



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

Α΄ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Ν. ΚΑΒΑΝΤΖΑΣ ΚΑΘ. ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΚΠΑ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ: ΕΡΕΥΝΑ ΚΑΙ
ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΗΣ
ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΜΕΝΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ (ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ)»

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΠΜΣ

ΣΤ. ΘΕΟΧΑΡΗΣ ΚΑΘ. ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΚΠΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Χρήση οργανοειδών για θεραπευτικές δράσεις σε τριπλά
αρνητικά καρκινώματα μαστού»

Όν/μο: Αμαλία Μαντζάρη

Αρ. μητρώου: 7450222100007

Ιδιότητα: Φαρμακοποιός

Επιβλέπων ΜΔΕ: Στ. Θεοχάρης Καθ. Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ ΙΟΥΛΙΟΣ 2023

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για την
απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη

«Νεοπλασματική Νόσος στον Άνθρωπο:

**Έρευνα και Κλινικοπαθολογοανατομική Προσέγγιση στα Πλαίσια της
Εξατομικευμένης Ιατρικής (Διάγνωση και Στοχευμένη Θεραπεία)»**

που απονέμει η Ιατρική Σχολή του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

ΒΑΘΜΙΑ

ΥΠΟΓΡΑΦΗ

Σ. Θεοχάρης (Επιβλέπων)

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

.....

Ι. Γιαννοπούλου

Ε.Δ.Ι.Π

.....

Π. Αλεξάνδρου

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ Ε.Σ.Υ

.....

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ.....	6
1.1 Γενικά στοιχεία	6
1.2 Ανατομία μαστού	6
1.3 Μη διηθητικά νεοπλάσματα	7
1.4 Διηθητικά νεοπλάσματα	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Τριπλά αρνητικά καρκινώματα (TNBC).....	18
2.1 Υπότυποι τριπλά αρνητικών καρκινωμάτων	19
2.2 Το μικροπεριβάλλον των τριπλά αρνητικών καρκινωμάτων	22
2.3 Προγνωστικοί βιοδείκτες για τα τριπλά αρνητικά καρκινώματα	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΟΡΓΑΝΟΕΙΔΗ	32
3.1 Διαδικασία καλλιέργειας οργανοειδών	34
3.2. Πλεονεκτήματα και η σημαντικότητα των οργανοειδών:	37
3.3 Προκλήσεις στην παραγωγή ανθρώπινων οργανοειδών:	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΟΕΙΔΩΝ ΣΤΗΝ ΕΥΡΕΣΗ ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΜΕΝΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΤΡΙΠΛΑ ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	42
4.1. Δημιουργία οργανοειδών καρκίνου μαστού	43
4.2 Ο ρόλος των οργανοειδών στην κατανόηση της παθογένεσης των TNBC	45
4.3. Η χρήση των TNBC οργανοειδών στον έλεγχο της ευαισθησίας στην χημειοθεραπεία	46
4.4. Η χρήση των οργανοειδών TNBC για τον έλεγχο της ευαισθησίας στην εναλλακτική και στοχευμένη θεραπεία	48
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	52
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ	55
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	58

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού (TNBC) είναι υπότυπος καρκίνου του μαστού με περιορισμένες θεραπευτικές επιλογές. Τα οργανοειδή είναι 3D καλλιέργειες που προέρχονται από βλαστοκύτταρα (πολυδύναμα, εμβρυϊκά ή ενήλικα) και τα οποία μιμούνται τη βασική λειτουργική, δομική και βιολογική πολυπλοκότητα ενός οργάνου. Πιο συγκεκριμένα, τα οργανοειδή που προέρχονται από ασθενείς (PDOs) έχουν αναδειχθεί ως πολύτιμο εργαλείο για τη μελέτη των TNBC και τον έλεγχο πιθανών φαρμάκων. Διατηρούν τα γενετικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του αρχικού όγκου, επιτρέποντας έτσι εξατομικευμένες δοκιμές φαρμάκων. Διατηρώντας παράλληλα και το μικροπεριβάλλον του όγκου, παρέχουν ακριβέστερη αναπαράσταση της in vivo συμπεριφοράς του όγκου σε σύγκριση με τα παραδοσιακά μοντέλα κυτταρικής καλλιέργειας. Έχουν χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο διαφόρων αντικαρκινικών παραγόντων και έχουν εντοπίσει νέους θεραπευτικούς στόχους, βιοδείκτες και ευαισθησία σε συνδυασμούς φαρμάκων. Με αυτό τον τρόπο τα PDOs προσφέρουν μια πολλά υποσχόμενη πλατφόρμα για τον έλεγχο φαρμάκων TNBC, επιτρέποντας την ανάπτυξη εξατομικευμένης ιατρικής και βελτιώνοντας τα αποτελέσματα της θεραπείας για τους ασθενείς με TNBC.

Λέξεις κλειδιά που χρησιμοποιήθηκαν: triple negative, breast cancer, organoids, stem cells, cell cultures, 3D cultures

ABSTRACT

Triple negative breast cancer (TNBC) is a breast cancer subtype with limited treatment options. Organoids are 3D tissue culture that are typically derived from stem cells (pluripotent, fetal or adult), and which mimics the key functional, structural and biological complexity of an organ. More specifically, patient-derived organoids (PDOs) have emerged as a valuable tool for studying TNBC and screening potential drugs. These organoids retain the genetic and phenotypic characteristics of the original tumor, thus enabling personalized drug testing. By preserving the tumor microenvironment, they provide a more accurate representation of in vivo tumor behavior compared to traditional cell culture models. They have been used to test various anti-cancer agents and have identified novel therapeutic targets, biomarkers and drug sensitivity. In this way, PDOs offer a promising platform for TNBC drug screening, enabling the development of personalized medicine and improving treatment outcomes for TNBC patients.

Keywords: triple negative, breast cancer, organoids, stem cells, cell cultures, 3D cultures

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΜΑΣΤΟΥ

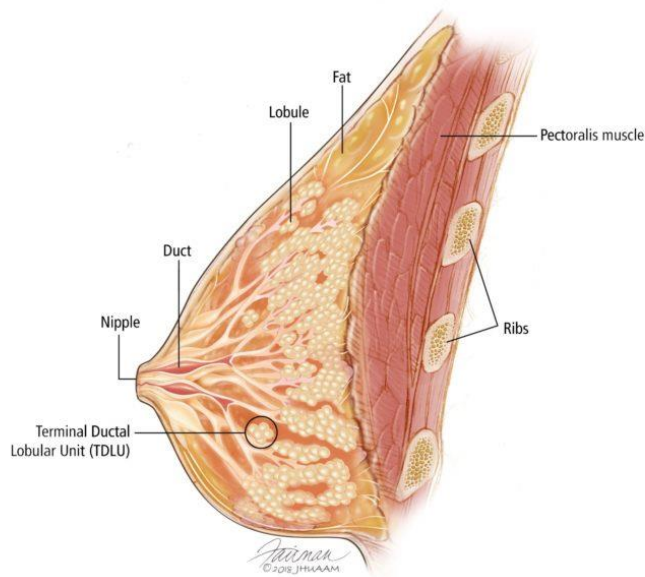
1.1 Γενικά στοιχεία

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί τον συχνότερο καρκίνο στις γυναίκες και την δεύτερη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Υπολογίζεται ότι 1 στις 9 γυναίκες θα διαγνωστεί με καρκίνο στον μαστό σε κάποια φάση της ζωής της. Η συχνότητα εμφάνισης αυξάνεται με την αύξηση της ηλικίας, την ύπαρξη κληρονομικότητας, τις διαταραχές της εμμήνου ρύσεως, την χρήση αντισυλληπτικών χαπιών, την θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης και τον τρόπο ζωής (αλκοόλ, καθιστική ζωή). Σπανιότερα, αλλά όχι σε ασήμαντα ποσοστά, η νόσος μπορεί να εμφανιστεί και στους άνδρες με τις ίδιες πιθανότητες επιβίωσης. Τα συμπτώματα εμφανίζονται σε μεταγενέστερα στάδια και όχι στην έναρξη της νόσου. Τα κυριότερα από αυτά είναι ογκίδιο στην περιοχή του μαστού ή της μασχάλης, εισολκή της θηλής, έκκριση υγρών από την θηλή, ερυθρότητα, πόνος στον μαστό και όψη φλοιού πορτοκαλιού. Η διάγνωση πραγματοποιείται σύμφωνα με το ιστορικό του ασθενούς, την κλινική εξέταση, τις απεικονιστικές εξετάσεις και την βιοψία ή/και κυτταρολογική εξέταση. Η αντιμετώπιση βασίζεται στην χειρουργική αφαίρεση, χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία, ορμονοθεραπεία και πρόσφατα και στην ανοσοθεραπεία.

1.2 Ανατομία μαστού

Κατά την διάρκεια των διαφορετικών περιόδων στην ζωή της γυναίκας, ο μαστός υφίσταται διάφορες μεταβολές. Το γεγονός αυτό οφείλεται στις διακυμάνσεις των επιπέδων των ορμονών, οι οποίες ασκούν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αύξησης, της ανάπτυξης και της λειτουργίας του μαστού. Ο φυσιολογικός μαστός αποτελείται από λόβια και πόρους. Τα λόβια αποτελούν τις εκκριτικές μονάδες του μαστού και καθένα από αυτά αποτελείται από αδenoκυψέλες μέσα σε χαλαρό συνδετικό ιστό, που εκβάλλουν σε ενδολόβιο πόρο. Δύο είναι τα είδη των κυττάρων που απαρτίζουν τις αδenoκυψέλες, τα επιθηλιακά και μυοεπιθηλιακά κύτταρα. Τα επιθηλιακά κύτταρα είναι εκκριτικά και παράγουν το γάλα όταν δοθεί το ερέθισμα, καθώς και ποικίλες γλυκοπρωτεΐνες μέσα στους εκφορητικούς πόρους. Τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα περιβάλλουν τα επιθηλιακά και βρίσκονται σε επαφή με την βασική μεμβράνη ελέγχοντας άμεσα ή έμμεσα την λειτουργία τους. Ο ενδολόβιος πόρος συνδέεται με τον

εξωλόβιο πόρο και μαζί με το λόβιο συνιστούν την τελική πορολοβιακή μονάδα. Οι εξωλόβιοι πόροι συνδέονται και σχηματίζουν υποτμηματικούς πόρους, οι οποίοι συγκλίνουν και σχηματίζουν τους τμηματικούς πόρους. Οι πόροι αυτοί εκβάλουν στους γαλακτοφόρους πόρους και κόλπους και τελικά καταλήγουν στην επιφάνεια της θηλής. Οι πόροι αποτελούνται από επιθηλιακά κύτταρα και ο συνδετικός ιστός που τους περιβάλλει είναι πυκνότερος από εκείνον στα λόβια. Επιπρόσθετα, περιβάλλονται και από ελαστικό ιστό, ο οποίος βοηθά στην παροχευτική λειτουργία τους (J.C.E Underwood, 2004).



Εικόνα 1: Φυσιολογική ανατομία μαστού (“Overview of the Breast - Breast Pathology | Johns Hopkins Pathology,” n.d.)

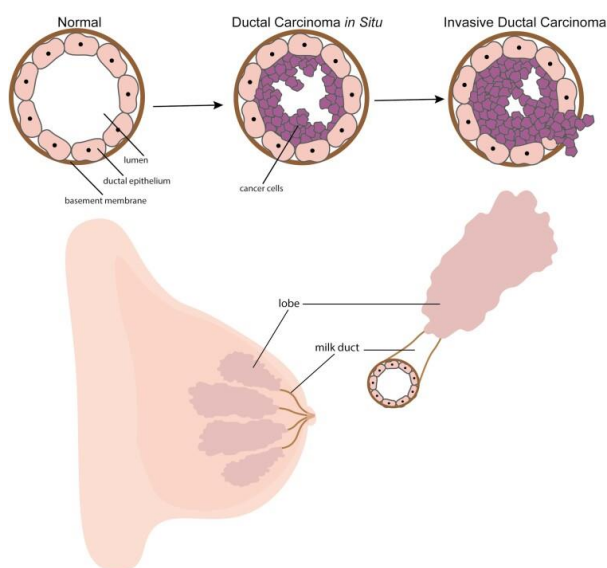
Ο καρκίνος εμφανίζεται είτε στα λόβια είτε στους πόρους και μπορεί να είναι μη διηθητικός ή διηθητικός. Στους μη διηθητικούς τύπους συγκαταλέγεται το πορογενές *in situ* καρκίνωμα και το λοβιακό *in situ* καρκίνωμα. Στα διηθητικά νεοπλάσματα ταξινομούνται οι παρακάτω ιστολογικοί τύποι: το διηθητικό πορογενές, το διηθητικό λοβιακό, το βλεννώδες, το σωληνώδες, το μυελοειδές, το μικροθηλώδες, το μεταπλαστικό και το αποκρινές καρκίνωμα.

1.3 Μη διηθητικά νεοπλάσματα

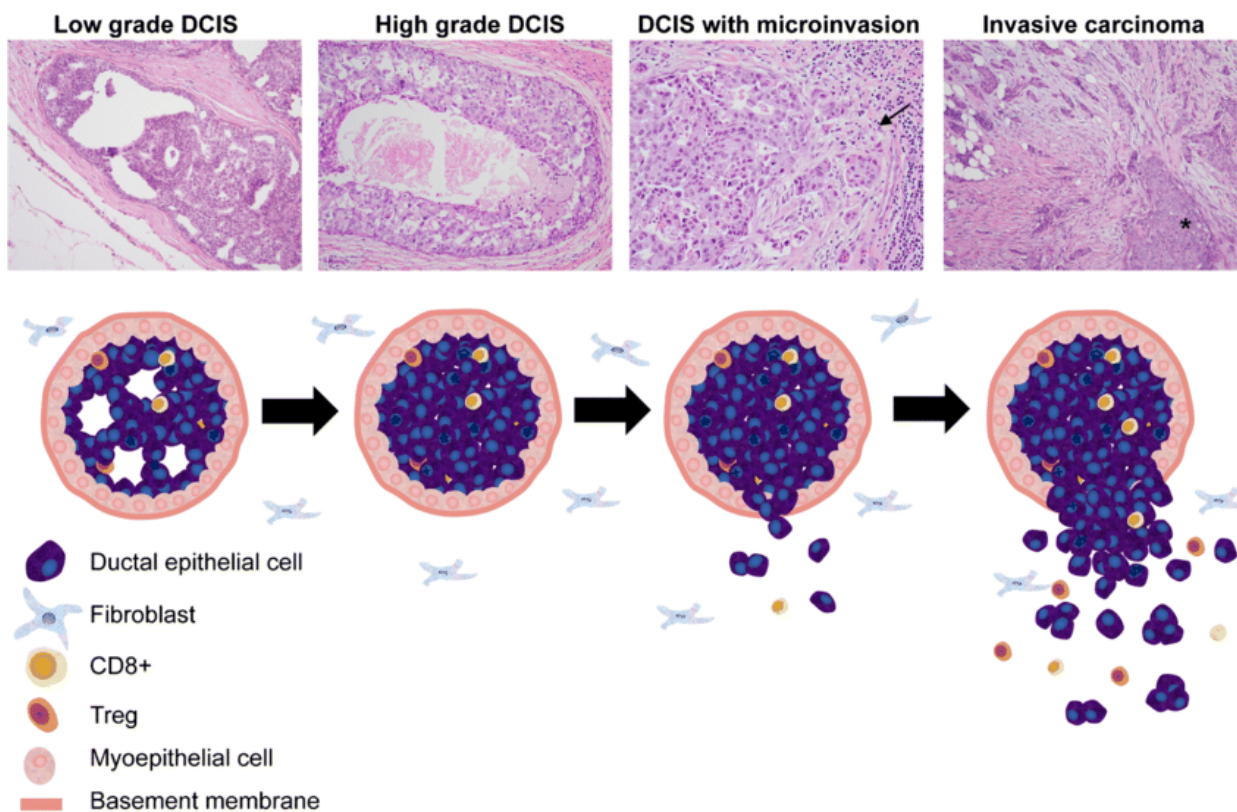
Μη διηθητικά νεοπλάσματα είναι τα νεοπλάσματα τα οποία δεν διαταράσσουν την ακεραιότητα της βασικής μεμβράνης και συνεπώς δεν παρατηρούνται μεταστάσεις σε

άλλους ιστούς. Τέτοια νεοπλάσματα είναι το ενδοτορικό *in situ* καρκίνωμα και το λοβιακό *in situ* καρκίνωμα.

Το ενδοτορικό *in situ* καρκίνωμα (DCIS) αποτελεί μια υπερπλασία νεοπλασματικών κυττάρων, που όμως δεν έχουν χάσει την συνεκτικότητα τους, περιορίζεται στην τελική πορολοβιακή μονάδα (TDLU) και δεν διηθεί άλλους παρακείμενους ιστούς. Η μέση ηλικία εμφάνισης είναι τα 50-59 έτη. Χαρακτηρίζονται όσον αφορά το βαθμό κακοήθειας (grade) σε χαμηλόβαθμο (grade 1), ενδιάμεσο (grade 2) και υψηλόβαθμο (grade 3). Στο grade 1 παρατηρείται απώλεια του 16q και προσθήκη του 1q χρωμοσώματος, ενώ στο grade 3 υπάρχει απώλεια των 8p, 11q, 13q, 14q και προσθήκη των 5p, 8p, 17p και 20p χρωμοσωμάτων. Στα υψηλόβαθμης κακοήθειας νεοπλάσματα εμφανίζεται ενίσχυση του HER2 και αρνητικοί ορμονικοί υποδοχείς (ER και PR). Οι βλάβες αυτές τείνουν να εμφανίζονται με την μορφή μικροαποπιτανώσεων. Η ανοσοχρώση για κερατίνες υψηλού μοριακού βάρους (HMWK) μπορεί να βοηθήσει στην διάκριση του DCIS από την συνήθη υπερπλασία. Ωστόσο, η ισχυρή και ομοιόμορφη έκφραση του οιστρογονικού υποδοχέα (ER), ενδεικτική του κλωνικού πολλαπλασιασμού, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την υποστήριξη της διάγνωσης του DCIS. Τα ποσοστά συνολικής επιβίωσης των πασχόντων είναι >95% στα 10 χρόνια. Υπάρχουν ομοιότητες του DCIS με το διηθητικό καρκίνωμα. Συνήθως, δεν εμφανίζεται με μορφή ογκόμορφης βλάβης αλλά ανακαλύπτεται στον μαστογραφικό έλεγχο. Η μικρή ηλικία εμφάνισης, το μεγάλο μέγεθος, η μη ύπαρξη καθαρών ορίων εκτομής > 2 mm, το μικροθλώδες πρότυπο ανάπτυξης, η παρουσία ίνωσης και η ύπαρξη στρωματικών λεμφοκυττάρων (TILS) σχετίζονται με μεγαλύτερο κίνδυνο υποτροπής (Badve and Gökmen-Polar, 2019).



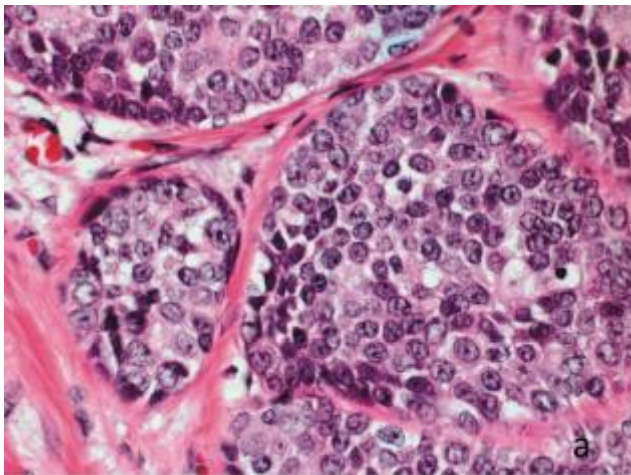
Εικόνα 2: Στάδια ανάπτυξης διηθητικού καρκίνου από DCIS (Hophan et al., 2022)



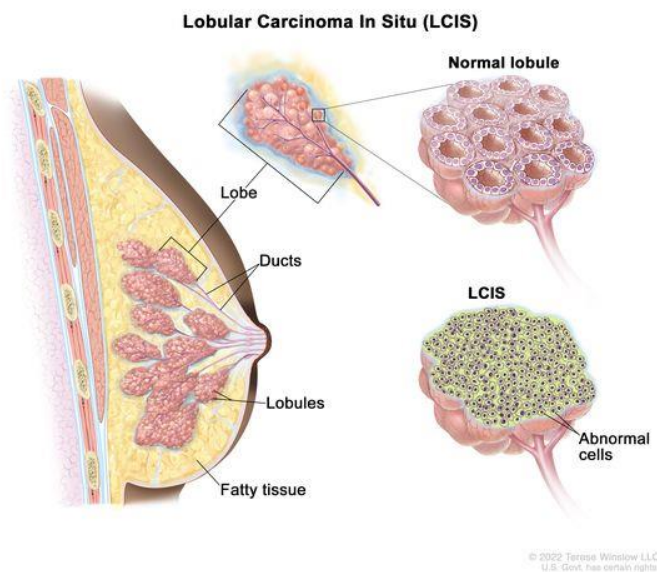
Εικόνα 3: Ιστολογική απεικόνιση της εξέλιξης του DCIS σε διηθητικό καρκίνωμα (Dessources et al., 2019)

Το λοβιακό in situ καρκίνωμα (LCIS) αποτελεί μια πολυκεντρική νεοπλασματική αλλοίωση που δεν διηθεί τους παρακείμενους υγιείς ιστούς, τα κύτταρα διατηρούν την συνεκτικότητά τους και περιορίζονται εντός της τελικής πορολοβιακής μονάδας (TDLU). Είναι πρόδρομη αλλοίωση για την ανάπτυξη διηθητικού καρκινώματος του μαστού. Διακρίνεται στον κλασσικό τύπο με μικρά ομοιόμορφα κύτταρα, στον πλειόμορφο τύπο με τους πυρήνες των κυττάρων να είναι 4 φορές το μέγεθος του λεμφοκυττάρου και τέλος στον τύπο florid με τα κύτταρα που επενδύουν τους λοβούς να έχουν σχηματίσει μια μάζα με μια περιοχή νέκρωσης στο κέντρο. Η μέση ηλικία εμφάνισης είναι τα 45-50 έτη για τον κλασσικό τύπο, ενώ για τους υπόλοιπους η μέση ηλικία είναι τα 60-70 έτη. Και στο LCIS η ύπαρξη αποπιτανώσεων στην μαστογραφία εγείρει υποψίες ώστε να πραγματοποιηθεί περαιτέρω έλεγχος. Παρατηρείται προσθήκη του 1q χρωμοσώματος και απώλεια του 16q χρωμοσώματος και οι συχνότερες μεταλλάξεις είναι CDH1,

ERBB2, PIK3CA, C6FB. Ο κλασσικός τύπος συχνότερα είναι θετικός στους οιστρογονικούς και προγεστερονικούς υποδοχείς (ER, PR), ενώ ο πλειόμορφος περιστασιακά εμφανίζει ενίσχυση του HER2. Τα καθαρά χειρουργικά όρια, η ορμονοθεραπεία ως χημειοπροφύλαξη και η στοχευμένη ακτινοθεραπεία μειώνουν τον κίνδυνο υποτροπής της νόσου (Sokolova and Lakhani, 2021).



Εικόνα 4: Ιστολογική απεικόνιση λοβιακού καρκινώματος in situ (Sokolova and Lakhani, 2021)

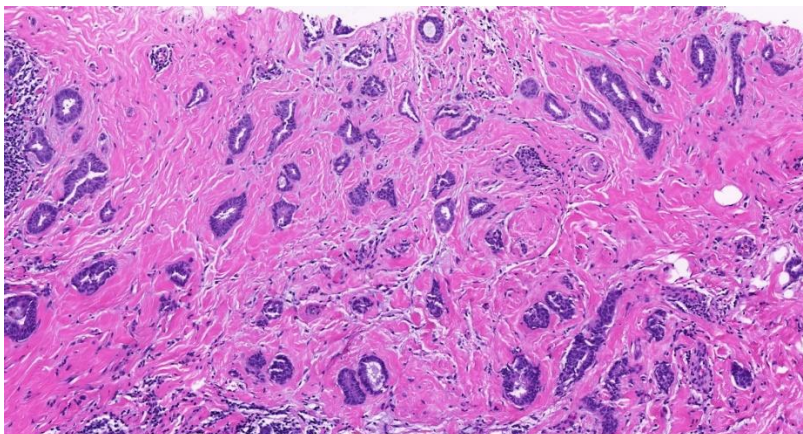


Εικόνα 5: Λοβιακό καρκίνωμα in situ ("Definition of lobular carcinoma in situ - NCI Dictionary of Cancer Terms - NCI," 2023)

1.4 Διηθητικά νεοπλάσματα

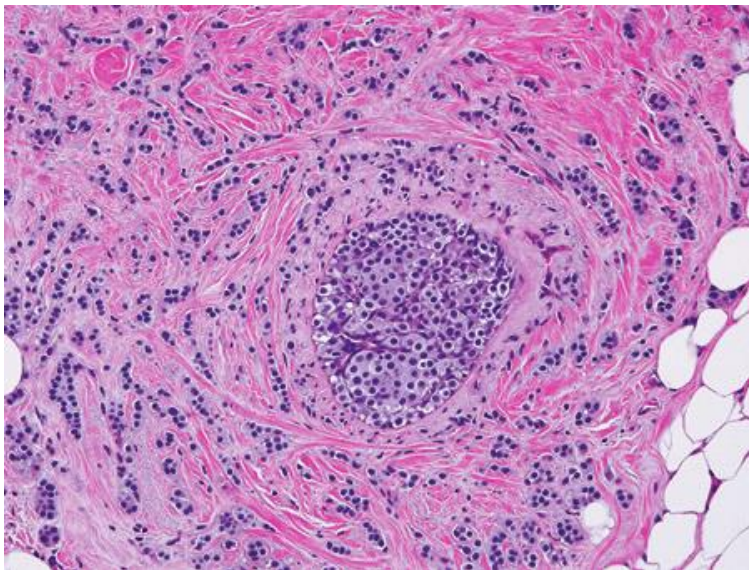
Τα διηθητικά καρκινώματα του μαστού αποτελούν μια ομάδα κακοήθων επιθηλιακών νεοπλασμάτων που έχουν την τάση να διηθούν την βασική μεμβράνη και να μεθίστανται σε απομακρυσμένους ιστούς λεμφογενώς ή/και αιματογενώς. Υπάρχει ποικιλία στα μορφολογικά και ιστοπαθολογικά τους χαρακτηριστικά και συνεπώς στην πρόγνωση τους. Την πλειοψηφία τους συνιστούν τα αδenoκαρκινώματα, τα οποία προέρχονται από τα κύτταρα της τελικής πορολοβιακής μονάδας (TDLU). Έτσι, οι βασικότεροι ιστολογικοί τύποι είναι τα διηθητικά πορογενή καρκινώματα, τα διηθητικά λοβιακά καρκινώματα, τα βλεννώδη καρκινώματα, τα σωληνώδη καρκινώματα, τα μυελοειδή καρκινώματα, τα μικροθλώδη καρκινώματα, τα αποκρινή καρκινώματα, τα μεταπλαστικά καρκινώματα και αυτά που εμφανίζουν ενδοκρινή διαφοροποίηση.

Τα διηθητικά πορογενή καρκινώματα (IDC) αποτελούν την πλειονότητα των καρκινωμάτων με την μεγαλύτερη συχνότητα (μέχρι 85%). Δεν εμφανίζουν κάποιον συγκεκριμένο ιστολογικό τύπο και γι' αυτό χαρακτηρίζονται ως NOS (Not otherwise Specified), δηλαδή χωρίς ειδικούς χαρακτήρες. Μακροσκοπικά, αποτελούν μια ασαφώς περιγεγραμμένη μάζα με σκληρή σύσταση και ανώμαλο ακτινωτό περίγραμμα ή οζώδη διαμόρφωση. Μπορεί να εμφανιστεί και σε προ- και σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Το μέγεθος ποικίλλει από <10mm- >10 cm. Ανοσοϊστοχημικά τα νεοπλασματικά κύτταρα μπορεί να παρουσιάζουν θετικότητα για τους ER και PR. Ιστολογικά τα κύτταρα διατίθενται σε αθροίσεις, δοκίδες, χορδές και σωληνώδεις σχηματισμούς και εμφανίζουν άφθονο ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα. Χαρακτηρίζονται από περινευρική διήθηση, διήθηση λεμφαγγείων και αιμοφόρων αγγείων και νέκρωση. Ταξινομούνται σε grade 1, 2, 3 ανάλογα με το πόσο ομοιάζει με τον φυσιολογικό ιστό. Είναι δυνατόν σε έδαφος IDC να περιέχονται και εστίες DCIS (J.C.E Underwood, 2004).



Εικόνα 6: Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (Emad Rakha, 2022)

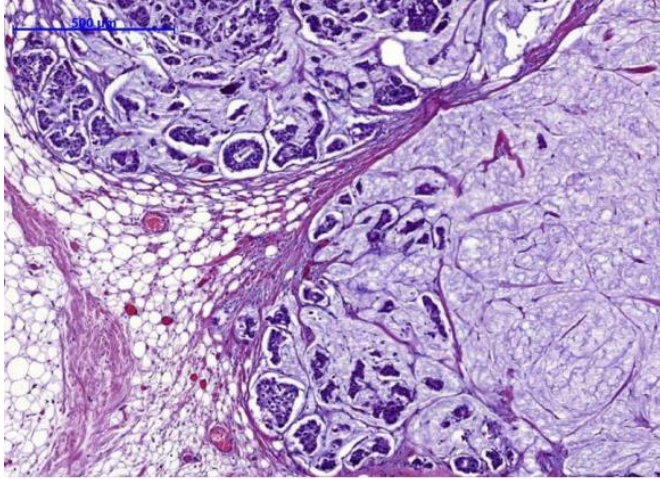
Τα διηθητικά λοβιακά καρκινώματα (ILC) αποτελούν τον δεύτερο συχνότερο τύπο κακοήθους νεοπλασματος (5-15%) μετά το πορογενές διηθητικό καρκίνωμα. Η μέση ηλικία εμφάνισης είναι τα 63 έτη. Μπορεί να είναι πολυκεντρικό και η αμφοτερόπλευρη προσβολή των μαστών είναι πιο σύνηθες σε αυτή την περίπτωση (Van Baelen et al., 2022). Ανοσοϊστοχημικά, στην πλειονότητα τους είναι θετικά στους ER και PR και αρνητικά για το HER2. Οι πιο συχνές θέσεις μετάστασης είναι το γαστρεντερικό και το περιτόναιο. Πιστεύεται ότι η αιτία της παθογένεσης αυτού του τύπου είναι κυρίως η απώλεια της E-Cadherin που κωδικοποιείται από το γονίδιο CDH1 στο χρωμόσωμα 16q22. Το γονίδιο αυτό λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό, καθώς η E-Cadherin είναι μια εξαρτώμενη από το ασβέστιο, διαμεμβρανική πρωτεΐνη που διατηρεί την ακεραιότητα των ιστών, την προσκόλληση από κύτταρο σε κύτταρο και αποτρέπει την εισβολή στους άλλους ιστούς (Thomas et al., 2019). Ιστολογικά, ταξινομείται σε 4 πρότυπα ανάπτυξης: τον συμπαγή τύπο, τον κυψελιδώδη, τον πλειόμορφο και τον σωληνολοβιακό. Τα κύτταρα είναι μικρά και ομοιόμορφα και είναι διάσπαρτα ή σε στοίχους πλάτους ενός κυττάρου μέσα σε ένα πυκνό ινώδες στρώμα (Reed et al., 2015).



Εικόνα 7: Διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα (Patricia A. Thomas, 2011)

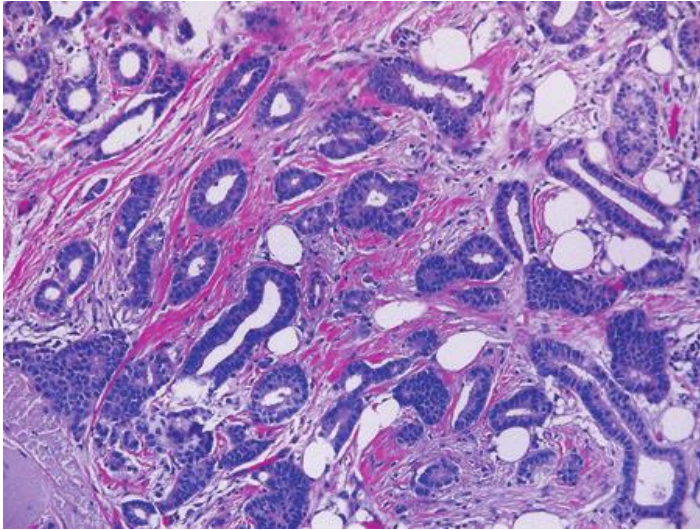
Το βλεννώδες καρκίνωμα είναι ένας σπάνιος τύπος καρκινώματος του μαστού (2%) που χαρακτηρίζεται από την παρουσία μεγάλων ποσοτήτων εξωκυτταρικής βλέννης. Μπορούν να διακριθούν 2 υπότυποι: ο γνήσιος και ο μικτός τύπος. Εμφανίζεται με μεγαλύτερη συχνότητα στις περι- και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (με μέση ηλικία

διάγνωσης τα 71 έτη) και έχει καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με το διηθητικό πορογενές και λοβιακό καρκίνωμα του μαστού. Η 10-ετής επιβίωση ανέρχεται στο 90,3%. Στην πλειονότητα τους είναι θετικά για τους ER και PR και αρνητικά για τους ανδρογονικούς υποδοχείς (AR) (Marrazzo et al., 2020).



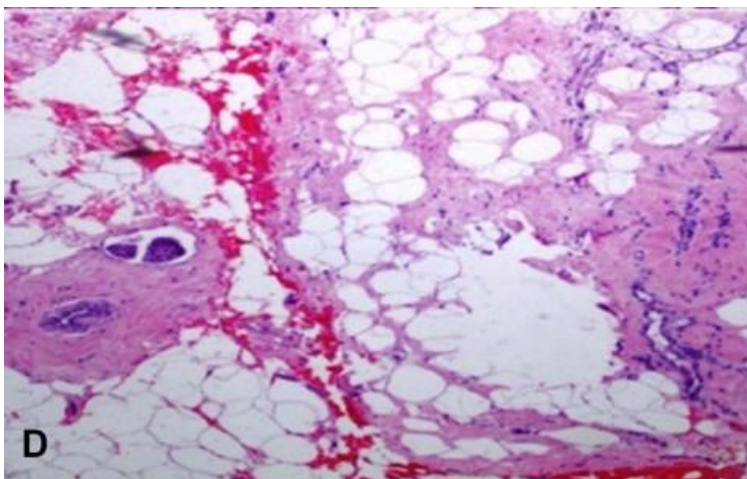
Εικόνα 8: Γνήσιο βλεννώδες καρκίνωμα του μαστού grade 2 (με χαρακτηριστικές φωλεές καρκινικών κυττάρων μέσα στην εξωκυττάρια βλέννη) (Budzik et al., 2021)

Το σωληνώδες καρκίνωμα του μαστού (1-2%) αποτελείται από καλά διαφοροποιημένες σωληνοειδείς δομές, τυπικά πάχους ενός στρώματος που περιβάλλεται από άφθονο πυκνό στρώμα. Λόγω της μη επιθετικής, ιστολογικής εμφάνισής του, της χαμηλής του τάσης να υποτροπιάζει τοπικά, να εξαπλώνεται στους μασχαλαίους λεμφαδένες και να δίνει μεταστάσεις, έχει ευνοϊκή πρόγνωση (εξ' ορισμού grade 1). Το μέγεθος τους είναι 0,2-2 cm και η ηλικία εμφάνισης είναι τα 54-60 έτη. Είναι σχεδόν πάντα θετικό για ER και PR και είναι συνήθως αρνητικό για HER2, EGFR, P-Cadherin, p53 και HKMW (Limaiem and Mlika, 2023).



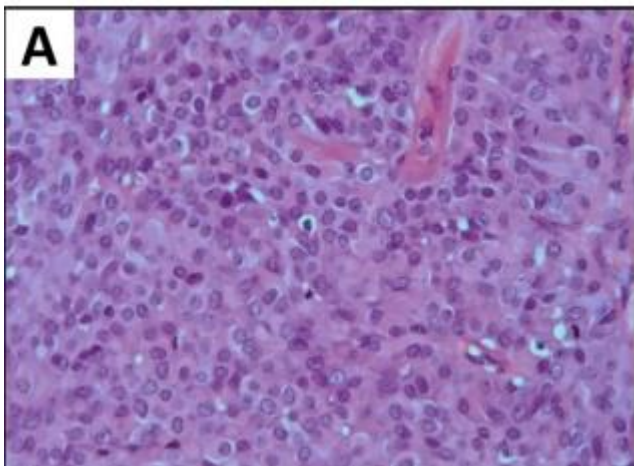
Εικόνα 9: Διθηθικό σωληνώδες καρκίνωμα (Patricia A. Thomas, 2011)

Το διθηθικό μικροθηλώδες καρκίνωμα του μαστού (0,9-2%) είναι ένας σπάνιος υπότυπος που ξεχωρίζει για την έντονη λεμφαγγειακή επέκταση του. Η ηλικία διάγνωσης είναι τα 50-60 έτη. Ιστολογικά αποτελείται από θηλές ή αθροίσεις σε κενούς χώρους του υποστρώματος, που προσομοιάζουν σε κυστικά διευρυμένα αγγεία. Τα κύτταρα του όγκου είναι μικρά, σχετικά ομοιόμορφα και με ελάχιστες μιτώσεις. Επιπρόσθετα, είναι χαρακτηριστική η διάταξη 'από μέσα προς τα έξω' ('inside-out') με την κυτταρική επιφάνεια του αυλού να είναι εξωτερικά, δηλαδή παρουσιάζει αντίστροφο κυτταρικό προσανατολισμό. Είναι στην πλειονότητα τους θετικά για τους PR και το HER2 (Verras et al., 2022).



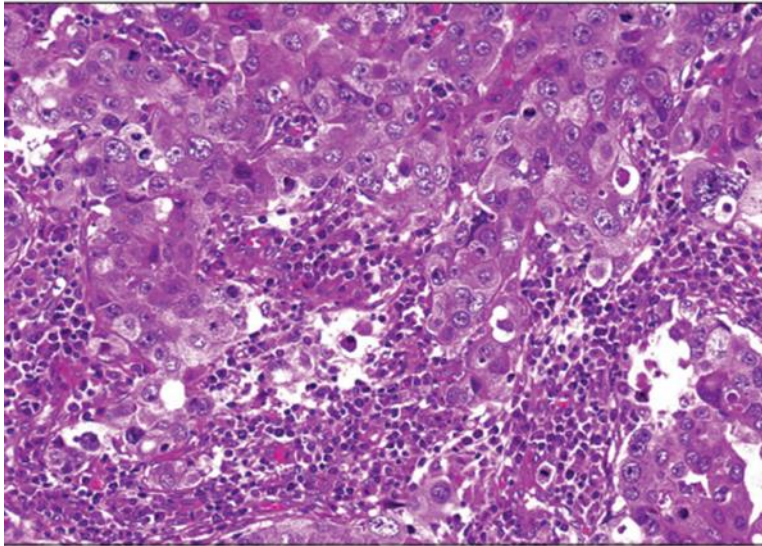
Εικόνα 10: Διθηθικό μικροθηλώδες καρκίνωμα με νεοπλασματικό έμβολο εντός λεμφαγγείου (Verras et al., 2022)

Τα καρκινώματα του μαστού με νευροενδοκρινή διαφοροποίηση (NEBC) αποτελούν το 2-5% των διηθητικών νεοπλασμάτων του μαστού. Η μέση ηλικία εμφάνισης είναι τα 60-70 έτη. Η διάγνωση βασίζεται στην παρουσία μορφολογικών χαρακτηριστικών παρόμοια με τους γαστρεντερικούς και πνευμονικούς νευροενδοκρινικούς όγκους, καθώς και στην θετικότητα για νευροενδοκρινικούς δείκτες (συναπτοφυσίνη, χρωμογρανίνη, CD56, CK7). Είναι συνήθως θετικά στους ER και PR και HER2 αρνητικά (Trevisi et al., 2020).



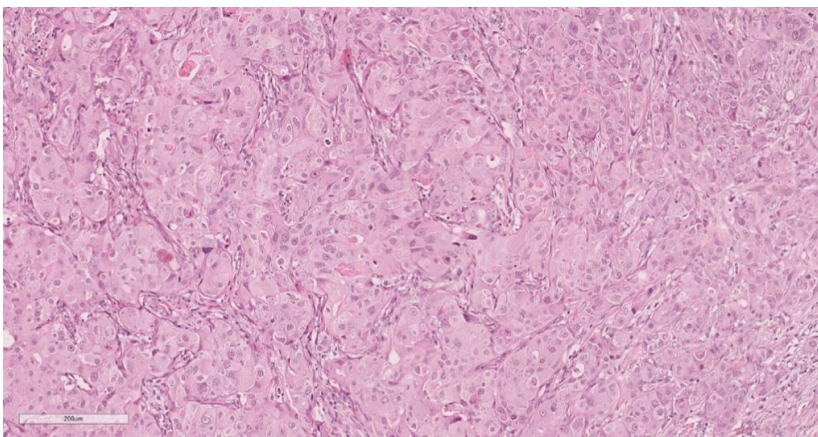
Εικόνα 11: Νευροενδοκρινικό καρκίνωμα του μαστού (Trevisi et al., 2020)

Τα μυελοειδή καρκινώματα (<1%) στην πλειοψηφία τους εμφανίζουν συγκυτιακό πρότυπο ανάπτυξης, είναι περιγράπτα και συχνά ευμεγέθη με περιοχές νέκρωσης. Ιστολογικά τα κύτταρα παρουσιάζουν σημαντική πολυμορφία και πολλές μιτώσεις, διατάσσονται σε δεσμίδες και παρεμβάλλεται μεταξύ τους ελάχιστο στρώμα. Γύρω από τα νεοπλασματικά κύτταρα παρατηρείται έντονη λεμφοκυτταρική διήθηση. Έχουν καλή πρόγνωση παρά την φτωχή τους διαφοροποίηση. Η 5-ετής επιβίωση είναι 82-84% και η μέση ηλικία διάγνωσης είναι τα 52 έτη. Σχετίζεται πολύ συχνά με μεταλλάξεις BRAC1 και TP53. Τυπικά, στερούνται ER και PR και έχουν χαμηλή συχνότητα ενίσχυσης του c-erB2 γονιδίου. Το γεγονός αυτό κατατάσσει αυτόν τον τύπο ως υποομάδα των τριπλών αρνητικών καρκινωμάτων (TNBC) (Lee et al., 2022).



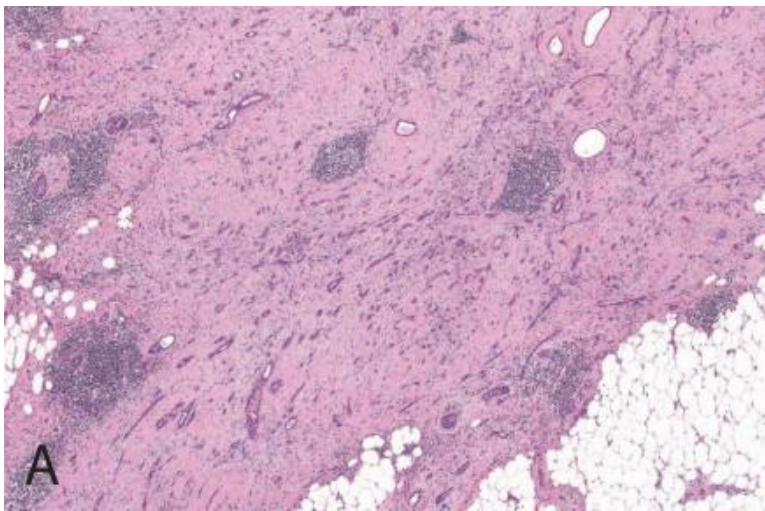
Εικόνα 12: Μυελοειδές καρκίνωμα του μαστού με συγκυτιακό πρότυπο ανάπτυξης (Lee et al., 2022)

Το αποκρινές καρκίνωμα αποτελεί μια σπάνια κατηγορία κακοήθους εξεργασίας του μαστού και αντιπροσωπεύει το ~1% των διηθητικών νεοπλασμάτων του μαστού. Ιστολογικά αποτελείται από άφθονο κοκκώδες ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα, με καλά καθορισμένα όρια και μεγάλους πυρήνες με προεξέχον πυρήνιο. Παρουσιάζει ένα χαρακτηριστικό προφίλ υποδοχέων στεροειδών ορμονών, δηλαδή είναι θετικό στους AR και αρνητικό στους ER, ενώ η πρωτεΐνη HER2 είναι θετική ~30-50%. Παρατηρούνται μεταλλάξεις στο σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K/ PTEN/ AKT και TP53 (Vranic and Gatalica, 2022). Όμως, ένα μεγάλο ποσοστό των αποκρινών καρκινωμάτων είναι τριπλά αρνητικά (TNACs) και η μέση ηλικία διάγνωσης αυτού του τύπου είναι τα 55,5 έτη (Sun et al., 2020).



Εικόνα 13: Αποκρινές καρκίνωμα (Vranic and Gatalica, 2022)

Τα μεταπλαστικά καρκινώματα αποτελούν <1% των κακοηθειών του μαστού. Έχει φτωχή πρόγνωση και αρκετά επιθετικό χαρακτήρα. Η 5-ετής επιβίωση ανέρχεται στο 57,1% και η πλειοψηφία των ασθενών βρίσκεται ήδη σε προχωρημένο στάδιο κατά την διάγνωση. Διακρίνονται 5 ιστολογικοί φαινότυποι: ο πλακώδης, ο αδеноπλακώδης, ο ατρακτοκυτταρικός, με μεσεγχυματική διαφοροποίηση και ο μικτός (Gortman et al., 2021). Περισσότερο από 90% τα μεταπλαστικά καρκινώματα είναι τριπλά αρνητικά και εμφανίζουν μεγάλα ποσοστά υποτροπών. Ακόμη αξίζει να σημειωθεί ότι η προσβολή των λεμφαδένων δεν είναι συχνή παρά το μεγάλο μεταστατικό δυναμικό αυτού του τύπου. Το μεταπλαστικό καρκίνωμα με πλακώδη διαφοροποίηση έχει την χειρότερη πρόγνωση, ενώ αυτό με την μεσεγχυματική την καλύτερη (Haroon et al., 2021).



Εικόνα 14: Μεταπλαστικό καρκίνωμα αδеноπλακώδους διαφοροποίησης χαμηλού βαθμού κακοήθειας με διηθημένα όρια (McMullen et al., 2019)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Τριπλά αρνητικά καρκινώματα (TNBC)

Το καρκίνωμα του μαστού εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια και ως εκ τούτου διακρίνεται σε διαφορετικούς υποτύπους με διαφορετική κλινική συμπεριφορά, παράγοντες κινδύνου, πρόγνωση και απάντηση στην θεραπεία.

- Luminal A: ER/PR +, HER2-, Ki67+<20%
- Luminal B: ER/PR+< 20 %, HER2-, Ki67+≥ 20%
- ER/PR-, υπερέκφραση HER2
- ER/PR-, HER2- (Manjunath and Choudhary, 2021)

Τα συστήματα ταξινόμησης είναι 2: οι ιστοπαθολογικές παράμετροι (ιστολογικός τύπος και βαθμός κακοήθειας) και η έκφραση κλασσικών βιοδεικτών (ER, PR, HER2) . Αποτελούν βασικά στοιχεία για την πρόγνωση καθώς και για την πρόβλεψη της απάντησης στην εκάστοτε θεραπεία (Yin et al., 2020).

Ως τριπλά αρνητικά καρκινώματα ορίζονται τα καρκινώματα τα οποία δεν εκφράζουν υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης καθώς επίσης δεν εμφανίζουν ενίσχυση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη HER2. Η μέση ηλικία εμφάνισης είναι κάτω από τα 40 έτη και ο κίνδυνος υποτροπής αγγίζει το 60-90%, ενώ μεγαλύτερη συχνότητα νόσησης έχουν γυναίκες Αφρικάνικης ή Αφροαμερικάνικης καταγωγής (Wang et al., 2019). Υπάρχει μεγαλύτερος κίνδυνος υποτροπής 3 χρόνια μετά την διάγνωση, ωστόσο ο κίνδυνος ελαττώνεται σημαντικά μετά την 5ετία. Επιπρόσθετα, το ποσοστό θνησιμότητας είναι μεγάλο και ανέρχεται στο 40% μέσα στα 5 πρώτα χρόνια από την διάγνωση. Είναι επιθετικά καρκινώματα με μεγάλο μεταστατικό δυναμικό (46%). Οι πιο συχνές θέσεις μετάστασης είναι ο πνεύμονας και ο εγκέφαλος. Λόγω του ειδικού αυτού φαινότυπου δεν είναι ευαίσθητα σε ενδοκρινική θεραπεία και σε μοριακές στοχευμένες θεραπείες, ως εκ τούτου η συστηματική χημειοθεραπεία είναι η μόνη λύση με φτωχά όμως αποτελέσματα. Διαχωρίζονται σε 6 υπότυπους, σύμφωνα με τον Lehman et al. σε βασικού τύπου 1 (BL1), βασικού τύπου 2 (BL2), ανοσορυθμιστικός (IM), μεσεγγυματικός (M), μεσεγγυματικός τύπου προγονικών κυττάρων (MSL), τύπου αυλικού ανδρογονικού υποδοχέα (LAR) (Yin et al., 2020). Αυτοί οι υπότυποι ταξινομούνται περαιτέρω, σύμφωνα με Burstein et al. σε θετικά AR, μεσεγγυματικά, βασικού τύπου ανοσοκατεσταλμένα και βασικού τύπου ανοσοενεργοποιημένα (Sukumar et al., 2021).

2.1 Υπότυποι τριπλά αρνητικών καρκινωμάτων

Ο βασικού τύπου 1 υπότυπος (BL1) είναι εμπλουτισμένος με γονίδια που εμπλέκονται στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA, DDR (DNA Damage Response), και στο σύστημα ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου (συμπεριλαμβανομένου τις μεταλλάξεις στο TP53, την υψηλή ενίσχυση των γονιδίων MYC, PIK3CA, CDK6, AKT2, KRAS, FGFR1, IGF-1R, CCNE1 και CDKN2A/B και ελλείψεις, είτε ομόζυγες είτε ετερόζυγες, των γονιδίων BRAC2, PTEN, MDM2 και RB1. Οι πιθανοί θεραπευτικοί παράγοντες για αυτή την κατηγορία είναι οι αναστολείς PARP και γενετοξικοί παράγοντες, ενώ οι ασθενείς είναι ευαίσθητοι στην θεραπεία με σισπλατίνη (Garrido-Castro et al., 2019; Yin et al., 2020).

Ο βασικού τύπου 2 υπότυπος (BL2) είναι εμπλουτισμένος με γονίδια που εμπλέκονται στην μη φυσιολογική ενεργοποίηση των οδών σηματοδότησης EGFR, Wnt/ β -κατενίνη, MET, NGF και IGF-1R, στην γλυκόλυση, στην γλυκονεογένεση και στην έκφραση μυοεπιθηλιακών δεικτών. Τα πιθανά φάρμακα αντιμετώπισης περιλαμβάνουν αναστολείς mTOR και αναστολείς αυξητικού παράγοντα (lapatinib, gefitinib και cetuximab).

Ο ανοσορυθμιστικός υπότυπος (IM) είναι σημαντικά εμπλουτισμένος με γονίδια που σχετίζονται με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και με τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος όπως η οδός Th1/Th2, η οδός των NK κυττάρων, η οδός των υποδοχέων των B- κυττάρων, η οδός των δενδριτικών κυττάρων, η οδός των υποδοχέων των T- κυττάρων και η οδός της IL-7. Έτσι, αυτός ο υπότυπος ομοιάζει αρκετά με το καρκίνωμα του μαστού με μυελοειδή χαρακτηριστικά. Πιθανά φάρμακα αυτής της κατηγορίας είναι φάρμακα που στοχεύουν το PD1, PDL1, CTLA-4 καθώς και η χρήση άλλων ανοσοτροποποιητικών αναστολέων των σημείων ελέγχου.

Ο μεσεγχυματικός φαινότυπος (M) παρουσιάζει ιδιαίτερα ενεργοποιημένα τα μονοπάτια σηματοδότησης που ελέγχουν την κυτταρική μετανάστευση (ρυθμιζόμενα από την ακτίνη), την αλληλεπίδραση του υποδοχέα με εξωκυττάρια σήματα και αυτά της διαφοροποίησης (μονοπάτι Wnt, οδός κινάσης του αναπλαστικού λεμφώματος, μονοπάτι TGF β) και ονομάζεται επομένως μεταπλαστικός καρκίνος του μαστού. Ο ιστός αυτού του υποτύπου ομοιάζει χαρακτηριστικά με σάρκωμα ή πλακώδες επιθήλιο και είναι επιρρεπής στο να αναπτύξει αντίσταση στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Επομένως, τα πιθανά βοηθητικά φάρμακα μπορεί να περιλαμβάνουν αναστολείς mTOR ή φάρμακα που στοχεύουν στην επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT).

Ο μεσεγχυματικός φαινότυπος τύπου προγονικών κυττάρων (MSL) εκφράζει χαμηλά επίπεδα γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και υψηλά επίπεδα γονιδίων που σχετίζονται με τις ιδιότητες των μεσεγχυματικών προγονικών κυττάρων (ABCA8, PROCR, ENG, ALDHA1, PER1, ABCB1, TERT2IP, BCL2, BMP2 και THY), γονίδια HOX (HOXA5, HOXA10, MEIS1, MEIS2, MEOX1, MEOX2 και MSX1), και ειδικό δείκτης μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων (BMP2, ENG, ITGAV, KDR, NGFR, NT5E, PDGFR, THY1 και VCAM1). Εικάζεται, ότι οι ασθενείς αυτής της κατηγορίας μπορεί να αντιμετωπιστούν με αναστολείς PI3K, ανταγωνιστές Src ή αντιαγγειογενετικά φάρμακα. Μελέτες έχουν αναφέρει ότι το dasatinib, ένας αναστολέας Abl/Src, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία ασθενών με καρκίνο του μαστού M και MSL.

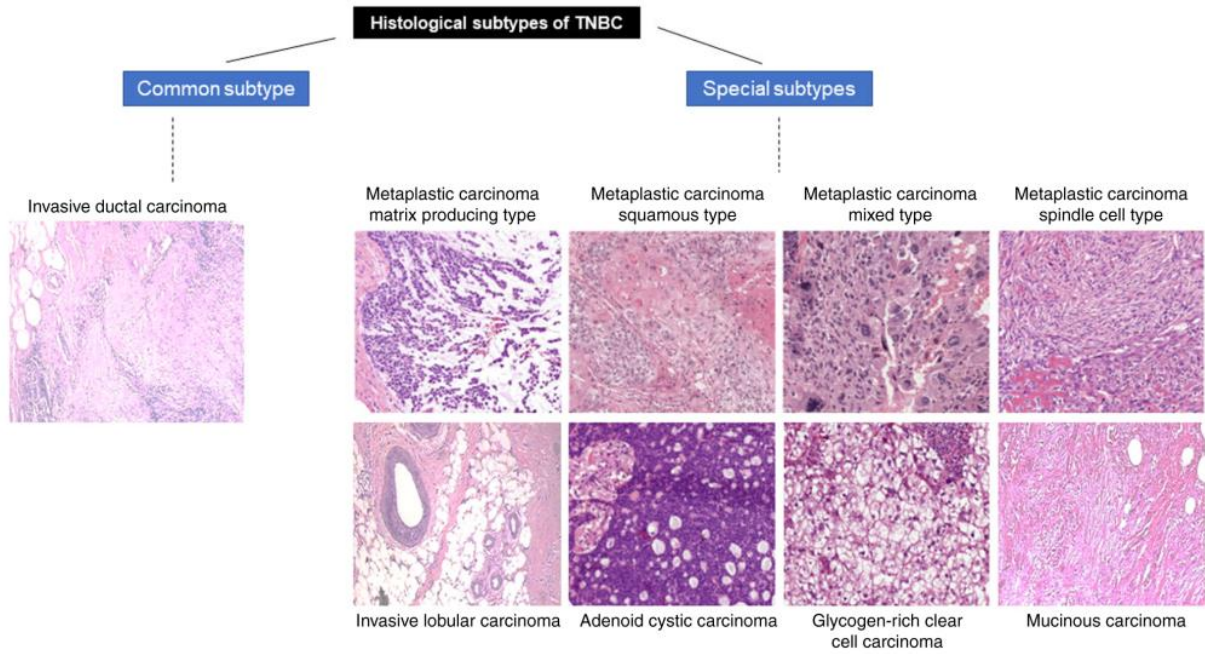
Ο φαινότυπος τύπου αυλικού ανδρογονικού υποδοχέα (LAR) παρουσιάζει ένα σημαντικά διαφορετικό προφίλ έκφρασης σε σχέση με τους άλλους υπότυπους των TNBC. Αν και αυτός ο τύπος δεν εκφράζει τον ER, έχει υπερενεργοποιημένα ορμονικά μονοπάτια σηματοδότησης (συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης στεροειδών ορμονών, του μεταβολισμού της πορφυρίνης και του μεταβολισμού των ανδρογόνων/οιστρογόνων). Είναι αξιοσημείωτο ότι υπάρχουν υψηλά επίπεδα έκφρασης του AR και τα επίπεδα του mRNA είναι 9 φορές υψηλότερα σε σχέση με τις παραπάνω κατηγορίες. Επιπρόσθετα, πέραν των αυξημένων επιπέδων AR, αυξημένα είναι και τα επίπεδα των βοηθητικών ενεργοποιητών του (DHCR24, ALCAM, FASN, FKBP5, APOD, PIP, SPDEF και CLDN8). Επομένως, η θεραπεία με αντιανδρογόνα συνίσταται σε αυτό τον τύπο (Yin et al., 2020).

Όλοι οι παραπάνω υπότυποι, εκτός από τον υπότυπο LAR και MSL, αποτελούν έναν μεταξύ τους συνδυασμό, δηλαδή:

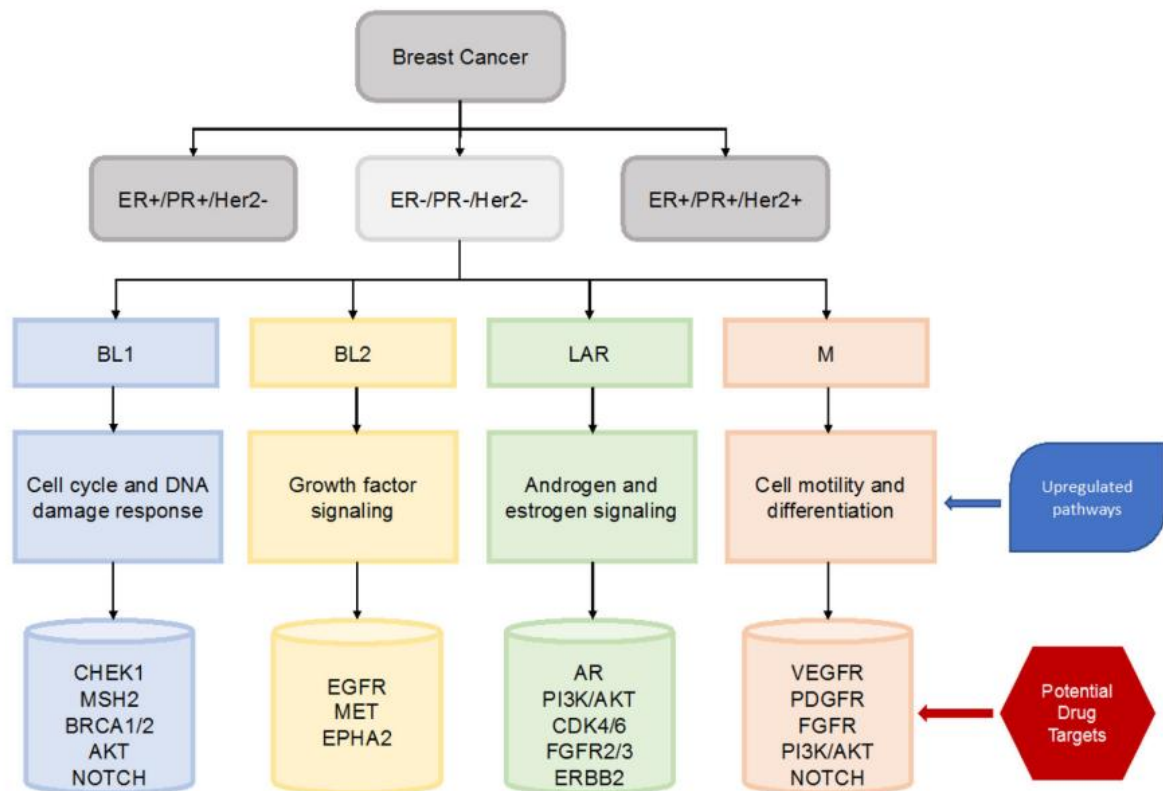
- BL1 (99%)
- BL2 (95%)
- IM (84%)
- M (97%)

Ο υπότυπος LAR αποτελείται από HER2 (74%) luminal B (14%), ενώ ο υπότυπος MSL αποτελείται από βασικού τύπου (50%), φυσιολογικού τύπου (28%) και luminal B (14%). Ο LAR έχει υψηλότερα ποσοστά ελεύθερα απομακρυσμένης μετάστασης και συνολικό ποσοστό επιβίωσης (OS), ενώ αυτά των υποτύπων M και BL2 είναι σαφώς χαμηλότερα. Τα ποσοστά υποτροπής μέσα στα 3 έτη των υποτύπων M και BL2 ήταν σημαντικά υψηλότερα από αυτό του υποτύπου LAR. Οι ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με ανθρακυκλίνη και πακλιταξέλη, παρά την ύφεση που παρουσιάζουν (28%),

ανταποκρίνονται διαφορετικά μεταξύ των διαφόρων υποτύπων. Ο τύπος BL1 ανταποκρίνεται καλύτερα (52%), ενώ οι τύποι BL2, LAR και MSL είχαν φτωχότερη ανταπόκριση (Yin et al., 2020).



Εικόνα 15: Ιστολογική ταξινόμηση των TNBC (Manjunath and Choudhary, 2021)



Εικόνα 16: Μοριακή ταξινόμηση των TNBC και πιθανοί στόχοι (Nunnery et al., 2021)

2.2 Το μικροπεριβάλλον των τριπλά αρνητικών καρκινωμάτων

Το μικροπεριβάλλον του καρκίνου του μαστού αποτελείται από το εξωκυτταρικό υλικό και άλλους στρωματικούς κυτταρικούς τύπους συμπεριλαμβανομένων των ανοσοκυττάρων, των μακροφάγων που σχετίζονται με τον όγκο (TAMs), των ινοβλαστών που σχετίζονται με τον καρκίνο (CAFs), των αδιποκυττάρων (CAAs) και των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αλλαγές στο μικροπεριβάλλον επηρεάζουν σημαντικά την ογκογένεση, την ασθένεια, την εξέλιξη και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία των T στρωματικών λεμφοκυττάρων (TILs) στο TNBC σχετίζονται με μεγαλύτερη απόκριση στην νεοεπιχειρητική και επικουρική χημειοθεραπεία. Αυτά τα ευρήματα έχουν ωθήσει περαιτέρω στην διερεύνηση της ανοσοδιήθησης ως βιοδείκτη για την καθοδήγηση της θεραπείας και την προβλέψη της κλινικής έκβασης. Τα IM TNBC έχουν την υψηλότερη έκφραση προσαρμοστικών γονιδιακών υπογραφών που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό και ένα πλήρως φλεγμονώδες μοτίβο, υποδηλώνοντας ότι αυτοί οι όγκοι είναι ο βέλτιστος υποψήφιος για θεραπεία με αναστολείς των σημείων ελέγχου (ICIs) του ανοσοποιητικού συστήματος.

Οι υποτύποι M και LAR θεωρούνται ότι έχουν ένα ψυχρό φαινότυπο με υψηλή έκφραση στρωματικών υπογραφών. Οι όγκοι BL συσχετίστηκαν επίσης με ένα ανοσοκατασταλμένο μικροπεριβάλλον. Οι υποτύποι M, LAR και BL παρουσιάζουν χαμηλή έκφραση των στόχων του ανοσοποιητικού συστήματος (Nunnery et al., 2021).

2.3 Προγνωστικοί βιοδείκτες για τα τριπλά αρνητικά καρκινώματα

Μια σειρά από πρωτεϊνικούς βιοδείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση των τριπλά αρνητικών καρκινωμάτων του μαστού.

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) είναι ένας υποδοχέας κινάσης τυροσίνης που ανήκει στην οικογένεια ErbB και εμπλέκεται στην αγγειογένεση, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τις μεταστάσεις, καθώς και την αναστολή της απόπτωσης. Μελέτες έχουν δείξει ότι το σύνολο των πρωτεϊνών EGFR υπερεκφράζεται συχνότερα στα TNBC σε σύγκριση με άλλους υποτύπους. Η συχνότητα υπερέκφρασης του EGFR μπορεί να ποικίλλει σημαντικά από 13% έως 76%. Έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης χειρότερης επιβίωσης χωρίς νόσο (DFS) και συνολικής επιβίωσης OS. Λόγω της υψηλής συχνότητας έκφρασης του στα TNBC, οι αναστολείς τυροσινικής κινάσης του EGFR (TKI), καθώς και τα μονοκλωνικά αντισώματα κατά του EGFR έχουν μελετηθεί μόνοι και σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία και τα αποτελέσματα ήταν απογοητευτικά χωρίς κανένα όφελος στο αρχικό στάδιο ή κατά το μεταστατικό στάδιο.

Οι αγγειακοί ενδοθηλιακοί αυξητικοί παράγοντες (VEGFs) εκφράζονται στο 30-60% των TNBC. Ο VEGF προάγει την αγγειογένεση, διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, αναστέλλοντας έτσι την απόπτωση τους και υποστηρίζοντας τα νεοσχηματιζόμενα αιμοφόρα αγγεία. Οι ασθενείς με TNBC είχαν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά ενδοκαρκινικού VEGF σε σύγκριση με ασθενείς χωρίς TNBC. Οι ασθενείς αυτοί παρουσίασαν μικρότερη επιβίωση χωρίς υποτροπές και συνολική επιβίωση (OS). Δεδομένου ότι η αγγειογένεση πιστεύεται ότι είναι ένα βασικό συστατικό που οδηγεί στον πολλαπλασιασμό και την επιβίωση των κυττάρων του όγκου, το bevacizumab, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που δεσμεύει τον VEGF-A, έχει μελετηθεί ως στόχος για τη θεραπεία. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε βελτίωση στην αποτροπή των μεταστάσεων (DFS) ή στην συνολική επιβίωση (OS) παρά μόνο σταμάτησε την εξέλιξη της νόσου (PFS).

Οι υποδοχείς αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών (FGFR) είναι μια οικογένεια διαμεμβρανικών υποδοχέων που παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένης της διαφοροποίησης, του πολλαπλασιασμού και της αγγειογένεσης. Το FGFR 1-4 περιλαμβάνει υποδοχείς κινάσης τυροσίνης και η ανώμαλη σηματοδότηση συμβάλλει στην ογκογένεση μέσω πολλαπλών μηχανισμών γονιδιακής αλλαγής, συμπεριλαμβανομένων σημειακών και ενεργοποιητικών μεταλλάξεων, συντήξεων/αναδιατάξεων και ενισχύσεων. Στα κύτταρα του καρκίνου του μαστού, η ενίσχυση FGFR1 είναι η πιο συχνή ανωμαλία που εμπλέκεται στην ογκογένεση. Ο επιπολασμός της υπερέκφρασης του FGFR1 εκτιμήθηκε ότι είναι 18%, με την ενίσχυση του γονιδίου FGFR1 περίπου 33%. Η ενίσχυση FGFR2 είναι σχετικά λιγότερο συχνή και εμφανίζεται σε λιγότερο από το 5% του TNBC. Ενώ στο θετικό για ορμονικούς υποδοχείς καρκίνο μαστού, η παρουσία ενίσχυσης FGFR1 συνδέεται σταθερά με χειρότερη πρόγνωση. Η αναστολή σηματοδότησης FGFR είναι ένας ενθαρρυντικός φαρμακολογικός στόχος. Η πλειονότητα αυτών των ενώσεων είναι μικρά μόρια TKI . Αυτό περιλαμβάνει ευνοϊκά αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν σε κλινικές δοκιμές τόσο για TKI πολλαπλών στόχων όσο και για TKI επιλεκτικά FGFR. Εκτός από τα TKI, υπάρχουν επίσης προκλινικά δεδομένα που υποδηλώνουν την αποτελεσματικότητα των αντισωμάτων έναντι των ισομορφών FGFR και των αναστολέων των προσδεμάτων του αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών.

Η HER2-θετική πρωτεΐνη αντιπροσωπεύει το 15% όλων των καρκινωμάτων του μαστού στα οποία η γονιδιακή ενίσχυση του ERBB2 οδηγεί σε υπερέκφραση της πρωτεΐνης αυτής. Δίνεται έμφαση στην καθιέρωση μιας νέας ταξινόμησης σε όγκους με χαμηλή έκφραση πρωτεΐνης HER2 αλλά και με μη ανιχνεύσιμη γονιδιακή ενίσχυση που αναφέρεται ως HER2- χαμηλό. Αυτοί οι όγκοι περιλαμβάνουν υποτύπους που κλασικά αναφέρονται ως αρνητικοί HER2. Το HER2-χαμηλό καρκίνωμα μαστού αντιπροσωπεύει περίπου το 45-55% όλων των καρκίνων του μαστού. Ενώ ο HER2-χαμηλός τύπος δεν έχει αποδειχθεί ότι ανταποκρίνεται σημαντικά σε καθιερωμένες θεραπείες anti-HER2, συμπεριλαμβανομένου του trastuzumab, έχει δείξει αποτελεσματικότητα σε σχέση με πολλούς νέους στοχευμένους αντι-HER2 παράγοντες. Το anti-HER2 σχήμα trastuzumab deruxtecan έδειξε ευνοϊκή ανταπόκριση σε μια δοκιμή φάσης 1 σε προχωρημένους συμπαγείς όγκους χαμηλής έκφρασης HER2. Πολλά εμβόλια anti-HER2 είναι επίσης υπό αξιολόγηση στον HER2-χαμηλό τύπο, με ορισμένα να παρουσιάζουν ευνοϊκά αποτελέσματα ως προς τα TNBC. Επιπλέον, μεταλλάξεις του γονιδίου HER2, που υπάρχουν σε περίπου 2% όλων των καρκινωμάτων στον μαστό, μπορούν να βρεθούν σε όγκους χαμηλής έκφρασης HER2 και τα δεδομένα

υποδηλώνουν ανταπόκριση σε αντι-HER2 TKIs. Η neratinib έχει δείξει αποτελεσματικότητα σε μεταστατικά μεταλλαγμένα HER2 και HER2-χαμηλά.

Ο ανδρογονικός υποδοχέας AR είναι μέρος της οικογένειας υποδοχέων στεροειδών ορμονών και λειτουργεί ως πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας. Κανονικά βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα περιμένοντας να δεσμευτεί με τα ανδρογόνα. Κατά την πρόσδεση τους, ο AR μετατοπίζεται στον πυρήνα και προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ο επιπολασμός στο TNBC είναι περίπου 30-35% και η θετικότητα AR σχετίζεται με τον υποτύπο LAR, τον χαμηλό grade, τον χαμηλότερο κίνδυνο εμπλοκής των κομβικών οδών και τη μεγαλύτερη ηλικία κατά τη διάγνωση. Το AR-θετικό TNBC έχει χαμηλότερο δείκτη Ki-67 από το AR-αρνητικό TNBC και θα μπορούσε να είναι λιγότερο ευαίσθητο στη χημειοθεραπεία. Αρκετές πρόσφατες μετα-αναλύσεις έχουν βρει ότι η έκφραση AR σχετίζεται με βελτιωμένο DFS στο TNBC. Πολλαπλές μελέτες έχουν αξιολογήσει τον ρόλο των αντι-ανδρογόνων στην θεραπεία της τοπικά προχωρημένης ή μεταστατικής νόσου. Δύο μελέτες φάσης II που διερεύνησαν τη χρήση των μη στεροειδών αναστολέων AR, της βικαλουταμίδης και της ενζα-λουταμίδης, βρήκαν μια αναλογία κλινικού οφέλους περίπου 20-25%. Επιπλέον, υπάρχουν αρκετές συνεχιζόμενες κλινικές δοκιμές για την αξιολόγηση του αποκλεισμού του AR σε συνδυασμό με διάφορες στοχευμένες θεραπείες, συμπεριλαμβανομένων των αναστολέων CDK4/6 και των αναστολέων PI3K.

Η οδός σηματοδότησης NOTCH μπορεί να είναι ένας πολλά υποσχόμενος βιοδείκτης στο TNBC. Η οδός σηματοδότησης Notch ενεργοποιεί πολλά γονίδια που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και τον κυτταρικό θάνατο. Αποτελείται από τέσσερις υποδοχείς (Notch-1, Notch-2, Notch-3, Notch-4) οι οποίοι αλληλεπιδρούν με πέντε συνδέτες (Delta-like 1, Delta-like 3, Delta-like 4, Jagged-1, και Jagged-2). Οι μεταλλάξεις υπάρχουν σε περίπου 10% του TNBC. Έχει αναδειχτεί συσχέτιση μεταξύ του Notch-1 και της θετικότητας των λεμφαδένων με το Jagged-1 και του μεγαλύτερου μεγέθους όγκου. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η αυξημένη έκφραση των Notch-1, Notch-4 ή Jagged-1 θεωρείται κακός προγνωστικός παράγοντας που σχετίζεται με μειωμένη επιβίωση.

Μια ομάδα μικρών δραστικών μορίων και ελεύθερων ριζών προέρχονται από το οξυγόνο και παράγονται συνεχώς στο σώμα. Οι κατάλληλες ποσότητες αυτών είναι κρίσιμες για τη λειτουργία και την επιβίωση των κυττάρων. Ωστόσο, το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται όταν υπάρχει ανισορροπία μεταξύ των ενεργών μορίων οξυγόνου και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη του

DNA και να διαταράξει τις οδούς σηματοδότησης που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την απόπτωση και την αγγειογένεση. Ο ρόλος του στην έναρξη και την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού, καθώς και η χρησιμότητά του ως προγνωστικός δείκτης παραμένει αμφιλεγόμενος. Ωστόσο, μια πρόσφατη μελέτη βρήκε αυξημένα ποσοστά αντιδραστικών μορίων οξυγόνου στα κύτταρα TNBC, καθώς και αυξημένη εξάρτηση από τις ελεύθερες ρίζες ROS για την επιβίωση των κυττάρων σε σύγκριση με τα θετικά για ορμονικούς υποδοχείς καρκινώματα μαστού. Ενώ οι αρχικές μελέτες που αξιολογούν τη χρήση διατροφικών αντιοξειδωτικών δεν έχουν δείξει όφελος στην πρόληψη του καρκίνου, ο πιθανός ρόλος των αντικαρκινικών θεραπειών που βασίζονται σε οξειδοαναγωγή στο TNBC έχει αποδειχθεί πολλά υποσχόμενος και παραμένει ένας τομέας ενεργού έρευνας.

Η έκφραση του RNA και των miRNA αποτελούν συνεχώς εξελισσόμενους παράγοντες για την χρήση τους ως βιοδείκτες στα TNBC.

Τα miRNAs αντιπροσωπεύουν κυκλοφορούντα μη κωδικοποιητικά μόρια RNA μήκους 17-27 νουκλεοτιδίων που ρυθμίζουν τη μετα-μεταγραφική έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην ογκογόνο οδό, όπως τα ογκογονίδια και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια. Οι τεχνικές προσδιορισμού αλληλουχίας υψηλής απόδοσης έχουν εντοπίσει 28.000 ώριμα miRNA. Λόγω της σταθερότητάς τους, τα miRNAs μπορούν να μελετηθούν σε μη επεμβατικά δείγματα όπως αίμα, ορός και ούρα. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα μη ρυθμισμένα miRNA εμπλέκονται στην καρκινογένεση του μαστού. Οι συγκεκριμένες υπογραφές miRNA είναι μοναδικές και φαίνεται να είναι προγνωστικές για το TNBC. Για παράδειγμα, η μειωμένη έκφραση του miR-155 έχει αποδειχθεί ότι είναι προγνωστική για την φτωχή συνολική επιβίωση (OS) σε ασθενείς με TNBC, ενώ τα αυξημένα επίπεδα των miR-21, miR-27a/b, miR-210 και miR-454 συσχετίστηκαν με μικρότερο OS. Ομοίως, η μειωμένη έκφραση του miR-374a/b και το αυξημένο επίπεδο του miR-454 συσχετίστηκαν με μικρότερη πιθανότητα απομακρυσμένων μεταστάσεων (DFS). Άλλα πάνελ miRNAs βρέθηκαν να σχετίζονται με τη χημειοανθεκτικότητα. Η έκφραση του miR-181a ήταν αυξημένη σε δείγματα ιστού TNBC από ασθενείς που δεν ανταποκρίθηκαν στη νεοεπικουρική χημειοθεραπεία. Επίσης, μια πιλοτική μελέτη με υπογραφές miRNA από 21 περιπτώσεις βασικού τύπου TNBC που αντιμετωπίστηκαν με νεοεπικουρική θεραπεία, ανέδειξε 321 miRNAs συμπεριλαμβανομένου του miR-34a που απορυθμίστηκαν κατά τη σύγκριση της έκφρασης πριν και μετά τη θεραπεία. Μάλιστα διαπίστωσε ότι αυτοί οι πλήρεις ανταποκρινόμενοι όγκοι είχαν μια τάση για αύξηση των επιπέδων miRNA μετά από χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνη. Τα

μακρά μη κωδικοποιητικά RNA (lncRNA) είναι μεταγραφές με μήκη άνω των 200 νουκλεοτιδίων που δεν μπορούν να μεταφραστούν σε πρωτεΐνες. Όπως τα miRNA, εκτελούν επίσης ρυθμιστικές λειτουργίες και είναι διαταραγμένα σε πολλούς τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του TNBC. Το lncRNA έχει βρεθεί ότι ρυθμίζεται προς τα πάνω στους ιστούς TNBC και έχει αποδειχθεί ότι συσχετίζεται με χειρότερα κλινικά αποτελέσματα. Επίσης, το σχετιζόμενο με τη μετάσταση του αδενοκαρκινώματος πνεύμονα 1 (MALAT1) είναι ένα εξαιρετικά διατηρημένο lncRNA και πρόσφατες προκλινικές μελέτες έχουν εντοπίσει το MALAT1 ως πιθανό βιοδείκτη στο TNBC, βοηθώντας στην πρόβλεψη της μετάστασης.

Η αρένα του DNA και των γενετικών βιοδεικτών επεκτείνεται γρήγορα και στα TNBC. Το TP53 είναι ένα γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17 και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη του μεταγραφικού παράγοντα p53. Όταν υπάρχει βλάβη στο DNA, η μεταγραφή του p53 αυξάνεται, προάγοντας τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου και επιτρέποντας την επιδιόρθωση ή την απόπτωση του DNA. Το TP53 είναι ένα από τα πιο συχνά μεταλλαγμένα γονίδια στον καρκίνο του μαστού και μεταλλάσσεται περίπου στο 80% του TNBC. Οι μεταλλάξεις TP53 οδηγούν σε γενετική αστάθεια και μεγαλύτερη πιθανότητα απώλειας ετεροζυγωτίας και η έκφραση της πρωτεΐνης p53 μπορεί να ποικίλλει λόγω του τύπου της μετάλλαξης. Αρκετές μελέτες έχουν προσπαθήσει να προσδιορίσουν την επίδραση της μετάλλαξης TP53 στην πρόγνωση του TNBC, αλλά λόγω της μεταβλητής έκφρασης του p53, η τιμή της κατάστασης TP53 ως προγνωστικού βιοδείκτη είναι ασαφής. Δεδομένου ότι το TP53 μεταλλάσσεται στην πλειονότητα των TNBC είναι ελκυστικός υποψήφιος για αντικαρκινικές θεραπείες. Ενώ το μεταλλαγμένο TP53 είχε προηγουμένως θεωρηθεί ως «μη φαρμακοτεχνικό», πιο πρόσφατα δημιουργήθηκαν αρκετές ενώσεις που στοχεύουν τη μεταλλαγμένη p53. Αυτές οι ενώσεις συμπεριλαμβανομένων των PRIMA-1, APR-246, PK11007 και COTI-2, έχουν αποδειχθεί ότι επανενεργοποιούν το μεταλλαγμένο p53 και αποκαθιστούν τις ιδιότητες του άγριου τύπου (wild type).

Τα γονίδια BRCA1/2 κωδικοποιούν ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (HRD) και επομένως διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη γενετική ακεραιότητα. Οι μεταλλάξεις BRCA οδηγούν σε ανεπάρκεια του ομόλογου ανασυνδυασμού (HRD). Η μετάλλαξη της βλαστικής σειράς BRCA1/2 υπάρχει σε περίπου 10-20% του TNBC. Αρκετές μελέτες δεν έχουν δείξει διαφορά στα αποτελέσματα μεταξύ φορέων BRCA1/2 και μη φορέων. Είναι ενδιαφέρον ότι η μελέτη POSH έδειξε ότι στα 10 χρόνια το OS ήταν 78% στους φορείς

gBRCA σε σύγκριση με 69% στους φορείς που ήταν αρνητικοί σε gBRCA. Οι ασθενείς με μεταλλάξεις gBRCA1/2 είναι πιο επιρρεπείς σε παράγοντες που βλάπτουν το DNA όπως η πλατίνα και οι αναστολείς PARP. Δύο δοκιμές φάσης III κατέδειξαν, τη σημαντική παρατεταμένη επιβίωση χωρίς πρόοδο νόσου (PFS) των αναστολέων PARP, ως μονοθεραπεία σε σύγκριση με την τυπική χημειοθεραπεία στο μεταστατικό περιβάλλον για το gBRCA 1/2 μεταλλαγμένο. Ακόμη, μελετήθηκε ο συνδυασμός της ανοσοθεραπείας με αναστολείς PARP, δεδομένου ότι η ανεπάρκεια επιδιόρθωσης του DNA μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της ανοσογονικότητας και η αναστολή της PARP σχετίζεται με την προς τα πάνω ρύθμιση της έκφρασης PDL1. Οι μελέτες που συνδυάζουν την ανοσοθεραπεία με αναστολείς PARP συνεχίζονται και δείχνουν πολλά υποσχόμενες. Ωστόσο, ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών έχει αναφερθεί ότι φιλοξενεί HRD. Η HRD μπορεί επίσης να εντοπιστεί σε όγκους που δεν φέρουν μετάλλαξη BRCA1/2, ορίζοντας μια υποομάδα ασθενών που αναφέρεται ως BRCAness. Το BRCAness έχει προκύψει για να περιγράψει έναν φαινότυπο κοινό στο TNBC, που μοιράζεται παρόμοια μοριακά και κλινικά χαρακτηριστικά με τους ασθενείς που έχουν μεταλλαχθεί από BRCA. Οι ασθενείς με φαινότυπο BRCAness έχουν ελαττώματα επιδιόρθωσης του DNA μέσω μιας ποικιλίας διαφορετικών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της επιγενετικής αδρανοποίησης του BRCA, καθώς και των βλαστικών ή σωματικών μεταλλάξεων σε άλλα βασικά γονίδια που εμπλέκονται στο σύστημα του ομόλογου ανασυνδυασμού. Παραδείγματα τέτοιων σημαντικών γονιδίων περιλαμβάνουν τα BARD1, ATR, PALB2, RAD51, RAD51D, ATM, CHK1, PLK1 και WEE1. Η κατανόηση των όγκων TNBC που έχουν HRD μπορεί να αποσαφηνίσει περαιτέρω ποιοί ασθενείς θα ωφελούνταν θεραπευτικά από τους παράγοντες πλατίνας. Σε μια μελέτη από τους Telli et al., η βαθμολογία HRD αξιολογήθηκε ως βιοδείκτης για την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στη θεραπεία στο πρώιμο TNBC και προέβλεψε την πιθανότητα ανταπόκρισης σε θεραπεία που περιέχει πλατίνα σε τρεις κλινικές δοκιμές. Οι χρωμοσωμικές μετατοπίσεις είναι γνωστοί ογκογόνοι παράγοντες για κακοήθειες και η στόχευση των συντήξεων των γονιδίων έχει γίνει μια εξαιρετικά αποτελεσματική στρατηγική για τη θεραπεία καρκίνων που προκαλούνται από αναδιάταξη. Οι σωματικές χρωμοσωμικές αναδιατάξεις που περιλαμβάνουν τα γονίδια NTRK1, NTRK2 ή NTRK2 συμβαίνουν σε περίπου 1% όλων των συμπαγών όγκων. Τα συμβάντα σύντηξης του γονιδίου TRK έχουν ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση των πρωτεϊνών και την ενεργοποίησή τους, γεγονός που προάγει την ανάπτυξη του όγκου. Η δοκιμή LOXO-101 αξιολόγησε την αποτελεσματικότητα της λαροτρεκτινίμπης, ενός αναστολέα κινάσης υποδοχέα τροπομυσίνης, η οποία έδειξε συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης 71% και

οδήγησε στην έγκριση της από τον FDA. Πιο πρόσφατα, ένας δεύτερος αναστολέας κινάσης υποδοχέα τροπο-μυσίνης, η εντρεκτινίμπη, αποδείχθηκε αποτελεσματική για ασθενείς με συμπαγείς όγκους θετικούς στη σύντηξη NTRK. Ενώ η συχνότητα των συγχωνεύσεων γονιδίων NTRK στον καρκίνο του μαστού είναι εξαιρετικά σπάνια <1%, είναι μια εξαιρετικά αποτελεσματική θεραπευτική επιλογή για αυτούς τους ασθενείς.

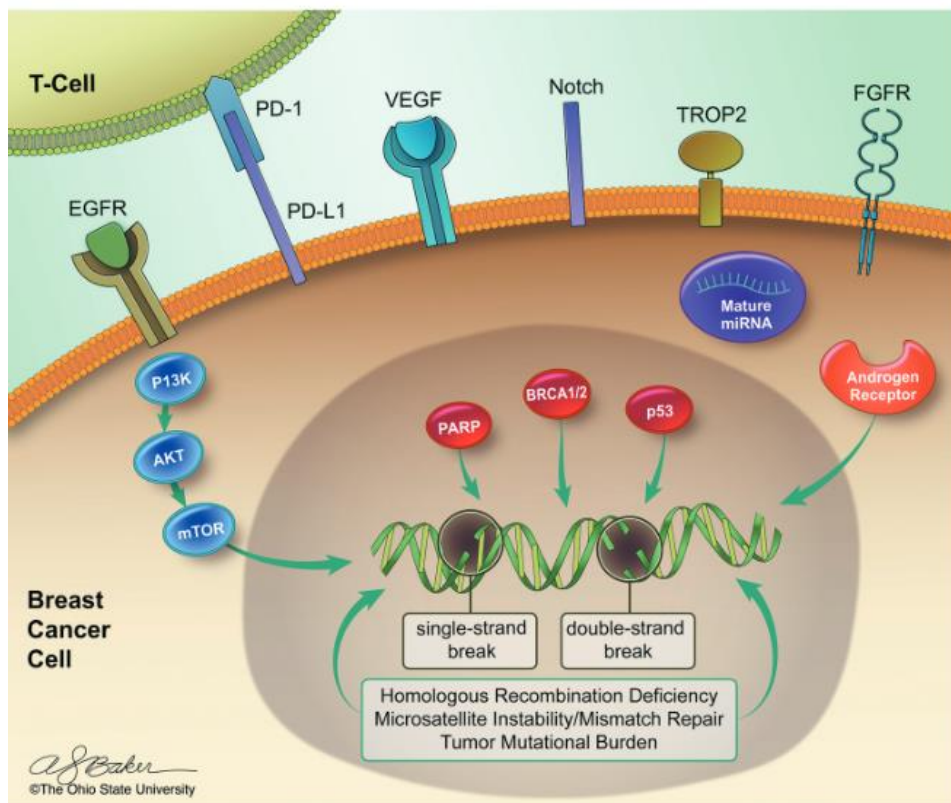
Η οδός PI3K/AKT/mTOR συνδέεται με τον κυτταρικό μεταβολισμό, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση. Σε πολλούς καρκίνους είναι υπερβολικά ενεργή λόγω μεταλλάξεων της PIK3CA, λόγω απώλειας λειτουργίας του ογκοκατασταλτικού PTEN και λόγω απορύθμισης της σηματοδότησης του υποδοχέα κινάσης τυροσίνης. Σε ασθενείς με TNBC περίπου το 10% έχει ενεργοποιητική μετάλλαξη στο PIK3CA και το 30-50% αλλοιώσεις PTEN. Διαφορετικοί υπότυποι TNBC έχουν συγκεκριμένες μεταλλάξεις της οδού. Για παράδειγμα, οι μεταλλάξεις PIK3CA και AKT1 είναι πιο πιθανό να βρεθούν σε θετικό AR TNBC. Οι μεταλλάξεις PIK3CA έχουν αποδειχθεί ότι έχουν προγνωστική αξία για τη θεραπεία με τον α-εκλεκτικό και β-συντηρητικό αναστολέα PI3K, το Aipelisib, στον προχωρημένο με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς και HER2-αρνητικό καρκίνο του μαστού. Εκτός από τους αναστολείς PI3K, οι αναστολείς AKT έχουν επίσης δείξει μια πολλά υποσχόμενη δράση στο TNBC. Το ipatasertib, ένας μικρομοριακός αναστολέας του AKT, έδειξε βελτιωμένο PFS σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο όταν συνδυάστηκε με πακλιταξέλη για μεταστατικό TNBC πρώτης γραμμής. Το carinvasertib, ένας άλλος από του στόματος μικρομοριακός αναστολέας AKT, έδειξε βελτιωμένο PFS και OS όταν συνδυάστηκε με πακλιταξέλη για θεραπεία πρώτης γραμμής του TNBC με τα αποτελέσματα να είναι καλύτερα σε ασθενείς με όγκους που φέρουν μεταλλάξεις του PIK3CA, AKT ή PTEN.

Το ανοσοποιητικό σύστημα κατέχει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της ογκογένεσης και η ανοσοδιαφυγή μέσω πολλαπλών μηχανισμών είναι μια κρίσιμη διαδικασία για την ανάπτυξη κακοήθειας. Έχει υπάρξει τεράστια ανάπτυξη της ανοσοθεραπείας για τη βελτίωση των ανταποκρίσεων σε πολλούς τύπους συμπαγών όγκων. Το TNBC είναι πιο ανοσογονικό και η παρουσία πολλαπλών συστατικών του μικροπεριβάλλοντος έχει συνδεθεί με θετικά προγνωστικά χαρακτηριστικά. Η πρωτεΐνη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου 1 (PD1) είναι μια πρωτεΐνη διαμεμβρανικού υποδοχέα στην επιφάνεια των κυττάρων του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένων των T κυττάρων, η οποία συνδέεται με τον προγραμματισμένο συνδέτη θανάτου 1 (PDL1) ή τον προγραμματισμένο συνδέτη θανάτου 2 (PDL2) και υπάρχουν τόσο στα καρκινικά κύτταρα όσο και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού

συστήματος που διεισδύουν στον όγκο. Αυτή η αλληλεπίδραση επάγει την αναστολή των T-λεμφοκυττάρων και ως εκ τούτου μεσολαβεί στην ανοχή και την αποφυγή του όγκου από το μικροπεριβάλλον του ανοσοποιητικού συστήματος. Η PDL1 εκφράζεται συνήθως στο 20% περίπου των TNBC και σχετίζεται με κακά προγνωστικά χαρακτηριστικά όπως η νεαρή ηλικία, ο υψηλότερος βαθμός κακοήθειας, η ER-αρνητική κατάσταση, η HER2-θετική κατάσταση και το μεγαλύτερο μέγεθος όγκου. Το PDL1 μπορεί να μετρηθεί και να ποσοτικοποιηθεί σε κύτταρα του όγκου ή του ανοσοποιητικού. Η έκφραση PDL1 στο TNBC είναι μεταβλητή και αυτό το εύρος μπορεί να σχετίζεται με τα μετρούμενα κύτταρα, το στάδιο του TNBC (πρωτογενές έναντι του προχωρημένου), τη θέση της μεταστατικής νόσου και τη διακύμανση των κλώνων των αντισωμάτων. Τα μονοκλωνικά αντισώματα που κατευθύνονται κατά των PD1 και PDL1 επάγουν αποτελεσματικά την προς τα κάτω ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, οδηγώντας σε ανοσο-μεσολαβούμενη απόκριση κατά του όγκου. Η έκφραση PDL1 βρέθηκε επίσης να σχετίζεται με βελτιωμένο ρυθμό επιβίωσης χωρίς μετάσταση και συνολική επιβίωση. Πολλαπλές δοκιμές έχουν δείξει τον πιθανό ευεργετικό ρόλο των αναστολέων των σημείων ελέγχου στο αρχικό στάδιο TNBC. Το pembrolizumab οδηγεί σε σημαντική αύξηση του ποσοστού επιβίωσης. Στο αρχικό στάδιο TNBC, η PDL1 δεν φαίνεται να προβλέπει την ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία και η απόκριση σε αναστολείς σημείου ελέγχου μπορεί να παρατηρηθεί σε όγκους αρνητικούς για έκφραση PDL1. Τα TNBC χαρακτηρίζονται επίσης από υψηλό ποσοστό μετάλλαξης και τα TILs που είναι σημαντικά κύτταρα του προσαρμοστικού ανοσοποιητικού συστήματος αποτελούν σημαντικό μέλος του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Τα TILs εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στο 20% περίπου των περιπτώσεων TNBC και υπάρχουν τόσο εντός του όγκου όσο και σε στρώματα του παρακείμενου ιστού. Η παρουσία ενδοκαρκινικών και στρωματικών TILs έχει προγνωστικό ρόλο. Μια αύξηση στα TILs συνδέεται με βελτιωμένο ρυθμό DFS και OS. Τα TILs έχουν επίσης βρεθεί ότι δυνητικά προβλέπουν την ανταπόκριση στην ανοσοθεραπεία. Έχουν επίσης μελετηθεί ως βιοδείκτης στο μεταστατικό TNBC, με υψηλότερα επίπεδα να σχετίζονται με καλύτερη πρόγνωση. Η δυνατότητά τους να προβλέπουν την ανταπόκρισή στην ανοσοθεραπεία με pembrolizumab σε αυτό το πλαίσιο έχει αποδειχθεί σε ασθενείς με TILs $\geq 5\%$. Δεδομένης της συσχέτισης των υψηλών TILs με βελτιωμένα μακροπρόθεσμα αποτελέσματα στην πρώιμη TNBC, μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να περιλαμβάνουν τη χρήση τους ως προγνωστικό βιοδείκτη για την καθοδήγηση της αποκλιμάκωσης της θεραπείας, συμπεριλαμβανομένης της πιθανότητας για θεραπευτικά σχήματα που συντηρούν τη χημειοθεραπεία.

Τέλος, σημαντικούς προγνωστικούς βιοδείκτες μπορούν να αποτελέσουν:

- το μεταλλακτικό φορτίο του όγκου και όγκοι με μεγάλο μεταλλακτικό δυναμικό εμφανίζονται πιο ευαίσθητοι στους αναστολείς ελέγχου του κυτταρικού κύκλου.
- η μικροδορυφορική αστάθεια και οι πρωτεΐνες DDR (DNA Damage Response), που προκαλούν δυσλειτουργίες κατά την αντιγραφή του DNA, ενεργοποιούν το άνοσο-μικροπεριβάλλον του όγκου.
- τα νεοαντιγόνα βρίσκονται σε υψηλά ποσοστά στα TNBC και μπορούν να γίνουν στόχοι για εμβόλια.
- το ελεύθερο κυκλοφορούν DNA (cfDNA) από υγρές βιοψίες βρέθηκε ότι αν ξεπερνά το 10% αυτό σχετίζεται με κακή πρόγνωση.
- η ύπαρξη υπολειπόμενης νόσου μετά από χημειοθεραπεία, συνοδεύεται με υψηλό κίνδυνο υποτροπής (Sukumar et al., 2021).



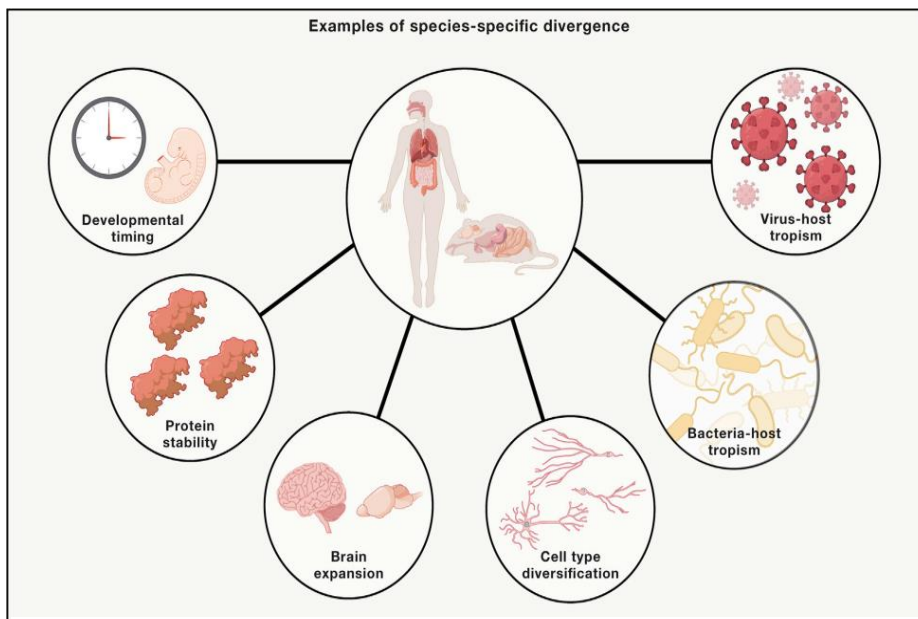
Εικόνα 17: Μηχανισμοί για την μεταγωγή σήματος και την ογκογένεση στα TNBC (Sukumar et al., 2021)

Παρά τους πολλούς βιοδείκτες οι περισσότεροι δεν είναι εδραιωμένοι στην καθημερινή πρακτική και τα φάρμακα που υπάρχουν δεν αντιμετωπίζουν πλήρως την ασθένεια. Συνεπώς, επιτακτική είναι η ανάγκη μελέτης διάφορων θεραπευτικών παραγόντων σε καλλιέργειες που προσομοιάζουν σχεδόν ακριβώς τον πάσχοντα ιστό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΟΡΓΑΝΟΕΙΔΗ

Η ιστορική εξάρτηση της βιολογικής έρευνας από τη χρήση ζωικών μοντέλων μερικές φορές καθιστούσε δύσκολη την αντιμετώπιση ερωτημάτων που αφορούν την κατανόηση της ανθρώπινης βιολογίας και των ασθενειών. Αλλά με την ανακάλυψη των ανθρώπινων οργανοειδών - τα οποία είναι τρισδιάστατες καλλιέργειες που προέρχονται από βλαστικά κυτταρικά συστήματα - είναι πλέον δυνατή η αναδημιουργία της αρχιτεκτονικής και της φυσιολογίας των ανθρώπινων οργάνων με αξιοσημείωτη λεπτομέρεια. Τα ανθρώπινα οργανοειδή παρέχουν μοναδικές ευκαιρίες για τη μελέτη των ανθρώπινων ασθενειών και συμπληρώνουν τα ζωικά μοντέλα. Έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη μολυσματικών ασθενειών, γενετικών διαταραχών και καρκίνων μέσω της γενετικής μηχανικής των ανθρώπινων βλαστικών κυττάρων, καθώς και άμεσα όταν τα οργανοειδή παράγονται από δείγματα βιοψίας ασθενών. Η χρήση των κλασικών συστημάτων κυτταρικών σειρών και ζωικών μοντέλων στην βιοϊατρική έρευνα στα τέλη του εικοστού και στις αρχές του 21ου αιώνα υπήρξε επιτυχής σε πολλούς τομείς, όπως η βελτίωση της κατανόησης των κυτταρικών μονοπατιών σηματοδότησης, ο εντοπισμός πιθανών στόχων φαρμάκων και η καθοδήγηση του σχεδιασμού υποψήφιων φαρμάκων για παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου και των μολυσματικών ασθενειών. Η αξία των επιτευγμάτων που κατέστησαν δυνατά αυτά τα συστήματα μοντέλων, αποδεικνύεται από το γεγονός ότι η χρήση τους έχει γίνει σχεδόν καθολική στη βιοϊατρική έρευνα σήμερα. Ιστορικά, η διερεύνηση των μηχανισμών των ασθενειών σε ζωικά μοντέλα έχει ένα κοινό παρονομαστή ανακάλυψης, σύμφωνα με τον οποίο οι βιολογικές διεργασίες διερευνήθηκαν αρχικά με γενετικές οθόνες σε ασπόνδυλα, ακολουθούμενες από ανάλυση της εξελικτικής διατήρησης σε συστήματα μοντέλων θηλαστικών, που τελικά οδήγησε στην κλινική μετάφραση στον άνθρωπο. Οι κοινές αρχές της ζωικής ανάπτυξης και της φυσιολογίας των οργάνων που απορρέουν από αυτή την προσέγγιση έχουν οδηγήσει σε μια λεπτομερή μηχανιστική κατανόηση πολλών ανθρώπινων ασθενειών του ανθρώπου. Ωστόσο, η εξαγωγή αποτελεσμάτων από αυτά τα μοντέλα συστημάτων στον άνθρωπο έχει γίνει ένα σημαντικό εμπόδιο στη διαδικασία ανακάλυψης φαρμάκων. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έχουν εντοπίσει βιολογικές διεργασίες που είναι ειδικές για το ανθρώπινο σώμα και δεν μπορούν να μοντελοποιηθούν σε άλλα ζώα. Αυτές περιλαμβάνουν, για παράδειγμα, την ανάπτυξη του εγκεφάλου, τον μεταβολισμό και τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των φαρμάκων. Η εμφάνιση προσεγγίσεων τρισδιάστατης καλλιέργειας ανθρώπινων κυττάρων *in vitro* με χρήση βλαστικών

κυττάρων από διάφορα όργανα έχει λάβει ευρεία προσοχή, καθώς έχει τη δυνατότητα να ξεπεράσει αυτούς τους περιορισμούς. Προσπάθειες μοντελοποίησης της βιολογίας των ανθρώπινων οργάνων -συμπεριλαμβανομένης της διαφοροποίησης των ανθρώπινων βλαστικών κυττάρων σε 2D, είτε παρουσία είτε απουσία τρισδιάστατης μήτρας, της βιοεκτύπωσης ανθρώπινων κυττάρων και της καλλιέργειας κυττάρων σε μικρόρευστη μηχανή ("όργανο σε ένα τσιπ") – πραγματοποιήθηκαν πριν από την εμφάνιση των οργανοειδών και έχουν δείξει κάποιες δυνατότητες για τον έλεγχο φαρμάκων ή ανθρώπινων ασθενειών. Ωστόσο, τα οργανοειδή είναι μοναδικά, δεδομένου ότι οργανώνονται ατομικά , αποτελούν τρισδιάστατα συστήματα καλλιέργειας που είναι ιδιαίτερα παρόμοια και σε ορισμένες περιπτώσεις, ιστολογικά πανομοιότυπα με τα πραγματικά ανθρώπινα όργανα. Ένα χαρακτηριστικό που είναι κοινό σε όλα τα οργανοειδή είναι ότι παράγονται από πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (PSC) ή ενήλικα βλαστικά κύτταρα (AdSCs- επίσης γνωστά ως ιστικά βλαστικά κύτταρα) μιμούμενα την ανθρώπινη ανάπτυξη ή την αναγέννηση οργάνων in vitro. Η ανάλυση του σχηματισμού των οργανοειδών μπορεί συνεπώς να παρέχει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τους μηχανισμούς που διέπουν την ανθρώπινη ανάπτυξη και την αναγέννηση οργάνων, αναδεικνύοντας την αξία τους για τη βασική βιολογική έρευνα εκτός από την πιθανή εφαρμογή τους στις φαρμακευτικές δοκιμές φαρμάκων και στην μοριακή ιατρική. Οι δυνατότητες των οργανοειδών να συμπληρώσουν τα υπάρχοντα συστήματα μοντέλων και να επεκτείνουν τη βασική βιολογική έρευνα, την ιατρική έρευνα και τη φαρμακευτική ανακάλυψη σε ένα πιο φυσιολογικά σχετικό ανθρώπινο περιβάλλον εκτιμάται όλο και ευρύτερα. Ωστόσο, η ανάπτυξη της τεχνολογίας των οργανοειδών βρίσκεται ακόμη σε νηπιακό στάδιο σε σύγκριση με τις καθιερωμένες κυτταρικές σειρές και τα ζωικά μοντέλα, με προκλήσεις που πρέπει να ξεπεραστούν (Kim et al., 2020). Η χρήση ζωικών μοντέλων στη βιοϊατρική έρευνα βασίζεται στην εξελικτική διατήρηση των βιολογικών διεργασιών. Αν και οι περισσότερες διεργασίες διατηρούνται στα ποντίκια, το πιο κοινό ζωικό μοντέλο θηλαστικών, ορισμένες πτυχές είναι μοναδικές για τον άνθρωπο. Η ανθρώπινη ανάπτυξη είναι γενικά παρατεταμένη σε σύγκριση με τα τρωκτικά, εν μέρει λόγω της αυξημένης σταθερότητας των πρωτεϊνών και του χαμηλότερου κύκλου εργασιών των πρωτεϊνών στον άνθρωπο. Ο ανθρώπινος εγκέφαλος είναι εξαιρετικά διευρυμένος και η ποικιλομορφία των κυτταρικών τύπων στον άνθρωπο υπερβαίνει κατά πολύ εκείνη των άλλων θηλαστικών. Οι λοιμογόνοι παράγοντες είναι συχνά ειδικό για τον άνθρωπο λόγω της ειδικής για το είδος αλληλεπίδρασης ξενιστή-παθογόνου (Corsini and Knoblich, 2022).



Εικόνα 18: Βιολογικές διεργασίες που διαφέρουν στους ανθρώπους (Corsini and Knoblich, 2022)

3.1 Διαδικασία καλλιέργειας οργανοειδών

Η παραγωγή ανθρώπινων οργανοειδών έχει αναδειχθεί σε επαναστατική ανακάλυψη στη βιοϊατρική έρευνα και διαθέτει τεράστιες δυνατότητες για την προώθηση της κατανόησης της ανθρώπινης ανάπτυξης, της παθολογίας των ασθενειών και της εξατομικευμένης ιατρικής. Τα οργανοειδή, τρισδιάστατα μικροσκοπικά μοντέλα οργάνων που αναπτύσσονται από βλαστικά κύτταρα, αναπαριστούν πιστά τη δομή, τη λειτουργία και την κυτταρική ποικιλομορφία των πραγματικών ανθρώπινων οργάνων. Παρακάτω, θα εξερευνήσουμε την περίπλοκη διαδικασία παραγωγής ανθρώπινων οργανοειδών, τονίζοντας τη σημασία, τις προκλήσεις και τον αντίκτυπο που έχουν στον τομέα της βιολογίας και της υγείας.

Η βάση της παραγωγής ανθρώπινων οργανοειδών (Yoshida, 2020):

- Καλλιέργεια βλαστοκυττάρων: Η διαδικασία ξεκινά με την απόκτηση πολυδύναμων βλαστοκυττάρων από διάφορες πηγές, όπως εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα. Αυτά τα κύτταρα διαθέτουν την εξαιρετική ικανότητα να διαφοροποιηθούν σε διάφορους τύπους κυττάρων που βρίσκονται σε συγκεκριμένα όργανα.
- Επαγωγή οργανοειδικών γραμμών: Εκθέτοντας τα βλαστικά κύτταρα σε συγκεκριμένα μοριακά ερεθίσματα και αυξητικούς παράγοντες, οι επιστήμονες τα

ωθούν να αναπτυχθούν στους επιθυμητούς τύπους κυττάρων που βρίσκονται στο στοχευόμενο όργανο. Αυτό το βήμα μιμείται τις φυσικές αναπτυξιακές διαδικασίες που συμβαίνουν κατά την εμβρυογένεση.

- Τεχνικές με την χρήση ικριωμάτων ή χωρίς ικριώματα: Ανάλογα με τον τύπο του οργανοειδούς, οι ερευνητές χρησιμοποιούν είτε τεχνικές που βασίζονται σε ικριώματα, όπου τα κύτταρα ενσωματώνονται σε μια υποστηρικτική μήτρα, είτε τεχνικές χωρίς ικριώματα, οι οποίες βασίζονται στην εγγενή ικανότητα αυτο-οργάνωσης των κυττάρων για το σχηματισμό πολύπλοκων δομών.

Πιο συγκεκριμένα για τον μαστό, το υλικό εκτομής που προέρχεται από τον ασθενή κόβεται σε μικρά κομμάτια, πλένεται καλά και πραγματοποιείται ενζυμική πέψη με κολλαγενάση. Μετά από πρόσθετο πλύσιμο και διήθηση ο ιστός τοποθετείται στο εκχύλισμα της βασικής μεμβράνης (BME) και συμπληρώνεται με μέσο επέκτασης. Το BME είναι σαν γέλη που πολυμερίζεται σε θερμοκρασίες άνω των 10 °C και χρησιμοποιείται για να μιμηθεί την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία ώστε να παρέχει υποστήριξη για τα τρισδιάστατα οργανοειδή. Το matrigel μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική λύση για το BME με παρόμοια αποτελέσματα. Η παραγωγή οργανοειδών είναι ιδανική για ιστούς που περιέχουν ελάχιστη ποσότητα λίπους και νεκρωτικού ιστού. Ο επιθυμητός επιθηλιακός ιστός για τη δημιουργία οργανοειδών εμφανίζεται συνήθως ως σταθερός, ροζ έως καφετί ιστός, ενώ ο νεκρωτικός ιστός είναι συνήθως πιο μαλακός και σκούρος. Ο λιπώδης ιστός είναι μαλακός και λευκός έως κίτρινος και μπορεί εύκολα να αποξεσθεί ή να αποκοπεί. Τα οργανοειδή μπορούν να πραγματοποιήσουν το πρώτο πέρασμα 7-21 ημέρες μετά την εγκατάστασή τους ή μετά από προηγούμενο διαχωρισμό σε αναλογία 1:2-1:8. Ο χρόνος διέλευσης και η αναλογία διαχωρισμού θα πρέπει να βελτιστοποιούνται για κάθε νεοσύστατη καλλιέργεια οργανοειδών. Η καλύτερη στιγμή για τη διέλευση είναι λίγο πριν τα οργανοειδή αρχίζουν να πεθαίνουν στο κέντρο της σταγόνας του εκχυλίσματος της βασικής μεμβράνης, που χαρακτηρίζονται από αποβολή υπολειμμάτων ή πιο σκούρα εμφάνιση, ή όταν τα οργανοειδή φθάνουν σε διάμετρο μεγαλύτερη από 300 μm. Ο προτιμώμενος τρόπος διέλευσης για τις περισσότερες καλλιέργειες οργανοειδών είναι μέσω θραυσμάτων παρά μέσω μεμονωμένων κυττάρων, επειδή τα μεμονωμένα κύτταρα αναπτύσσονται πιο αργά σε νέα και έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να πεθάνουν σε σύγκριση με τα θραύσματα.

Η χρήση μεμονωμένων κυττάρων, σε αντίθεση με τα θραύσματα, θα αυξήσει την πιθανότητα ότι τα οργανοειδή που αναπτύσσονται μετά από επιλογή (π.χ. με

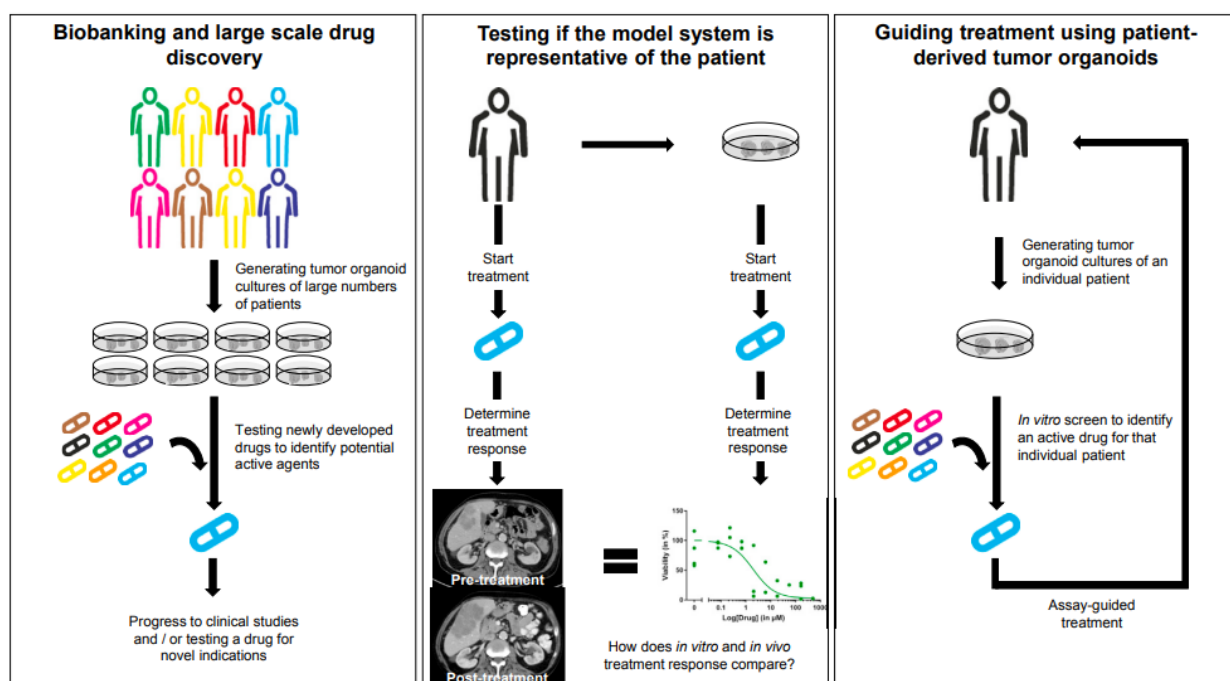
πουρομυκίνη) θα προέρχονται πράγματι από μεμονωμένα κύτταρα και θα είναι, επομένως, κλωνικά. Συνίσταται η κρυσυντήρηση τουλάχιστον έξι κρυσυντηρήσεις για κάθε νεοσύστατη καλλιέργεια οργανοειδών σε πρώιμο πέρασμα (< πέρασμα 5). Υπάρχουν τρεις διαφορετικοί μέθοδοι για τη γενετική τροποποίηση των οργανοειδών του μαστού, όπως λιποφεκταμίνη 2000 για παροδική διαμόλυνση με μέτρια έως υψηλή αποτελεσματικότητα, ηλεκτρομόλυνση για παροδική διαμόλυνση με υψηλή απόδοση ή μόλυνση με ιό lenti για σταθερή μεταγωγή του DNA. Συγκεκριμένες συνθήκες (π.χ. συγκέντρωση DNA, ιικός τίτλος και αριθμός οργανοειδικών κυττάρων) ή ρυθμίσεις (π.χ. τάση που χρησιμοποιείται για την ηλεκτρομόλωση) απαιτούν βελτιστοποίηση για κάθε πείραμα και καλλιέργεια. Συνίσταται η χρήση φορέων διαμόλυνσης ή μεταγωγής ελέγχου με φθορίζουσα σήμανση για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της διαδικασίας. Τα γενετικώς τροποποιημένα οργανοειδή μπορούν να επιλεγούν με προσθήκη αντιβιοτικών εάν έχουν ένα γονίδιο ανθεκτικότητας ή με την προσθήκη ή την αφαίρεση άλλων συστατικών του μέσου. Για παράδειγμα, η προσθήκη Nutlin-3a θα σκοτώσει όλα τα κύτταρα που εκφράζουν P53 άγριου τύπου και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιλογή οργανοειδών με μετάλλαξη P53. Επιπλέον, η απόσυρση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR) μπορεί να επιλέξει κύτταρα που υπερεκφράζουν KRAS. Είναι σημαντικό να καθοριστεί η βέλτιστη συγκέντρωση ανά παράγοντα επιλογής και καλλιέργειας οργανοειδούς, η οποία είναι συχνά η χαμηλότερη συγκέντρωση που σκοτώνει το 100% των μη επεξεργασμένων οργανοειδών. Η επιλογή και ο πολλαπλασιασμός των μεμονωμένων οργανοειδών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία μιας κλωνικής καλλιέργειας. Μια μεγάλη ποσότητα οργανοειδών είναι απαραίτητη για την εμφύτευση που συνήθως ποικίλλει μεταξύ $0,25 \times 10^6$ και 1×10^6 κύτταρα ανά θέση έγχυσης με τη μορφή άθικτων οργανοειδών, για ένα καλύτερο ποσοστό εμφύτευσης σε σύγκριση με τα μεμονωμένα κύτταρα. Οι αριθμοί αυτοί απαιτούν βελτιστοποίηση ανά καλλιέργεια. Οι καλλιέργειες οργανοειδών με γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης *in vitro* τείνουν να εμφυτεύονται καλύτερα σε *in vivo*. Η εμφύτευση σφαιριδίων οιστρογόνων χωρίς χειρουργική επέμβαση πριν την ορθοτοπική έγχυση οργανοειδών είναι σημαντική για την παροχή εξωγενούς πηγής οιστρογόνων που διευκολύνει την εμφύτευση και την ανάπτυξη τους. Συνίσταται η έγχυση οργανοειδούς με την έγχυση 30 μl μέσου μεταμόσχευσης με 5% trypan blue, ακολουθούμενη από εκτομή, για να επιβεβαιωθεί ο εντοπισμός στον ιστό του μαστού (Dekkers et al., 2021).

3.2. Πλεονεκτήματα και η σημαντικότητα των οργανοειδών:

Πάνω από το 90% των φαρμάκων αποτυγχάνουν στις κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους με χρήση των προκλινικών μοντέλων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, αυτό σχετίζεται με λανθασμένα in vivo μοντέλα. Από αυτή την άποψη, τα οργανοειδή που προέρχονται από ασθενείς, προσφέρουν μια πολύτιμη πλατφόρμα διαλογής για προκλινικές δοκιμές. Λόγω της χωρικής οργάνωσης πολλαπλών τύπων κυττάρων ειδικών για το όργανο, τα οργανοειδή έχουν τεράστιο δυναμικό ως σύστημα δοκιμών για τον χαρακτηρισμό της διαπερατότητας των ιστολογικών φραγμών, της εναπόθεσης, του μεταβολισμού των φαρμάκων, της μεταβολής των διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων και των αντιδράσεων του διακυτταρικού περιβάλλοντος. Επιπρόσθετα, διαφορετικές κυτταρικές σειρές διαφέρουν σημαντικά ως προς την ευαισθησία τους στις δράσεις των φαρμάκων. Αυτό εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου των ενδοκυτταρικών επιπέδων των δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS), τη δραστηριότητα της αυτοφαγίας ή την ευαισθησία σε συγκεκριμένα στοιχεία. Ωστόσο, για την επαρκή σηματοδότηση, τα κύτταρα πρέπει να βρίσκονται κοντά το ένα στο άλλο με τον ίδιο τρόπο όπως στο εσωτερικό του σώματος. Τα οργανοειδή καθιστούν δυνατή τη μοντελοποίηση τέτοιων κυτταρικών συνδέσεων. Η παρουσία διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών, οργανωμένων σε τρισδιάστατες δομές, μας επιτρέπει να μιλάμε για διαμερισματοποίηση στα οργανοειδή. Σε σύγκριση με τα οργανοειδή, τα σφαιροειδή δεν παρουσιάζουν καμία σχετική δομή ιστού- με άλλα λόγια, η δομή τους παρουσιάζει χαμηλή ομοιότητα με τον αρχικό ιστό. Τα σφαιροειδή μπορούν να ορίζονται ως συστάδες κυττάρων που προέρχονται από διαφοροποιημένα κύτταρα τα οποία συσσωρεύονται και παρουσιάζουν κάποιες δομές που μοιάζουν με ιστούς. Ένα άλλο πλεονέκτημα των οργανοειδών είναι ότι υποστηρίζουν καλλιέργειες βλαστοκυττάρων και προγονικών κυττάρων και τις αλληλεπιδράσεις κυττάρων-κυττάρων, σε αντίθεση με τις παραδοσιακά 2D καλλιέργειες (Nikopogona et al., 2023). Το κόστος των νέων αντικαρκινικών φαρμάκων έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια λόγω, μεταξύ άλλων, της αυξανόμενης πολυπλοκότητας των κλινικών δοκιμών και των κανονιστικών απαιτήσεων. Εν τω μεταξύ, η πιθανότητα ένα φάρμακο να φθάσει στην αγορά για έγκριση μετά την είσοδό του στη φάση 1 των κλινικών δοκιμών έχει παραμείνει ίδια, και είναι σημαντικά χαμηλότερη για τα αντικαρκινικά φάρμακα σε σύγκριση με φάρμακα σε άλλους τομείς ασθενειών. Ενώ υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που συμβάλλουν στο χαμηλό ποσοστό επιτυχίας από τις μελέτες στον ασθενή, ένας ξεχωρίζει: η μετάφραση των προκλινικών μοντέλων καρκίνου στον ασθενή (Weeber et al., 2017).

Συνεπώς η χρήση οργανοειδών έχει προσφέρει πολλές δυνατότητες στα παρακάτω:

- Μοντελοποίηση ασθενειών: Όπως νευροεκφυλιστικές διαταραχές, καρκίνος και γενετικές παθήσεις. Οι ερευνητές μπορούν να μελετήσουν την εξέλιξη της νόσου, να εντοπίσουν νέους θεραπευτικούς στόχους και να δοκιμάσουν την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων με πιο ακριβή και ηθικό τρόπο, μειώνοντας την ανάγκη για ζωικά μοντέλα.
- Αναπτυξιακή Βιολογία: Τα οργανοειδή προσφέρουν γνώσεις για την ανθρώπινη εμβρυϊκή ανάπτυξη και τον σχηματισμό των ιστών. Μελετώντας την αυτο-οργάνωση των κυττάρων και τις χωρικές αλληλεπιδράσεις τους, οι επιστήμονες αποκτούν βαθύτερη κατανόηση της οργανογένεσης και του καθορισμού της κυτταρικής μοίρας.
- Εξατομικευμένη ιατρική: Τα οργανοειδή που προέρχονται από κύτταρα ασθενών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη της ατομικής ανταπόκρισης στα φάρμακα, επιτρέποντας προσαρμοσμένα σχέδια θεραπείας. Αυτή η προσέγγιση υπόσχεται την ιατρική ακριβείας, όπου οι θεραπείες μπορούν να βελτιστοποιηθούν για κάθε ασθενή με βάση το συγκεκριμένο μοντέλο οργανοειδούς.



Εικόνα 19: Οργανοειδή προερχόμενα από όγκους ασθενών και οι εφαρμογές τους (Weeber et al., 2017)

3.3 Προκλήσεις στην παραγωγή ανθρώπινων οργανοειδών:

Οι οργανοειδικές καλλιέργειες χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο για την πειραματική μοντελοποίηση ανθρώπινων καρκίνων με σκοπό την εξατομικευμένη

ιατρική και την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στα φάρμακα. Ο καρκίνος του μαστού δεν αποτελεί εξαίρεση, αλλά ειδικότερα ο πρωτοπαθής καρκίνος του μαστού εμφανίζει ορισμένες εγγενείς δυσκολίες λόγω της συχνής παρουσίας υπολειμματικών μη κακοήθων κυττάρων στις βιοψίες (Goldhammer et al., 2019).

- Πολυπλοκότητα και ετερογένεια: Η αναδημιουργία της πολύπλοκης αρχιτεκτονικής και της κυτταρικής ποικιλομορφίας των πραγματικών οργάνων μέσα στα οργανοειδή παραμένει μια σημαντική πρόκληση. Η εξασφάλιση της κατάλληλης χωρικής οργάνωσης των διαφόρων κυτταρικών τύπων και η μίμηση των φυσιολογικών λειτουργιών απαιτεί περαιτέρω βελτιστοποίηση. Δεν αναπαριστούν πλήρως την πολυπλοκότητα και την ετερογένεια ολόκληρων οργάνων και δεν διαθέτουν το πλήρες φάσμα των κυτταρικών τύπων και της αρχιτεκτονικής των ιστών που απαντώνται *in vivo*, γεγονός που περιορίζει την ικανότητά τους να μοντελοποιούν με ακρίβεια ορισμένες ασθένειες ή φυσιολογικές διεργασίες. Επιπρόσθετα, το μικροπεριβάλλον των ιστών αποτελείται γενικά από ποικίλες και πολύπλοκες φυσικές/χημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολλαπλών τύπων κυττάρων ιστού, βλαστικών κυττάρων, κύτταρων του ανοσοποιητικού συστήματος, στρωματικών κύτταρων, διαφόρων διαλυτών παραγόντων και της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Το μικροπεριβάλλον επηρεάζει τις φαινοτυπικές εκβάσεις των κυττάρων τόσο σε υγιείς όσο και σε κατεστραμμένους ιστούς και εμπλέκεται στη διατήρηση των βλαστικών κυττάρων και στην εξέλιξη του καρκίνου. Σε οργανοειδικά μοντέλα, το *in vitro* μικροπεριβάλλον πρέπει να βελτιστοποιηθεί όσο το δυνατόν περισσότερο για να ληφθούν τα ακριβέστερα αποτελέσματα, ιδίως στις μελέτες όπου οι αλληλεπιδράσεις των κυττάρων με το περιβάλλον τους αποτελούν βασικό παράγοντα για την εξέλιξη του μοντέλου (Suarez-Martinez et al., 2022).
- Αγγείωση: Η αποτελεσματική ενσωμάτωση των αιμοφόρων αγγείων στα οργανοειδή είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων και την αναπαραγωγή της λειτουργικότητας του οργάνου. Η ανάπτυξη στρατηγικών για την αγγείωση των οργανοειδών αποτελεί ενεργό πεδίο έρευνας. Προς το παρόν, τα οργανοειδή εξακολουθούν να έχουν μέγεθος μικρομέτρων και εξακολουθεί να υπάρχει ένα χάσμα μεταξύ των λειτουργιών τους και των λειτουργιών των φυσιολογικών ιστών. Σημαντικός παράγοντας είναι η έλλειψη αγγειακού συστήματος. Όταν τα οργανοειδή αναπτύσσονται σε ορισμένο βαθμό, τα κύτταρα στο κέντρο δεν μπορούν να πάρουν αρκετή τροφή και η απέκκριση των μεταβολικών αποβλήτων από τα κύτταρα είναι δύσκολη, περιορίζοντας έτσι

την εφαρμογή των οργανοειδών. Δύο κύριες μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή αγγειωμένων οργανοειδών: η μία είναι η "in vivo αγγείωση" με μεταμόσχευση οργανοειδών σε ζωικά μοντέλα και η άλλη είναι η "in vitro αγγείωση", η οποία υλοποιείται με το συνδυασμό γονιδιακής επεξεργασίας, μικτής κυτταρικής καλλιέργειας και της μικρόρευστης πλατφόρμας (Huang et al., 2021).

- **Ανωριμότητα:** Τα οργανοειδή αντιπροσωπεύουν συνήθως πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του οργάνου από το οποίο προέρχονται και μπορεί να μην έχουν ωριμάσει πλήρως ή να μην έχουν φτάσει σε πλήρως λειτουργική κατάσταση. Αυτή η ανωριμότητα μπορεί να περιορίσει την καταλληλότητα τους για τη μελέτη ασθενειών ή φυσιολογικών διεργασιών που επηρεάζουν κυρίως ώριμα όργανα. Μπορεί επίσης να επηρεάσει τις προβλέψεις της φαρμακευτικής απόκρισης, καθώς ο μεταβολισμός των φαρμάκων και οι οδοί απόκρισης στα ανώριμα οργανοειδή μπορεί να διαφέρουν από εκείνους στα ενήλικα όργανα (Lawlor et al., 2021).
- **Κόστος και χρόνος:** Η δημιουργία και η διατήρηση οργανοειδών που προέρχονται από ασθενείς μπορεί να είναι μια επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία. Απαιτεί εξειδικευμένες εργαστηριακές τεχνικές και τεχνογνωσία. Επιπλέον, οι καλλιέργειες οργανοειδών συχνά απαιτούν ειδικούς παράγοντες ανάπτυξης, μέσα και συνθήκες καλλιέργειας, τα οποία μπορεί να είναι δαπανηρά. Το κόστος και ο χρόνος που απαιτούνται για τη δημιουργία και τη συντήρηση τους μπορεί να περιορίσει την ευρεία υιοθέτηση και την εφαρμογή τους για πειράματα μεγάλης κλίμακας ή κλινικές εφαρμογές (Clevvers, 2019) .
- **Τυποποίηση και αναπαραγωγιμότητα:** Η καθιέρωση τυποποιημένων πρωτοκόλλων για την παραγωγή και τον χαρακτηρισμό οργανοειδών είναι απαραίτητη για αξιόπιστη και αναπαραγωγίμη έρευνα. Αυτό περιλαμβάνει τον καθορισμό μέτρων ποιοτικού ελέγχου, τη διασφάλιση της συνέπειας και την εφαρμογή αυστηρών τεχνικών χαρακτηρισμού (Kim et al., 2020).
- **Ηθικά ζητήματα:** Η παραγωγή οργανοειδών που προέρχονται από ασθενείς μπορεί να περιλαμβάνει επεμβατικές διαδικασίες για τη λήψη δειγμάτων ιστού, όπως βιοψίες ή χειρουργικές επεμβάσεις. Αυτό εγείρει δεοντολογικά ζητήματα σχετικά με τη συγκατάθεση των ασθενών, την προστασία της ιδιωτικότητας και τις πιθανές βλάβες που σχετίζονται με αυτές τις διαδικασίες. Η διασφάλιση των κατάλληλων δεοντολογικών κατευθυντήριων γραμμών και της συγκατάθεσης των

ασθενών μετά από ενημέρωση είναι ζωτικής σημασίας για την κατάλληλη αντιμετώπιση αυτών των ανησυχιών(Lewis and Holm, 2022).

Η παραγωγή ανθρωπινων οργανοειδών έχει φέρει επανάσταση στη βιοϊατρική έρευνα παρέχοντας ένα ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη της ανθρώπινης ανάπτυξης, τη μοντελοποίηση ασθενειών και την ανάπτυξη εξατομικευμένων θεραπειών. Παρόλο που παραμένουν προκλήσεις στην αναπαραγωγή της πολυπλοκότητας και της λειτουργικότητας των πραγματικών οργάνων, οι επιστήμονες συνεχίζουν να σημειώνουν αξιοσημείωτη πρόοδο στην τελειοποίηση των τεχνικών παραγωγής οργανοειδών. Ο αντίκτυπος των οργανοειδών στην κατανόηση των μηχανισμών των ασθενειών, την ανακάλυψη φαρμάκων και την προώθηση της εξατομικευμένης ιατρικής υπόσχεται πολλά για τη βελτίωση της ανθρώπινης υγείας και τη διαμόρφωση του μέλλοντος της υγειονομικής περίθαλψης (Yoshida, 2020). Όπως για παράδειγμα η χρήση οργανοειδών για την θεραπεία του τριπλά αρνητικού καρκινώματος του μαστού αποτελεί επιτακτική ανάγκη, τόσο λόγω της επιθετικότητας αυτού του τύπου και της μικρής ηλικίας εμφάνισης όσο και λόγω της μη ύπαρξης διαθέσιμων αποτελεσματικών θεραπειών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΟΕΙΔΩΝ ΣΤΗΝ ΕΥΡΕΣΗ ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΜΕΝΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΤΡΙΠΛΑ ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Τα οργανοειδή αντιπροσωπεύουν επαναστατικά τρισδιάστατα μοντέλα κυτταρικής καλλιέργειας, που προέρχονται από βλαστικά ή διαφοροποιημένα κύτταρα και διατηρούν την ικανότητα να διαφοροποιούνται στους κυτταρικούς τύπους του ιστού προέλευσής τους. Τα οργανοειδή που προέρχονται από ασθενείς (PDOs) είναι εξαιρετικά μοντέλα *in vitro* μελέτης ικανά να προάγουν την εξατομικευμένη θεραπεία για τα TNBC, αντανακλώντας τις θεραπευτικές αποκρίσεις των αντίστοιχων ασθενών και παρουσιάζοντας υψηλή προγνωστική αξία στο πλαίσιο της αξιολόγησης της επιβίωσης. Η χειρουργική επέμβαση διατήρησης του παρεγχύματος του μαστού, ακολουθούμενη από μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία και η ολική μαστεκτομή αποτελούν εφικτές θεραπευτικές επιλογές για τα εντοπισμένα TNBC αρχικού σταδίου (R. Yang et al., 2022). Η χημειοθεραπεία είναι η κύρια μέθοδος συστηματικής θεραπείας και βασικό στοιχείο της συνδυασμένης θεραπείας (Boyle, 2012). Η έλλειψη φαρμακευτικών επιλογών για στοχευμένη θεραπεία στα τόσο επιθετικά TNBC εγείρει την αναγκαιότητα της δημιουργίας οργανοειδικών μοντέλων. Επί του παρόντος εφαρμόζεται η πρώτη γραμμή των χημειοθεραπευτικών σχημάτων που αποτελούνται από ενώσεις πλατίνας, ταξάνες, ανθρακυκλίνες, καθώς και αντιμεταβολίτες (Landry et al., 2022). Η έλλειψη του ER, του PR και της έκφρασης του HER2 καθιστά αναποτελεσματική τη θεραπεία με ενδοκρινικά φάρμακα και trastuzumab, αποτελώντας έτσι αναγκαία την εφαρμογή στοχευμένων φαρμάκων, συζεύξεων αντισωμάτων-φαρμάκων ή ανοσοθεραπείας στα προχωρημένα στάδια των TNBC. Τα οργανοειδή έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών στον τομέα της ογκολογίας, καθώς επιτρέπουν την τρισδιάστατη ανακατασκευή μη φυσιολογικών ιστών *in vitro* από πολυδύναμα ή ιστικά βλαστικά κύτταρα ή διαφοροποιημένα φυσιολογικά ή καρκινικά κύτταρα, μιμούμενα έτσι το βιολογικό και λειτουργικό προφίλ των υγιών ή των καρκινικών ιστών (Huch and Koo, 2015; Lancaster and Knoblich, 2014). Μετά την αρχική τους εισαγωγή το 2009 ως πρωτοποριακά τρισδιάστατα μοντέλα πρωτογενούς καλλιέργειας ιστών, τα οργανοειδή όγκων έχουν προέλθει από βιοψίες ιστών ή υγρών και δείγματα διαφόρων μορφών καρκίνου και έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανθρώπινη αναπτυξιακή βιολογία, την αναπαράσταση της ασθένειας, την μηχανική των ιστών, την αναγεννητική και εξατομικευμένη ιατρική, καθώς και την επιλογή φαρμάκων (Lehmann et al., 2019; Sato et al., 2011, 2009). Η εγκατάστασή τους απαιτεί τεχνικές ικριωμάτων ή τεχνικές χωρίς

ικριώματα προκειμένου να αποφευχθεί η άμεση φυσική επαφή με το τριβλίο (Corrò et al., 2020). Το matrigel, ένα ετερογενές και ζελατινώδες μείγμα πρωτεϊνών που προέρχεται από σάρκωμα ποντικού Engelbreth-Holm-Swarm και ομοιάζει με τη φυσική εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM), είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο ικρίωμα. Μέχρι στιγμής, το matrigel ή παρόμοια υδρογέλη έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τη δημιουργία γαστρεντερικών, σιελογόνων αδένων, ηπατικών, παγκρεατικών, εγκεφαλικών, αμφιβληστροειδικών, νεφρικών, πνευμονικών ή γυναικολογικών οργανοειδών (Clevers, 2016).

4.1. Δημιουργία οργανοειδών καρκίνου μαστού

Η παραγωγή οργανοειδών για τον καρκίνο του μαστού είναι μάλλον περίπλοκη και απαιτεί υψηλή εμπειρογνωμοσύνη στον τομέα αυτό. Δεδομένου ότι η συγκέντρωση των ινιδίων κολλαγόνου I στο μικτό πήκτωμα παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη ενός μοντέλου οργανοειδούς ανθρώπινου μαστού, που αποτελείται από το μικροπεριβάλλον του ιστού του μαστού, τα συνθετικά ικριώματα, συμπεριλαμβανομένων των πολυμερών που διατηρούν τις μηχανικές ιδιότητες των όγκων, χρησιμοποιούνται λιγότερο συχνά σε οργανοειδικές καλλιέργειες μαστού (Rimann and Graf-Hausner, 2012). Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι τα οργανοειδή του μαστού αναπαριστούν με ακρίβεια το *in vivo* μικροπεριβάλλον του μαστού και παρέχουν μια αξιόπιστη εικόνα για τους παράγοντες που επηρεάζουν τη μεταγωγή σημάτων, την έκφραση γονιδίων και την αναδιαμόρφωση των ιστών, διευκολύνοντας έτσι τη μελέτη της φυσιολογικής ανάπτυξης του μαζικού αδένου και της καρκινογένεσης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των Mohan et al. που συζήτησαν σημαντικές μελέτες οργανοειδών μαστού με σχετικές λεπτομέρειες του πρωτοκόλλου, και επεσήμαναν τις ομοιότητες και τις διαφορές που παρατηρήθηκαν στον τύπο της μήτρας, στα συστατικά του μέσου, τις τεχνικές επιμετάλλωσης, καθώς και τις μεθόδους διαστρωμάτωσης. Επιπροσθέτως, η ίδια ομάδα μελέτης περιέγραψε τους περιορισμούς των σημερινών οργανοειδικών μοντέλων του μαστού, τονίζοντας πολυάριθμους παράγοντες που συμβάλλουν, όπως η διαφορική φυγοκέντρωση, η κυτταρική καταπόνηση ή η ύπαρξη πολλαπλών κυτταρικών τύπων (Mohan et al., 2021). Οι Sachs et al., ανέπτυξαν με επιτυχία ένα αυστηρό πρωτόκολλο που επιτρέπει την μακροχρόνια καλλιέργεια ανθρώπινων επιθηλιακών οργανοειδών μαστού και κατ' επέκταση, την δημιουργία οργανοειδικών σειρών πρωτοπαθούς και μεταστατικού καρκίνου του μαστού. Πιο συγκεκριμένα, μετά τη λήψη δειγμάτων ιστού από καρκίνο του μαστού, τα καρκινικά κύτταρα του μαστού πρέπει να απομονωθούν μέσω ενός

συνδυασμού μηχανικής διάσπασης και ενζυμικής πέψης. Αυτά τα κύτταρα στη συνέχεια τοποθετούνται σε σταγόνες εκχυλίσματος προσκολλημένης βασικής μεμβράνης και επικαλύπτονται με ένα προσαρμοσμένο μέσο καλλιέργειας οργανοειδών καρκίνου του μαστού. Η προσθήκη του μιτογόνου Neuregulin 1 στο μέσο οργανοειδούς καρκίνου του μαστού όχι μόνο επιτρέπει την αποτελεσματική εγκατάσταση των καρκινικών οργανοειδών, αλλά διευκολύνει επίσης τη μακροχρόνια επέκτασή τους για πολλαπλά περάσματα. Αντίστοιχα, η προσθήκη του αναστολέα της ειδικής πρωτεϊνικής κινάσης Rho-associated coiled-coil containing (ROCK) Y-27632 βελτιώνει επίσης τις συνθήκες καλλιέργειας, επιτρέποντας τον μακροχρόνιο πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων του όγκου *in vitro*. Αντίθετα, η προσθήκη του Wnt-3A δεν φαίνεται να συμβάλλει αποτελεσματικά στη βελτίωση των συνθηκών καλλιέργειας. Η αυξημένη συγκέντρωση του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) μπορεί να αυξάνει τον πολλαπλασιασμό, αλλά συσχετίζεται με σταδιακή βύθιση του εκχυλίσματος της βασικής μεμβράνης του οργανοειδούς και την απώλεια της τρισδιάστατης οργάνωσης του, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις SB202190 οδηγούν σε βαθιά μείωση της αποτελεσματικότητας της εγκατάστασης τους. Οι προσεγγίσεις που χρησιμοποίησαν οι συγγραφείς για να περιγράψουν την πιστότητα των προερχόμενων από ασθενείς οργανοειδών κυμαίνονταν από τυφλή ιστοπαθολογική ανάλυση και καρυότυπο έως την αλληλουχία ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS) και την αλληλουχία RNA. Το προαναφερθέν πρωτόκολλο άνοιξε το δρόμο για τη δημιουργία μιας αντιπροσωπευτικής συλλογής καλά χαρακτηρισμένων οργανοειδών του καρκίνου του μαστού που αντιστοιχούσαν στην ιστοπαθολογία, την κατάσταση ER, PR και HER2 του όγκου προέλευσης, καθώς και την κύρια ταξινόμηση βάσει της γονιδιακής έκφρασης (Sachs et al., 2018). Ομοίως, οι Dekkers et al., περιέγραψαν ένα πρωτόκολλο για την αποτελεσματική εξαγωγή και την μακροχρόνια καλλιέργεια ανθρώπινων φυσιολογικών και καρκινικών οργανοειδών του μαστού. Τόσο η ανάπτυξη των νεοσύστατων καλλιιεργειών σε κατάλληλα μέσα επέκτασης όσο και η χρήση μέσων με R-σπονδίνη-1, Noggin και Wnt-3A φαίνεται να αντιπροσωπεύουν τις ελάχιστες απαιτήσεις στο πλαίσιο των συνθηκών καλλιέργειας οργανοειδών του μαστού. Το εκχύλισμα της βασικής μεμβράνης (BME) πολυμερίζεται σε θερμοκρασίες άνω των 10°C και μπορεί να μιμείται την εξωκυτταρική μήτρα, προωθώντας έτσι την τρισδιάστατη ενίσχυση των οργανοειδών. Η δημιουργία οργανοειδών από εκτομές φυσιολογικού μαστού ή καρκινικού ιστού ακολουθείται από συντήρηση ή κατάψυξη των οργανοειδών για μακροχρόνια αποθήκευση. Διαμόλυνση με βάση τη λιποφεκταμίνη, η ηλεκτρομόλυνση με βάση την ηλεκτρομόνωση ή μεταμόσχευση με ιό *lenti* αντιπροσωπεύουν τρεις

διαφορετικές χρησιμοποιούμενες μεθόδους που επιτρέπουν γενετικό χειρισμό καθώς και (κλωνική) επιλογή οργανοειδών. Η μέση διάρκεια για τη δημιουργία μιας καλλιέργειας, από την απομόνωση του ιστού μέχρι το πρώτο πέρασμα, μπορεί να εκτιμηθεί σε μία έως τρεις εβδομάδες, με τις καλύτερες στιγμές για την διέλευση (είτε μέσω μεμονωμένων κυττάρων είτε μέσω τμημάτων) είναι η φάση πριν από το θάνατο του οργανοειδούς στο κέντρο της σταγόνας BME ή μια διάμετρος οργανοειδούς μεγαλύτερη από 300 μm. Ο γενετικός χειρισμός μιας καλλιέργειας, καθώς και η παραγωγή μιας επιλεγμένης κλωνικής γραμμής κατά το πρώτο πέρασμα διαρκεί τουλάχιστον δύο εβδομάδες. Η προετοιμασία της καλλιέργειας για μεταμόσχευση απαιτεί συνήθως περισσότερο από έναν μήνα, εξαρτώμενη από διάφορους παράγοντες, όπως ο αριθμός των ποντικών που εγχέονται ή ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των οργανοειδών. Ειδικότερα, αυτή η μέθοδος με βάση την έγχυση για την εμφύτευση των σφαιριδίων οιστρογόνων και την ξενομεταμόσχευση οργανοειδών του καρκίνου του μαστού μπορεί, αφενός, να αποφύγει την ανάγκη για προηγμένες και ιδιαίτερα περίπλοκες χειρουργικές διαδικασίες αφετέρου, είναι σχετικά επίπονη και δαπανηρή (Dekkers et al., 2021).

4.2 Ο ρόλος των οργανοειδών στην κατανόηση της παθογένεσης των TNBC

Από την αρχική τους εφαρμογή, τα οργανοειδή που προέρχονται από ασθενείς (PDOS) έχουν προσφέρει σπουδαίες γνώσεις στην παθοφυσιολογία πολυάριθμων καρκινικών οντοτήτων και έχουν ρίξει φως σε σκοτεινές και ανεξήγητες πτυχές που σχετίζονται με την παθογένεια σπάνιων ή πολύπλοκων όγκων (Psilopatis et al., 2022a, 2022b; Rossi et al., 2022; Tiriác et al., 2019). Τα TNBC ανήκουν στους πολύπλευρους και κατά συνέπεια, επιθετικούς υποτύπους του καρκίνου του μαστού, καθώς δεν ακολουθούν τις καλά κατανοητές ορμονικές οδούς που χαρακτηρίζουν τις πιο κοινές οντότητες καρκίνου του μαστού με θετικούς ορμονικούς υποδοχείς, αλλά αναπτύσσονται και εξαπλώνονται μέσω ποικίλων και εξαιρετικά περίπλοκων μοριακών μηχανισμών. Σε αυτό το πλαίσιο, αρκετές ομάδες μελετών έχουν δημιουργήσει με επιτυχία οργανοειδή TNBC PDOs και προσπάθησαν να διερευνήσουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην παθογένεια τους. Οι Mazzucchelli et al., ήταν μεταξύ των πρώτων ομάδων μελέτης που εγκαινίασαν ένα νέο πρωτόκολλο για την δημιουργία οργανοειδών από χειρουργικά δείγματα και δείγματα βιοψίας καρκίνου του μαστού το οποίο σαφώς ενσωμάτωσε και δείγματα TNBC. Πιο συγκεκριμένα, οι προερχόμενες από ασθενείς οργανοειδικές καλλιέργειες που προέκυψαν από την εκτομή δειγμάτων

ιστού με ποσοστό επιτυχίας 87,5%, με ένα από τα 21 παραχθέντα οργανοειδή προερχόμενα από ασθενείς να ανήκει ιστολογικά σε TNBC (Mazzucchelli et al., 2019). Ενδιαφέρον προκαλεί ότι οι Dekkers et al., ανέφεραν σχετικά χαμηλή αποτελεσματικότητα για τα PDOs TNBC σε σύγκριση με άλλους υποτύπους καρκίνου του μαστού, η οποία αποδόθηκε στα επιθετικά και γενετικά ασταθή χαρακτηριστικά των κυττάρων των TNBC που δεν προσαρμόζονται σωστά σε in vitro συνθήκες καλλιέργειας (Dekkers et al., 2021). Οι Fang et al., ανέμιξαν T-κύτταρα, με διαφορετικά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης MAL2, με ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο από τον ίδιο καρκινικό ιστό, για να σχηματίσουν οργανοειδή TNBC. Μετά τη συγκαλλιέργεια οργανοειδών με προ-ενεργοποιημένα αυτόλογα CD8+ T κύτταρα, διαπιστώθηκε ότι η μείωση της MAL2 ενισχύει την CD8+ κυτταροτοξικότητα των T κυττάρων (Fang et al., 2021) Επιπλέον, οι Bhatia et al., ανέπτυξαν μακροχρόνια TNBC οργανοειδή που μιμούνταν τα εκτενώς μελετημένα και προφανώς αποδεδειγμένα χαρακτηριστικά του επιθετικού βασικοκυτταρικού καρκινώματος του μαστού με μετάλλαξη στο γονίδιο MYC και παρουσίαζαν υπερενεργοποίηση της σηματοδότησης NOTCH και MYC (Bhatia et al., 2022), ενώ οι Chew et al., περιέγραψαν χαμηλό ή μη ανιχνεύσιμο υποδοχέα αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών 4 (FGFR4) σε ανοσοϊστοχημική χρώση (Chew et al., 2021). Συνολικά, η μελέτη των οργανοειδών αυτών μπορεί να ανοίξει το δρόμο για νέες και αξιόπιστες ανακαλύψεις στον τομέα της παθογένειας των TNBC που άλλα μοντέλα καλλιέργειας in vitro ή ακόμη και in vivo δεν το επιτρέπουν. Ειδικά, η δημιουργία και αναπαράσταση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου, συμπεριλαμβανομένων των νεοπλασματικών κυττάρων και των μη καρκινικών συστατικών του ξενιστή, μπορεί να προσφέρει μια κρίσιμη εικόνα της συμπεριφοράς του όγκου και να συμβάλει στην καλύτερη κατανόηση της γένεσης των TNBC, της εξέλιξης και της μετάστασης.

4.3. Η χρήση των TNBC οργανοειδών στον έλεγχο της ευαισθησίας στην χημειοθεραπεία

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει διερευνήσει μέχρι στιγμής τη χρήση οργανοειδών TNBC για δοκιμές ευαισθησίας στη χημειοθεραπεία. Οι Campaner et al., δημιούργησαν οργανοειδή από διάφορες μορφές καρκίνου του μαστού και εξέτασαν την επίδραση των συνήθων θεραπειών στη βιωσιμότητά τους. Η βιωσιμότητα των οργανοειδών μειώθηκε μετά την εφαρμογή docetaxel αλλά παρέμεινε ανεπηρέαστη από την θεραπεία με ταμοξιφαίνη (Campaner et al., 2020). Επιπλέον, οι Chen et al., αναφέρουν ότι η φαρμακοφαινοτυπία των οργανοειδών βρέθηκε ότι συσχετίζεται σε

μεγάλο βαθμό με τα κλινικά αποτελέσματα και αντανακλά τις προηγούμενες θεραπευτικές απαντήσεις. Σημαντικό είναι ότι τα οργανοειδή αυτά μπορεί να προβλέπουν την ευαισθησία στα φάρμακα για την εξατομικευμένη θεραπεία, δεδομένου ότι όλες οι θεραπείες περιλαμβάνουν τουλάχιστον ένα φάρμακο που καταχωρήθηκε ως ευαίσθητο και επιτεύχθηκε μερική ανταπόκριση, σταθεροποίηση νόσου ή μακρά επιβίωση χωρίς νόσο (DFS), σε ασθενείς με TNBC (Chen et al., 2021). Ομοίως, οι Shu et al., ταίριαξαν τα δεδομένα ευαισθησίας των φαρμάκων με τα κλινικά αποτελέσματα ασθενών και σκιαγράφησαν τη συνέπεια της κλινικής ανταπόκρισης των ασθενών με TNBC με την ανταπόκριση των οργανοειδών που προέρχονται από ιστούς στη νεοεπικουρική χημειοθεραπεία (docetaxel, epirubicin). Αυτά τα αποτελέσματα ενισχύουν την εφαρμογή των TNBC PDOs ως *in vitro* μοντέλα μελέτης για την εξέλιξη των εξατομικευμένων θεραπευτικών αντιλήψεων (Shu et al., 2022). Επιπλέον, οι Cromwell et al., δημιούργησαν οργανοειδή που προέρχονται από ιστό ξενομοσχεύματος σειριακής μεταμόσχευσης μεταπλαστικού TNBC υποτύπου καρκίνου του μαστού σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια. Μετά την προετοιμασία δύο περασμάτων του ξενομοσχεύματος από τον ασθενή, το σύστημα flowchip, σε συνδυασμό με την υψηλής περιεκτικότητας απεικόνιση, χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση των επιδράσεων της ρομιδεψίνης, της τραμετινίμπης και της πακλιταξέλης. Σε σύγκριση με αντίστοιχα κλιμακούμενα καρκινικά ογκοειδή, τα αποτελέσματα βρέθηκαν να είναι συνεπή, συμπεριλαμβανομένης μιας υψηλής τιμής IC50 της πακλιταξέλης (Cromwell et al., 2022). Κατ' αναλογία, οι Matossian et al., χρησιμοποίησαν ένα παρόμοιο οργανοειδικό μοντέλο και περιέγραψαν την ικανότητα της πακλιταξέλης να ρυθμίζει προς τα κάτω το CD44 και την E-cadherin με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Αυτές οι μελέτες συνδύασαν τα οφέλη και των δύο ξενομοσχευμάτων και των οργανοειδών και διατήρησαν τις αλληλεπιδράσεις όγκου-στρώματος, οι οποίες συμβάλλουν σημαντικά στην καρκινογένεση (Matossian et al., 2022). Οι Liu et al., δημιούργησαν καλλιέργειες οργανοειδών TNBC και τις επεξεργάστηκαν με πακλιταξέλη τόσο παρουσία όσο και απουσία του τελεστή Rab στην μεταφορά κυστιδίων, Synaptotagmin-like 4 (SYTL4). Η χρώση Hoechst/PI έδειξε ότι η εφαρμογή πακλιταξέλης προκάλεσε απόπτωση στα επεξεργασμένα οργανοειδή, ιδίως μετά την εξουδετέρωση του SYTL4 (Liu et al., 2020). Οι Wang et al, χρησιμοποίησαν οργανοειδή για να διερευνήσουν τους ρόλους του υποψήφιου κυκλικού ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA) και έδειξαν ότι αυτά με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης κυκλικού RNA, που δρα ως αναστολέας της χημειοαντοχής στα TNBC, έτειναν να είναι πιο ευαίσθητα στην δοξορουβικίνη και να έχουν χαμηλότερες τιμές IC50 (Wang et al., 2022). Τέλος, οι Yu et al., απέδειξαν τη συσχέτιση μεταξύ των

πρωτεϊνικών επιπέδων της δεοξυριβονουκλεϊκής μεθυλοτρανσφεράσης του οξέος (DNMT) και της ανταπόκρισης στη θεραπεία με δεσιταβίνη σε οργανοειδή ξενομοσχεύματος προερχόμενα από ασθενείς που προέρχονται από χημειοθεραπευτικά ευαίσθητα και ανθεκτικά στη χημειοθεραπεία TNBC (Yu et al., 2018). Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτών των μελετών υπογραμμίζουν τα πλεονεκτήματα των οργανοειδικών καλλιέργειών για την πειραματική διερεύνηση άγνωστων πτυχών όσον αφορά την χημειοθεραπεία για τα TNBC. Είναι εντυπωσιακό ότι τα οργανοειδή μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για δοκιμές στην ογκολυτική ιοθεραπεία, υποστηρίζοντας έτσι δυναμικά την καθιέρωση αυτού του νέου τύπου στοχευμένου παράγοντα για την ανοσοθεραπεία των TNBC. Με σκοπό την ποσοτικοποίηση της ευαισθησίας στις ογκολυτικές ιοθεραπείες, οι Behrens et al., χρησιμοποίησαν ένα δείγμα του ιού Urabe MuV (MuV-U-Japan) και ανέφεραν ότι τα δύο απομονωμένα στελέχη, MuV-UA και MuV-UC, παρουσίασαν αποτελεσματική φονική δράση έναντι των κυτταρικών σειρών των ξενομοσχευμάτων και αναπτύσσονται ως τρισδιάστατα οργανοειδή, τα οποία ήταν ανθεκτικά στην τυπική χημειοθεραπεία με βάση τις ανθρακυκλίνες και τις ταξάνες (Behrens et al., 2022). Στο ίδιο πλαίσιο, οι Huang et al., διερεύνησαν τις ογκοκατασταλτικές και ανοσοενεργοποιητικές επιδράσεις ενός in-situ DC εμβολίου (HELA-Exos) σε ποντίκια και σε TNBC PDOs και έδειξαν ότι το HELA-Exos διαθέτει επαρκή ικανότητα να ενισχύει τις συμβατικές κυτταρικές αντιδράσεις τύπου 1 δενδριτικών κυττάρων (cDC1) στην διασταυρούμενη παρουσίαση αντιγόνων και παραγωγή CD8+ T-κυττάρων που αντιδρούν στον όγκο, οδηγώντας έτσι σε ισχυρή αναστολή των TNBC (Huang et al., 2022).

4.4. Η χρήση των οργανοειδών TNBC για τον έλεγχο της ευαισθησίας στην εναλλακτική και στοχευμένη θεραπεία

Διάφορες μελέτες έχουν εξετάσει τη χρήση οργανοειδών TNBC για εναλλακτικές και στοχευμένες δοκιμές ευαισθησίας σε θεραπείες. Οι Conway et al., χρησιμοποίησαν δύο καλλιέργειες οργανοειδών από αρχόμενο βασικοκυτταρικό TNBC και δήλωσαν ότι οι αναστολές μικρών μορίων των μεταγραφικών παραγόντων του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) και του μετατροπέα σήματος και ενεργοποιητή της μεταγραφής 3 (STAT3) οδηγούν σε σημαντική, συνεργιστική και δοσοεξαρτώμενη μείωση της ανάπτυξης των κυττάρων TNBC, μετρούμενη με βάση τα επίπεδα ATP (Conway et al., 2020). Επιπλέον, οι Ge et al., επέλεξαν δύο οργανοειδή προερχόμενα από ασθενείς με TNBC και πρότειναν ότι τα οργανοειδή με ανεπάρκεια *tektin4* ευνοούν την

αποτελεσματικότητα της απακετυλάσης των ιστονών 6 (HDAC6) μέσω του εκλεκτικού αναστολέα ACY1215 (Ge et al., 2021). Επιπλέον, οι Guillen et al., αξιοποίησαν ξενομοσχεύματα προερχόμενα από ασθενείς και ξενομοσχεύματα οργανοειδών για τον έλεγχο φαρμάκων. Το 50% των χρησιμοποιηθέντων ξενομοσχευμάτων παρουσίασαν αξιοσημείωτη ευαισθησία στον δεύτερο ενεργοποιητή που προέρχεται από τα μιτοχόνδρια των κασπασών (SMAC), ενώ οι υπόλοιπες κυτταρικές σειρές TNBC ήταν ανθεκτικές σε υψηλές δόσεις μπιριναπάντης. Επιπρόσθετα, με βάση τις υποσχόμενες αντικαρκινικές επιδράσεις των αναστολέων της δυναμικής των μικροσωληνίσκων σε ένα οργανοειδικό μοντέλο TNBC, ένας ασθενής με TNBC με πρώιμη μεταστατική υποτροπή έλαβε θεραπεία με εριβουλίνη. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη ανταπόκριση και μεγαλύτερη επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου (PFS) καθώς και αυξημένο χρόνο μέχρι την επόμενη συστηματική θεραπεία σε σχέση με τις προηγούμενες θεραπείες. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν ότι τα οργανοειδή μπορούν να λειτουργήσουν ως εξαιρετικές πλατφόρμες *in vitro* μελέτης για την ανάπτυξη εξατομικευμένων, ακόμη και εναλλακτικών ή στοχευμένων, θεραπευτικών αντιλήψεων (Guillen et al., 2022). Ειδικότερα, οι Jung et al., καλλιέργησαν οργανοειδή από τέσσερις ασθενείς με TNBC και διαπίστωσαν ότι το νικοτιναμίδιο (NAM), μια υδατοδιαλυτή αμιδική μορφή της νιασίνης, αναστέλλει την ανάπτυξη των οργανοειδών TNBC και αποδιατάσσει τις τρισδιάστατες σφαιροειδείς δομές (Jung et al., 2022). Οι Kurani et al., πραγματοποίησαν δοκιμές φαρμάκων σε δύο διαφορετικές καλλιέργειες ξενομοσχευμάτων και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο αναστολέας της τελομερικής αποσιώπησης-1, όπως ο αναστολέας της μεθυλοτρανσφεράσης της λυσίνης της ιστόνης (DOT1L) EPZ-5676, καταργεί την ανάπτυξη κλωνογονικής καλλιέργειας οργανοειδικών ξενομοσχευμάτων (Kurani et al., 2022), ενώ οι Li et al., δημιούργησαν μοντέλα οργανοειδών ώστε να αξιολογήσουν τα θεραπευτικά οφέλη της στόχευσης της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 16 (CDK16) και υπογράμμισαν ότι η CDK16 κατέστειλε την ανάπτυξη των οργανοειδών και την έκφραση του Ki67 (Li et al., 2022). Ακόμη, οι Liu et al., ανέπτυξαν οργανοειδή από πρωτογενείς ιστούς TNBC και ανέφεραν ότι η συνδυαστική θεραπεία με RU.521, ενός αναστολέα της κυκλικής GMP-AMP συνθετάσης (cGAS), και afatinib ή gefitinib καταστέλλει της ανάπτυξη των οργανοειδών (Liu et al., 2022). Μετά την δοκιμή του μικρομοριακού ανταγωνιστή της εξαγωγίνης-1, LFS-1107, σε πέντε οργανοειδή, οι Liu et al. τόνισαν ότι το LFS-1107 ανέστειλε αποτελεσματικά τον πολλαπλασιασμό τους (Liu et al., 2023). Επίσης, οι Parsyan et al., παρατήρησαν ότι η ακτινοθεραπεία σε συνδυασμό με την Polo-Like Kinase 4 (PLK4), αναστολέα του CFI-400945, παρουσιάζουν συνεργιστικό αντικαρκινικό

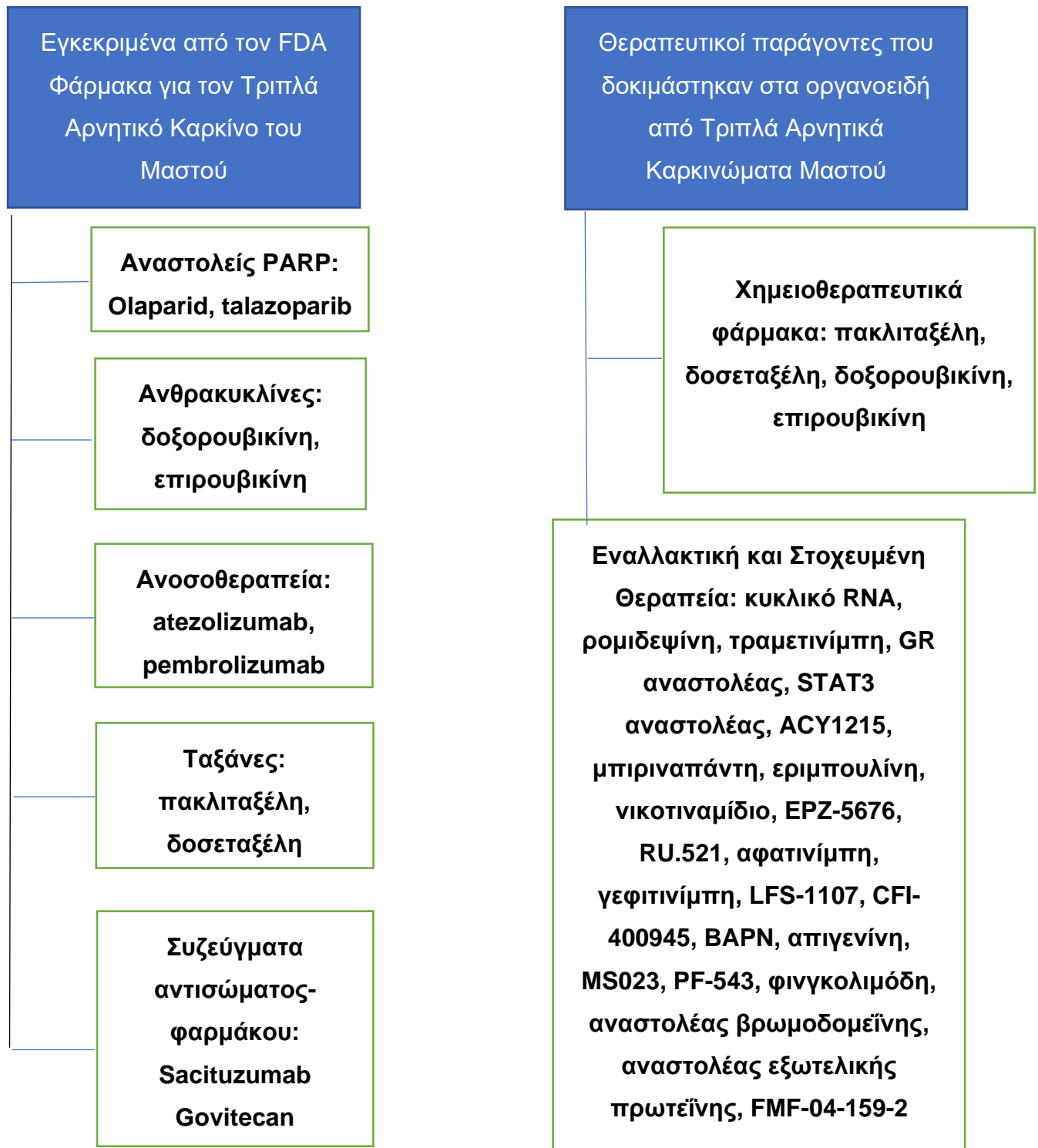
αποτέλεσμα σε TNBC οργανοειδή (Parsyan et al., 2021). Οι Saatci et al., δημιούργησαν οργανοειδικές καλλιέργειες ενός ανθεκτικού στη δοξορουβικίνη TNBC όγκου και έδειξαν ότι οι αναστολείς της οξειδάσης του λυσιλίου (LOX) σε συνδυασμό με δοξορουβικίνη προκαλούν συνεργιστική συρρίκνωση των οργανοειδών. Η συνδυασμένη θεραπεία με δοξορουβικίνη και αμινοπροπιονιτρίλιο (BAPN) οδήγησε σε σημαντική μείωση του μεγέθους των οργανοειδών σε πρωτογενές οργανοειδικό μοντέλο που αναπτύχθηκε από ασθενή με TNBC χωρίς να έχει λάβει θεραπεία. Ως εκ τούτου, τα οργανοειδή αυτά φαίνεται να παρέχουν στους ερευνητές μεγάλες ευκαιρίες να διερευνήσουν επίσης την αποτελεσματικότητα νέων παραγόντων σε συνδυασμό με καθιερωμένους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, διερευνώντας έτσι πιθανές συνεργιστικές επιδράσεις (Saatci et al., 2020). Οι Sudhakaran et al., επιδίωξαν να διερευνήσουν την επίδραση της διαιτητικής φλαβόνης απιγενίνη σε TNBC που προέρχεται από ξενομοσχεύματα ασθενών και διαπίστωσαν ότι μειώνει τόσο την ανάπτυξη όσο και την βιωσιμότητα τους σε συγκεντρώσεις εφικτές *in vivo* (Sudhakaran et al., 2020). Είναι αξιοσημείωτο ότι οι Wu et al., εξέτασαν τέσσερα διαφορετικά οργανοειδικά μοντέλα είτε με διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) είτε με MS023. Η μικροσκοπική αξιολόγηση και η χρώση PrestoBlue αποκάλυψε ότι τα οργανοειδή με υψηλότερη βασική γονιδιακή έκφραση ιντερφερόνης ήταν πιο ευαίσθητα στην αναστολή της μεθυλοτρανσφεράσης της πρωτεΐνης αργινίνης τύπου I (PRMT), ενώ η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qRT-PCR) επιβεβαίωσε την ανοδική ρύθμιση των χημειοκινών των T1-βοηθητικών κυττάρων και των γονιδίων αντιγονοπαρουσίασης (Wu et al., 2022). Μετά την εκτέλεση πειραμάτων, οι Xiao et al., έδειξαν ότι η κινάση της σφιγγοσίνης 1 (SPHK1), οι αναστολείς PF-543 και η φινγκολιμόδη παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη αποτελεσματικότητα σε θετικά για υποδοχέα ανδρογόνων (LAR) TNBC (Xiao et al., 2022). Συμπληρωματικά, οι Yang et al., χρησιμοποίησαν οργανοειδή και επικύρωσαν την υπόθεση ότι οι όγκοι TNBC με έκφραση υποδοχέα με κολλαγονική δομή-TST (MARCO-TST) στα μακροφάγα είναι πιο ευαίσθητοι στους αναστολείς της βρωμοδομειΐνης και της εξωτελικής πρωτεΐνης (Y. S. Yang et al., 2022), ενώ οι Zhang et al., ανέπτυξαν μοντέλα από δύο ασθενείς με TNBC και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η φαρμακολογική αναστολή του ομοιοπολικού αναστολέα της CDK14 FMF-04-159-2, έχει ως αποτέλεσμα τόσο την μείωση του μεγέθους και του αριθμού, όσο και μειωμένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επαγωγή της απόπτωσης (Zhang et al., 2022). Συνολικά, αυτές οι παρατηρήσεις αποκαλύπτουν τα αναρίθμητα πλεονεκτήματα που παρέχουν αυτές οι 3D καλλιέργειες και θα μπορούσαν να προσφερθούν ως κατάλληλες

πλατφόρμες μελέτης in vitro για εναλλακτικές και στοχευμένες δοκιμές ευαισθησίας στις στοχευμένες θεραπείες.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα οργανοειδή του μαστού αποτελούν αναμφίβολα τα πιο χρήσιμα *in vitro* εργαλεία για την κατανόηση όχι μόνο του φυσιολογικού ανθρώπινου μαστικού αδένα αλλά και της ανάπτυξης του καρκίνου του μαστού. Μέχρι σήμερα, έχουν καθιερωθεί πολυάριθμα πρωτόκολλα για τη δημιουργία τέτοιων τρισδιάστατων καλλιιεργειών οργανοειδών του μαστού (Ebrahimi et al., 2022). Ο ρόλος αυτών των εξαιρετικών μοντέλων στη αποτύπωση των μοριακών παραγόντων και μονοπατιών που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού είναι ζωτικής σημασίας, τόσο για τη διερεύνηση της σχετικής παθοφυσιολογίας όσο και για την πρόβλεψη της φαρμακευτικής ανταπόκρισης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού (Azimian Zavareh et al., 2022; Lewis et al., 2022; Salinas-Vera et al., 2022). Η παρούσα εργασία επικεντρώνεται στα πλεονεκτήματα των οργανοειδών στο πλαίσιο των δοκιμών ευαισθησίας για τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στα TNBC, δεδομένου ότι, σε σύγκριση με τις καρκινικές κυτταρικές σειρές, τα μοντέλα ξενομοσχεύματος ή τα μοντέλα καλλιέργειας δύο διαστάσεων, επιτυγχάνουν να αναπαριστούν επιστημονικά τα βασικά χαρακτηριστικά του πρωτοπαθούς όγκου και του μικροπεριβάλλοντος του, συμπεριλαμβανομένης της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετατροπής (EMT) (Yang et al., 2018). Ως πλατφόρμες διαλογής τυποποιημένων φαρμακευτικών παραγόντων χημειοθεραπείας, τα οργανοειδή που προέρχονται από ασθενείς προσφέρουν τη δυνατότητα δοκιμής της αποτελεσματικότητας των ευρέως εφαρμοζόμενων, εγκεκριμένων από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, επιτρέποντας έτσι την αξιόπιστη επαναξιολόγηση κάθε παράγοντα και μια ρεαλιστική επιλογή ασθενών με TNBC που μπορούν να επωφεληθούν από κάθε θεραπευτικό σχήμα. Είναι σημαντικό ότι η ανθεκτικότητα σε ορισμένα χημειοθεραπευτικά μπορεί να ελεγχθεί εκ των προτέρων σε συνθήκες *in vitro*, αποφεύγοντας έτσι την αναποτελεσματική εφαρμογή χημειοθεραπείας σε ακατάλληλους ασθενείς και μειώνοντας τις ανεπιθύμητες παρενέργειες. Επιπρόσθετα, η συνδυαστική θεραπεία με νέες πειραματικούς παράγοντες μπορεί να δοκιμαστεί, προκειμένου να αναπτυχθούν πρωτοποριακά σχήματα που θα επαναπροσδιορίσουν την θεραπεία των TNBC παρακάμπτοντας την επίκτητη αντίσταση ή ενισχύοντας την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων σε συγκεκριμένα χημειοθεραπευτικά σχήματα. Η χρήση PDOs που χρησιμοποιούνται για εναλλακτικές και στοχευμένες δοκιμές ευαισθησίας, μπορεί να φέρουν επανάσταση στη θεραπεία των TNBC. Τα οργανοειδή αυτά έχουν δημιουργήσει μια εξαιρετική φαρμακευτική πλατφόρμα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη του

μηχανισμού δράσης και των δυνατοτήτων διαφόρων παραγόντων εκτός από την καθιερωμένη χημειοθεραπεία, να εξετάσουν την αποτελεσματικότητά τους σε ορισμένους υποτύπους TNBC ανθεκτικούς στη χημειοθεραπεία, καθώς και να τους συγκρίνουν με θεραπευτικές προσεγγίσεις πρώτης γραμμής (Psilopatis et al., 2023). Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζονται οι σημερινοί θεραπευτικοί παράγοντες εγκεκριμένοι από τον FDA σε σχέση με τα φάρμακα που δοκιμάστηκαν για τα TNBC σε οργανοειδή και συνοφίζονται στην παρούσα εργασία (Mandarati and Lukong, 2022).



Εικόνα 20: Τρέχοντα εγκεκριμένα φάρμακα από τον FDA σε σχέση με φάρμακα που δοκιμάστηκαν σε οργανοειδή ασθενών με TNBC (Psilopatis et al., 2023)

Παρά τις μεγάλες δυνατότητες, η γενιά των οργανοειδών TNBC συνδέεται με ορισμένα μειονεκτήματα που εμποδίζουν την ευρεία καθιέρωσή τους ως κύριο προκλινικό μοντέλο για την έρευνα των TNBC και τον έλεγχο ευαισθησίας στα φάρμακα. Πρώτον, η ανάπτυξη οργανοειδών έχει τεχνικούς περιορισμούς, καθώς η απαιτούμενη προετοιμασία είναι τόσο χρονοβόρα και δαπανηρή, σε σύγκριση με άλλες *in vitro*, ή ακόμη και *in vivo*, στα διαθέσιμα σήμερα μοντέλα καλλιέργειας. Δεύτερον, τα τυποποιημένα πρωτόκολλα για οργανοειδή TNBC που προέρχονται από ασθενείς δεν έχουν ακόμη καθοριστεί και καθιερωθεί ευρέως, δεδομένου ότι τα επί του παρόντος διαθέσιμα πρωτόκολλα για τα οργανοειδή του μαστού δεν μπορούν να εφαρμοστούν σε κάθε υπότυπο καρκίνου του μαστού, συμπεριλαμβανομένου του επιθητικού και περίπλοκου TNBC. Τρίτον, η αναπαραγωγή του μικροπεριβάλλοντος των όγκων TNBC μπορεί να είναι πρόκληση, μειώνοντας έτσι εν μέρει τη λειτουργικότητα και την ετερογένεια του οργανοειδούς, καθώς και να μεταβάλλει την ανταπόκριση τους σε δοκιμασίες διαλογής φαρμάκων. Σημειωτέον, αυτά τα μειονεκτήματα δεν περιορίζονται μόνο σε οργανοειδή προερχόμενα από ασθενείς με TNBC. Παρόμοιοι περιορισμοί έχουν περιγραφεί και για άλλες καρκινικές οντότητες, σκιαγραφώντας έτσι την επιτακτική ανάγκη για περαιτέρω έρευνα στον τομέα της βελτιστοποίησης της καλλιέργειας οργανοειδών.

Συνολικά, τα PDOs θα μπορούσαν να προωθήσουν την εξατομικευμένη θεραπεία για τα TNBC, όπως παραδείγματος χάριν μεμονωμένα οργανοειδή που προέρχονται από ασθενείς αντικατοπτρίζουν την απόκριση στην θεραπείας και έχουν υψηλή προγνωστική αξία όσον αφορά την αξιολόγηση της επιβίωσης των ασθενών. Παρά τα πολυάριθμα πλεονεκτήματα, τα PDOs εξακολουθούν να αποτελούν μοντέλα *in vitro* μελέτης. Ως εκ τούτου, τα αποτελέσματα της διαλογής φαρμάκων θα πρέπει να συγκρίνονται με τα κλινικά αποτελέσματα με τυποποιημένο τρόπο και να εξεταστούν σε μεγάλες, κατάλληλα σχεδιασμένες τυχαίοποιημένες κλινικές δοκιμές, με σκοπό την αξιολόγηση της ικανότητας των οργανοειδών να προβλέπουν την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας, της εναλλακτικής θεραπείας και της στοχευμένης θεραπείας.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ

AKT2: κινάση σερίνης/θρεονίνης 2

AR: androgen receptor-ανδρογονικός υποδοχέας

BAPN: αμινοπροπιονιτρίλιο

BL1: βασικού τύπου 1 υπότυπος

BL2: βασικού τύπου 2 υπότυπος

BME: εκχύλισμα βασικής μεμβράνης

BRAC1/2: γονίδια επιδιόρθωσης του DNA, ειδικά για τον μαστό και τις ωοθήκες

CAAs: αδιποκύτταρα

CAFs: ινοβλάστες που σχετίζονται με καρκίνο

CBFB: Core-Binding Factor Subunit Beta

CCNE1: κυκλίνη 1

CDH1: ογκοκατασταλτικό γονίδιο που κωδικοποιεί την E-cadherin

CDK6: κυκλινοεξαρτώμενη κινάση 6

CDK16: κυκλινοεξαρτώμενη κινάση 16

CDKN2A/B: αναστολέας κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 2 A/B

cfDNA: ελεύθερο κυκλοφορούν DNA

CTLA4: Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4- υποδοχέας που λειτουργεί ως σημείο ελέγχου

DCIs: Ductal Carcinoma In situ- ενδοτοπικό καρκίνωμα in situ

DDR: Dna Damage Response- σύστημα επιδιόρθωσης του DNA

DFS: Disease Free Survival- επιβίωση χωρίς νόσο

DMSO: διμεθυλοσουλφοξείδιο

DOT1L: μεθυλοτρανσφεράση της λυσίνης της ιστόνης H3K79

EGFR: επιδερμικός αυξητικός παράγοντας

EMT: επιθήλιο-μεσεγχυματική μετατροπή

ERBB2: γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη HER2

ER: Estrogen Receptor- οιστρογονικός υποδοχέας

FGFR1: υποδοχέας αυξητικών παραγόντων ινοβλαστών

Grade: βαθμός κακοήθειας

GR: υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών

HDAC6: απακετυλάση της ιστόνης 6

HMWK: κερατίνες υψηλού μοριακού βάρους

HRD: ομόλογος ανασυνδυασμός

IDC: Invasive Ductal Carcinoma- διηθητικό πορογενές καρκίνωμα

IGFIR: Insulin-like growth factor 1 receptor

ILC: Invasive Lobular Carcinoma- διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα

IL-7: ιντερλευκίνη 7

IM: ανοσορρυθμιστικός υπότυπος

lncRNA: long non-coding RNA-μακρά μη κωδικοποιητικά RNA

Ki-67: δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού

KRAS: πρωτο-ογκογονίδιο

LAR: υπότυπος τύπου αυλικού ανδρογονικού υποδοχέα

LCIs: Lobular Carcinoma In situ- Λοβιακό καρκίνωμα in situ

LOX: οξειδάση του λυσιλίου

M: μεσεγχυματικός υπότυπος

MDM2: αρνητικός ρυθμιστής του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53

MET: μεσεγχυματική-επιθήλιο μετατροπή

MSL: μεσεγχυματικός υπότυπος τύπου προγονικών κυττάρων

MYC: πρωτο-ογκογονίδιο

NAM: νικοτιναμίδιο

NEBC: καρκίνωμα μαστού με νευροενδοκρινική διαφοροποίηση

NGF: Nerve growth factor

OS: Overall Survival- συνολική επιβίωση

PARP: Poly (ADP-ribose) polymerase

PD1: πρωτεΐνη προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου 1

PDOs: Patient Derived Organoids- οργανοειδή προερχόμενα από ασθενείς

PFS: Progress Free Survival- επιβίωση χωρίς εξέλιξη της νόσου

PLK4: Polo-like kinase 4

PR: Progesterone Receptor- προγεστερονικός υποδοχέας

PRMT: μεθυλοτρανσφεράση της αργινίνης τύπου 1

PTEN: ογκοκατασταλτικό γονίδιο

qRT-PCR: αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο

RB1: πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος

ROCK: Rho- associated coiled-coil containing protein kinase

SPHK1: κινάση της σφιγγοσίνης

STAT3: Signal Transducer And Activator Of Transcription 3

SYTL4: Synaptotagmin-like 4

TAMs: μακροφάγα που σχετίζονται με τον όγκο

TDLU: τελική πορολοβιακή μονάδα

TILs: στρωματικά λεμφοκύτταρα

TKI: αναστολείς τυροσινικής κινάσης

TGFβ: Transforming growth factor beta

TNBC: Triple Negative Breast Cancer- τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού

VEGF: αγγειακός ενδοθηλιακός παράγοντας

WGS: Whole Genome Sequencing

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Azimian Zavareh, V., Rafiee, L., Sheikholeslam, M., Shariati, L., Vaseghi, G., Savoji, H., Haghjooy Javanmard, S., 2022. Three-Dimensional in Vitro Models: A Promising Tool To Scale-Up Breast Cancer Research. *ACS Biomater Sci Eng* 8, 4648–4672.
- Badve, S., Gökmen-Polar, Y., n.d. Ductal carcinoma in situ of breast: update 2019.
- Behrens, M.D., Stiles, R.J., Pike, G.M., Sikkink, L.A., Zhuang, Y., Yu, J., Wang, L., Boughey, J.C., Goetz, M.P., Federspiel, M.J., 2022. Oncolytic Urabe mumps virus: A promising virotherapy for triple-negative breast cancer. *Mol Ther Oncolytics* 27, 239–255.
- Bhatia, S., Kramer, M., Russo, S., Naik, P., Arun, G., Brophy, K., Andrews, P., Fan, C., Perou, C.M., Preall, J., Ha, T., Plenker, D., Tuveson, D.A., Rishi, A., Wilkinson, J.E., McCombie, W.R., Kostroff, K., Spector, D.L., 2022. Patient-Derived Triple-Negative Breast Cancer Organoids Provide Robust Model Systems That Recapitulate Tumor Intrinsic Characteristics. *Cancer Res* 82, 1174–1192.
- Boyle, P., 2012. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Ann Oncol* 23 Suppl 6.
- Budzik, M.P., Fudalej, M.M., Badowska-Kozakiewicz, A.M., 2021. Histopathological analysis of mucinous breast cancer subtypes and comparison with invasive carcinoma of no special type. *Scientific Reports* 2021 11:1 11, 1–9.
- Campaner, E., Zannini, A., Santorsola, M., Bonazza, D., Bottin, C., Cancila, V., Tripodo, C., Bortul, M., Zanconati, F., Schoeftner, S., Del Sal, G., 2020. Breast Cancer Organoids Model Patient-Specific Response to Drug Treatment. *Cancers (Basel)* 12, 1–19.
- Chen, P., Zhang, X., Ding, R., Yang, L., Lyu, X., Zeng, J., Lei, J.H., Wang, L., Bi, J., Shao, N., Shu, D., Wu, B., Wu, J., Yang, Z., Wang, H., Wang, B., Xiong, K., Lu, Y., Fu, S., Choi, T.K., Lon, N.W., Zhang, A., Tang, D., Quan, Y., Meng, Y., Miao, K., Sun, H., Zhao, M., Bao, J., Zhang, L., Xu, X., Shi, Y., Lin, Y., Deng, C., 2021. Patient-Derived Organoids Can Guide Personalized-Therapies for Patients with Advanced Breast Cancer. *Adv Sci (Weinh)* 8.
- Chew, N.J., Lim Kam Sian, T.C.C., Nguyen, E. V., Shin, S.Y., Yang, J., Hui, M.N., Deng, N., McLean, C.A., Welm, A.L., Lim, E., Gregory, P., Nottle, T., Lang, T., Vereker, M., Richardson, G., Kerr, G., Micati, D., Jardé, T., Abud, H.E., Lee, R.S., Swarbrick, A., Daly, R.J., 2021. Evaluation of FGFR targeting in breast cancer through interrogation of patient-derived models. *Breast Cancer Res* 23.
- Clevers, H., 2016. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell* 165, 1586–1597.
- Clevers, H.C., 2019. Organoids: Avatars for Personalized Medicine. *Keio J Med* 68, 95.
- Conway, M.E., McDaniel, J.M., Graham, J.M., Guillen, K.P., Oliver, P.G., Parker, S.L., Yue, P., Turkson, J., Buchsbaum, D.J., Welm, B.E., Myers, R.M., Varley, K.E., 2020. STAT3 and GR Cooperate to Drive Gene Expression and Growth of Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res* 80, 4355–4370.
- Corrò, C., Novellademunt, L., Li, V.S.W., 2020. A brief history of organoids. *Am J Physiol Cell Physiol* 319, C151–C165.

- Corsini, N.S., Knoblich, J.A., 2022. Human organoids: New strategies and methods for analyzing human development and disease. *Cell* 185, 2756–2769.
- Cromwell, E.F., Sirenko, O., Nikolov, E., Hammer, M., Brock, C.K., Matossian, M.D., Alzoubi, M.S., Collins-Burow, B.M., Burow, M.E., 2022. Multifunctional profiling of triple-negative breast cancer patient-derived tumoroids for disease modeling. *SLAS Discov* 27, 191–200.
- Definition of lobular carcinoma in situ - NCI Dictionary of Cancer Terms - NCI [WWW Document], n.d. URL <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/lobular-carcinoma-in-situ> (accessed 3.28.23).
- Dekkers, J.F., van Vliet, E.J., Sachs, N., Rosenbluth, J.M., Kopper, O., Rebel, H.G., Wehrens, E.J., Piani, C., Visvader, J.E., Verissimo, C.S., Boj, S.F., Brugge, J.S., Clevers, H., Rios, A.C., 2021. Long-term culture, genetic manipulation and xenotransplantation of human normal and breast cancer organoids. *Nat Protoc* 16, 1936–1965.
- Dessources, K., Sebastiao, A.P.M., Pareja, F., Weigelt, B., Reis-Filho, J.S., 2019. How Did We Get There? The Progression from Ductal Carcinoma In Situ to Invasive Ductal Carcinoma. *Curr Breast Cancer Rep* 11, 175–184.
- Ebrahimi, N., Nasr Esfahani, A., Samizade, S., Mansouri, A., Ghanaatian, M., Adelian, S., Shadman Manesh, V., Hamblin, M.R., 2022. The potential application of organoids in breast cancer research and treatment. *Hum Genet* 141, 193–208.
- Emad Rakha, G.T., 2022. Pathology Outlines - Invasive breast cancer of no special type (NST) [WWW Document]. URL <https://www.pathologyoutlines.com/topic/breastmalignantductalnos.html> (accessed 3.28.23).
- Fang, Y., Wang, L., Wan, C., Sun, Y., Van der Jeught, K., Zhou, Z., Dong, T., So, K.M., Yu, T., Li, Y., Eyvani, H., Colter, A.B., Dong, E., Cao, S., Wang, J., Schneider, B.P., Sandusky, G.E., Liu, Y., Zhang, C., Lu, X., Zhang, X., 2021. MAL2 drives immune evasion in breast cancer by suppressing tumor antigen presentation. *J Clin Invest* 131.
- Garrido-Castro, A.C., Lin, N.U., Polyak, K., 2019. Insights into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment. *Cancer Discov* 9, 176–198.
- Ge, L.P., Jin, X., Yang, Y.S., Liu, X.Y., Shao, Z.M., Di, G.H., Jiang, Y.Z., 2021. Tektin4 loss promotes triple-negative breast cancer metastasis through HDAC6-mediated tubulin deacetylation and increases sensitivity to HDAC6 inhibitor. *Oncogene* 40, 2323–2334.
- Goldhammer, N., Kim, J., Timmermans-Wielenga, V., Petersen, O.W., 2019. Characterization of organoid cultured human breast cancer. *Breast Cancer Res* 21.
- Gortman, A., Aherne, N.J., Westhuyzen, J., Amalaseelan, J. V., Dwyer, P.M., Hoffmann, M., Last, A.T., Shakespeare, T.P., 2021. Metaplastic carcinoma of the breast: Clinicopathological features and treatment outcomes with long-term follow up. *Mol Clin Oncol* 15.
- Guillen, K.P., Fujita, M., Butterfield, A.J., Scherer, S.D., Bailey, M.H., Chu, Z., DeRose, Y.S., Zhao, L., Cortes-Sanchez, E., Yang, C.H., Toner, J., Wang, G., Qiao, Y., Huang, X., Greenland, J.A., Vahrenkamp, J.M., Lum, D.H., Factor, R.E., Nelson, E.W., Matsen, C.B., Poretta, J.M., Rosenthal, R., Beck, A.C., Buys, S.S., Vaklavas, C., Ward, J.H., Jensen, R.L., Jones, K.B., Li, Z., Oesterreich, S., Dobrolecki, L.E., Pathi, S.S., Woo,

- X.Y., Berrett, K.C., Wadsworth, M.E., Chuang, J.H., Lewis, M.T., Marth, G.T., Gertz, J., Varley, K.E., Welm, B.E., Welm, A.L., 2022. A human breast cancer-derived xenograft and organoid platform for drug discovery and precision oncology. *Nat Cancer* 3, 232–250.
- Haroon, S., Zia, S., Shirazi, U.A., Ahmed, O., Asghar, I.A., Diwan, M.A., Afzal, A., Irfan, M., Ali, S.J., Hashmi, A.A., 2021. Metaplastic Breast Carcinoma: Clinicopathological Parameters and Prognostic Profile. *Cureus* 13.
- Hophan, S.L., Odnokoz, O., Liu, H., Luo, Y., Khan, S., Gradishar, W., Zhou, Z., Badve, S., Torres, M.A., Wan, Y., 2022. Ductal Carcinoma In Situ of Breast: From Molecular Etiology to Therapeutic Management. *Endocrinology* 163.
- Huang, L., Rong, Y., Tang, X., Yi, K., Qi, P., Hou, J., Liu, W., He, Y., Gao, X., Yuan, C., Wang, F., 2022. Engineered exosomes as an in situ DC-primed vaccine to boost antitumor immunity in breast cancer. *Mol Cancer* 21.
- Huang, Y., Huang, Z., Tang, Z., Chen, Y., Huang, M., Liu, H., Huang, W., Ye, Q., Jia, B., 2021. Research Progress, Challenges, and Breakthroughs of Organoids as Disease Models. *Front Cell Dev Biol* 9.
- Huch, M., Koo, B.K., 2015. Modeling mouse and human development using organoid cultures. *Development* 142, 3113–3125.
- J.C.E Underwood, 2004. Breast. In: *General and Systematic Pathology*. Elsevier Limited, Oxford, United Kingdom, pp. 532–556.
- Jung, M., Lee, K.M., Im, Y., Seok, S.H., Chung, H., Kim, D.Y., Han, D., Lee, C.H., Hwang, E.H., Park, S.Y., Koh, J., Kim, B., Nikas, I.P., Lee, H., Hwang, D., Ryu, H.S., 2022. Nicotinamide (niacin) supplement increases lipid metabolism and ROS-induced energy disruption in triple-negative breast cancer: potential for drug repositioning as an anti-tumor agent. *Mol Oncol* 16, 1795–1815.
- Kim, J., Koo, B.K., Knoblich, J.A., 2020. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020 21:10 21, 571–584.
- Kurani, H., Razavipour, S.F., Harikumar, K.B., Dunworth, M., Ewald, A.J., Nasir, A., Pearson, G., Van Booven, D., Zhou, Z., Azzam, D., Wahlestedt, C., Slingerland, J., 2022. DOT1L Is a Novel Cancer Stem Cell Target for Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 28, 1948–1965.
- Lancaster, M.A., Knoblich, J.A., 2014. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 345.
- Landry, I., Sumbly, V., Vest, M., 2022. Advancements in the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer: A Narrative Review of the Literature. *Cureus* 14.
- Lawlor, K.T., Vanslambrouck, J.M., Higgins, J.W., Chambon, A., Bishard, K., Arndt, D., Er, P.X., Wilson, S.B., Howden, S.E., Tan, K.S., Li, F., Hale, L.J., Shepherd, B., Pentoney, S., Presnell, S.C., Chen, A.E., Little, M.H., 2021. Cellular extrusion bioprinting improves kidney organoid reproducibility and conformation. *Nat Mater* 20, 260–271.
- Lee, M., Jara-Lazaro, A.R., Cheok, P.Y., Thike, A.A., 2022. Medullary breast carcinoma: a pathogenic review and immunohistochemical study using tissue microarray. *Singapore Med J* 63, 394.

- Lehmann, R., Lee, C.M., Shugart, E.C., Benedetti, M., Charo, R.A., Gartner, Z., Hogan, B., Knoblich, J., Nelson, C.M., Wilson, K.M., 2019. Human organoids: a new dimension in cell biology. *Mol Biol Cell* 30, 1129–1137.
- Lewis, J., Holm, S., 2022. Organoid biobanking, autonomy and the limits of consent. *Bioethics* 36, 742–756.
- Lewis, S.M., Callaway, M.K., dos Santos, C.O., 2022. Clinical applications of 3D normal and breast cancer organoids: A review of concepts and methods. *Exp Biol Med (Maywood)* 247, 2176–2183.
- Li, X., Li, J., Xu, L., Wei, W., Cheng, A., Zhang, L., Zhang, M., Wu, G., Cai, C., 2022. CDK16 promotes the progression and metastasis of triple-negative breast cancer by phosphorylating PRC1. *J Exp Clin Cancer Res* 41.
- Limaïem, F., Mlika, M., 2023. Tubular Breast Carcinoma. *StatPearls*.
- Liu, C., Zhang, Y., Gao, J., Zhang, Q., Sun, L., Ma, Q., Qiao, X., Li, X., Liu, J., Bu, J., Zhang, Z., Han, L., Zhao, D., Yang, Y., 2023. A highly potent small-molecule antagonist of exportin-1 selectively eliminates CD44+CD24-enriched breast cancer stem-like cells. *Drug Resistance Updates* 66, 100903.
- Liu, L.C., Shen, Y.C., Wang, Y.L., Wu, W.R., Chang, L.C., Chen, Y.H., Lee, C.C., Wang, S.C., 2022. Growth-promoting function of the cGAS-STING pathway in triple-negative breast cancer cells. *Front Oncol* 12.
- Liu, X.Y., Jiang, W., Ma, D., Ge, L.P., Yang, Y.S., Gou, Z.C., Xu, X.E., Shao, Z.M., Jiang, Y.Z., 2020. SYTL4 downregulates microtubule stability and confers paclitaxel resistance in triple-negative breast cancer. *Theranostics* 10, 10940.
- Mandapati, A., Lukong, K.E., 2022. Triple negative breast cancer: approved treatment options and their mechanisms of action. *J Cancer Res Clin Oncol*.
- Manjunath, M., Choudhary, B., 2021. Triple-negative breast cancer: A run-through of features, classification and current therapies. *Oncol Lett* 22.
- Marrazzo, E., Frusone, F., Milana, F., Sagona, A., Gatzemeier, W., Barbieri, E., Bottini, A., Canavese, G., Rubino, A.O., Eboli, M.G., Rossetti, C.M., Testori, A., Errico, V., De Luca, A., Tinterri, C., 2020. Mucinous breast cancer: A narrative review of the literature and a retrospective tertiary single-centre analysis. *Breast* 49, 87–92.
- Matossian, M.D., Chang, T., Wright, M.K., Burks, H.E., Elliott, S., Sabol, R.A., Wathieu, H., Windsor, G.O., Alzoubi, M.S., King, C.T., Bursavich, J.B., Ham, A.M., Savoie, J.J., Nguyen, K., Baddoo, M., Flemington, E., Sirenko, O., Cromwell, E.F., Hebert, K.L., Lau, F., Izadpanah, R., Brown, H., Sinha, S., Zabaleta, J., Riker, A.I., Moroz, K., Miele, L., Zea, A.H., Ochoa, A., Bunnell, B.A., Collins-Burow, B.M., Martin, E.C., Burow, M.E., 2022. In-depth characterization of a new patient-derived xenograft model for metaplastic breast carcinoma to identify viable biologic targets and patterns of matrix evolution within rare tumor types. *Clin Transl Oncol* 24, 127–144.
- Mazzucchelli, S., Piccotti, F., Allevi, R., Truffi, M., Sorrentino, L., Russo, L., Agozzino, M., Signati, L., Bonizzi, A., Villani, L., Corsi, F., 2019. Establishment and Morphological Characterization of Patient-Derived Organoids from Breast Cancer. *Biol Proced Online* 21.
- McMullen, E.R., Zoumberos, N.A., Kleer, C.G., 2019. Metaplastic Breast Carcinoma: Update on Histopathology and Molecular Alterations. *Arch Pathol Lab Med* 143, 1492–1496.

- Mohan, S.C., Lee, T.Y., Giuliano, A.E., Cui, X., 2021. Current Status of Breast Organoid Models. *Front Bioeng Biotechnol* 9.
- Nikonorova, V.G., Chrishtop, V. V., Mironov, V.A., Prilepskii, A.Y., 2023. Advantages and Potential Benefits of Using Organoids in Nanotoxicology. *Cells* 12.
- Nunnery, S.E., Mayer, I.A., Balko, J.M., 2021. Triple-Negative Breast Cancer: Breast Tumors With an Identity Crisis. *Cancer J* 27, 2–7.
- Overview of the Breast - Breast Pathology | Johns Hopkins Pathology [WWW Document], n.d. URL <https://pathology.jhu.edu/breast/overview> (accessed 3.27.23).
- Parsyan, A., Cruickshank, J., Hodgson, K., Wakeham, D., Pellizzari, S., Bhat, V., Cescon, D.W., 2021. Anticancer effects of radiation therapy combined with Polo-Like Kinase 4 (PLK4) inhibitor CFI-400945 in triple negative breast cancer. *Breast* 58, 6–9.
- Patricia A. Thomas, 2011. Breast Cancer and its Precursor Lesions. *Breast Cancer and its Precursor Lesions*.
- Psilopatis, I., Kokkali, S., Palamaris, K., Digklia, A., Vrettou, K., Theocharis, S., 2022a. Organoids: A New Chapter in Sarcoma Diagnosis and Treatment. *Int J Mol Sci* 23.
- Psilopatis, I., Mantzari, A., Vrettou, K., Theocharis, S., 2023. The Role of Patient-Derived Organoids in Triple-Negative Breast Cancer Drug Screening. *Biomedicines* 11, 773.
- Psilopatis, I., Sykaras, A.G., Mandrakis, G., Vrettou, K., Theocharis, S., 2022b. Patient-Derived Organoids: The Beginning of a New Era in Ovarian Cancer Disease Modeling and Drug Sensitivity Testing. *Biomedicines* 2023, Vol. 11, Page 1 11, 1.
- Reed, M.E.M.C., Kutasovic, J.R., Lakhani, S.R., Simpson, P.T., 2015. Invasive lobular carcinoma of the breast: morphology, biomarkers and 'omics. *Breast Cancer Res* 17.
- Rimann, M., Graf-Hausner, U., 2012. Synthetic 3D multicellular systems for drug development. *Curr Opin Biotechnol* 23, 803–809.
- Rossi, R., De Angelis, M.L., Xhelili, E., Sette, G., Eramo, A., De Maria, R., Cesta Incani, U., Francescangeli, F., Zeuner, A., 2022. Lung Cancer Organoids: The Rough Path to Personalized Medicine. *Cancers (Basel)* 14.
- Saatci, O., Kaymak, A., Raza, U., Ersan, P.G., Akbulut, O., Banister, C.E., Sikirzhytski, V., Tokat, U.M., Aykut, G., Ansari, S.A., Dogan, H.T., Dogan, M., Jandaghi, P., Isik, A., Gundogdu, F., Kosemehmetoglu, K., Dizdar, O., Aksoy, S., Akyol, A., Uner, A., Buckhaults, P.J., Riazalhosseini, Y., Sahin, O., 2020. Targeting lysyl oxidase (LOX) overcomes chemotherapy resistance in triple negative breast cancer. *Nature Communications* 2020 11:1 11, 1–17.
- Sachs, N., de Ligt, J., Kopper, O., Gogola, E., Bounova, G., Weeber, F., Balgobind, A.V., Wind, K., Gracanin, A., Begthel, H., Korving, J., van Boxtel, R., Duarte, A.A., Lelieveld, D., van Hoeck, A., Ernst, R.F., Blokzijl, F., Nijman, I.J., Hoogstraat, M., van de Ven, M., Egan, D.A., Zinzalla, V., Moll, J., Boj, S.F., Voest, E.E., Wessels, L., van Diest, P.J., Rottenberg, S., Vries, R.G.J., Cuppen, E., Clevers, H., 2018. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell* 172, 373-386.e10.

- Salinas-Vera, Y.M., Valdés, J., Pérez-Navarro, Y., Mandujano-Lazaro, G., Marchat, L.A., Ramos-Payán, R., Nuñez-Olvera, S.I., Pérez-Plascencia, C., López-Camarillo, C., 2022. Three-Dimensional 3D Culture Models in Gynecological and Breast Cancer Research. *Front Oncol* 12.
- Sato, T., Stange, D.E., Ferrante, M., Vries, R.G.J., Van Es, J.H., Van Den Brink, S., Van Houdt, W.J., Pronk, A., Van Gorp, J., Siersema, P.D., Clevers, H., 2011. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology* 141, 1762–1772.
- Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., Van De Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., Van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., Clevers, H., 2009. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 2009 459:7244 459, 262–265.
- Shu, D., Shen, M., Li, K., Han, X., Li, H., Tan, Z., Wang, Y., Peng, Y., Tang, Z., Qu, C., Jin, A., Liu, S., 2022. Organoids from patient biopsy samples can predict the response of BC patients to neoadjuvant chemotherapy. *Ann Med* 54, 2581–2597.
- Sokolova, A., Lakhani, S.R., 2021. Lobular carcinoma in situ: diagnostic criteria and molecular correlates. *Modern Pathology* 34, 8–14.
- Suarez-Martinez, E., Suazo-Sanchez, I., Celis-Romero, M., Carnero, A., 2022. 3D and organoid culture in research: physiology, hereditary genetic diseases and cancer. *Cell Biosci* 12.
- Sudhakaran, M., Parra, M.R., Stoub, H., Gallo, K.A., Doseff, A.I., 2020. Apigenin by targeting hnRNPA2 sensitizes triple-negative breast cancer spheroids to doxorubicin-induced apoptosis and regulates expression of ABCC4 and ABCG2 drug efflux transporters. *Biochem Pharmacol* 182.
- Sukumar, J., Gast, K., Quiroga, D., Lustberg, M., Williams, N., 2021. Triple-negative breast cancer: promising prognostic biomarkers currently in development. *Expert Rev Anticancer Ther* 21, 135–148.
- Sun, X., Zuo, K., Yao, Q., Zhou, S., Shui, R., Xu, X., Bi, R., Yu, B., Cheng, Y., Tu, X., Lu, H., Yang, W., 2020. Invasive apocrine carcinoma of the breast: clinicopathologic features and comprehensive genomic profiling of 18 pure triple-negative apocrine carcinomas. *Modern Pathology* 33, 2473–2482.
- Thomas, M., Kelly, E.D., Abraham, J., Kruse, M., 2019. Invasive lobular breast cancer: A review of pathogenesis, diagnosis, management, and future directions of early stage disease. *Semin Oncol* 46, 121–132.
- Tiriác, H., Plenker, D., Baker, L.A., Tuveson, D.A., 2019. Organoid models for translational pancreatic cancer research. *Curr Opin Genet Dev* 54, 7–11.
- Trevisi, E., La Salvia, A., Daniele, L., Brizzi, M.P., De Rosa, G., Scagliotti, G. V., Di Maio, M., 2020. Neuroendocrine breast carcinoma: a rare but challenging entity. *Med Oncol* 37.
- Van Baelen, K., Geukens, T., Maetens, M., Tjan-Heijnen, V., Lord, C.J., Linn, S., Bidard, F.C., Richard, F., Yang, W.W., Steele, R.E., Pettitt, S.J., Van Ongeval, C., De Schepper, M., Isnaldi, E., Nevelsteen, I., Smeets, A., Punie, K., Voorwerk, L., Wildiers, H., Floris, G., Vincent-Salomon, A., Derksen, P.W.B., Neven, P., Senkus, E., Sawyer, E., Kok, M., Desmedt, C., 2022. Current and future diagnostic and treatment strategies for patients with invasive lobular breast cancer. *Ann Oncol* 33, 769–785.

- Verras, G.I., Tchabashvili, L., Mulita, F., Grypari, I.M., Sourouni, S., Panagodimou, E., Argentou, M.I., 2022. Micropapillary Breast Carcinoma: From Molecular Pathogenesis to Prognosis. *Breast Cancer (Dove Med Press)* 14, 41–61.
- Vranic, S., Gatalica, Z., 2022. An Update on the Molecular and Clinical Characteristics of Apocrine Carcinoma of the Breast. *Clin Breast Cancer* 22, e576–e585.
- Wang, D.Y., Jiang, Z., Ben-David, Y., Woodgett, J.R., Zacksenhaus, E., 2019. Molecular stratification within triple-negative breast cancer subtypes. *Sci Rep* 9.
- Wang, X., Chen, T., Li, C., Li, W., Zhou, X., Li, Y., Luo, D., Zhang, N., Chen, B., Wang, L., Zhao, W., Fu, S., Yang, Q., 2022. CircRNA-CREIT inhibits stress granule assembly and overcomes doxorubicin resistance in TNBC by destabilizing PKR. *J Hematol Oncol* 15.
- Weeber, F., Ooft, S.N., Dijkstra, K.K., Voest, E.E., 2017. Tumor Organoids as a Pre-clinical Cancer Model for Drug Discovery. *Cell Chem Biol* 24, 1092–1100.
- Wu, Q., Nie, D.Y., Ba-alawi, W., Ji, Y.S., Zhang, Z.W., Cruickshank, J., Haight, J., Ciamponi, F.E., Chen, J., Duan, S., Shen, Y., Liu, J., Marhon, S.A., Mehdipour, P., Szewczyk, M.M., Dogan-Artun, N., Chen, W.J., Zhang, L.X., Deblois, G., Prinos, P., Massirer, K.B., Barsyte-Lovejoy, D., Jin, J., De Carvalho, D.D., Haibe-Kains, B., Wang, X.J., Cescon, D.W., Lupien, M., Arrowsmith, C.H., 2022. PRMT inhibition induces a viral mimicry response in triple-negative breast cancer. *Nature Chemical Biology* 2022 18:8 18, 821–830.
- Xiao, Y., Ma, D., Yang, Y.S., Yang, F., Ding, J.H., Gong, Y., Jiang, L., Ge, L.P., Wu, S.Y., Yu, Q., Zhang, Q., Bertucci, F., Sun, Q., Hu, X., Li, D.Q., Shao, Z.M., Jiang, Y.Z., 2022. Comprehensive metabolomics expands precision medicine for triple-negative breast cancer. *Cell Research* 2022 32:5 32, 477–490.
- Yang, H., Sun, L., Liu, M., Mao, Y., 2018. Patient-derived organoids: a promising model for personalized cancer treatment. *Gastroenterol Rep (Oxf)* 6, 243.
- Yang, R., Li, Y., Wang, H., Qin, T., Yin, X., Ma, X., 2022. Therapeutic progress and challenges for triple negative breast cancer: targeted therapy and immunotherapy. *Molecular biomedicine* 3.
- Yang, Y.S., Jin, X., Li, Q., Chen, Y.Y., Chen, F., Zhang, H., Su, Y., Xiao, Y., Di, G.H., Jiang, Y.Z., Huang, S., Shao, Z.M., 2022. Superenhancer drives a tumor-specific splicing variant of MARCO to promote triple-negative breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119.
- Yin, L., Duan, J.J., Bian, X.W., Yu, S.C., 2020. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res* 22.
- Yoshida, G.J., 2020. Applications of patient-derived tumor xenograft models and tumor organoids. *J Hematol Oncol* 13.
- Yu, J., Qin, B., Moyer, A.M., Nowsheen, S., Liu, T., Qin, S., Zhuang, Y., Liu, D., Lu, S.W., Kalari, K.R., Visscher, D.W., Copland, J.A., McLaughlin, S.A., Moreno-Aspitia, A., Northfelt, D.W., Gray, R.J., Lou, Z., Suman, V.J., Weinshilboum, R., Boughey, J.C., Goetz, M.P., Wang, L., 2018. DNA methyltransferase expression in triple-negative breast cancer predicts sensitivity to decitabine. *J Clin Invest* 128, 2376–2388.

Zhang, M., Zhang, L., Geng, A., Li, X., Zhou, Y., Xu, L., Zeng, Y.A., Li, J., Cai, C., 2022. CDK14 inhibition reduces mammary stem cell activity and suppresses triple negative breast cancer progression. *Cell Rep* 40.