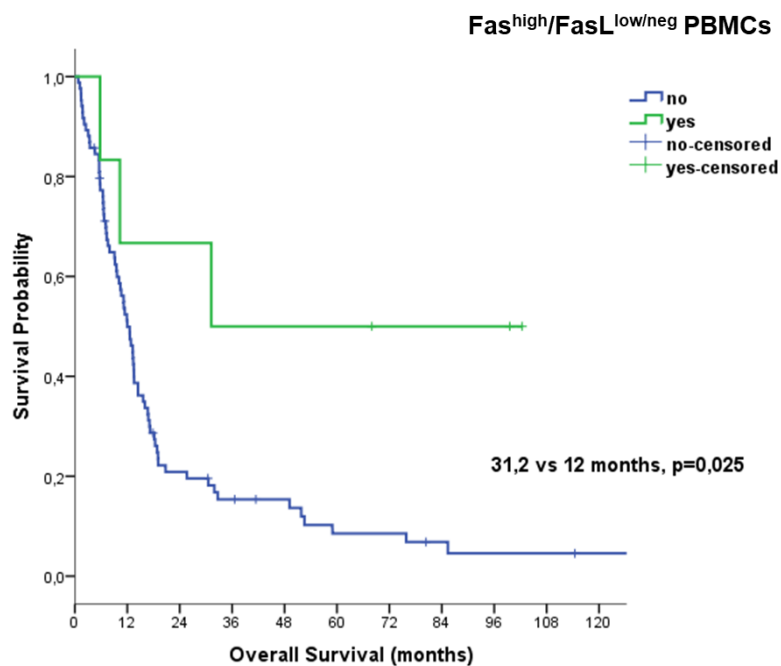
(23,1 έναντι 33,2 μήνες, $p = 0,011$). (Γράφημα 11)



Γράφημα 11. Καμπύλη Kaplan–Meier για το OS αναφορικά με την ανίχνευση των Fas^{low/neg}/FasL^{high} ΚΚΚ.

ΜΚΠΑ

Η ανίχνευση του φαινοτύπου Fas^{high}/FasL^{low/neg} στα ΜΚΠΑ των ασθενών με μεταστατικό ΚΜ συσχετίστηκε με αυξημένη συνολική επιβίωση (OS) (31,2 έναντι 12 μήνες, $p = 0.025$). (Γράφημα 12)



Γράφημα 12. Καμπύλη Kaplan–Meier για το OS αναφορικά με την ανίχνευση των Fas^{high}/FasL^{low/neg} ΜΚΠΑ.

6. Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε η αξιολόγηση της έκφρασης των Fas/FasL στα ΚΚΚ και στα ΜΚΠΑ στο περιφερικό αίμα ασθενών με μεταστατικό ΚΜ που επρόκειτο να λάβουν θεραπεία πρώτης γραμμής.

Αρχικά, η εντόπιση της έκφρασης του FasL ήταν συχνότερη από αυτή του Fas σε επίπεδο ΚΚΚ και σε επίπεδο ασθενών. Επιπλέον, όσον αφορά τη συν-έκφραση των δύο μορίων στα ΚΚΚ, το μεγαλύτερο ποσοστό ανίχνευσης κατείχε ο φαινότυπος Fas⁺/FasL⁺ στο σύνολο των ΚΚΚ και των ασθενών, αντίστοιχα. Έπειτα από την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των δύο μορίων, προέκυψαν διαφορετικοί συνδυασμοί φαινοτύπων έκφρασης με την περίπτωση της χαμηλής και για τα δύο μόρια έκφρασης (Fas^{low}/FasL^{low}) να είναι πιο συχνή σε επίπεδο ΚΚΚ και ασθενών.

Αντίστοιχα, όσον αφορά τα ΜΚΠΑ, το μέσο ποσοστό έκφρασης του FasL ήταν υψηλότερο σε σχέση με του Fas στα ΜΚΠΑ των ασθενών. Τέλος, μετά τη διερεύνηση του ενδεχόμενου να συσχετίζονται κάποιοι από τους φαινοτύπους έκφρασης στα ΚΚΚ με συγκεκριμένους φαινοτύπους έκφρασης στα ΜΚΠΑ του ίδιου ασθενούς, παρατηρήθηκε ότι οι ασθενείς με Fas^{high}/FasL^{high} ΚΚΚ, εμφάνισαν αυξημένο ποσοστό Fas^{high} ΜΚΠΑ. Επιπλέον, σε ασθενείς με αυξημένο ποσοστό FasL^{high} ΜΚΠΑ καταγράφηκαν επίσης Fas^{high}/FasL^{high} και Fas^{low}/FasL^{high} ΚΚΚ, ξεχωριστά.

Στη συνέχεια, αναφορικά με την ύπαρξη κάποιας κλινικής συσχέτισης των ΚΚΚ και της έκφρασης των δύο μορίων στα ΚΚΚ και τα ΜΚΠΑ, αρχικά παρατηρήθηκε μεγαλύτερη συχνότητα ανίχνευσης ΚΚΚ σε ασθενείς με εξ' αρχής μεταστατική νόσο σε σύγκριση με τους ασθενείς με υποτροπιάζουσα νόσο. Επιπροσθέτως, η συχνότητα ανίχνευσης ΚΚΚ ήταν επίσης μεγαλύτερη σε ασθενείς με οστικές μεταστάσεις και συγκεκριμένα κυρίαρχος ήταν ο φαινότυπος Fas^{high}. Οι μεταστάσεις στο ΚΝΣ επίσης συσχετίστηκαν με την εντόπιση Fas^{high} και Fas^{high}FasL^{low/neg} ΚΚΚ. Στη συνέχεια, σημειώθηκε μειωμένη επιβίωση έως την πρόοδο (PFS) στους ασθενείς θετικούς για ΚΚΚ. Επιπλέον, μειωμένο PFS είχαν οι ασθενείς των οποίων τα ΚΚΚ ήταν Fas^{high} ή FasL^{high}. Συγκεκριμένα, οι ασθενείς με φαινότυπο Fas^{high}/FasL^{high} ΚΚΚ είχαν επίσης χαμηλότερο PFS. Επιπλέον, στους ασθενείς με Fas^{low/neg}/FasL^{high} ΚΚΚ παρατηρήθηκε μειωμένη συνολική επιβίωση (OS), ενώ στα ΜΚΠΑ ο φαινότυπος Fas^{high}/FasL^{low/neg} συσχετίστηκε με αυξημένο OS.

Όπως προαναφέρθηκε, στην παρούσα μελέτη, τα ΚΚΚ ανιχνεύτηκαν στο 26,5% (26/98) των ασθενών με μεταστατικό ΚΜ πριν την έναρξη της πρώτης γραμμής θεραπείας. Συγκεκριμένα, ο συνολικός αριθμός των ΚΚΚ ήταν 70. Σε προηγούμενη

μελέτη της ερευνητικής ομάδας το ποσοστό ανίχνευσης ΚΚΚ στους ίδιους ασθενείς με μεταστατικό ΚΜ, πριν την έναρξη θεραπείας πρώτης γραμμής, ήταν 82%.⁸⁶ Η διαφορά στη θετικότητα είναι αρκετά μεγάλη, παρόλα αυτά ο συνολικός αριθμός των ασθενών στην αναφερθείσα μελέτη είναι μικρότερος από την παρούσα, 38 από 98, το οποίο μπορεί να επηρεάσει τα τελικά ποσοστά θετικότητας των ΚΚΚ στην εκάστοτε μελέτη, καθώς μιλάμε για διαφορετικό συνολικό δείγμα ασθενών.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε για πρώτη φορά η έκφραση του Fas στα ΚΚΚ. Όπως παρατηρήθηκε, το 57,1% των ΚΚΚ ήταν θετικά για Fas, όπου το 37,1% αφορούσε Fas^{high} και το 20% Fas^{low} έκφραση. Επιπλέον μελετήθηκε για πρώτη φορά η έκφραση του FasL στο σύνολο των ΚΚΚ όπου το 82,9% των ΚΚΚ είχαν έκφραση και συγκεκριμένα το 45,7% αφορούσε FasL^{high} και το 37,1% FasL^{low} έκφραση. Τα υπάρχοντα δεδομένα από τη βιβλιογραφία αφορούν κυρίως αναλύσεις σε καρκινικούς ιστούς. Συγκεκριμένα, σε μία μελέτη σε καρκινικό ιστό, με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας, το ποσοστό έκφρασης του Fas ανήλθε στο 71,4% (20/28) των όγκων που αναλύθηκαν, όπου το 35,7% (10/28) αναφέρεται σε υψηλή και το 35,7% (10/28) σε χαμηλή έκφραση, αντίστοιχα.⁸⁷ Στην προαναφερθείσα μελέτη, υπολογίστηκε επίσης η έκφραση του FasL και το ποσοστό έκφρασης του ανήλθε στο 92,8% (26/28), όπου το 71,4% (20/28) αναφέρεται σε υψηλή και το 21,4% (6/28) σε οριακή έκφραση αντίστοιχα.⁸⁷ Η σύγκριση αυτής της μελέτης με την παρούσα δεν είναι άμεση, αφού πρόκειται για δείγμα καρκινικού ιστού στην πρώτη και περιφερικού αίματος στη δεύτερη, αλλά επίσης πρόκειται για διαφορετικές εργαστηριακές τεχνικές και αντι σώματα. Παρόλα αυτά, υπάρχει συμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων, αφού όπως φαίνεται η πλειοψηφία των κυττάρων ή των ιστών εκφράζουν και τα δύο μόρια. Η διαφορά στις θετικότητες ανάμεσα στα καρκινικά κύτταρα που κυκλοφορούν στο αίμα και στον ιστό όμως, ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι τα ΚΚΚ υποβάλλονται σε διάφορες μοριακές αλλαγές καθώς περνάνε στην κυκλοφορία του αίματος, που κυρίως αποσκοπούν στην επιβίωσή τους μέσω της διαφυγής τους από την επιτήρηση του ανοσοποιητικού συστήματος. Συνεπώς, είναι πιθανόν να μεταβάλλουν και την έκφραση των μορίων Fas και FasL, καθώς και άλλων, οπότε θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να ελεγχθεί η έκφραση αυτών των μορίων στον ιστό των ασθενών των οποίων το περιφερικό αίμα χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

Όσον αφορά τη συν-έκφραση των δύο μορίων στο ίδιο κύτταρο, προέκυψαν 4 φαινότυποι, οι Fas+/FasL+, Fas-/FasL+, Fas+/FasL- και Fas-/FasL-. Το μεγαλύτερο ποσοστό ανίχνευσης κατείχε ο φαινότυπος Fas+/FasL+ όσον αφορά τα ΚΚΚ (38,8%). Στη συνέχεια ακολουθούν οι φαινότυποι Fas-/FasL+ (20,4%), Fas-/FasL- (10%) και Fas+/FasL- (2%). Παρόλα αυτά, από μία άλλη μελέτη όπου διερευνάται η

συν-έκφραση των Fas και FasL στον ιστό σε ΚΜ, έχουν προκύψει διαφορετικά αποτελέσματα, δηλαδή ο φαινότυπος Fas+/FasL- ανιχνεύτηκε στο 39% των καρκινικών ιστών και ο Fas-/FasL+ στο 33,8%, ενώ με χαμηλότερα ποσοστά ακολουθούν οι Fas+/FasL+ και Fas-/FasL-.⁸⁸ Ενώ πρόκειται για τον ίδιο τύπο καρκίνου, η αναφερθείσα μελέτη αναφέρεται σε πρώιμο ΚΜ, ενώ η παρούσα σε μεταστατικό, το οποίο είναι πιθανό να επηρεάζει το προφίλ έκφρασης των μορίων. Για παράδειγμα, ο φαινότυπος Fas+/FasL- συσχετίστηκε με όγκους που είχαν είτε πολύ μικρούς είτε καθόλου διηθημένους λεμφαδένες, δηλαδή χωρίς εμφανή χαρακτηριστικά ύπαρξης μεταστατικού δυναμικού. Επιπλέον, έπειτα από την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των δύο μορίων, προέκυψε ότι οι επικρατέστεροι φαινότυποι στα ΚΚΚ είναι ο Fas^{low}/FasL^{low} και ο Fas^{low}/FasL^{high}. Αυτή η πληροφορία, για τον φαινότυπο Fas^{low}/FasL^{high}, έρχεται σε ταύτιση με διάφορες μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε ιστό στον ΚΜ όσον αφορά τη συν-έκφραση των μορίων. Συγκεκριμένα, στην προαναφερθείσα έρευνα φαίνεται ότι η έκφραση του FasL αυξάνεται και του Fas μειώνεται, ειδικά σε ασθενείς με νόσο που χαρακτηρίζεται από μεταστατικούς λεμφαδένες και μεγαλύτερο μέγεθος όγκου.⁸⁸

Επιπροσθέτως, διερευνήθηκε η έκφραση των μορίων Fas και FasL στα ΜΚΠΑ με τα αποτελέσματα να τονίζουν ότι η μέση έκφραση του FasL είναι μεγαλύτερη από αυτή του Fas στα ΜΚΠΑ. Αυτό το εύρημα συνάδει με τα ευρήματα από τη βιβλιογραφία, καθώς πράγματι ο FasL εκφράζεται από ενδοθηλιακά κύτταρα, CAFs και ανοσοκύτταρα (ΜΚΠΑ) με σκοπό να επιτευχθεί η ομοιόσταση στο ανοσοποιητικό σύστημα, αλλά και η εξάλειψη των κυττάρων του όγκου, που εκφράζουν τον Fas.⁸⁹ Πράγματι, η έκφραση του FasL σε αυτούς τους πληθυσμούς κυττάρων οδηγούν στην αναστολή της απόπτωσης των λεμφοκυττάρων που διηθούν τον όγκο (tumor infiltrating lymphocytes, TILs), που στοχεύουν τα καρκινικά κύτταρα.⁹⁰

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε επιπλέον η συσχέτιση μεταξύ ΚΚΚ και ΜΚΠΑ αναφορικά με την έκφραση των μορίων, και προέκυψε ότι οι ασθενείς με Fas^{high}/FasL^{high} ΚΚΚ εμφάνισαν αυξημένο ποσοστό Fas^{high} ΜΚΠΑ. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αυξημένη έκφραση του FasL στα καρκινικά κύτταρα σε ένα μικροπεριβάλλον του όγκου αποτελούμενο από Fas^{high} ανοσοκύτταρα, συνάδει με τη θεωρία της ανοσοδιαφυγής του καρκίνου και συγκεκριμένα με την αντεπίθεση του όγκου. Τα ΚΚΚ με αυξημένα επίπεδα Fas και FasL, είναι πιθανόν να είναι ανθεκτικά στην απόπτωση που επάγεται από το σύστημα Fas/FasL.⁹¹ Με αυτόν τον τρόπο η αυξημένη έκφραση του Fas στα ΜΚΠΑ διευκολύνει την αντεπίθεση των FasL^{high} ΚΚΚ έναντι των ειδικών για τον όγκο ανοσοκυττάρων, όπως τα κυτταροτοξικά κύτταρα, τα οποία συμπεριλαμβάνονται στα ΜΚΠΑ.⁹² Επιπλέον, FasL^{high} ΜΚΠΑ καταγράφηκαν

σε ασθενείς με Fas^{high}/FasL^{high} ΚΚΚ και σε ασθενείς με Fas^{low}/FasL^{high} ΚΚΚ. Αυτή η παρατήρηση έρχεται επίσης σε συμφωνία με την υπάρχουσα βιβλιογραφία όσον αφορά την φυσιολογική λειτουργία του συστήματος Fas/FasL κατά την ανοσολογική απάντηση. Για παράδειγμα, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα κυτταροτοξικά Τ κύτταρα, που αποτελούν έναν υποπληθυσμό των ΜΚΠΑ, τα οποία εκφράζουν FasL στην επιφάνειά τους, μπορούν να επάγουν την απόπτωση σε Fas+ καρκινικά κύτταρα.⁹³

Μία ακόμη ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν η διαφορετική κατανομή των ΚΚΚ σε ασθενείς με εξαρχής μεταστατικό και υποτροπιάζοντα ΚΜ, καθώς η συχνότητα ανίχνευσής τους ήταν μεγαλύτερη στην πρώτη ομάδα. Επιπλέον, οι ασθενείς με οστικές μεταστάσεις είχαν μεγαλύτερα ποσοστά ανίχνευσης ΚΚΚ και συγκεκριμένα συχνότερα Fas^{high} ΚΚΚ. Η συσχέτιση της ύπαρξης ΚΚΚ και οστικών μεταστάσεων στον ΚΜ έχει παρατηρηθεί και σε άλλη μελέτη.⁹⁴ Παρόλα αυτά, αυτή η μελέτη, που αφορά σε όγκους μαστού, έδειξε ότι η απουσία και όχι η παρουσία της έκφρασης είτε του Fas είτε του FasL συνδέεται με την ύπαρξη οστικών μεταστάσεων.⁹⁵ Στη μελέτη αυτή όμως, το δείγμα των ασθενών με μεταστατικό ΚΜ ήταν μόλις 18 ασθενείς (έναντι 98 στην παρούσα μελέτη) και η τεχνική και τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν διαφορετικά, τα οποία ίσως επηρεάζουν τα εκάστοτε αποτελέσματα πέρα από τα είδη των δειγμάτων που είναι διαφορετικά. Πέρα από τις οστικές μεταστάσεις, η εντόπιση Fas^{high} και Fas^{high}FasL^{low/neg} ΚΚΚ συσχετίστηκε με μεταστάσεις στο ΚΝΣ, ένα εύρημα το οποίο δεν έχει σχετικές αναφορές στη βιβλιογραφία προς το παρόν.

Επιπροσθέτως, σχετικά με την ανταπόκριση στη θεραπεία, η ανίχνευση αποκλειστικά FasL^{high} ΚΚΚ συσχετίστηκε με πρόοδο νόσου (PD) και η ανίχνευση του φαινοτύπου Fas^{high}/FasL^{high} στα ΚΚΚ ήταν συχνότερη σε ασθενείς επίσης με PD σε σχέση με εκείνους που εμφάνισαν σταθερή νόσο (SD). Σε άλλες μελέτες που διερευνάται η ανταπόκριση στη θεραπεία, έχει δειχθεί ότι στον προχωρημένο ΚΜ δεν υπήρξε κάποια συσχέτιση όσον αφορά την έκφραση του Fas ή/και του FasL σε καρκινικό ιστό.⁹⁶ Παρόλα αυτά σε συμφωνία με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, σε άλλους τύπους καρκίνου πέρα του ΚΜ, όπως στον καρκίνο του παχέος εντέρου⁹⁷ και τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας⁹⁸, έχει συσχετιστεί η υψηλή έκφραση του FasL στον καρκινικό ιστό με πρόοδο νόσου.

Επιπλέον, συσχετίστηκε η ύπαρξη των ΚΚΚ με την επιβίωση των ασθενών και πράγματι οι ασθενείς στο αίμα των οποίων ανιχνεύτηκαν ΚΚΚ είχαν μειωμένη επιβίωση έως την πρόοδο (PFS). Το εύρημα αυτό συμφωνεί με πληθώρα μελετών

στον μεταστατικό ΚΜ που δείχνουν ότι η ανίχνευση και ο αριθμός των ΚΚΚ συσχετίζονται με μικρότερο PFS και OS.⁹⁹ Στην παρούσα μελέτη δείχθηκε για πρώτη φορά ότι η ανίχνευση των Fas^{high} ΚΚΚ και FasL^{high} ΚΚΚ ξεχωριστά, καθώς και των Fas^{high}/FasL^{high} ΚΚΚ σχετίζεται σημαντικά με μειωμένο PFS. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η έκφραση των δύο αυτών μορίων στα καρκινικά κύτταρα υπονοεί ότι τα ίδια τα κύτταρα είναι ανθεκτικά στην απόπτωση που μεσολαβείται από τον Fas, ακόμα και αν έχουν αυξημένα τα επίπεδα του Fas στην επιφάνειά τους.¹⁰⁰ Αυτό δικαιολογεί το χαμηλό PFS που εμφανίζουν οι ασθενείς σε ένα πιθανόν απορυθμισμένο σύστημα Fas/FasL, όπου η υψηλή έκφραση του Fas δεν αναιρεί το μηχανισμό της ανοσοδιαφυγής των ΚΚΚ. Επίσης, οι ασθενείς με Fas^{low/neg}/FasL^{high} ΚΚΚ είχαν σημαντικά μειωμένη συνολική επιβίωση (OS), κάτι το οποίο έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενη μελέτη, όπου οι ασθενείς με όγκους μαστού αρνητικούς για Fas και θετικούς για FasL είχαν σημαντικά χαμηλότερο PFS και OS.¹⁰¹ Αντίστοιχα σε μία άλλη μελέτη, η αυξημένη έκφραση του FasL στον ιστό συσχετίστηκε με μικρότερο OS.⁹³ Τέλος, σε μία μελέτη διερευνήθηκε η αναλογία της γονιδιακής έκφρασης (mRNA) FasL:Fas σε ιστό από ασθενείς με πρώιμο ΚΜ. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αναλογία FasL:Fas >1 στους ασθενείς, δηλαδή η μεγαλύτερη έκφραση FasL συγκριτικά με την έκφραση του Fas, συσχετίζεται με σημαντικά μικρότερο PFS. Το εύρημα αυτό, ενώ αναφέρεται σε υψηλότερη έκφραση του FasL, συμφωνεί ότι η αυξημένη έκφραση των δύο μορίων συνδέεται με μειωμένο PFS. Παρόλα αυτά, όπως αναφέρουν και οι ίδιοι οι συγγραφείς χρειάζεται μεγαλύτερη περίοδος μελέτης και μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων για να αποτελεί αυτό το εύρημα αξιόλογο δείκτη επιβίωσης στον ΚΜ.¹⁰²

Τέλος, στην παρούσα μελέτη, η ανίχνευση του φαινοτύπου Fas^{high}/FasL^{low/neg} στα ΜΚΠΑ των ασθενών συσχετίστηκε με αυξημένο OS. Το συγκεκριμένο εύρημα είναι αρκετά ενδιαφέρον και ίσως δικαιολογείται από τις άτυπες λειτουργικές ιδιότητες που φέρεται να έχει το σύστημα Fas/FasL στα ανοσοκύτταρα, οι οποίες συσχετίζονται με την επαγωγή του πολλαπλασιασμού και ενεργοποίησης, αλλά δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως ακόμα στη βιβλιογραφία.⁶⁴ Μελέτες έχουν δείξει ότι πράγματι όσον αφορά τα Τ κύτταρα, αυτά μπορούν να ενεργοποιούνται και να επάγουν μία επιτυχή ανοσολογική απόκριση μόνο εάν ο αποπτωτικός μηχανισμός τους είναι λειτουργικός, δηλαδή εάν η έκφραση του Fas είναι σε φυσιολογικά επίπεδα. Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση των Τ κυττάρων μέσω TCR ρυθμίζει την έκφραση του FasL στην επιφάνεια, ο οποίος συνδέεται με το Fas και οδηγεί στη στρατολόγηση του FADD και στην ενεργοποίηση της κασπάσης, άρα και της απόπτωσης. Ωστόσο, σε Τ

κύτταρα σε ηρεμία, αυτό δεν οδηγεί σε απόπτωση, αλλά μάλλον αυξάνει την ενεργοποίηση της IL-2 και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.⁶⁶

Γενικότερα, η έκφραση του Fas στα καρκινικά κύτταρα αναφέρεται ως θετικός προγνωστικός δείκτης στον καρκίνο του οισοφάγου, όπου η αυξημένη έκφρασή του συσχετίζεται με αυξημένη επιβίωση¹⁰³ και σε ουροθηλιακούς καρκίνους, όπου η μειωμένη έκφρασή του συσχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση¹⁰⁴, καθώς και σε άλλους τύπους καρκίνου. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι ο Fas συνήθως ανιχνεύεται σε χαμηλά επίπεδα κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του όγκου, καθώς απαιτείται τα καρκινικά κύτταρα να μειώσουν την πιθανότητα επαγωγής της απόπτωσης, και αντίστοιχα να επωφεληθούν από την ογκογόνο δράση του μονοπατιού Fas/FasL. Περιστασιακά, ο FasL έχει επίσης περιγραφεί ως θετικός προγνωστικός δείκτης στον καρκίνο και συγκεκριμένα στο λέμφωμα Β-κυττάρων, όπου η έκφρασή του συσχετίστηκε με αυξημένο OS¹⁰⁵ και στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, όπου επίσης η έκφρασή του FasL συσχετίστηκε με αυξημένο PFS¹⁰⁶. Ωστόσο, η συντριπτική πλειονότητα των αναφορών έχουν δείξει ότι η εξέλιξη της νόσου σχετίζεται με προοδευτικά αυξημένη έκφραση του FasL και μερικές φορές επίσης με του Fas. Συνοπτικά, οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι η έκφραση Fas και/ή του FasL προάγει την ανάπτυξη όγκου και ευνοεί την δημιουργία μεταστάσεων.⁷⁰ Στοιχεία τα οποία τείνουν να συμφωνούν με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σε μεγάλο βαθμό.

Όπως και θα ήταν αναμενόμενο, η παρούσα μελέτη είχε κάποιους περιορισμούς. Αρχικά, η φυγοκέντρηση με διαβαθμισμένη πυκνότητας φικόλης, που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των ΚΚΚ, ενώ αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο εργαλείο, χαρακτηρίζεται από μειωμένη ευαισθησία σε σύγκριση με τα αυτοματοποιημένα συστήματα απομόνωσης ΚΚΚ. Συνεπώς, ο συνήθως μικρός αριθμός των απομονωμένων ΚΚΚ από το αίμα των ασθενών περιορίζει την εκτενέστερη μελέτη των διάφορων φαινοτύπων τους. Επιπλέον, η μελέτη των δύο μορίων σε δείγματα καρκινικού ιστού των ίδιων ασθενών θα έδινε μία ολοκληρωμένη και συγκριτική εικόνα όσον αφορά την ανοσολογική απάντηση και το ρόλο του συγκεκριμένου μονοπατιού τόσο στον όγκο όσο και στην περιφέρεια. Δυστυχώς, δεν υπήρχε διαθεσιμότητα των δειγμάτων ιστού των συγκεκριμένων ασθενών.

Η παρούσα μελέτη, όπως θα ήταν επίσης αναμενόμενο είχε και αρκετά πλεονεκτήματα. Αρχικά, οι συμπεριλαμβανόμενοι ασθενείς με μεταστατικό ΚΜ ανέρχονται στους 98, ένας αριθμός δειγμάτων ο οποίος είναι ικανοποιητικός σε μέγεθος, ώστε τα αποτελέσματα να έχουν στατιστική ισχύ. Επιπλέον,

πραγματοποιήθηκε εκτενής φαινοτυπικός χαρακτηρισμός της έκφρασης των Fas/FasL σε επίπεδο ενός κυττάρου, ο οποίος επέτρεψε αφενός την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης και αφετέρου την συνεντόπισή της στο ίδιο κύτταρο. Αυτό προσέφερε τη δυνατότητα να αναδειχθούν φαινοτυπικοί υποπληθυσμοί, όσον αφορά την έκφραση σε ΚΚΚ και ΜΚΠΑ, οι οποίοι έχουν κλινική σημασία στο μεταστατικό ΚΜ. Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη, η παράλληλη αξιολόγηση στα ΚΚΚ και ΜΚΠΑ των φαινοτύπων έκφρασης των μορίων, αποκάλυψε αρκετές συσχετίσεις, προσφέροντας σημαντικές ενδείξεις που συμβάλλουν στην κατανόηση της περιφερικής ανοσολογικής απάντησης και της ανοσοδιαφυγής του καρκίνου στο μεταστατικό ΚΜ.

6. Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά η διερεύνηση της έκφρασης και της κλινικής σημασίας των μορίων Fas/FasL στα ΚΚΚ και ΜΚΠΑ ασθενών με μεταστατικό ΚΜ. Τα ευρήματα που προέκυψαν παρέχουν σημαντικές ενδείξεις για τη συμμετοχή του σηματοδοτικού μονοπατιού Fas/FasL στο μηχανισμό διαφυγής των ΚΚΚ από το ανοσοποιητικό σύστημα και τον πιθανό ρόλο του στη μεταστατική εξέλιξη του ΚΜ. Επιπλέον, τα ευρήματα της μελέτης αναδεικνύουν το ρόλο της υγρής βιοψίας ως ένα σημαντικό προγνωστικό εργαλείο για τους ασθενείς με μεταστατικό ΚΜ.

Όσον αφορά στην μελλοντική έκβαση της παρούσας εργασίας, υπάρχουν διάφορες κατευθύνσεις στις οποίες αυτή μπορεί να κινηθεί. Αρχικά, η αξιολόγηση της υποκυττάριας εντόπισης της έκφρασης των πρωτεϊνών Fas και FasL πιθανόν να μπορούσε να προσθέσει σημαντική πληροφορία σχετικά με την βιολογική και κλινική σημασία τους. Σε κάποιες μελέτες, έχει καταγραφεί η συσχέτιση της έκφρασης του Fas στην πλασματική μεμβράνη με πιο επιθετικά χαρακτηριστικά του όγκου σε καρκινικό ιστό ασθενών με πρώιμο ΚΜ. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη η μεμβρανική έκφραση του FasL συσχετίστηκε με θετικούς λεμφαδένες και επίσης αυξημένο μέγεθος όγκου.⁸⁸ Επίσης, η μελέτη επιπλέον μορίων-σημείων ελέγχου στα ΚΚΚ και ΜΚΠΑ των ίδιων ασθενών θα μπορούσε να αναδείξει συσχετίσεις και να συμβάλλει στην περαιτέρω κατανόηση της περιφερικής ανοσολογικής απάντησης. Τέλος, η επανάληψη των πειραματικών διαδικασιών σε άλλες χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια της θεραπείας, πέρα από την στιγμή πριν την έναρξη της θεραπείας πρώτης γραμμής, θα μπορούσε επίσης να διαλευκάνει τον ενδεχόμενο ρόλο των μορίων Fas και FasL στην αντίσταση θεραπεία.

7. Βιβλιογραφία

1. What Is Breast Cancer? | CDC. https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/what-is-breast-cancer.htm.
2. Winters, S., Martin, C., Murphy, D. & Shokar, N. K. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* vol. 151 1–32 (Elsevier B.V., 2017).
3. How Does Breast Cancer Start & Spread? | NBCF. <https://nbcf.org.au/about-breast-cancer/diagnosis/breast-cancer-anatomy/>.
4. Breast cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>.
5. Momenimovahed, Z. & Salehiniya, H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer: Targets and Therapy* vol. 11 151–164 (2019).
6. Sung, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
7. Thakur, P. *et al.* Breast cancer risk factor evaluation in a Western Himalayan state: A case–control study and comparison with the Western World. *South Asian J. Cancer* **06**, 106–109 (2017).
8. Hussein, A. *et al.* Epidemiology and prognosis of breast cancer in young women. *Journal of Thoracic Disease* vol. 5 (2013).
9. Cobain, E. F., Milliron, K. J. & Merajver, S. D. Updates on breast cancer genetics: Clinical implications of detecting syndromes of inherited increased susceptibility to breast cancer. *Seminars in Oncology* vol. 43 528–535 (2016).
10. Godet, I. & M. Gilkes, D. BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. *Integr. Cancer Sci. Ther.* **4**, (2017).
11. Chen, M. J. *et al.* Body mass index and breast cancer: Analysis of a nation-wide population-based prospective cohort study on 1 393 985 Taiwanese women. *Int. J. Obes.* **40**, 524–530 (2016).
12. Fuller, M. S., Lee, C. I. & Elmore, J. G. Breast cancer screening: An evidence-based update. *Medical Clinics of North America* vol. 99 451–468 (2015).
13. Pace, L. E. & Keating, N. L. A systematic assessment of benefits and risks to guide breast cancer screening decisions. *JAMA - Journal of the American Medical Association* vol. 311 1327–1335 (2014).
14. Berg, W. A. *et al.* Combined screening with ultrasound and mammography vs mammography alone in women at elevated risk of breast cancer. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **299**, 2151–2163 (2008).
15. McDonald, E. S., Clark, A. S., Tchou, J., Zhang, P. & Freedman, G. M. Clinical diagnosis and management of breast cancer. *J. Nucl. Med.* **57**, 9S-16S (2016).
16. Types of Breast Cancer - Breast Pathology | Johns Hopkins Pathology. <https://pathology.jhu.edu/breast/types-of-breast-cancer/>.
17. Bennett, N. C. & Farah, C. S. Next-generation sequencing in clinical oncology: Next steps towards clinical validation. *Cancers* vol. 6 2296–2312 (2014).
18. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
19. Xu, G., Zhao, L. & He, Z. Performance of whole-body PET/CT for the detection of distant malignancies in various cancers: A systematic review and meta-analysis. *J. Nucl. Med.* **53**, 1847–1854 (2012).
20. TNM and Staging of Breast Cancer Simplified | Epomedicine. <https://epomedicine.com/medical-students/tnm-staging-breast-cancer-simplified/>.
21. Most Common Molecular Subtypes of Breast Cancer | CTCA. <https://www.cancercenter.com/cancer-types/breast-cancer/types/breast-cancer-molecular-types>.

22. Koboldt, D. C. *et al.* Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**, 61–70 (2012).
23. Valastyan, S. & Weinberg, R. A. Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell* vol. 147 275–292 (2011).
24. Xiong, Z. *et al.* Bone metastasis pattern in initial metastatic breast cancer: A population-based study. *Cancer Manag. Res.* **10**, 287–295 (2018).
25. Pentheroudakis, G. *et al.* Metastatic breast cancer with liver metastases: A registry analysis of clinicopathologic, management and outcome characteristics of 500 women. *Breast Cancer Res. Treat.* **97**, 237–244 (2006).
26. Quigley, M. R., Fukui, O., Chew, B., Bhatia, S. & Karlovits, S. The shifting landscape of metastatic breast cancer to the CNS. *Neurosurg. Rev.* **36**, 377–382 (2013).
27. Liang, Y., Zhang, H., Song, X. & Yang, Q. Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets. *Seminars in Cancer Biology* vol. 60 14–27 (2020).
28. Guise, T. A. XBreast cancer bone metastases: It's all about the neighborhood. *Cell* vol. 154 957–959 (2013).
29. Qian, B. Z. *et al.* CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* **475**, 222–225 (2011).
30. Cheng, Y. C. & Ueno, N. T. Improvement of survival and prospect of cure in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer* vol. 19 191–199 (2012).
31. Vlastos, G. *et al.* Long-term survival after an aggressive surgical approach in patients with breast cancer hepatic metastases. *Ann. Surg. Oncol. Off. J. Soc. Surg. Oncol.* **11**, 869–874 (2004).
32. Smith, G. L. *et al.* Association between treatment with brachytherapy vs whole-breast irradiation and subsequent mastectomy, complications, and survival among older women with invasive breast cancer. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **307**, 1827–1837 (2012).
33. Dellas, K. Does radiotherapy have curative potential in metastatic patients? the concept of local therapy in oligometastatic breast cancer. *Breast Care* vol. 6 363–368 (2011).
34. Paridaens, R. *et al.* Mature results of a randomized phase II multicenter study of exemestane versus tamoxifen as first-line hormone therapy for postmenopausal women with metastatic breast cancer. *Annals of Oncology* vol. 14 1391–1398 (2003).
35. Peng, J., Sengupta, S. & Jordan, V. C. Potential of Selective Estrogen Receptor Modulators as Treatments and Preventives of Breast Cancer. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **9**, 481–499 (2012).
36. O'Shaughnessy, J. Extending Survival with Chemotherapy in Metastatic Breast Cancer. *Oncologist* **10**, 20–29 (2005).
37. Vogel, C. L. *et al.* Efficacy and Safety of Trastuzumab as a Single Agent in First-Line Treatment of HER2 -Overexpressing Metastatic Breast Cancer . *J. Clin. Oncol.* **20**, 719–726 (2002).
38. Cobleigh, M. A. *et al.* A Phase I/II Dose-Escalation Trial of Bevacizumab in Previously Treated Metastatic Breast Cancer. in *Seminars in Oncology* vol. 30 117–124 (W.B. Saunders, 2003).
39. Sledge, G. W. Curing metastatic breast cancer. *Journal of Oncology Practice* vol. 12 6–10 (2016).
40. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* vol. 12 252–264 (2012).
41. Mittendorf, E. A. *et al.* PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 361–370 (2014).
42. Mao, J. H., Diest, P. J. V., Perez-Losada, J. & Snijders, A. M. Revisiting the impact of age and molecular subtype on overall survival after radiotherapy in breast cancer patients. *Sci. Rep.* **7**, 1–8 (2017).
43. Bockhorn, M., Jain, R. K. & Munn, L. L. Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed? *Lancet Oncology* vol. 8 444–448 (2007).

44. Sambhi, M., Qorri, B., Harless, W. & Szewczuk, M. R. Therapeutic Options for Metastatic Breast Cancer. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 1152 131–172 (Springer New York LLC, 2019).
45. Douma, S. *et al.* Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* **430**, 1034–1040 (2004).
46. Grisard, E. & Nicoloso, M. S. Following MicroRNAs Through the Cancer Metastatic Cascade. in *International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 333 173–228 (Elsevier Inc., 2017).
47. Yu, M. *et al.* Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science (80-)*. **339**, 580–584 (2013).
48. Jurasz, P., Alonso-Escolano, D. & Radomski, M. W. Platelet-cancer interactions: Mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation. *British Journal of Pharmacology* vol. 143 819–826 (2004).
49. Melzer, C., Von Der Ohe, J. & Hass, R. Breast Carcinoma: From Initial Tumor Cell Detachment to Settlement at Secondary Sites. *BioMed Research International* vol. 2017 (2017).
50. Massagué, J. & Obenauf, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* vol. 529 298–306 (2016).
51. Uhr, J. W. & Pantel, K. Controversies in clinical cancer dormancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 12396–12400 (2011).
52. Aragon-Sanabria, V., Kim, G. B. & Dong, C. From cancer immunoediting to new strategies in cancer immunotherapy: The roles of immune cells and mechanics in oncology. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 1092 113–138 (Springer New York LLC, 2018).
53. Smyth, M. J. *et al.* Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J. Exp. Med.* **192**, 755–760 (2000).
54. Shankaran, V. *et al.* IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107–1111 (2001).
55. Shieh, A. C. Biomechanical forces shape the tumor microenvironment. *Ann. Biomed. Eng.* **39**, 1379–1389 (2011).
56. Mohme, M., Riethdorf, S. & Pantel, K. Circulating and disseminated tumour cells-mechanisms of immune surveillance and escape. *Nature Reviews Clinical Oncology* vol. 14 155–167 (2017).
57. Fridman, W. H., Zitvogel, L., Sautès-Fridman, C. & Kroemer, G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nature Reviews Clinical Oncology* vol. 14 717–734 (2017).
58. Dushyanthen, S. *et al.* Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *BMC Medicine* vol. 13 (2015).
59. Domschke, C. *et al.* Cellular Immune Responses and Immune Escape Mechanisms in Breast Cancer: Determinants of Immunotherapy. *Breast Care* vol. 11 102–107 (2016).
60. Steinberg, A. D. MRL-lpr/lpr disease: Theories meet Fas. *Semin. Immunol.* **6**, 55–69 (1994).
61. Green, D. R. & Ferguson, T. A. The role of fas ligand in immune privilege. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 2 917–924 (2001).
62. Yamada, A., Arakaki, R., Saito, M., Kudo, Y. & Ishimaru, N. Dual role of Fas/FasL-mediated signal in peripheral immune tolerance. *Frontiers in Immunology* vol. 8 403 (2017).
63. Volpe, E., Sambucci, M., Battistini, L. & Borsellino, G. Fas-fas ligand: Checkpoint of t cell functions in multiple sclerosis. *Frontiers in Immunology* vol. 7 (2016).
64. Poissonnier, A. & Legembre, P. Atypical Immune Functions of CD95/CD95L. 131–157 (2017) doi:10.1007/978-3-319-56805-8_7.
65. Cullen, S. P. *et al.* Fas/CD95-Induced Chemokines Can Serve as “Find-Me” Signals for Apoptotic Cells. *Mol. Cell* **49**, 1034–1048 (2013).
66. NJ, K., T, K., J, T. & RC, B. Caspase activation is required for T cell proliferation. *J. Exp. Med.* **190**, 1891–1895 (1999).
67. Klebanoff, C. A. *et al.* Memory T cell-driven differentiation of naive cells impairs adoptive

- immunotherapy. *J. Clin. Invest.* **126**, 318–334 (2016).
68. Ju, S. Te, Cui, H., Panka, D. J., Ettinger, R. & Marshak-Rothstein, A. Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by CD4+ Th1 and CD8+ cytotoxic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 4185–4189 (1994).
 69. Igney, F. H. & Krammer, P. H. Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer* vol. 2 277–288 (2002).
 70. Peter, M. E. *et al.* The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death and Differentiation* vol. 22 549–559 (2015).
 71. Gutierrez, L. S., Eliza, M., Niven-Fairchild, T., Naftolin, F. & Mor, G. The Fas/Fas-ligand system: A mechanism for immune evasion in human breast carcinomas. *Breast Cancer Res. Treat.* **54**, 245–253 (1999).
 72. Boniface, J. De, Poschke, I., Mao, Y. & Kiessling, R. Tumor-dependent down-regulation of the ζ -chain in T-cells is detectable in early breast cancer and correlates with immune cell function. *Int. J. Cancer* **131**, 129–139 (2012).
 73. Martin-Villalba, A., Llorens-Bobadilla, E. & Wollny, D. CD95 in cancer: Tool or target? *Trends in Molecular Medicine* vol. 19 329–335 (2013).
 74. Le Gallo, M., Poissonnier, A., Blanco, P. & Legembre, P. CD95/Fas, non-apoptotic signaling pathways, and kinases. *Frontiers in Immunology* vol. 8 (2017).
 75. Postel, M., Roosen, A., Laurent-Puig, P., Taly, V. & Wang-Renault, S. F. Droplet-based digital PCR and next generation sequencing for monitoring circulating tumor DNA: a cancer diagnostic perspective. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **18**, 7–17 (2018).
 76. Allott, E. H. *et al.* Intratumoral heterogeneity as a source of discordance in breast cancer biomarker classification. *Breast Cancer Res.* **18**, 1–11 (2016).
 77. Pantel, K. & Res, C. A. P. Functional studies on viable circulating tumor Cells. *Clinical Chemistry* vol. 62 328–334 (2016).
 78. J, T. *et al.* Circulating tumour cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **21**, 1006–1012 (2010).
 79. Krebs, M. G. *et al.* Circulating Tumor Cell Enumeration in a Phase II Trial of a Four-Drug Regimen in Advanced Colorectal Cancer. *Clin. Colorectal Cancer* **14**, 115-122.e2 (2015).
 80. Cabel, L. *et al.* Circulating tumor cells: clinical validity and utility. *International Journal of Clinical Oncology* vol. 22 421–430 (2017).
 81. Remon, J. *et al.* Liquid biopsy in oncology: a consensus statement of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin. Transl. Oncol.* 2019 226 **22**, 823–834 (2019).
 82. Zhao, H. *et al.* Gene expression profiling predicts survival in conventional renal cell carcinoma. *PLoS Med.* **3**, 115–124 (2006).
 83. Chen, S. *et al.* Identification of human peripheral blood monocyte gene markers for early screening of solid tumors. *PLoS One* **15**, e0230905 (2020).
 84. Tay, T. K. Y. & Tan, P. H. Liquid biopsy in breast cancer: A focused review. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* vol. 145 678–686 (2021).
 85. Ficoll is not Fickle: Reliable Isolation of PBMCs From Whole Blood | Sanguine Biosciences. <https://researcher.sanguinebio.com/ficoll-is-not-fickle-reliable-isolation-of-pbmcs-from-whole-blood/>.
 86. Polioudaki, H. *et al.* Epithelial/Mesenchymal Characteristics and PD-L1 Co-Expression in CTCs of Metastatic Breast Cancer Patients Treated with Eribulin: Correlation with Clinical Outcome. *Cancers (Basel)*. **12**, 3735 (2020).
 87. Ioachim, H. L., Decuseara, R., Giancotti, F. & Dorsett, B. H. FAS and FAS-L expression by tumor cells and lymphocytes in breast carcinomas and their lymph node metastases. *Pathol. Res. Pract.* **200**, 743–751 (2005).
 88. Mottolese, M. *et al.* PROGNOSTIC RELEVANCE OF ALTERED Fas (CD95)-SYSTEM IN

- HUMAN BREAST CANCER. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)* **89**, 127–132 (2000).
89. Zhu, J. *et al.* Resistance to cancer immunotherapy mediated by apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
 90. Rossin, A., Miloro, G. & Hueber, A.-O. TRAIL and FasL Functions in Cancer and Autoimmune Diseases: Towards an Increasing Complexity. *Cancers (Basel)*. **11**, (2019).
 91. Ungefroren, H. *et al.* Human Pancreatic Adenocarcinomas Express Fas and Fas Ligand Yet Are Resistant to Fas-mediated Apoptosis. *Cancer Res.* **58**, (1998).
 92. Igney, F. H., Behrens, C. K. & Krammer, P. H. Tumor counterattack-concept and reality. doi:10.1002/1521-4141.
 93. PH, K. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789–795 (2000).
 94. Aceto, N. *et al.* AR Expression in Breast Cancer CTCs Associates with Bone Metastases. *Mol. Cancer Res.* **16**, 720–727 (2018).
 95. M, B., D, D. & J, K. Fas/Fas-ligand expressions in primary breast cancer are significant predictors of its skeletal spread. *Anticancer Res.* **27**, 215–218 (2007).
 96. Sjöström, J. *et al.* The Predictive Value of bcl-2, bax, bcl-xL, bag-1, fas, and fasL for Chemotherapy Response in Advanced Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **8**, (2002).
 97. Kykalos, S. *et al.* Tissue Expression of the Proteins Fas and Fas Ligand in Colorectal Cancer and Liver Metastases. *J. Gastrointest. Cancer* 2011 432 **43**, 224–228 (2011).
 98. Altered expression of survivin, Fas and FasL contributed to cervical cancer development and metastasis - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23280017/>.
 99. Kamal, M., Razaq, W., Leslie, M. & Tanaka, S. A. and T. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer: A Potential Liquid Biopsy. *Breast Cancer - From Biol. to Med.* (2017) doi:10.5772/66439.
 100. Algeciras-Schimmich, A. *et al.* Two CD95 tumor classes with different sensitivities to antitumor drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 11445–11450 (2003).
 101. Botti, C. *et al.* Altered Expression of FAS System Is Related to Adverse Clinical Outcome in Stage I-II Breast Cancer Patients Treated with Adjuvant Anthracycline-Based Chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **10**, 1360–1365 (2004).
 102. FasL:Fas Ratio—A Prognostic Factor in Breast Carcinomas | Cancer Research. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/60/4/822>.
 103. KW, C. *et al.* Clinical relevance of Fas expression in oesophageal squamous cell carcinoma. *J. Clin. Pathol.* **59**, 101–104 (2006).
 104. K, Y. *et al.* Prognostic impact of FAS/CD95/APO-1 in urothelial cancers: decreased expression of Fas is associated with disease progression. *Br. J. Cancer* **93**, 544–551 (2005).
 105. Y, K. *et al.* Fas and Fas ligand expression on germinal center type-diffuse large B-cell lymphoma is associated with the clinical outcome. *Eur. J. Haematol.* **76**, 465–472 (2006).
 106. E, F. *et al.* Expression and prognostic implications of apoptosis-related proteins in locally unresectable non-small cell lung cancers. *Lung Cancer* **52**, 241–247 (2006).
1. What Is Breast Cancer? | CDC. https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/what-is-breast-cancer.htm.
 2. Winters, S., Martin, C., Murphy, D. & Shokar, N. K. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* vol. 151 1–32 (Elsevier B.V., 2017).
 3. How Does Breast Cancer Start & Spread? | NBCF. <https://nbcf.org.au/about-breast-cancer/diagnosis/breast-cancer-anatomy/>.
 4. Breast cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>.
 5. Momenimovahed, Z. & Salehiniya, H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer: Targets and Therapy* vol. 11 151–164 (2019).

6. Sung, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
7. Thakur, P. *et al.* Breast cancer risk factor evaluation in a Western Himalayan state: A case–control study and comparison with the Western World. *South Asian J. Cancer* **06**, 106–109 (2017).
8. Hussein, A. *et al.* Epidemiology and prognosis of breast cancer in young women. *Journal of Thoracic Disease* vol. 5 (2013).
9. Cobain, E. F., Milliron, K. J. & Merajver, S. D. Updates on breast cancer genetics: Clinical implications of detecting syndromes of inherited increased susceptibility to breast cancer. *Seminars in Oncology* vol. 43 528–535 (2016).
10. Godet, I. & M. Gilkes, D. BRCA1 and BRCA2 mutations and treatment strategies for breast cancer. *Integr. Cancer Sci. Ther.* **4**, (2017).
11. Chen, M. J. *et al.* Body mass index and breast cancer: Analysis of a nation-wide population-based prospective cohort study on 1 393 985 Taiwanese women. *Int. J. Obes.* **40**, 524–530 (2016).
12. Fuller, M. S., Lee, C. I. & Elmore, J. G. Breast cancer screening: An evidence-based update. *Medical Clinics of North America* vol. 99 451–468 (2015).
13. Pace, L. E. & Keating, N. L. A systematic assessment of benefits and risks to guide breast cancer screening decisions. *JAMA - Journal of the American Medical Association* vol. 311 1327–1335 (2014).
14. Berg, W. A. *et al.* Combined screening with ultrasound and mammography vs mammography alone in women at elevated risk of breast cancer. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **299**, 2151–2163 (2008).
15. McDonald, E. S., Clark, A. S., Tchou, J., Zhang, P. & Freedman, G. M. Clinical diagnosis and management of breast cancer. *J. Nucl. Med.* **57**, 9S-16S (2016).
16. Types of Breast Cancer - Breast Pathology | Johns Hopkins Pathology. <https://pathology.jhu.edu/breast/types-of-breast-cancer/>.
17. Bennett, N. C. & Farah, C. S. Next-generation sequencing in clinical oncology: Next steps towards clinical validation. *Cancers* vol. 6 2296–2312 (2014).
18. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
19. Xu, G., Zhao, L. & He, Z. Performance of whole-body PET/CT for the detection of distant malignancies in various cancers: A systematic review and meta-analysis. *J. Nucl. Med.* **53**, 1847–1854 (2012).
20. TNM and Staging of Breast Cancer Simplified | Epomedicine. <https://epomedicine.com/medical-students/tnm-staging-breast-cancer-simplified/>.
21. Most Common Molecular Subtypes of Breast Cancer | CTCA. <https://www.cancercenter.com/cancer-types/breast-cancer/types/breast-cancer-molecular-types>.
22. Koboldt, D. C. *et al.* Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**, 61–70 (2012).
23. Valastyan, S. & Weinberg, R. A. Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell* vol. 147 275–292 (2011).
24. Xiong, Z. *et al.* Bone metastasis pattern in initial metastatic breast cancer: A population-based study. *Cancer Manag. Res.* **10**, 287–295 (2018).
25. Pentheroudakis, G. *et al.* Metastatic breast cancer with liver metastases: A registry analysis of clinicopathologic, management and outcome characteristics of 500 women. *Breast Cancer Res. Treat.* **97**, 237–244 (2006).
26. Quigley, M. R., Fukui, O., Chew, B., Bhatia, S. & Karlovits, S. The shifting landscape of metastatic breast cancer to the CNS. *Neurosurg. Rev.* **36**, 377–382 (2013).
27. Liang, Y., Zhang, H., Song, X. & Yang, Q. Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets. *Seminars in Cancer Biology* vol. 60 14–27 (2020).

28. Guise, T. A. XBreast cancer bone metastases: It's all about the neighborhood. *Cell* vol. 154 957–959 (2013).
29. Qian, B. Z. *et al.* CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* **475**, 222–225 (2011).
30. Cheng, Y. C. & Ueno, N. T. Improvement of survival and prospect of cure in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer* vol. 19 191–199 (2012).
31. Vlastos, G. *et al.* Long-term survival after an aggressive surgical approach in patients with breast cancer hepatic metastases. *Ann. Surg. Oncol. Off. J. Soc. Surg. Oncol.* **11**, 869–874 (2004).
32. Smith, G. L. *et al.* Association between treatment with brachytherapy vs whole-breast irradiation and subsequent mastectomy, complications, and survival among older women with invasive breast cancer. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **307**, 1827–1837 (2012).
33. Dellas, K. Does radiotherapy have curative potential in metastatic patients? the concept of local therapy in oligometastatic breast cancer. *Breast Care* vol. 6 363–368 (2011).
34. Paridaens, R. *et al.* Mature results of a randomized phase II multicenter study of exemestane versus tamoxifen as first-line hormone therapy for postmenopausal women with metastatic breast cancer. *Annals of Oncology* vol. 14 1391–1398 (2003).
35. Peng, J., Sengupta, S. & Jordan, V. C. Potential of Selective Estrogen Receptor Modulators as Treatments and Preventives of Breast Cancer. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **9**, 481–499 (2012).
36. O'Shaughnessy, J. Extending Survival with Chemotherapy in Metastatic Breast Cancer. *Oncologist* **10**, 20–29 (2005).
37. Vogel, C. L. *et al.* Efficacy and Safety of Trastuzumab as a Single Agent in First-Line Treatment of HER2 -Overexpressing Metastatic Breast Cancer . *J. Clin. Oncol.* **20**, 719–726 (2002).
38. Cobleigh, M. A. *et al.* A Phase I/II Dose-Escalation Trial of Bevacizumab in Previously Treated Metastatic Breast Cancer. in *Seminars in Oncology* vol. 30 117–124 (W.B. Saunders, 2003).
39. Sledge, G. W. Curing metastatic breast cancer. *Journal of Oncology Practice* vol. 12 6–10 (2016).
40. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* vol. 12 252–264 (2012).
41. Mittendorf, E. A. *et al.* PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol. Res.* **2**, 361–370 (2014).
42. Mao, J. H., Diest, P. J. V., Perez-Losada, J. & Snijders, A. M. Revisiting the impact of age and molecular subtype on overall survival after radiotherapy in breast cancer patients. *Sci. Rep.* **7**, 1–8 (2017).
43. Bockhorn, M., Jain, R. K. & Munn, L. L. Active versus passive mechanisms in metastasis: do cancer cells crawl into vessels, or are they pushed? *Lancet Oncology* vol. 8 444–448 (2007).
44. Sambhi, M., Qorri, B., Harless, W. & Szewczuk, M. R. Therapeutic Options for Metastatic Breast Cancer. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 1152 131–172 (Springer New York LLC, 2019).
45. Douma, S. *et al.* Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* **430**, 1034–1040 (2004).
46. Grisard, E. & Nicoloso, M. S. Following MicroRNAs Through the Cancer Metastatic Cascade. in *International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 333 173–228 (Elsevier Inc., 2017).
47. Yu, M. *et al.* Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science (80-.)*. **339**, 580–584 (2013).
48. Jurasz, P., Alonso-Escolano, D. & Radomski, M. W. Platelet-cancer interactions: Mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation. *British Journal of Pharmacology* vol. 143 819–826 (2004).
49. Melzer, C., Von Der Ohe, J. & Hass, R. Breast Carcinoma: From Initial Tumor Cell Detachment to Settlement at Secondary Sites. *BioMed Research International* vol. 2017 (2017).

50. Massagué, J. & Obenauf, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* vol. 529 298–306 (2016).
51. Uhr, J. W. & Pantel, K. Controversies in clinical cancer dormancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 12396–12400 (2011).
52. Aragon-Sanabria, V., Kim, G. B. & Dong, C. From cancer immunoediting to new strategies in cancer immunotherapy: The roles of immune cells and mechanics in oncology. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 1092 113–138 (Springer New York LLC, 2018).
53. Smyth, M. J. *et al.* Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J. Exp. Med.* **192**, 755–760 (2000).
54. Shankaran, V. *et al.* IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107–1111 (2001).
55. Shieh, A. C. Biomechanical forces shape the tumor microenvironment. *Ann. Biomed. Eng.* **39**, 1379–1389 (2011).
56. Mohme, M., Riethdorf, S. & Pantel, K. Circulating and disseminated tumour cells-mechanisms of immune surveillance and escape. *Nature Reviews Clinical Oncology* vol. 14 155–167 (2017).
57. Fridman, W. H., Zitvogel, L., Sautès-Fridman, C. & Kroemer, G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nature Reviews Clinical Oncology* vol. 14 717–734 (2017).
58. Dushyanthen, S. *et al.* Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *BMC Medicine* vol. 13 (2015).
59. Domschke, C. *et al.* Cellular Immune Responses and Immune Escape Mechanisms in Breast Cancer: Determinants of Immunotherapy. *Breast Care* vol. 11 102–107 (2016).
60. Steinberg, A. D. MRL-lpr/lpr disease: Theories meet Fas. *Semin. Immunol.* **6**, 55–69 (1994).
61. Green, D. R. & Ferguson, T. A. The role of fas ligand in immune privilege. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 2 917–924 (2001).
62. Yamada, A., Arakaki, R., Saito, M., Kudo, Y. & Ishimaru, N. Dual role of Fas/FasL-mediated signal in peripheral immune tolerance. *Frontiers in Immunology* vol. 8 403 (2017).
63. Volpe, E., Sambucci, M., Battistini, L. & Borsellino, G. Fas-fas ligand: Checkpoint of t cell functions in multiple sclerosis. *Frontiers in Immunology* vol. 7 (2016).
64. Poissonnier, A. & Legembre, P. Atypical Immune Functions of CD95/CD95L. 131–157 (2017) doi:10.1007/978-3-319-56805-8_7.
65. Cullen, S. P. *et al.* Fas/CD95-Induced Chemokines Can Serve as “Find-Me” Signals for Apoptotic Cells. *Mol. Cell* **49**, 1034–1048 (2013).
66. NJ, K., T, K., J, T. & RC, B. Caspase activation is required for T cell proliferation. *J. Exp. Med.* **190**, 1891–1895 (1999).
67. Klebanoff, C. A. *et al.* Memory T cell–driven differentiation of naive cells impairs adoptive immunotherapy. *J. Clin. Invest.* **126**, 318–334 (2016).
68. Ju, S. Te, Cui, H., Panka, D. J., Ettinger, R. & Marshak-Rothstein, A. Participation of target Fas protein in apoptosis pathway induced by CD4+ Th1 and CD8+ cytotoxic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 4185–4189 (1994).
69. Igney, F. H. & Krammer, P. H. Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer* vol. 2 277–288 (2002).
70. Peter, M. E. *et al.* The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death and Differentiation* vol. 22 549–559 (2015).
71. Gutierrez, L. S., Eliza, M., Niven-Fairchild, T., Naftolin, F. & Mor, G. The Fas/Fas-ligand system: A mechanism for immune evasion in human breast carcinomas. *Breast Cancer Res. Treat.* **54**, 245–253 (1999).
72. Boniface, J. De, Poschke, I., Mao, Y. & Kiessling, R. Tumor-dependent down-regulation of the ζ -chain in T-cells is detectable in early breast cancer and correlates with immune cell function. *Int. J. Cancer* **131**, 129–139 (2012).

73. Martin-Villalba, A., Llorens-Bobadilla, E. & Wollny, D. CD95 in cancer: Tool or target? *Trends in Molecular Medicine* vol. 19 329–335 (2013).
74. Le Gallo, M., Poissonnier, A., Blanco, P. & Legembre, P. CD95/Fas, non-apoptotic signaling pathways, and kinases. *Frontiers in Immunology* vol. 8 (2017).
75. Postel, M., Roosen, A., Laurent-Puig, P., Taly, V. & Wang-Renault, S. F. Droplet-based digital PCR and next generation sequencing for monitoring circulating tumor DNA: a cancer diagnostic perspective. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **18**, 7–17 (2018).
76. Allott, E. H. *et al.* Intratumoral heterogeneity as a source of discordance in breast cancer biomarker classification. *Breast Cancer Res.* **18**, 1–11 (2016).
77. Pantel, K. & Res, C. A. P. Functional studies on viable circulating tumor Cells. *Clinical Chemistry* vol. 62 328–334 (2016).
78. J, T. *et al.* Circulating tumour cells early predict progression-free and overall survival in advanced colorectal cancer patients treated with chemotherapy and targeted agents. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **21**, 1006–1012 (2010).
79. Krebs, M. G. *et al.* Circulating Tumor Cell Enumeration in a Phase II Trial of a Four-Drug Regimen in Advanced Colorectal Cancer. *Clin. Colorectal Cancer* **14**, 115-122.e2 (2015).
80. Cabel, L. *et al.* Circulating tumor cells: clinical validity and utility. *International Journal of Clinical Oncology* vol. 22 421–430 (2017).
81. Remon, J. *et al.* Liquid biopsy in oncology: a consensus statement of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin. Transl. Oncol.* 2019 226 **22**, 823–834 (2019).
82. Zhao, H. *et al.* Gene expression profiling predicts survival in conventional renal cell carcinoma. *PLoS Med.* **3**, 115–124 (2006).
83. Chen, S. *et al.* Identification of human peripheral blood monocyte gene markers for early screening of solid tumors. *PLoS One* **15**, e0230905 (2020).
84. Tay, T. K. Y. & Tan, P. H. Liquid biopsy in breast cancer: A focused review. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* vol. 145 678–686 (2021).
85. Ficoll is not Fickle: Reliable Isolation of PBMCs From Whole Blood | Sanguine Biosciences. <https://researcher.sanguinebio.com/ficoll-is-not-fickle-reliable-isolation-of-pbmcs-from-whole-blood/>.
86. Polioudaki, H. *et al.* Epithelial/Mesenchymal Characteristics and PD-L1 Co-Expression in CTCs of Metastatic Breast Cancer Patients Treated with Eribulin: Correlation with Clinical Outcome. *Cancers (Basel)*. **12**, 3735 (2020).
87. Ioachim, H. L., Decuseara, R., Giancotti, F. & Dorsett, B. H. FAS and FAS-L expression by tumor cells and lymphocytes in breast carcinomas and their lymph node metastases. *Pathol. Res. Pract.* **200**, 743–751 (2005).
88. Mottolese, M. *et al.* PROGNOSTIC RELEVANCE OF ALTERED Fas (CD95)-SYSTEM IN HUMAN BREAST CANCER. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)* **89**, 127–132 (2000).
89. Zhu, J. *et al.* Resistance to cancer immunotherapy mediated by apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
90. Rossin, A., Miloro, G. & Hueber, A.-O. TRAIL and FasL Functions in Cancer and Autoimmune Diseases: Towards an Increasing Complexity. *Cancers (Basel)*. **11**, (2019).
91. Ungefroren, H. *et al.* Human Pancreatic Adenocarcinomas Express Fas and Fas Ligand Yet Are Resistant to Fas-mediated Apoptosis. *Cancer Res.* **58**, (1998).
92. Igney, F. H., Behrens, C. K. & Krammer, P. H. Tumor counterattack-concept and reality. doi:10.1002/1521-4141.
93. PH, K. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789–795 (2000).
94. Aceto, N. *et al.* AR Expression in Breast Cancer CTCs Associates with Bone Metastases. *Mol. Cancer Res.* **16**, 720–727 (2018).
95. M, B., D, D. & J, K. Fas/Fas-ligand expressions in primary breast cancer are significant

- predictors of its skeletal spread. *Anticancer Res.* **27**, 215–218 (2007).
96. Sjöström, J. *et al.* The Predictive Value of bcl-2, bax, bcl-xL, bag-1, fas, and fasL for Chemotherapy Response in Advanced Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **8**, (2002).
 97. Kykalos, S. *et al.* Tissue Expression of the Proteins Fas and Fas Ligand in Colorectal Cancer and Liver Metastases. *J. Gastrointest. Cancer* **2011** **432** **43**, 224–228 (2011).
 98. Altered expression of survivin, Fas and FasL contributed to cervical cancer development and metastasis - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23280017/>.
 99. Kamal, M., Razaq, W., Leslie, M. & Tanaka, S. A. and T. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer: A Potential Liquid Biopsy. *Breast Cancer - From Biol. to Med.* (2017) doi:10.5772/66439.
 100. Algeciras-Schimmich, A. *et al.* Two CD95 tumor classes with different sensitivities to antitumor drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 11445–11450 (2003).
 101. Botti, C. *et al.* Altered Expression of FAS System Is Related to Adverse Clinical Outcome in Stage I-II Breast Cancer Patients Treated with Adjuvant Anthracycline-Based Chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **10**, 1360–1365 (2004).
 102. FasL:Fas Ratio—A Prognostic Factor in Breast Carcinomas | Cancer Research. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/60/4/822>.
 103. KW, C. *et al.* Clinical relevance of Fas expression in oesophageal squamous cell carcinoma. *J. Clin. Pathol.* **59**, 101–104 (2006).
 104. K, Y. *et al.* Prognostic impact of FAS/CD95/APO-1 in urothelial cancers: decreased expression of Fas is associated with disease progression. *Br. J. Cancer* **93**, 544–551 (2005).
 105. Y, K. *et al.* Fas and Fas ligand expression on germinal center type-diffuse large B-cell lymphoma is associated with the clinical outcome. *Eur. J. Haematol.* **76**, 465–472 (2006).
 106. E, F. *et al.* Expression and prognostic implications of apoptosis-related proteins in locally unresectable non-small cell lung cancers. *Lung Cancer* **52**, 241–247 (2006).