



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΝΙΚΗ Ι. ΑΓΝΑΝΤΗ

ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΩΝ
ΚΑΙ ΜΕΜΒΡΑΝΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΑΙ
ΜΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ ΜΑΣΤΟΥ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ Ε. ΜΠΑΛΤΑΤΖΗΣ
ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2005



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200250



Νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος: «Η έγκριση της διδακτορική διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα. Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2».



Ημερομηνία αίτησης: 4-12-1998

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 373α/9-2-1999

Ορισμός θέματος: 4-3-1999

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

1. **Νίκη Ι. Αγνάντη:** Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, επιβλέπουσα
2. **Βασιλική Μαλάμου-Μήτση:** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, μέλος
3. **Μαργαρίτα Τζαφλίδου:** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής, μέλος

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής: Επαμεινώνδας Τσιάνος, Καθηγητής Παθολογίας

Ημερομηνία Κατάθεσης: 20-4-2005

Βαθμός Διδακτορικής Διατριβής: Άριστα

Μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

1. **Νίκη Ι. Αγνάντη,** Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, επιβλέπουσα
2. **Βασιλική Μαλάμου-Μήτση,** Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, μέλος
3. **Μαργαρίτα Τζαφλίδου,** Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής, μέλος
4. **Δημήτριος Στεφάνου,** Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας, μέλος
5. **Μαρία Μπάη,** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, μέλος
6. **Άννα Μπατιστάτου,** Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, μέλος
7. **Δημήτριος Ρούκος,** Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής με ιδιαίτερη έμφαση στην Ερευνητική-Πειραματική Χειρουργική, μέλος

Γραμματέας Ιατρικής Σχολής: Ευαγγελία Τσαγγαλά



Στην γυναίκα μου, Ντία

Στα παιδιά μου



100-443881

[illegible]

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο καρκίνος του μαστού είναι μία μορφή καρκίνου που απαντάται κυρίως σε γυναίκες και πολύ σπάνια σε άνδρες και είναι μία από τις βασικότερες αιτίες θανάτου γυναικών στον Δυτικό κυρίως κόσμο. Για παράδειγμα, στις ΗΠΑ κάθε χρόνο διαγιγνώσκονται πάνω από 150.000 γυναίκες που πάσχουν από καρκίνο του μαστού εκ των οποίων άνω του ενός τρίτου θα πεθάνουν από αυτή την ασθένεια. Η ραγδαία αύξηση των περιστατικών σε Ευρώπη και ΗΠΑ έχει προκαλέσει εγρήγορση σε όλα τα ερευνητικά κέντρα και αντικαρκινικά νοσοκομεία για την προσπάθεια εξεύρεσης τρόπων πρόγνωσης, εντοπισμού «παραγόντων κινδύνου» ή καρκινικών δεικτών, αντιμετώπισης, θεραπείας και κυρίως τρόπους ψυχολογικής στήριξης και προσφοράς μιας καλύτερης ποιότητας ζωής για τις ασθενείς. Γιατί δεν πρέπει να ξεχνάει κανείς ότι ο καρκίνος του μαστού πέρα από τις σωματικές επιπτώσεις του, προκαλεί και τεράστιο ψυχολογικό πρόβλημα στις πάσχουσες που σχετίζεται με την αρτιμέλειά τους. Αυτή η αλλαγή της ψυχολογίας επεκτείνεται και στον χώρο της εργασίας τους και την εν γένη κοινωνική τους παρουσία.

Η μελέτη αυτή προσπαθεί να διερευνήσει τις πρωτεϊνικές αλλαγές που υφίσταται το κύτταρο λόγω του καρκίνου και να εντοπίσει ποιοτικές διαφορές στην έκφραση των πρωτεϊνών του κυττάρου, δηλαδή να αναδείξει νέες πρωτεΐνες που εκφράζονται μόνο στα καρκινικά κύτταρα και θα μπορούσαν να αποτελέσουν ειδικούς καρκινικούς δείκτες, για την καλύτερη πρόγνωση, αντιμετώπιση και θεραπεία του καρκίνου του μαστού.

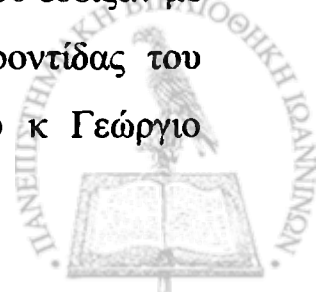
Πραγματοποιήθηκε κάτω από δύσκολες συνθήκες και με πάσης φύσεως προβλήματα, και χωρίς την συμβολή ορισμένων προσώπων θα ήταν



αδύνατη η εκπόνησή της. Από τη θέση αυτή, λοιπόν, θα ήθελα να τους απευθύνω τις ευχαριστίες μου.

Καταρχάς θα ήθελα να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κα Νίκη Ι. Αγνάντη για την αμέριστη φροντίδα και αγάπη με την οποία με περιέβαλλε από την αρχή της εκπονήσεως αυτής της διατριβής μέχρι την περάτωσή της καθώς επίσης και για τις πολύτιμες συμβουλές της. Ευχαριστώ επίσης και τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, την Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κα Βασιλική Μαλάμου – Μήτση και την Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κα Μαργαρίτα Τζαφλίδου, για την εποπτεία αυτής της εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής για την πρόθυμη προσέλευση τους προς κρίση της εργασίας μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στην μητέρα μου και Διευθύντρια του Ερευνητικού Κέντρου Ογκολογίας «Γ. Παπανικολάου» του Νοσοκομείου «Ο Άγιος Σάββας» καθώς και του Τμήματος Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας – Κυτταρικής Βιολογίας του ίδιου κέντρου κα Ειρήνη Βολουδάκη-Μπαλτατζή για τις πολύτιμες συμβουλές, την παρότρυνση και την συμπαράσταση της καθ' όλη την διάρκεια της εκπονήσεως της διατριβής, καθώς και στον πατέρα μου Καθηγητή Ορυκτολογίας-Πετρολογίας του Γεωλογικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Αθηνών κ Εμμανουήλ Μπαλτατζή, διότι αποτελούν για μένα πρότυπο αγάπης, γονέων, ανθρώπων και επιστημόνων και για αυτό τους ευχαριστώ από βάθους καρδιάς. Επίσης ευχαριστώ τους πνευματικούς μου γονείς Ιατρούς κ Ηλία Κωνσταντόπουλο και κα Αικατερίνα Κωνσταντοπούλου, διότι εκτός των γονέων μου ήταν οι πρώτοι άνθρωποι που μου έδειξαν με το παράδειγμά τους την έννοια της αγάπης και της φροντίδας του ασθενούς μέσω της επιστήμης. Τους επίσης γονείς μου κ Γεώργιο



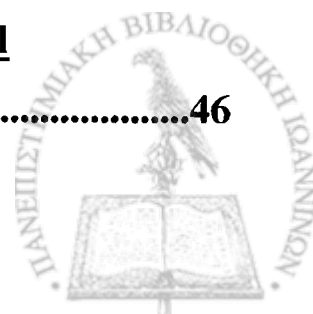
Γκραίκο και κα Σοφία Γκραίκου, για την αμέριστη υποστήριξη, συμπαράσταση και αγάπη με την οποία με περιέλαβαν σε δύσκολες στιγμές τόσο δικές μου όσο και τον ιδίων.

Τέλος το μεγαλύτερο ευχαριστώ το απευθύνω στην γυναίκα μου Κωνσταντία για την απεριόριστη αγάπη, φροντίδα, υπομονή και στήριξη που μου χάρισε εν μέσω μεγάλων δυσκολιών και στα τρία παιδιά μου τον Μανώλη, τον Θανάση και τον Αλέξανδρο που έδειξαν υπομονή ενηλίκου όταν ο μπαμπάς δεν ήταν εκεί για να παίζει μαζί τους.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<u>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u>	17
<u>1.1 ΜΑΣΤΟΣ</u>	17
<u>1.1.1 Γενικά περί των μαζικών αδένων ή μαστών</u>	17
<u>1.1.2 Εμβρυϊκή ανάπτυξη του μαστού</u>	17
<u>1.1.3 Ανάπτυξη του μαστού κατά τη διάρκεια της εφηβείας</u>	18
<u>1.1.4 Ανάπτυξη του μαστού στην ενήλικη γυναίκα</u>	18
<u>1.2 Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ</u>	20
<u>1.2.1 Γενικά περί καρκίνου του μαστού</u>	20
<u>1.2.2 Επιδημιολογία του καρκίνου του μαστού</u>	21
<u>1.2.3 Προέλευση και είδη καρκίνου του μαστού</u>	25
<u>1.2.4 Μοριακή εξέλιξη του καρκίνου του μαστού</u>	34
<u>1.2.5 Κυτταρική μεμβράνη</u>	35
<u>1.2.6 Μεμβρανικές πρωτεΐνες</u>	36
<u>1.2.7 Καρκινικοί Δείκτες</u>	37
<u>1.2.8 Θειορεδοξίνη (Thioredoxin – Trx)</u>	38
<u>1.2.9 Καλρετικουλίνη (Calreticulin – CRT)</u>	39
<u>1.3 ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ (PROTEOMICS)</u>	41
<u>1.3.1 Η Πρωτεομική (Proteomics) ως εργαλείο για την ανακάλυψη καρκινικών δεικτών και προφίλ επικοινωνιακών οδών στον καρκίνο του μαστού</u>	41
<u>1.3.2 Η πρωτεομική ως εργαλείο για την αναγνώριση καρκινικών δεικτών στον καρκίνο του μαστού</u>	43
<u>1.3.3 Η Πρωτεομική στον ρόλο του αποκωδικοποιητή ενδοκυτταρικών οδών επικοινωνίας</u>	45
<u>1.3.4 Ηλεκτροφόρηση Πηκτώματος Ακρυλαμιδίου Δύο Διαστάσεων (Two –Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis)</u>	46



<u>ΣΚΟΠΟΣ</u>	50
<u>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	51
<u>2.1 Συλλογή και αρχική επεξεργασία ιστών</u>	51
<u>2.2 Ομογενοποίηση ιστών</u>	52
<u>2.3 Απομόνωση κυτταροπλασματικού και μεμβρανικού υλικού</u>	52
<u>2.3.1 Απομάκρυνση πυρήνων</u>	52
<u>2.3.2 Διαχωρισμός κυτταροπλασματικού και μεμβρανικού υλικού</u>	53
<u>2.3.3 Ανταλλαγή διαλυμάτων</u>	53
<u>2.3.4 Διαλυτοποίηση του μεμβρανικού ιζήματος</u>	54
<u>2.4 Ποσοτικός καθορισμός πρωτεΐνης</u>	54
<u>2.5 Ηλεκτροφόρηση Δύο Διαστάσεων</u>	54
<u>2.5.1 Ισοηλεκτρική Εστίαση (Isoelectrofocusing)</u>	54
<u>2.5.2 Ηλεκτροφόρηση Πηκτώματος Ακρυλαμιδίου (SDS – PAGE)</u>	56
<u>2.5.3 Χρώση νιτρικού αργύρου (Silver Staining)</u>	57
<u>2.5.4 Επεξεργασία πηκτωμάτων</u>	57
<u>3. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ</u>	59
<u>3.1 Παρασκευή διαλυμάτων</u>	59
<u>3.2 Παρασκευή πηκτωμάτων</u>	62
<u>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>	65
<u>4.1 Ηλεκτροφόρηση Δύο Διαστάσεων</u>	65
<u>4.2 Ποιοτικές διαφορές (Άγνωστες Πρωτεΐνες)</u>	66
<u>4.2.1 Δείγματα ιστών βαθμού κακοήθειας I (Grade I)</u>	66
<u>4.2.2 Δείγματα ιστών βαθμού κακοήθειας II (Grade II)</u>	66
<u>4.2.3 Δείγματα ιστών βαθμού κακοήθειας III (Grade III)</u>	67
<u>4.3 Ποσοτικές διαφορές</u>	69
<u>4.3.1 Άγνωστες πρωτεΐνες</u>	69



<u>4.3.2 Γνωστές Πρωτεΐνες.....</u>	71
<u>4.4 Σχέση βαθμού κακοήθειας και συνύπαρξης άλλου τύπου καρκινώματος με την πρωτεϊνική έκφραση</u>	73
<u>4.4.1 Ποιοτικές διαφορές.....</u>	73
<u>4.4.2 Ποσοτικές διαφορές.....</u>	76
<u>4.5 Σχέση ύπαρξης μεταστατικών λεμφαδένων με την πρωτεϊνική έκφραση</u>	80
<u>4.5.1 Ποιοτικές διαφορές.....</u>	80
<u>4.5.2 Ποσοτικές διαφορές.....</u>	82
<u>5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</u>	85
<u>6. ΥΠΟΜΝΗΜΑ</u>	105
<u>6.1 Πίνακες αποτελεσμάτων</u>	105
<u>6.1.1 Ποιοτικές διαφορές.....</u>	105
<u>6.1.2 Ποσοτικές διαφορές</u>	111
<u>6.2 Διαγράμματα αποτελεσμάτων</u>	117
<u>6.3 Εικόνες.....</u>	138
<u>7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u>	179
<u>8. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</u>	183
<u>9. SUMMARY</u>	185
<u>10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	187



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΜΑΣΤΟΣ

1.1.1 Γενικά περί των μαζικών αδένων ή μαστών

Κάθε μαζικός αδένας περιλαμβάνει 15-20 ακανόνιστους λοβούς του σύνθετου σωληνοκυψελιδωτού τύπου, που η λειτουργία τους είναι να εκκρίνει γάλα για να τρέφονται από αυτό τα νεογέννητα. Κάθε λοβός χωρίζεται από τους άλλους με πυκνό συνδετικό ιστό και πολύ λιπώδη ιστό και από μόνος του στην πραγματικότητα είναι ένας αδένας με δικό του αποκριτικό πόρο. Αυτοί οι αποκριτικοί γαλακτοφόροι πόροι, 2-4.5 εκατοστά σε μήκος, βγαίνουν ανεξάρτητοι στη μαζική θηλή που έχει 15-25 ανοίγματα, το καθένα περίπου 0.5 mm σε διάμετρο. Ο μεσολόβιος συνδετικός ιστός εισχωρεί σε κάθε λοβό, διαιρώντας τον σε λοβίδια με μεσολοβίδιο συνδετικό ιστό που περιβάλλει κάθε εκκριτική μονάδα. Η ιστολογική δομή των μαζικών αδένων αλλάζει ανάλογα με το φύλο, την ηλικία και τις φυσιολογικές συνθήκες που επικρατούν στο σώμα ^[1].

1.1.2 Εμβρυϊκή ανάπτυξη του μαστού

Ο μαζικός αδένας εμφανίζεται στο ανθρώπινο έμβρυο των 8 mm σε μια πάχυνση της επιδερμίδας που λέγεται «γαλακτική γραμμή». Συνεχίζει να παχύνεται και γίνεται η μαζική πτυχή. Καθώς περνάει ο καιρός, αυτές οι επιθηλιακές παχύνσεις γίνονται σφαιρικές ή πληκτροειδής με κυλινδρικά ή πολυεδρικά κύτταρα. Συνεχίζοντας να πολλαπλασιάζονται σχηματίζουν προβολές με επάρματα στις άκρες τους. Αυτές οι προβολές σιγά-σιγά μεγαλώνουν στην κατεύθυνση του συνδετικού ιστού και γίνονται οι μαζικοί πόροι. Αργότερα η πλειονότητα της «γαλακτικής γραμμής» εκφυλίζεται. Στα νεογέννητα και των δύο φύλων, οι αδένες έχουν μία διάμετρο από 3.5-9 mm και περιέχουν



διακριτές κυψελίδες. Στα θηλυκά, η ανάπτυξη συνεχίζεται και με την έναρξη της σεξουαλικής ωριμότητας, αυξάνει σε ένταση και ποσότητα ^[1].

1.1.3 Ανάπτυξη του μαστού κατά τη διάρκεια της εφηβείας

Πριν από την εφηβεία, οι μαζικοί αδένες αποτελούνται από γαλακτοφόρα κολποειδή και διακλαδισμένους γαλακτοφόρους πόρους που έχουν μικρά κυτταρικά αθροίσματα στις άκρες τους. Η ανάπτυξη των μαζικών αδένων στη διάρκεια της εφηβείας αποτελεί ένα από τα δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου. Στη διάρκεια αυτής της περιόδου, αυξάνουν σε μέγεθος και αναπτύσσουν μία προεξέχουσα θηλή. Στα αρσενικά παραμένουν επίπεδοι. Η ανάπτυξη του μαστού στη διάρκεια της εφηβείας είναι το αποτέλεσμα δύο αυξητικών διεργασιών:

1. Αύξηση του όγκου των γαλακτοφόρων πόρων που προκαλείται από τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.
2. Συσσώρευση από λιπώδη ιστό και στο μεσολόβιο και στο μεσολοβίδιο συνδετικό ιστό.

Ο πολλαπλασιασμός των γαλακτοφόρων πόρων και η συσσώρευση λίπους οφείλονται στην αύξηση του ποσού των ωοθηκικών ορμονών στη διάρκεια της εφηβείας. Σε αυτό το στάδιο μπορεί να παρατηρηθεί στις άκρες των πόρων ο σχηματισμός μικρών σωληνοκυψελιδωτών δομών ^[1].

1.1.4 Ανάπτυξη του μαστού στην ενήλικη γυναίκα

Οι μαζικοί αδένες της ενήλικης γυναίκας αποτελούνται από γαλακτοφόρους πόρους και σωληνοκυψελιδωτούς εκκριτικούς αδένες. Κοντά στο στόμιο της θηλής, οι γαλακτοφόροι πόροι διαστέλλονται για να σχηματίσουν τα γαλακτοφόρα κολποειδή ή ληκύθους. Οι γαλακτοφόροι πόροι επενδύονται κοντά στα εξωτερικά τους στόμια με πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο. Βαθύτερα στον αδένα το επιθήλιο γίνεται διαδοχικά λεπτότερο με λιγότερες κυτταρικές στιβάδες, μέχρι να γίνουν μόνο δύο στιβάδες από κυβοειδή ή χαμηλά κυλινδρικά κύτταρα.



Πλησιέστερα προς τα εκκριτικά τμήματα του αδένου – κυψελιδικοί πόροι και κυψελίδες – το επιθήλιο γίνεται απλό κυβικό και στηρίζεται πάνω στη βασική μεμβράνη και σε μια ασυνεχή στιβάδα από προσεκβολές μυοεπιθηλιακών κυττάρων. Στη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου, παρατηρούνται μικρές αλλαγές στην ιστολογική δομή αυτών των αδένων, δηλαδή γύρω στο χρόνο της ωορρηξίας φαίνεται πολλαπλασιασμός στα κύτταρα που έχουν οι πόροι και τα εκκριτικά τμήματα. Αυτό συμπίπτει με την περίοδο που τα οιστρογόνα που κυκλοφορούν βρίσκονται στην κορυφή τους. Μεγαλύτερη συγκέντρωση λιπώδους ιστού και μεγαλύτερη υδάτωση συνδετικού ιστού στην προεμμηνορρησιακή φάση έχει σαν αποτέλεσμα την μεγέθυνση του μαστού. Η διαίρεση των μαζικών αδένων σε λοβία επίσης γίνεται πιο έντονη.

Η μαζική θηλή έχει ένα κυλινδροκωνικό σχήμα. Σε χρώμα μπορεί να είναι ελαφριά καφέ, σκούρα καφέ ή μαύρη. Εξωτερικά καλύπτεται από κερατινοποιημένο πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο που είναι συνέχεια με αυτό που είναι στο γειτονικό δέρμα. Το επιθήλιο της μαζικής θηλής στηρίζεται σε μια στοιβάδα συνδετικού ιστού πλούσιου σε λείες μυϊκές ίνες. Αυτές οι ίνες είναι τοποθετημένες σε κύκλους γύρω από τους γαλακτοφόρους πόρους και είναι παράλληλες προς αυτούς όπου συναντάνε την θηλή και ανοίγουν χωριστά στην κορυφή της θηλής. Στη διάρκεια της εφηβείας οι μαζικές θηλές προεξέχουν περισσότερο. Το δέρμα γύρω από την θηλή φτιάχνει την άλω. Το χρώμα που έχει η άλω αλλάζει από ροδαλό σε σκοτεινό καφέ στη διάρκεια της κύησης και αυτό οφείλεται σε μία τοπική συσσώρευση μελανίνης. Μετά τον τοκετό μπορεί να γίνει πιο ανοιχτή σε χρώμα αλλά ποτέ πια δεν μπορεί να έχει την αρχική της απόχρωση ^[1].



1.2 Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

1.2.1 Γενικά περί καρκίνου του μαστού

Ο καρκίνος του μαστού είναι μία από τις βασικότερες αιτίες θανάτου του γυναικείου πληθυσμού δημιουργώντας σοβαρότατο πρόβλημα δημόσιας υγείας, λόγω του μεγάλου αριθμού γυναικών που διαγιγνώσκονται και που πεθαίνουν ετησίως από αυτή την ασθένεια. Τα ποσοστά εμφάνισης είναι υψηλότερα στις ανεπτυγμένες χώρες, ενώ στις υπό ανάπτυξη χώρες τα ποσοστά είναι χαμηλά αλλά με τάση αύξησης. Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, υπολογίζεται ότι κάθε χρόνο παραπάνω από 180.000 γυναίκες διαγιγνώσκονται με καρκίνο μαστού. Αν λοιπόν τα μέχρι τώρα ποσοστά καρκίνου μαστού παραμείνουν σταθερά, μία γυναίκα που γεννιέται σήμερα έχει μία στις δέκα πιθανότητες να αναπτύξει καρκίνο του μαστού. Σε περιπτώσεις μεταναστών από χώρες χαμηλού κινδύνου σε χώρες υψηλού κινδύνου, το ποσοστό κινδύνου εμφάνισης καρκίνου μαστού αυξάνει και τελικά γίνεται παρόμοιο με αυτό των κατοίκων της νέας χώρας. Στις χώρες της Δύσης τα ποσοστά αυξήθηκαν από την αρχή της δεκαετίας του 1900 μέχρι την δεκαετία του 1990. Στη δε Ιαπωνία, τα ποσοστά έχουν αυξηθεί τα τελευταία 30 χρόνια.

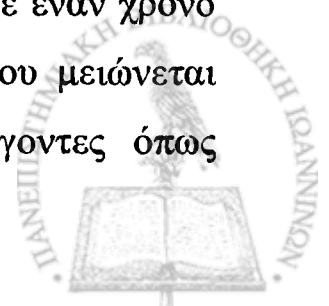
Αυτή η αύξηση των περιστατικών μπορεί να οφείλεται κατά κύριο λόγο στην εισαγωγή του προληπτικού ελέγχου (screening) με μαστογραφία, οπότε υπάρχει μεγαλύτερη καταγραφή περιστατικών, διότι αύξηση έχει παρατηρηθεί και σε μη δυτικές χώρες όπου έχει εισαχθεί ο έλεγχος αυτός. Σε αντίθεση, η θνησιμότητα από καρκίνο μαστού στην Μεγάλη Βρετανία, ΗΠΑ και αρκετές άλλες χώρες, έχει μειωθεί κατά την διάρκεια της δεκαετίας του 1990. Αυτή η μείωση είναι πιθανόν να οφείλεται σε βελτιώσεις στην διάγνωση και θεραπεία, παρά σε αλλαγές τις υποκείμενης επιδημιολογίας της ασθένειας ^[2].



1.2.2 Επιδημιολογία του καρκίνου του μαστού

Η αιτιολογία του καρκίνου του μαστού δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη. Η εξέλιξη του καρκίνου του μαστού χαρακτηρίζεται από μακρά διάρκεια. Επίσης έχει εμφανή ετερογένεια κυττάρων και ενδοκρινικών μηχανισμών, με αποτέλεσμα η ετερογένεια αυτή να είναι έντονη και μεταξύ ασθενών. Ο καρκίνος του μαστού συγκαταλέγεται συνήθως μεταξύ των πιο αργά εξελισσόμενων όγκων και η προκλινική περίοδος πριν την διάγνωση και οι κλινικές φάσεις μετά την αρχική θεραπεία, ακόμα και μετά την εμφάνιση μεταστάσεων μετρώνται σε χρόνια ή και δεκαετίες. Συνεπώς και η επιδημιολογική μελέτη αυτού του τύπου καρκίνου, εστιάζεται κυρίως στην νόσο καθώς γίνεται εμφανής σε πληθυσμούς, παρά σε άτομα, συγκρίνοντας έναν αριθμό συγκεκριμένων παραγόντων κινδύνου ^[3]. Η ηλικία είναι ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου, μιας και η εμφάνιση καρκίνου μαστού έχει αυξηθεί κατά 0.5% ετησίως καθώς ο πληθυσμός της Δύσης ηλικιώνεται. Άλλοι παράγοντες από τους οποίους εξαρτάται η εμφάνιση ή όχι καρκίνου του μαστού είναι η τεκνοποιία, η ηλικία της πρώτης ολοκληρωμένης εγκυμοσύνης, ο θηλασμός, ηλικία έναρξης έμμηνης ρύσης και ηλικία εμμηνόπαυσης, θεραπεία οιστρογόνων μετά την εμμηνόπαυση, το περιβάλλον, το άγχος και η διατροφή. Ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας είναι και το οικογενειακό ιστορικό στον καρκίνο του μαστού (οικογενής καρκίνος), ο οποίος δίνει έμφαση στο ρόλο της γενετικής σε αυτήν την ασθένεια. Ακολουθεί μία πιο εκτενής περιγραφή κάποιων από τους παραπάνω παράγοντες κινδύνου:

- i. **Έναρξη εμμήνου ρύσεως και εμμηνοριακού κύκλου:** Το ποσοστό κινδύνου εμφάνισης καρκίνου μαστού μειώνεται όσο πιο μεγάλη είναι η ηλικία έναρξης της εμμήνου ρύσεως. Για κάθε έναν χρόνο καθυστέρησης στην έναρξη αυτή το ποσοστό κινδύνου μειώνεται περίπου 5%. Αντιθέτως άλλοι εμμηνοριακοί παράγοντες όπως



διάρκεια κύκλου και τακτικότητα δεν έχουν συστηματικά συσχετισθεί με κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου μαστού.

- ii. **Τεκνοποιία και ηλικία πρώτου τοκετού:** Σε σύγκριση με άτεκνες γυναίκες, οι γυναίκες με τουλάχιστον μία πλήρη εγκυμοσύνη έχουν κατά μέσο όρο περίπου 25% μείωση στον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου μαστού. Επίσης αυξημένη προφύλαξη έχει παρατηρηθεί με το αυξανόμενο νούμερο από πλήρεις εγκυμοσύνες, με αποτέλεσμα μία γυναίκα με πέντε ή περισσότερα παιδιά να έχει περίπου τις μισές πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου μαστού από μία άτεκνη γυναίκα. Ένας παράγοντας που είναι ανεξάρτητος του αριθμού των τέκνων τα οποία έχει μία γυναίκα είναι η ηλικία του πρώτου τοκετού. Όσο μικρότερη η ηλικία τόσο μεγαλύτερη η προφύλαξη από τον καρκίνο του μαστού. Οι αποδείξεις για τις επιπτώσεις μιας μη ολοκληρωμένης εγκυμοσύνης, δεν είναι ξεκάθαρες αλλά δείχνουν ότι δεν έχουν μεγάλο βάρος στον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου μαστού.
- iii. **Θηλασμός:** Ο συσχετισμός μεταξύ του θηλασμού και του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου μαστού έχει γίνει το θέμα πολλών μελετών. Κάποιες έχουν αναφέρει ότι δεν υπάρχει συσχετισμός και κάποιες άλλες αναφέρουν ότι υπάρχει μειωμένος κίνδυνος, ειδικά σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Πρόσφατες μελέτες σε λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες, όπου η περίοδος θηλασμού μπορεί να είναι πολύ μεγάλη, αναφέρουν πολύ μεγάλες προστατευτικές επιπτώσεις. Προστατευτικές επιπτώσεις έχουν αναφερθεί και σε μελέτες από κάποιες, αλλά όχι από όλες, πιο ανεπτυγμένες χώρες. Για παράδειγμα, η US Cancer and Steroid Hormone Study, αναφέρει ότι ο θηλασμός για μία περίοδο 25 μηνών και περισσότερο, μειώνει τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού κατά 33% σε περισσότερες από 4500 γυναίκες που μελετήθηκαν.



- iv. Εμμηνόπαυση:** Προστατευτικό ρόλο κατά της εμφάνισης καρκίνου μαστού παίζει και η εμμηνόπαυση. Αυτό αποδεικνύεται από την καμπύλη εμφάνισης σε σχέση με την ηλικία. Ο σχετικός κίνδυνος της ανάπτυξης καρκίνου μαστού σε γυναίκες με φυσική εμμηνόπαυση πριν την ηλικία των 45 ετών είναι 0.73 σε σύγκριση με γυναίκες με φυσική εμμηνόπαυση μεταξύ των 45 και 54 ετών. Ο κίνδυνος αυξάνει κατά περίπου 3% για κάθε χρόνο καθυστέρησης της εμμηνόπαυσης. Το μέγεθος αυτής της επίπτωσης είναι παρόμοιο είτε η εμμηνόπαυση προέλθει φυσικά είτε ως αποτέλεσμα αμφίπλευρης ωοθηκεκτομής.
- v. Ενδογενείς ορμόνες:** Μελέτες που ερευνούν την σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης ορμονών στον ορό του αίματος και του καρκίνου του μαστού, σε γυναίκες που βρίσκονται στην εμμηνόπαυση, δείχνουν έναν θετικό συσχετισμό. Γυναίκες που βρίσκονται μετά την εμμηνόπαυση, με υψηλά επίπεδα οιστραδιόλης στον ορό, έχουν διπλάσιο κίνδυνο απ' ότι γυναίκες με μικρότερες συγκεντρώσεις. Για γυναίκες πριν την εμμηνόπαυση τα δεδομένα είναι λίγα και τα συμπεράσματα ασαφή. Μία ακόμη θετική συσχέτιση έχει παρατηρηθεί σε κάποιες μελέτες με άλλες ορμόνες φύλου όπως η προλακτίνη και ο αυξητικός παράγοντας της ινσουλίνης 1.
- vi. Στοματικά αντισυλληπτικά:** Στις γυναίκες που τώρα χρησιμοποιούν στοματικά αντισυλληπτικά, έχει παρατηρηθεί αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου μαστού κατά 25%. Αυτός ο κίνδυνος όμως μειώνεται μετά την διακοπή της λήψεως, ώστε μετά από δέκα χρόνια από την διακοπή δεν υπάρχει σημαντική αύξηση στον κίνδυνο. Επίσης, όσο πιο αργά αρχίσει η λήψη των αντισυλληπτικών, τόσο πιο μεγάλος ο αριθμός των επιπλέον περιστατικών καρκίνου μαστού.

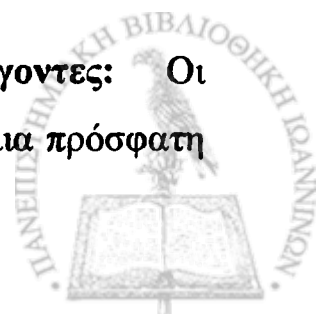


vii. Ορμονική θεραπεία για την εμμηνόπαυση: Γυναίκες που κάνουν ή είχαν κάνει πρόσφατα θεραπεία υποκατάστασης ορμονών, βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο από γυναίκες που δεν έχουν κάνει ποτέ αυτή την διαδικασία. Ο κίνδυνος αυξάνει με αυξανόμενη διάρκεια χρήσης αλλά και ο επιπλέον κίνδυνος μειώνεται μετά την διακοπή και μηδενίζεται μετά από 5 χρόνια μετά την χρήση ορμονοθεραπείας για την εμμηνόπαυση.

Πρόσφατες πιθανότητες δείχνουν ότι 10 χρόνια χρήσης ορμονοθεραπείας για την εμμηνόπαυση σε ηλικίες από 50 έως 60 ετών θα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των περιστατικών κατά 6 περιστατικά καρκίνου μαστού ανά 1000 γυναίκες ηλικίας 50 έως 70 ετών. Αυτές οι πιθανότητες σχετίζονται κατά ένα μεγάλο ποσοστό στην χρήση μόνο οιστρογόνων και η συνδυασμένη χρήση οιστρογόνων και προγεστερόνης επιφέρει μεγαλύτερες επιπτώσεις.

viii. Διατροφή: Τα καλύτερα δεδομένα ότι δίαιτες υψηλές σε λιπαρά αυξάνουν τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού, προέρχονται από τη συγκεντρωτική ανάλυση επτά μελετών οι οποίες δεν δείχνουν κάποιον συσχετισμό διατροφής και καρκίνου του μαστού. Έχουν μελετηθεί και άλλοι πιθανοί διαιτητικοί παράγοντες όπως η κατανάλωση κρέατος, φυτικών ινών, φρούτων, λαχανικών και φυτοοιστρογόνων, οι οποίοι έχουν δείξει μια σχετική προστατευτική επίδραση στην υψηλή κατανάλωση λαχανικών. Οι αναφορές για το κρέας, τις φυτικές ίνες και τα φρούτα είναι ασαφείς. Από την άλλη μεριά η κατανάλωση αλκοόλ είναι συσχετισμένη με μέτρια αύξηση κινδύνου. Πολλές μελέτες έχουν μελετήσει και την σχέση μεταξύ καπνίσματος και καρκίνου του μαστού και συνολικά δεν έχουν δείξει κάποια συσχέτιση.

ix. Οικογενειακό ιστορικό και γενετικοί παράγοντες: Οι περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου μαστού (75% σε μια πρόσφατη



Νορβηγική μελέτη σε 45000 ζευγάρια διδύμων) οφείλονται περισσότερο σε περιβαντολλογικούς παράγοντες και στον τρόπο ζωής παρά σε κληρονομούμενους γενετικούς παράγοντες. Παρ' όλα αυτά η οικογενειακή προδιάθεση μπορεί να παίζει ρόλο, κυρίως λόγω των κοινών περιβαντολλογικών παραγόντων και του παραπλήσιου τρόπου ζωής. Στις περισσότερες μελέτες, υπάρχει μια διπλάσια αύξηση του κινδύνου για συγγενείς πρώτου βαθμού όπως μητέρα, αδερφή, κόρη και μια μικρότερη αύξηση για συγγενείς δευτέρου βαθμού όπως γιαγιά, θεία και εγγονή. Υπάρχουν τουλάχιστον πέντε μεταλλάξεις της αναπαραγωγικής σειράς που έχουν αναγνωριστεί ότι ενέχονται για προδιάθεση για καρκίνο μαστού. Αυτές είναι τα BRCA1, BRCA2, p53, PTEN και ATM. Τα αλληλόμορφα γονίδια υψηλού κινδύνου πιθανώς να εμπλέκονται, σε οικογενειών με τέσσερα ή περισσότερα περιστατικά καρκίνου μαστού, δηλαδή ποσοστό περίπου 20-25% του οικογενούς καρκίνου του μαστού και 5% περίπου όλων των μη οικογενών καρκίνων του μαστού ^[4].

1.2.3 Προέλευση και είδη καρκίνου του μαστού

Ο όρος «καρκίνος του μαστού» περικλείει έναν μεγάλο αριθμό κακοηθών όγκων, οι οποίοι κατατάσσονται ανάλογα με την προέλευσή τους και τα ιστολογικά τους χαρακτηριστικά. Τα σαρκώματα του μαστού (κακοήθεις όγκοι που ξεκινούν από τον συνδετικό ιστό) συναντώνται σπάνια. Η μεγάλη πλειοψηφία των κακοηθών όγκων μαστού είναι τα καρκινώματα (κακοήθεις επιθηλιακοί όγκοι), τα οποία χωρίζονται σε δύο ομάδες:



- i. *In situ* καρκινώματα, τα οποία αποτελούνται από καρκινικά κύτταρα εντοπισμένα είτε στο επιθήλιο των πόρων (ductal carcinomas *in situ*, DCIS τα οποία χωρίζονται σε comedo και non-comedo) είτε στο επιθήλιο των λοβίων (lobular carcinomas *in situ*, LCIS) του μαστού, χωρίς διήθηση στο περιβάλλον στρώμα. Επίσης ένας τύπος μη διηθητικού καρκινώματος είναι και το ενδοκυστικό θυλώδες καρκίνωμα
- ii. Διηθητικά καρκινώματα όπου η βασική μεμβράνη έχει μερικώς ή πλήρως καταστραφεί και υπάρχει διήθηση στο περιβάλλον στρώμα.

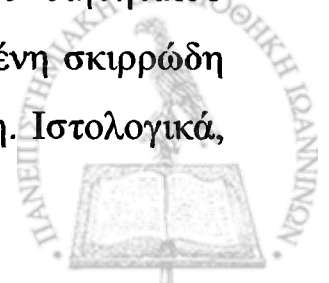
Η ομάδα των διηθητικών καρκινωμάτων περιλαμβάνει πάνω από δέκα διαφορετικά είδη. Τα διηθητικά πορογενή καρκινώματα μη ειδικού τύπου (65-80% των περιπτώσεων καρκίνου μαστού) και τα διηθητικά λοβιακά καρκινώματα (5-15% των περιπτώσεων) συνιστούν τους δύο κύριους τύπους, ενώ άλλα είδη όπως τα βλεννώδη, τα μυελώδη, τα σωληνώδη και τα αποκρινικά καρκινώματα είναι λιγότερο συχνά (0,1-4%). Εκτός από τα *in situ* και τα διηθητικά καρκινώματα, η νόσος της θηλής (νόσος του Paget) συνιστά μια ιδιαίτερη μορφή κακοήθους επιθηλιακού όγκου όπου το έσω-επιδερμικό διήθημα των κακοηθών κυττάρων είναι συσχετισμένο με DCIS στον υποκείμενο μαστό και συχνά συσχετίζεται επίσης με διηθητικούς καρκίνου μαστού. Τέλος ένας αριθμός όγκων είναι καλοήθεις. Έχουν περιγραφεί πολλά είδη, μεταξύ των οποίων είναι και η άτυπη επιθηλιακή υπερπλασία, η οποία θεωρείται προκαρκινική μορφή. Στην διατριβή αυτή μελετήθηκαν τα παρακάτω είδη καρκίνων:

1. **Πορογενές Διηθητικό Καρκίνωμα Μη Ειδικού Τύπου (Invasive Ductal Carcinoma No special Type (NST))**: Αυτό το είδος καρκινώματος αποτελεί τον πιο συχνό ιστολογικό τύπο καρκινώματος του μαστού. Η ονομασία του προέρχεται κυρίως με την «εις άτοπο διάγνωση», δηλαδή την έλλειψη χαρακτηριστικών



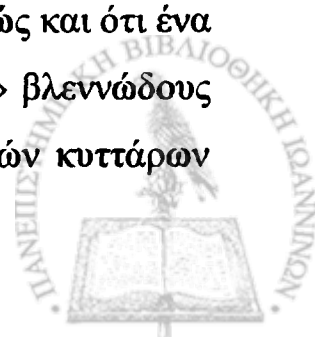
που θα το προσδιόριζαν ως λοβιακό άρα οι περισσότεροι το ονομάζουν πορογενές. Καθώς το σημείο αφετηρίας της κακοήθειας δεν αποδεικνύεται, μετά από αποκλεισμό όλων των ειδικών τύπων καρκίνου (εις άτοπο διάγνωση) συνήθως προτιμάται ο χαρακτηρισμός «μη ειδικού τύπου» (No Special Type, NST). Δεν υπάρχουν μακροσκοπικά ή μικροσκοπικά χαρακτηριστικά που να επιτρέπουν την αναγνώριση των νεοπλασμάτων μη ειδικού τύπου. Έτσι, αυτή και μόνο η έλλειψη ειδικών και σταθερών ιστολογικών χαρακτηριστικών, είναι αυτή που προσδιορίζει τα διηθητικά καρκινώματα μη ειδικού τύπου. Για παράδειγμα, συχνά απουσιάζει η ομοιομορφία του βλεννώδους και του μυελώδους καρκινώματος καθώς και η σαφής οριοθέτησή τους. Ιστολογικά παρατηρείται μια μεγάλη ποικιλομορφία χωρίς την κανονικότητα και ομοιομορφία σε όλη την έκταση του όγκου, που χαρακτηρίζουν τους ειδικούς τύπους καρκίνου. Χαρακτηριστικά διήθησης ενός κυττάρου συχνά παρατηρούνται αναμεμιγμένα με ασθενείς συνδετικές νήσους διηθητικών κυττάρων και περιστασιακά με ασθενείς σχηματισμένους αδένες. Μπορεί να υπάρξει συχνά υπόνοια αδενικών σχηματισμών, το οποίο είναι σταθερό χαρακτηριστικό σε όλο σχεδόν τον όγκο. Επίσης μπορούν να παρατηρηθούν μείγματα των παραπάνω προτύπων καθώς και χαρακτηριστικά των ειδικών τύπων καρκίνου, που θα αναφερθούν παρακάτω, τα οποία απαντώνται εστιασμένα ή βρίσκονται σε όχι τόσο καλό στάδιο σχηματισμού. Τα πυρηνικά χαρακτηριστικά μπορεί να είναι σχετικά κανονικά ή πολυμορφικά και περίεργα.

2. **Λοβιακό Διηθητικό Καρκίνωμα (Infiltrating Lobular Carcinoma):** Η μακροσκοπική δομή του λοβιακού διηθητικού καρκινώματος ποικίλει από μία σχετικά καλά ορισμένη σκιρρώδη μάζα σε μία φτωχά ορισμένη περιοχή με σκλήρυνση. Ιστολογικά,



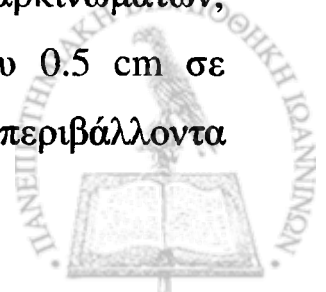
το λοβιακό διηθητικό καρκίνωμα πρέπει να περιλαμβάνει δύο βασικά χαρακτηριστικά τα οποία μπορεί να εμφανίζονται μαζί ή το καθένα μόνο του. Αυτά τα δύο χαρακτηριστικά είναι η κυτταρολογία και το πρότυπο διήθησης. Όταν εμφανίζονται και τα δύο, αναγνωρίζεται ένας κλασικός τύπος. Οι συμπαγείς και κυψελοειδής τύποι αναγνωρίζονται, όταν είναι παρόντα τα κατάλληλα κυτταρολογικά χαρακτηριστικά αλλά το πρότυπο διήθησης δεν είναι το κλασικό. Μια μεικτή ή πλειομορφική ομάδα αναγνωρίζεται όταν το κλασικό πρότυπο της διάχυτης εξάπλωσης είναι παρόν χωρίς τα απαραίτητα κυτταρολογικά χαρακτηριστικά ή όταν κλασικά συμπαγή ή κυψελοειδή πρότυπα είναι ανάμεικτα. Η ιστολογική εμφάνιση του κλασικού τύπου είναι ένα διάχυτο διηθητικό πρότυπο από μικρά, στρογγυλά και σχετικά συνήθη κύτταρα σε μονές γραμμές μεταξύ δεσμίδων κολλαγόνου. Η κυψελοειδής παραλλαγή έχει κυτταρικά συσσωματώματα, ομοιόμορφα σε εμφάνιση και η συμπαγής παραλλαγή έχει φύλλα κυττάρων. Ο μικτός ή άτυπος τύπος περιλαμβάνει αρκετά διαφορετικά ιστολογικά πρότυπα όπως μείγματα από οποιαδήποτε πρότυπα του κλασικού, συμπαγούς ή κυψελοειδούς τύπου ή ένα διάχυτο διηθητικό πρότυπο, κυτταρολογικά παράξενων κυττάρων, με την συχνή τάση να δημιουργούν συσσωματώματα.

3. **Βλεννώδες Καρκίνωμα (Mucinous Carcinoma):** Αυτός ο διακριτός τύπος διηθητικού καρκινώματος, είναι συνήθως 1-4 cm σε διάμετρο και χαρακτηρίζεται κυρίως από λεία, στρογγυλεμένα όρια και γυαλιστερή κοφτή επιφάνεια, καθώς και μαλακή υφή. Οι ιστολογικοί συσχετισμοί της συνολικής εμφάνισης, είναι τα λεία όρια του όγκου, τα οποία πιέζουν τις γύρω δομές καθώς και ότι ένα μεγάλο ποσοστό του όγκου αποτελείται από «λίμνες» βλεννώδους υλικού, μέσα στις οποίες συσσωματώματα καρκινικών κυττάρων



φαίνονται να αιωρούνται. Αυτό το καρκίνωμα συνώνυμα αναφέρεται και ως ζελατινώδες, κολλοειδές ή βλεννοειδές. Τα κύτταρα του όγκου είναι συνήθως διατεταγμένα σε κολλώδη συσσωματώματα ή νήσους με λεία όρια και είναι σταθερά χαρακτηρισμένα από έλλειψη αγνώστων γνωρισμάτων και από πυρήνες με μικρή ατυπία. Νέκρωση του όγκου και λεμφική διήθηση δεν παρατηρούνται συνήθως και είναι σπάνια επίσης η ύπαρξη ενός *in situ* συστατικού. Για να χαρακτηριστεί λοιπόν ένας όγκος ως βλεννώδης θα πρέπει να έχει τα βλεννώδη γνωρίσματα σε όλη την έκταση του όγκου. Οποιοδήποτε γνώρισμα μη ειδικού τύπου, αφαιρεί τον όγκο αυτόν από την κατηγορία του βλεννώδους. Με άλλα λόγια, για να χαρακτηριστεί ένας όγκος ως βλεννώδες καρκίνωμα, πρέπει να επιδεικνύει βλεννώδη χαρακτηριστικά σε καθαρή φόρμα σε όλη την έκταση του. Η εξαίρεση σε αυτό είναι μικρές περιοχές που παράγουν λίγη βλέννη και έχουν σταθερή κυτταρολογία με το υπόλοιπο του όγκου. Άλλη μία εξαίρεση είναι όταν η ιστολογική μελέτη ενός όγκου παρουσιάζει κυρίως βλεννώδη γνωρίσματα αλλά περιέχει και περιοχές σκληρότητας οι οποίες αποκαλύπτουν ότι ένα τμήμα του όγκου είναι μη-βλεννώδους τύπου. Η ιστολογική αναφορά τέτοιων όγκων θα πρέπει να αναφέρει ως διάγνωση «καρκίνωμα μαστού με επικρατούντα βλεννώδη γνωρίσματα», καθώς και το ποσοστό του κάθε τύπου.

4. **Σωληνώδες Καρκίνωμα (Tubular Carcinoma):** Η πλειοψηφία αυτών των όγκων είναι μικροί, συνήθως περίπου 1 cm στη μεγαλύτερη διάσταση τους. Οι σωληνώδεις καρκίνοι αποτελούν ένα μεγάλο ποσοστό των πολύ μικρών διηθητικών καρκινωμάτων, δηλαδή αυτών που το μέγεθός τους είναι περίπου 0.5 cm σε διάμετρο. Είναι σκληροί και στερεωμένοι στον περιβάλλοντα



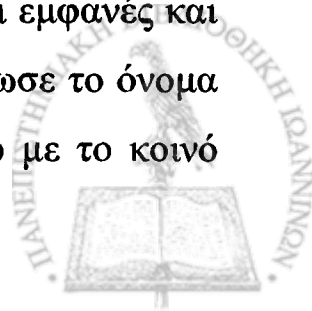
μαστό και όταν κοπούν μπορεί κεντρικά να δείξουν μια «ακτινωτή» εικόνα με ωχρές ραβδώσεις ελάστωσης. Ιστολογικά, οι σωληνώδεις δομές είναι χαρακτηριστικά οβάλ ή στρογγυλές, με ένα ανοιχτό κεντρικό διάστημα το οποίο είναι επιστρωμένο με μία μονή στρώση επιθηλίου με τα κύτταρά του να δείχνουν ίδια το ένα με το άλλο. Ένα συχνό και σχεδόν χαρακτηριστικό γνώρισμα είναι η κάμψη ή η γωνιοποίηση περιστασιακών διαστημάτων, παράγοντας σε σχήμα ένα λυγισμένο δάκρυ. Τα σωληνίδια είναι σχετικά ομοιόμορφα διεσπαρμένα σε ένα ινώδες στρώμα, το οποίο μπορεί να είναι πυκνό και κρυσταλλωμένο, ειδικά στο κεντρικό τμήμα του όγκου ή χαλαρό και φαινομενικά να εξαρτάται σε στοιχεία του όγκου. Είναι χαρακτηριστικό αυτών των όγκων να διηθούν το παρακείμενο λίπος χωρίς την ύπαρξη ινώδους ιστού ο οποίος διαχωρίζει τον όγκο από το λίπος. Δεν υπάρχει σχέση μεταξύ των σωληνωδών στοιχείων και της τοπικής αρχιτεκτονικής των λοβίων. Τα κύτταρα έχουν κανονικούς, στρογγυλούς πυρήνες συνήθως χωρίς πυρηνίσκους. Η όψη των αυλών, των κυττάρων αυτών, έχει βολβώδεις προεξοχές προερχόμενες από τις κορυφές τους. Εστίες *in situ* καρκινώματος, είναι συνήθως αναμεμιγμένες με τον διηθητικό όγκο. Το *in situ* καρκίνωμα συνήθως έχει κεντρική εντόπιση και είναι συνήθως ηθμοειδούς τύπου, αν και είναι συχνά πρότυπα θηλώδους τύπου. Συχνά όμως ο *in situ* πολλαπλασιασμός δεν εμπίπτει στα κριτήρια του *in situ* καρκινώματος και αναγνωρίζεται ως άτυπη υπερπλασία πορώδους προτύπου. Ένα πολύ μικρότερο ποσοστό σωληνωδών καρκινωμάτων συσχετίζεται με *in situ* καρκίνωμα λοβιακού τύπου. Επίσης απαντάται συχνά ελαστικός ιστός σε πηγμάτα στρώματος ή γύρω από πόρους.



5. Μυελοειδές Καρκίνωμα (Medullary Carcinoma): Αυτό η καλά αναγνωρίσιμη οντότητα, παρουσιάζεται ως μία λεία κυκλική μάζα που δεν είναι στερεωμένη στον παρακείμενο ιστό. Τα πλέον αναγνωρίσιμα χαρακτηριστικά του μυελοειδούς καρκινώματος είναι η σαφής οριοθέτηση με μία απαλή και ομοιόμορφη σύσταση. Ιστολογικά ο καρκίνος αυτός χαρακτηρίζεται από καρκινικά κύτταρα τα οποία δημιουργούν νήσους με ακανόνιστα όρια χωρίς σαφείς άκρες, τα οποία συχνά αλληλοσυνδέονται. Τα καρκινικά κύτταρα δεν διηθούν τον παρακείμενο μαστικό ιστό αλλά μάλλον δείχνουν να τον πιέζουν, με αποτέλεσμα να υπάρχουν λεία όρια χωρίς κάποια εμφανή κάψα. Εσωτερικά του όγκου υπάρχει στρώμα χαλαρού συνδετικού ιστού, συνήθως με ένα προεξέχων λεμφοκυτταρικό και/ή πλασμοκυτταρικό διήθημα. Το λεμφικό διήθημα δεν διασπείρεται ανάμεσα στα καρκινικά κύτταρα. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν μεγάλους πυρήνες και άφθονο κυτταρόπλασμα. Οι πυρήνες έχουν άτυπα ή περίεργα γνωρίσματα, μερικές καθαρές περιοχές και συνήθως περιέχουν πυρηνίσκους. Το κυτταρόπλασμα είναι ηωσινόφιλο, περιστασιακά κοκκώδες και τα κυτταροπλασματικά όρια είναι συνήθως ασαφή και μπορεί να είναι ακανόνιστα. ^[5]

6. Πορογενές Κομεδοκαρκίνωμα (Comedo) *In situ*

Ο όρος κομεδοκαρκίνωμα *in situ* χρησιμοποιείται για αλλοιώσεις χωρίς διήθηση του στρώματος. Τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα αυτού του τύπου *in situ* καρκινώματος, είναι η παρουσία νεκρωτικού κυτταρικού υλικού στα διαστήματα των πόρων και των λοβών. Καθώς αυτά τα διαστήματα συνήθως είναι διαμέτρου 2 ή και ακόμα 3 mm, το μαλακό νεκρωτικό υλικό είναι εμφανές και με γυμνό μάτι. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι που έδωσε το όνομα σε αυτόν τον τύπο όγκου, λόγω της ομοιότητάς του με το κοινό

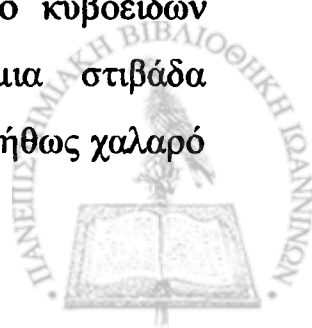


κομέδωμα. Ιστολογικά, το νεκρωτικό υλικό συνήθως τοποθετείται κεντρικά δημιουργώντας διαφορετικά επίπεδα κυτταρικής διάσπασης ή διάλυσης, περιλαμβανομένης και της ολικής απώλειας κυτταρικής λεπτομέρειας. Βιώσιμα κύτταρα είναι παρόντα σε στερεές ή διάτρητες μάζες δίπλα στο τοίχωμα του πόρου που περικλείει το νεκρωτικό υλικό. Τα κύτταρα είναι μεγάλα με αξιοσημείωτα άτυπα πυρηνικά χαρακτηριστικά και συχνά έχουν μεγάλη ποσότητα κυτταροπλασματικού υλικού. Αυτό το προχωρημένο επίπεδο κυτταρολογικής ατυπίας είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα του κομεδοκαρκινώματος *in situ* όσο είναι και η νέκρωση. ^[5]

Εκτός από τα κακοήθη είδη όγκων, απαντώνται και τα εξής καλοήθη:

1. Ινοαδένωμα (καλοήθης υπερπλαστική αλλοίωση του μαστού)

Το ινοαδένωμα, είναι η πιο συχνή καλοήθης αλλοίωση του μαστού και θεωρείται ότι αποτελεί μάλλον μία εντοπισμένη οζώδη υπερπλασία από αδενικό και συνδετικό ιστό και όχι ένα πραγματικό νεόπλασμα. Μακροσκοπικά το τυπικό ινοαδένωμα είναι περιγραπτό ογκίδιο και έχει διάμετρο που δεν ξεπερνά συνήθως τα 3 εκατοστά. Η επιφάνεια διατομής του προβάλλει, είναι συμπαγής, λευκόφαη και ελαστική και μπορεί να εμφανίζει σχισμοειδείς χώρους. Νέκρωση δεν παρατηρείται. Μικροσκοπικά, τα ινοαδενώματα ποικίλλουν σε εμφάνιση, γεγονός που εξαρτάται από την σχετική αναλογία των αδενικών τους στοιχείων και του συνδετικού υποστρώματος και διακρίνονται σε ενδοσωληνώδη και περισωληνώδη. Η διάκριση αυτή δεν έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία και συχνά οι δύο τύποι συνυπάρχουν στην ίδια αλλοίωση. Οι αδένες επενδύονται από ένα στοίχο κυβοειδών κυττάρων, κάτω από τον οποίο βρίσκεται μια στιβάδα μυοεπιθηλιακών κυττάρων. Το υπόστρωμα είναι συνήθως χαλαρό



και μυξωματώδες, μερικές φορές όμως αποτελείται εν μέρει ή εξ ολοκλήρου από πυκνό συνδετικό ιστό.

Κακοήθης εξαλλαγή των επιθηλιακών στοιχείων του ινοαδενώματος παρατηρείται σε αναλογία 0,1% των περιπτώσεων. Σαρκωματώδης εξαλλαγή του υποστρώματος είναι εξαιρετικά σπάνιο φαινόμενο ^[6].

2. Ινοκυστικές αλλοιώσεις του μαστού

Οι ινοκυστικές αλλοιώσεις θεωρούνται ότι οφείλονται σε διαταραχή (π.χ. διέγερση και στη συνέχεια αδυναμία υποστροφής) των κυκλικών αλλοιώσεων, που υφίσταται ο μαστός κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου.

Στον όρο «ινοκυστικές αλλοιώσεις» περιλαμβάνονται διάφορες ιστολογικές αλλοιώσεις, οι οποίες συνήθως συνυπάρχουν και ποικίλλουν σε αναλογία και βαρύτητα. Οι αλλοιώσεις αυτές περιλαμβάνουν:

- I. Την ίνωση που χαρακτηρίζεται από αύξηση του ινώδους υποστρώματος
- II. Τις κύστεις (συνήθως κατά την εμμηνόπαυση). Οι κύστεις σχηματίζονται από προοδευτική διάταση των τελικών πόρων των λοβίων. Με τις κύστεις συχνά παρατηρείται αποκρινής μεταπλασία ενώ μπορεί να συνυπάρχει και επιθηλιακή υπερπλασία με ή χωρίς ατυπία.
- III. Την σκληρυντική αδένωση που χαρακτηρίζεται από υπερπλασία των τελικών πόρων των λοβίων και συνοδεύεται από ίνωση του υποστρώματος. Ιστολογικά μοιάζει με το διηθητικό καρκίνωμα.

Την επιθηλιακή υπερπλασία (επιθηλίωση) που μερικές φορές συνοδεύεται από θηλωμάτωση των πόρων ^[6].



1.2.4 Μοριακή εξέλιξη του καρκίνου του μαστού

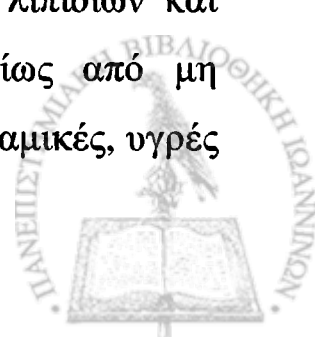
Ας δούμε ποιες εξελίξεις σε μοριακό επίπεδο οδηγούν σε καρκινογένεση τα επιθηλιακά κύτταρα μαστού. Μεταβολές στην δομή και στην έκφραση των ογκογονιδίων και των κατασταλτικών γονιδίων (όπως το *ras* και το *p53* αντίστοιχα) οι οποίες προκαλούν μια μη ισορροπημένη αύξηση χαρακτηρισμένη από υψηλά ποσοστά πολλαπλασιασμού και τελικά μετανάστευσης των κυττάρων, καθώς και τάσης να αντιστέκονται καλύτερα σε περιβαντολογικές παραμέτρους που υπό φυσιολογικές συνθήκες θα οδηγούσαν σε απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος). Παρόλα αυτά, οι όγκοι του μαστού εξελίσσονται αργά. Έχει υπολογιστεί ότι για να φτάσει ένας όγκος προερχόμενος από ένα κύτταρο, στο μέγεθος του 1 cm χρειάζονται 6-8 χρόνια. Αυτή η διαπίστωση υποδεικνύει την σημασία του ρόλου της ενδοκρινικής και παρακρινικής ρύθμισης της αύξησης των καρκινικών κυττάρων μαστού στην δημιουργία όγκων. Η αύξηση των καρκινικών κυττάρων μαστού βρίσκεται υπό τον έλεγχο οιστρογονικών ορμονών (οιστραδιόλης και προγεστερόνης) και αυξητικών παραγόντων. Τα οιστρογόνα είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των φυσιολογικών κυττάρων και κάποιων καρκινικών κυττάρων, γεγονός το οποίο έχει οδηγήσει σε στρατηγικές ανάπτυξης αντιοιστρογόνων για την διακοπή της ανάπτυξής τους. Το πιο διαδεδομένο αντιοιστρογόνο στην αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού είναι το Tamoxifen. Παρόλα αυτά κάποια κύτταρα δεν βασίζονται στα οιστρογόνα για την ανάπτυξή τους. Η επιθετικότητα των κυττάρων, τα οποία είναι ανθεκτικά στο Tamoxifen, είναι πολύ μεγαλύτερη όσον αφορά στον πολλαπλασιασμό και στη διηθητικότητά τους. Εκτός από τις οιστρογονικές ορμόνες, η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων μαστού μπορεί να ρυθμιστεί και από διάφορους αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και την απόπτωση. Για παράδειγμα ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας



(epidermal growth factor, EGF) και ο βήτα μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας (transforming growth factor beta, TGF-β) αυξάνουν ή εμποδίζουν αντίστοιχα την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων μαστού. Πολλοί υποδοχείς αυξητικών παραγόντων όπως οι IGFR-I, FGFR, EGFR και NGFR, έχουν προγνωστική αξία στον καρκίνο του μαστού. Συνολικά ο μηχανισμός δράσης αυτών των αυξητικών παραγόντων είναι ζωτικής σημασίας στην διαδικασία ανάπτυξης καρκίνου μαστού και αυτό το γεγονός έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία νέων στρατηγικών για πρόληψη, εντόπιση και αντιμετώπιση της νόσου. ^[2]

1.2.5 Κυτταρική μεμβράνη

Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι απαραίτητες στη ζωή ενός κυττάρου. Η κυτταροπλασματική μεμβράνη περικλείει το κύτταρο, καθορίζει τα όριά του και διατηρεί βασικές διαφορές μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος. Διαβαθμίσεις ιόντων κατά μήκος των μεμβρανών, οι οποίες καθιερώνονται μέσω των δράσεων ειδικών μεμβρανικών πρωτεϊνών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την σύνθεση ATP, για να οδηγήσουν την διαμεμβρανική κίνηση επιλεγμένων διαλυμάτων ή την παραγωγή και εκπομπή ηλεκτρικών σημάτων στα νευρικά και μυϊκά κύτταρα. Σε όλα τα κύτταρα η κυτταροπλασματική μεμβράνη περιέχει επίσης πρωτεΐνες ή οποίες δρουν ως ανιχνευτές εξωτερικών σημάτων, επιτρέποντας στο κύτταρο να αλλάζει την συμπεριφορά του ανάλογα με τα περιβαλλοντολογικά ερεθίσματα που δέχεται. Αυτοί οι πρωτεϊνικοί ανιχνευτές ή υποδοχείς, μεταφέρουν πληροφορίες αντί για ιόντα ή μόρια κατά μήκος της μεμβράνης. Παρόλες τις διαφορετικές τους λειτουργίες, όλες οι βιολογικές μεμβράνες έχουν κοινή δομή. Κάθε μία είναι μια λεπτή ταινία από μόρια λιπιδίων και πρωτεϊνών, τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους κυρίως από μη ομοιοπολικούς δεσμούς. Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι δυναμικές, υγρές



δομές και η πλειονότητα των μορίων τους μπορεί και μετακινείται στο επίπεδο της μεμβράνης. Τα λιπίδια είναι τοποθετημένα σε μια συνεχόμενη διπλή στοιβάδα με πάχος περίπου 5nm. Η λιπιδική διπλοστοιβάδα παρέχει την βασική δομή της μεμβράνης και συμπεριφέρεται ως ένα σχετικά αδιαπέραστο φράγμα στην δίοδο των περισσότερων υδατοδιαλυτών μορίων. Τα πρωτεϊνικά μόρια που είναι «διαλυμένα» στη λιπιδική διπλοστοιβάδα καθορίζουν τις περισσότερες από τις άλλες λειτουργίες της μεμβράνης, π.χ. μεταφέροντας συγκεκριμένα μόρια διαμέσου της μεμβράνης ή καταλύοντας αντιδράσεις συσχετισμένες με την μεμβράνη όπως η σύνθεση του ATP. Μερικές πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης εξυπηρετούν ως δομικές συνδέσεις με τον κυτταρικό σκελετό και/ή με το εξωκυτταρικό στρώμα ή με παράπλευρα κύτταρα, ενώ άλλες λειτουργούν ως υποδοχείς λαμβάνοντας και μεταδίδοντας χημικά σήματα στο περιβάλλον του κυττάρου. Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι ασύμμετρες δομές στο ότι η λιπιδική και πρωτεϊνική τους σύνθεση διαφέρει από τη μία στην άλλη και στην εξωτερική αλλά και στην εσωτερική πλευρά τους, με τέτοιο τρόπο που αντικατοπτρίζει τις διαφορετικές λειτουργίες που επιτελούνται στις δύο επιφάνειες της μεμβράνης. ^[7]

1.2.6 Μεμβρανικές πρωτεΐνες

Παρόλο που η βασική δομή μιας βιολογικής μεμβράνης προκύπτει από την λιπιδική διπλοστοιβάδα, οι περισσότερες ειδικές λειτουργίες της γίνονται από τις πρωτεΐνες. Η ποσότητα και ο τύπος των πρωτεϊνών στη μεμβράνη διαφοροποιείται από κύτταρο σε κύτταρο και αναλόγως με τον ρόλο του κυττάρου οι πρωτεΐνες μπορεί να αποτελούν π.χ. το 25% της μεμβράνης (μεμβράνη μυελίνης, όπου η μεμβράνη λειτουργεί ως ηλεκτρική μόνωση των αξόνων των νευρικών κυττάρων) είτε να αποτελούν ακόμα και το 75% της μεμβράνης, όπως στην περίπτωση των



μεμβρανών του μιτοχονδρίου όπου η μεμβράνη εμπλέκεται στην μεταγωγή ενέργειας. Η συνήθης κυτταροπλασματική μεμβράνη είναι κάπου στο ενδιάμεσο με περίπου 50% της μάζας της σε πρωτεΐνες. Επειδή τα λιπαρά μόρια είναι μικρά σε σύγκριση με τα πρωτεϊνικά μόρια, υπάρχουν πάντα περισσότερα λιπαρά μόρια σε μια μεμβράνη απ' ότι πρωτεϊνικά, περίπου 50 λιπαρά μόρια για κάθε μόριο πρωτεΐνης σε μια μεμβράνη με 50% πρωτεΐνη κατ' όγκο. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες, όπως και τα μεμβρανικά λιπίδια, έχουν συχνά αλυσίδες ολιγοσακχάρων ενωμένες πάνω τους. Έτσι η επιφάνεια που παρουσιάζει το κύτταρο προς τα έξω αποτελείται κυρίως από υδρογονάνθρακες, οι οποίοι δημιουργούν έναν γλυκοκάλυκα ή κυτταρικό κάλυμμα.^[7]

1.2.7 Καρκινικοί Δείκτες

Πολύ προσπάθεια έχει εστιαστεί στην αναγνώριση δεικτών καρκίνου και του ορού, για να βοηθήσουν στην διάγνωση και στην παρακολούθηση της αντίδρασης των ασθενών στην θεραπεία. Ένας χρήσιμος καρκινικός δείκτης είναι μία χημική ουσία η οποία βρίσκεται παρούσα σε αρκετά μεγαλύτερη ποσότητα σε έναν όγκο απ' ότι στον αντίστοιχο φυσιολογικό ιστό και (κατά προτίμηση) ο οποίος δεν εκφράζεται φυσιολογικά σε υγιή κύτταρα και ιστούς. Η αναγνώριση καρκινικών δεικτών μπορεί να δώσει την δυνατότητα στην χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων για θεραπευτική προσέγγιση με στόχευση συγκεκριμένων γονιδιακών προϊόντων τα οποία υπερεκφράζονται σε μεταστατικές ασθένειες. Αυτή η προσέγγιση έχει μακρά ιστορία με μικρή επιτυχία σε κλινική θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του μαστού. Επίσης αναζητούνται καρκινικοί δείκτες οι οποίοι έχουν μπει στον ορό, για την αναγνώριση ασθενών οι οποίοι έχουν υποτροπιάσει με μετάσταση πριν αυτές οι μεταστάσεις γίνουν αντιληπτές με συμβατικά οπτικά συστήματα όπως



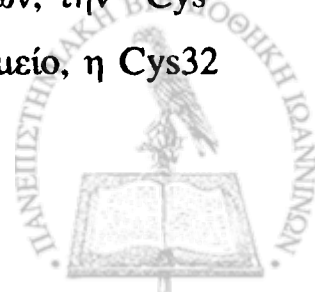
αξονική τομογραφία, scanning οστών και ακτινογραφία θώρακος. Οι CEA (carcino-embryonic antigen, καρκίνο-εμβρυϊκό αντιγόνο) και CA15.3, οι οποίες είναι και οι δύο πρωτεΐνες της οικογένειας του γονιδίου *mic*, έχουν προταθεί ως δείκτες ορού για την παρακολούθηση της ανάπτυξης μεταστάσεων μετά από θεραπεία για καρκίνο μαστού. Δυστυχώς όμως ούτε η CEA, ούτε η CA15.3 προσφέρουν βελτίωση στο χρόνο για την αναγνώριση μεταστατικού καρκίνου έναντι των συμβατικών οπτικών διαγνωστικών μεθόδων και έτσι δεν υπάρχει αυτή την στιγμή κάποιος χρήσιμος δείκτης. Οι πιο πολλά υποσχόμενοι καρκινικοί δείκτες έχουν γλυκοζυλιωθεί (πχ η CEA) και κάποια γλυκόφορμα φαίνεται να είναι ειδικά για τον καρκίνο (πχ η hCG). Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η χαρτογράφηση του πρωτεόματος και των ολιγοσακχάρων, μπορεί να είναι ένας χρήσιμος τρόπος για την αναγνώριση πρωτεϊνών και ολιγοσακχάρων τα οποία υπερεκφράζονται στον καρκίνο και στην μεταστατική ασθένεια ^[8]. Δύο πρωτεΐνες που προκύπτουν ως πιθανοί καρκινικοί δείκτες, κυρίως λόγω του συγκεκριμένου υποκυτταρικού τους εντοπισμού σε φυσιολογικές συνθήκες, είναι η θειορεδοξίνη (Thioredoxin-Trx) και η καλρετικουλίνη (Calreticulin- Crt).

1.2.8 Θειορεδοξίνη (Thioredoxin – Trx)

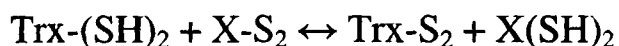
Η θειορεδοξίνη (Thioredoxin – Trx) αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1964 ^[9], ως δότης διθειϊκού υδρογόνου για την ριβονουκλεοτιδική αναγωγή, ένα απαραίτητο ένζυμο για την σύνθεση του DNA της *Escherichia Coli* ^[10].

1.2.8.1 Οξειδοαναγωγική βιοχημεία της θειορεδοξίνης

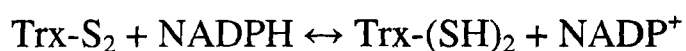
Η Trx έχει μία υψηλά διατηρημένη αλληλουχία αμινοξέων, την –Cys-Gly-Pro-Cys-. Τα δύο αμινοξέα κυστεΐνης στο ενεργό σημείο, η Cys32



και Cys35 (C32/C35), παίρνουν από μία αντιστρεπτή αντίδραση οξειδοαναγωγής η οποία δίνει ένα παράγωγο κυστεΐνης-δισουλφιδίου (Trx-S₂), μέσω της μεταφοράς αναγωγικών ισοδύναμων σε ένα δισουλφιδικό υπόστρωμα (X-S₂). Η οξειδωμένη θειορεδοξίνη ανάγεται πίσω στην μορφή της κυστεΐνης-θειόλης [Trx-(SH)₂] μέσω του NADPH-εξαρτώμενου ενζύμου, αναγωγάση της θειορεδοξίνης (Thioredoxin Reductase - TR) ^[9]. Η αντίδραση αυτή φαίνεται σχηματικά παρακάτω ^[9]:



TR



Η Trx και η γλουταθιόνη συνιστούν το βασικό σύστημα αναγωγής του κυττάρου ^[10].

1.2.8.2 Μορφές της θειορεδοξίνης

Έχουν κλωνοποιηθεί δύο μορφές θειορεδοξίνης, η θειορεδοξίνη-1 (Trx-1) και η θειορεδοξίνη-2 (Trx-2). Η ανθρώπινη Trx-1 είναι μια πρωτεΐνη που αποτελείται από 104 αμινοξέα με μοριακό βάρος 12kDa, η οποία περιέχει τις δύο κυστεΐνες του ενεργού σημείου -Trp-Cys³²-Gly-Pro-Cys³⁵-Lys ^[11-14] που απαντάται σε όλες τις θειορεδοξίνες, καθώς και τρεις πρόσθετες κυστεΐνες τις Cys⁶², Cys⁶⁹ και Cys⁷³, οι οποίες δεν απαντώνται στις βακτηριακές θειορεδοξίνες ^[9]. Η ανθρώπινη Trx κλωνοποιήθηκε ως ένα γονίδιο το οποίο κωδικοποιούσε έναν παράγοντα προερχόμενο από ενήλικα T-κύτταρα λευχαιμίας. Τα κύτταρα αυτά προέρχονταν από T κύτταρα τα οποία είχαν μεταμορφωθεί με τον ανθρώπινο ιό I λευχαιμίας T-κυττάρων ^[15-17].

1.2.9 Καλρετικουλίνη (Calreticulin - CRT)

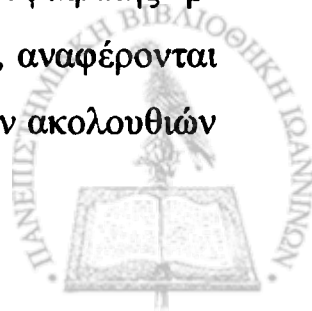
Η καλρετικουλίνη πρωτοαναγνωρίστηκε ως μία πρωτεΐνη του μυϊκού σαρκοπλασματικού δικτύου η οποία δεσμεύει ιόντα ασβεστίου (Ca²⁺) ^[18-20]. Χρειάστηκε λίγο παραπάνω από μία δεκαετία για να διαπιστωθεί ότι

αυτή η πρωτεΐνη υπάρχει σε πληθώρα και σε μη μυϊκούς ιστούς και ότι είναι μία από τις κύριες πρωτεΐνες δέσμευσης Ca^{2+} του ενδοπλασματικού δικτύου ^{[21], [22-24]}. Η καλρετικουλίνη έχει συσχετιστεί με την ρύθμιση μιας πληθώρας κυτταρικών λειτουργιών, αλλά το ποιος είναι ο ακριβής της ρόλος και ποια είναι η αιτία της πολύ μεγάλης διατήρησής της κατά την διάρκεια της εξέλιξης, παραμένουν άγνωστα ^[25].

1.2.9.1 Δομή της καλρετικουλίνης

Η καλρετικουλίνη είναι μια πρωτεΐνη 46 kDa, με υψηλή ικανότητα δέσμευσης Ca^{2+} , η οποία βρίσκεται σε αφθονία (με την εξαίρεση των ερυθροκυττάρων) σε κάθε κύτταρο των ανώτερων οργανισμών ^{[25], [26]}. Περιέχει μία εύσχιστη ακολουθία αμινοξέων σηματοδότησης στο N-άκρο και μία ακολουθία σηματοδότησης ανάκτησης KDEL ER στο C-άκρο. Αυτές οι συγκεκριμένες ακολουθίες αμινοξέων, είναι υπεύθυνες για την στόχευση και συγκράτηση της καλρετικουλίνης στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου. Η καλρετικουλίνη έχει τρία μόρια κυστεΐνης, τα οποία εντοπίζονται στην N-περιοχή της πρωτεΐνης. Είναι σημαντικό ότι ο εντοπισμός αυτών των αμινοξέων διατηρείται στην καλρετικουλίνη από τα ανώτερα φυτά έως αυτή του ανθρώπου. Οι δύο από τις τρεις κυστεΐνες δημιουργούν μια δισουλφιδική γέφυρα ($\text{Cys}^{120} - \text{Cys}^{146}$), η οποία πιθανόν να είναι σημαντική για το σωστό δίπλωμα της περιοχής του N-άκρου της καλρετικουλίνης ^[25].

Η ανθρώπινη καλρετικουλίνη αποτελείται από μία υδρόφοβη ακολουθία σηματοδότησης του ενδοπλασματικού δικτύου 17 αμινοξέων, ακολουθούμενη από 400 αμινοξέα της ώριμης πρωτεΐνης. Η ανάλυση της πρωτοταγούς ακολουθίας της πρωτεΐνης έχει οδηγήσει στην διαίρεσή της σε τρεις περιοχές. Τα 180 αμινοξέα του N-άκρου ονομάζονται η N-περιοχή και προβλέπονται να σχηματίζουν μια δομή σφαιρικής β-επιφανείας. Τα μόρια 180 – 290 είναι πλούσια σε προλίνη, αναφέρονται ως η P-περιοχή, και περιέχουν δύο σετ επαναλαμβανόμενων ακολουθιών

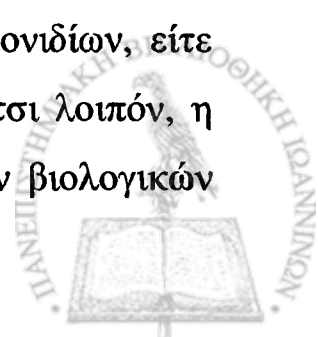


αμινοξέων, τα οποία είναι μοναδικά για την καλρετικουλίνη και για τα μοριακά της ομόλογα, την καλνεξίνη (calnexin) και καλμεγίνη (calmegin). Η Ρ-περιοχή προσδένεται στα Ca^{2+} και λειτουργεί ως η θέση πρόσδεσης υψηλής συγγένειας για τα Ca^{2+} της καλρετικουλίνης. Τα 110 αμινοξέα του C-άκρου της πρωτεΐνης (αναφέρονται ως η C-περιοχή), είναι πλουσία σε ασπαρτικό και γλουταμινικό οξύ και προσδένουν στα Ca^{2+} με χαμηλή συγγένεια αλλά με υψηλή ικανότητα (20 – 30 moles Ca^{2+} mole⁻¹ protein) [27], [28], [29, 30].

1.3 ΠΡΩΤΕΟΜΙΚΗ (PROTEOMICS)

1.3.1 Η Πρωτεομική (Proteomics) ως εργαλείο για την ανακάλυψη καρκινικών δεικτών και προφίλ επικοινωνιακών οδών στον καρκίνο του μαστού.

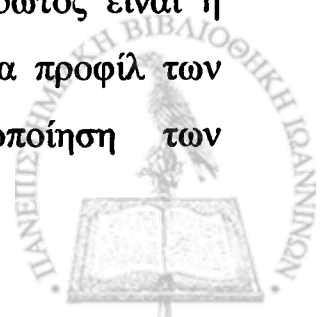
Στην κλινική πρακτική, μετά την ανακάλυψη ενός όγκου, ο χαρακτηρισμός του ως καρκίνος μαστού γίνεται με την χρήση της ιστολογίας. Παράμετροι όπως το μέγεθος του όγκου και η φλεγμονή, η ιστοπρογνωστικός βαθμός διαφοροποιήσεως (grading) και η ύπαρξη λεμφαδένων χρησιμοποιούνται για να αποφασιστεί η θεραπεία και να αξιολογηθεί η πρόγνωση. Κλινικά σήμερα χρησιμοποιούνται πολύ λίγοι μοριακοί δείκτες. Είναι ευρέως γνωστή σήμερα, η ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων μαστού στα οιστρογόνα, καθώς οι πρώτοι βιολογικοί δείκτες που προτάθηκαν στην ρουτίνα είναι η ύπαρξη υποδοχέων οιστραδιόλης και προγεστερόνης. Η ορθόδοξη όμως μέθοδος που χρησιμοποιείται για να αναγνωρίσει ανωμαλίες οι οποίες ενέχονται στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού, περιλαμβάνει την εντόπιση και/ή την ποσοτικοποίηση της έκφρασης νέων απομονωμένων γονιδίων, είτε αυτά είναι ογκογονίδια είτε ογκοκατασταλτικά γονίδια. Έτσι λοιπόν, η τελευταία λέξη της τεχνολογίας επιβάλλει την ανάγκη νέων βιολογικών



παραμέτρων και για τον εντοπισμό και την διαχείριση του καρκίνου του μαστού. Από κλινικής απόψεως, υπάρχει μία επιτακτική ανάγκη για μοριακούς δείκτες οι οποίοι θα μπορούσαν να βοηθήσουν την πρόωμη πρόγνωση καθώς και την σταδιοποίηση της ασθένειας.^[2]

Αυτή την ανάγκη, προσπαθεί σήμερα να καλύψει η πρωτεομική. Ο όρος «Πρωτέωμα» δόθηκε πρόσφατα για την περιγραφή ολόκληρου του πρωτεϊνικού συμπληρώματος του γονιδιώματος. Σε αντίθεση με το γονιδίωμα, το πρωτέωμα δεν είναι στατικό αλλά αλλάζει σύμφωνα με την κατάσταση του κυττάρου και των εξωτερικών περιβαντολογικών συνθηκών. Οι πρωτεΐνες που είναι παρούσες αλλάζουν διαρκώς σύμφωνα με τις οδηγίες στο γονιδίωμα και επίσης λόγω περιβαντολογικών ερεθισμάτων. Επίσης πολλές πρωτεΐνες στην βιολογικά ενεργή μορφή τους είναι μετά-μεταφραστικά τροποποιημένες από διαδικασίες όπως γλυκοζυλίωση, φωσφορυλίωση ή άλλες τροποποιήσεις. Η κατάσταση της τροποποίησης των πρωτεϊνών είναι ένας σημαντικός δείκτης για την κατάσταση του βιολογικού συστήματος.^[3] Η πρωτεομική είναι έτσι σχεδιασμένη ώστε να διασαφηνίζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα καθώς και τις μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων κάτω από διαφορετικές φυσιολογικές συνθήκες. Ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα προερχόμενα και από φυσιολογικά αλλά και από καρκινικά κύτταρα ή ιστούς, μπορούν να συγκριθούν με την χρήση υψηλής ευκρίνειας 2-DE (Δύο Επιπέδων Ηλεκτροφόρηση – Two Dimensional Electrophoresis) και να εντοπιστούν διαφορές. Οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος, μπορούν εν συνεχεία να χαρακτηριστούν με φασματογραφία μάζας.

Πρέπει λοιπόν να υπάρξουν δύο κύριοι στόχοι για την χρήση της πρωτεομικής ανάλυσης στον καρκίνο του μαστού. Ο πρώτος είναι η ανακάλυψη νέων καρκινικών δεικτών για την δημιουργία προφίλ των όγκων μαστού. Ο δεύτερος είναι η αποκωδικοποίηση των



ενδοκυτταρικών οδών επικοινωνίας, οι οποίες οδηγούν στην ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων μαστού. Αυτές οι πληροφορίες θα δώσουν την γνωστική βάση για την αναγνώριση θεραπευτικών στόχων και στην ανάπτυξη νέων στρατηγικών κατά του καρκίνου του μαστού. [2]

1.3.2 Η πρωτεομική ως εργαλείο για την αναγνώριση καρκινικών δεικτών στον καρκίνο του μαστού.

Η τεχνολογία που χρησιμοποιείται συνήθως για πρωτεομική ανάλυση είναι αυτή της 2D-E, η οποία επιτρέπει τον διαχωρισμό και την απεικόνιση χιλιάδων πρωτεϊνών από ένα πολύπλοκο μείγμα. Η 2D-E ανάλυση του καρκίνου του μαστού, πρωτοπορήθηκε πριν από την εμφάνιση της πρωτεομικής το 1995 [32]. Κατά την διάρκεια αυτής της προπρωτεομικής περιόδου, οι πρωτεΐνες μπορούσαν να αναγνωριστούν μετά από διαχωρισμό είτε με συνμετανάστευση, είτε με σήμανση συγκεκριμένου αντισώματος, είτε με χημικό μικρό-προσδιορισμό αλληλουχίας. Όλες αυτές οι προσεγγίσεις ήταν χρονοβόρες και δύσκολες στην πραγματοποίησή τους, παρόλο που επέτρεψαν την εγκαθίδρυση των πρωτεϊνικών προφίλ 2D-E μεταξύ όγκων μαστού και φυσιολογικού μαζικού ιστού και την ταυτοποίηση λίγων καρκινικών δεικτών ογκογένεσης. Από το 1974, είχε αναφερθεί η χρήση της 2D-E για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών του ορού του αίματος από καρκινοπαθείς, και είχαν παρατηρηθεί διαφορές στα πρωτεϊνικά πρότυπα καρκινοπαθών. Η πρώτη αυτή μελέτη όμως ήταν περισσότερο περιγραφική και δεν είχε γίνει καμία αναγνώριση πρωτεΐνης, πέραν της αλβουμίνης. Σε αντίθεση μερικά χρόνια αργότερα οι Westley και Rochefort εντόπισαν σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, μια εκκριθείσα γλυκοπρωτεΐνη 46 kDa η οποία είχε προκληθεί από οιστρογόνα και αποδείχτηκε, με χρήση συγκεκριμένων αντισωμάτων, ότι ήταν η πρωτεάση καθεψίνη D. Επίσης η παραγωγή του αναστολέα πρωτεασών α1-αντιχημοτρυψίνης

στον καρκίνο του μαστού, επιδείχτηκε μέσο της 2D-E, δείχνοντας την σημασία της εξωκυτταρικής ισορροπίας μεταξύ πρωτεασών /αντιπρωτεασών στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Με πολύ ενδιαφέρον έγινε και ανάλυση 2D-E σε μεγάλη κλίμακα, η οποία αποκάλυψε την λεπτή φύση των πρωτεϊνικών διαφορών που παρατηρούνται μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων. Τα ολικά προφίλ ήταν συνολικά αρκετά όμοια και μόνο ένα μικρό ποσοστό πρωτεϊνών είχε διαφορά στα επίπεδα έκφρασης μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών ιστών. Χρησιμοποιώντας υψηλότερα επίπεδα ευκρίνειας οι Wirth *et al* και Worland *et al*, έχουν δείξει ότι από περίπου 1000 κυτταροπλασματικά πολυπεπτίδια με χρώση αργύρου, τα 2D-E πρότυπα μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών ιστών διαφέρουν ποιοτικά σε έξι σημεία και ποσοτικά μόνο σε 22 σημεία. Το γεγονός ότι οι διαφορές που αναφέρονται είναι λίγες μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών μαζικών επιθηλιακών κυττάρων, δίνει έμφαση στην ανάγκη για χρησιμοποίηση ευαίσθητων και επαναλήψιμων πρωτοκόλλων ^[2]. Σε αντίθεση όμως των προαναφερθέντων ομοιοτήτων από μελέτες φυσιολογικών και καρκινικών ιστών, έρχονται αναφορές από σύγχρονες μελέτες που έχουν γίνει με χρήση κυτταρικών σειρών. Η ερμηνεία των μελετών αυτών είναι περιορισμένη από το γεγονός ότι πρωτογενή κύτταρα τα οποία έχουν αφαιρεθεί από το μικροπεριβάλλον του ιστού τους και έχουν καλλιεργηθεί *in vitro* μπορούν να χάσουν και/ή να αποκτήσουν διάφορα χαρακτηριστικά με την πάροδο του χρόνου. Η καλύτερη σύγκριση έχει δοθεί στον καρκίνο του προστάτη από τον Ornstein *et al*. Ανθρώπινα κύτταρα προστάτη έγιναν «αθάνατα» με την χρήση των μεταμορφωτικών πρωτεϊνών E6 και E7 του ανθρώπινου θηλωϊού. Όταν αυτά τα κύτταρα συγκρίθηκαν, με χρήση 2D-E και ανάλυσης εικόνας, με αυθεντικά καρκινικά κύτταρα από τον ίδιο ασθενή τα πρωτεϊνόματά τους βρέθηκαν να είναι λιγότερο από 20% όμοια. Αντίθετα τα φυσιολογικά και



καρκινικά κύτταρα από δείγματα χειρουργείου, ακόμα και μεταξύ διαφορετικών ασθενών, δείχνουν μια ομοιότητα της τάξεως περίπου του 95%.^[33]

1.3.3 Η Πρωτεομική στον ρόλο του αποκωδικοποιητή ενδοκυτταρικών οδών επικοινωνίας.

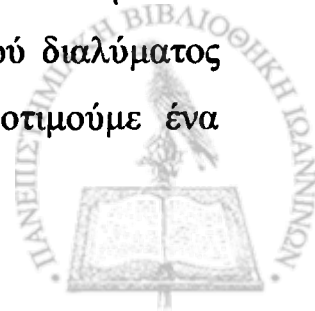
Η πρωτεομική συζητήθηκε πρώτη φορά ως η μέθοδος για την χαρτογράφηση όλων των κυτταρικών πρωτεϊνών σε πηκτώματα 2-DE. Αυτή η προοπτική, που ονομάστηκε πρωτεομική έκφρασης, συμπληρώνεται τώρα από ένα εξελισσόμενο πεδίο το οποίο ονομάζεται πρωτεομική λειτουργίας. Αυτό το πεδίο ασχολείται με τις αλληλεπιδράσεις και ενεργοποιήσεις των πρωτεϊνών σε λειτουργικό επίπεδο. Πρόσφατες δημοσιεύσεις έχουν δείξει την σημασία της πρωτεομικής για την μελέτη της ενδοκυτταρικής επικοινωνίας, ειδικά στην περίπτωση της διέγερσης των αυξητικών παραγόντων, ανοίγοντας τον δρόμο για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών της καρκινικής ανάπτυξης. Η αποκρυπτογράφηση των οδών επικοινωνίας που εμπλέκονται στην κυτταρική ανάπτυξη, είναι υψίστης σημασίας για την κατανόηση της ανάπτυξης ενός όγκου και της μετάστασης. Οι αυξητικοί παράγοντες, οι οποίοι είναι απαραίτητα πολυπεπτίδια για την ανάπτυξη του ευκαρυωτικού κυττάρου, εκκινούν την διέγερσή τους μέσω συγκεκριμένων μεμβρανικών υποδοχέων της κινάσης τυροσίνης, που με τη σειρά τους προκαλούν ενδοκυτταρικούς καταρράκτες πρωτεϊνό-φωσφορυλίωσης. Αυτοί ενεργοποιούν μια πληθώρα από πρωτεΐνες επικοινωνίας όπως οι πρωτεϊνικές κινάσες που ενεργοποιούνται από το μιτογόνο (MAP kinases). Αυτός ο καταρράκτης από πρωτεϊνικές φωσφορυλίωσης προκαλεί τελικά αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση με συνεπακολουθείς αλλαγές στην σύνθεση των πρωτεϊνών, οδηγώντας είτε σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό, σε διαφοροποίηση ή σε μετανάστευση.



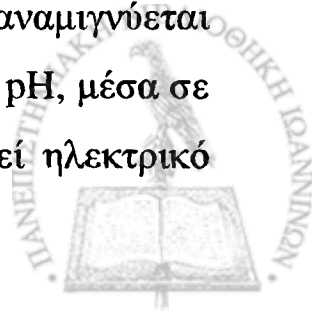
Μία κλασική μέθοδος μελέτης αυτών των διαδικασιών είναι ο διαχωρισμός και η επεξεργασία των πρωτεϊνών αυτών με 2-DE.^[2]

1.3.4 Ηλεκτροφόρηση Πηκτώματος Ακρυλαμιδίου Δύο Διαστάσεων (Two –Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis).

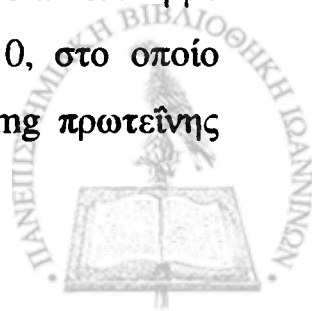
Η ηλεκτροφορητική μετανάστευση των πρωτεϊνών στην ηλεκτροφόρηση πηκτώματος εξαρτάται από δύο σημαντικούς παράγοντες, την ηλεκτροφορητική κινητικότητα της πρωτεΐνης και την αντίσταση του μέσου. Περίπου μισό αιώνα πριν, οι επιστήμονες διαπίστωσαν ότι ένα πολύπλοκο μείγμα πρωτεϊνών δεν μπορούσε να διαχωριστεί ευκρινώς μόνο από ηλεκτροφόρηση μίας διάστασης. Το 1956 οι Smithies και Roulik χρησιμοποίησαν ηλεκτροφόρηση χαρτιού και πηκτώματος αμύλου για να διαχωρίσουν πρωτεΐνες ορού. Διαπίστωσαν ότι «ο συνδυασμός δύο ηλεκτροφορητικών διαδικασιών σε ένα πήκτωμα σε ορθή γωνία θα πρέπει να δίνει μία πολύ μεγαλύτερη ικανότητα ευκρίνειας απ' ότι μπορεί η κάθε μία χωριστά». Οι δύο διαδικασίες ήταν i) μοριακό μέγεθος και ii) κινητικότητα σε ελεύθερο διάλυμα σε πήκτωμα αμύλου. Αργότερα το 1962 οι Raymond και Aurell αντιλήφθηκαν τις μη γραμμικές επιπτώσεις της συγκέντρωσης του πηκτώματος, στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πρωτεϊνών. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποίησαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις πηκτώματος για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών ορού: 5% ακρυλαμίδιο για την πρώτη διάσταση ακολουθούμενο από ένα πήκτωμα 8% για την δεύτερη διάσταση. Δύο χρόνια αργότερα ο Raymond διαπίστωσε τα πλεονεκτήματα της ηλεκτροφόρησης σε μορφή επίπεδων πηκτωμάτων αντί κυλινδρικών σωλήνων. Η διαδικασία που χρησιμοποίησε ο Raymond αποτελείτο από ένα κάθετο επίπεδο πήκτωμα το οποίο είχε παρασκευαστεί σε μία ειδικά σχεδιασμένη μονάδα η οποία συνδύαζε ένα καλούπι πηκτώματος, ντεπόζιτα ρυθμιστικού διαλύματος και ηλεκτρόδια, και πλάκες ψύξης. Δήλωσε ότι « Προτιμούμε ένα



επίπεδο πήκτωμα έναντι ενός κυλινδρικού πηκτώματος για διάφορους λόγους. Πρώτον, το επίπεδο πήκτωμα δίνει την μέγιστη επιφάνεια ψύξης του πηκτώματος. Δεύτερον, τα επακόλουθα πρότυπα είναι πιο εύκολα να ποσοτικοποιηθούν σε τυπικούς πυκνομετρητές εγγραφής. Τρίτον, ένας μεγάλος αριθμός δειγμάτων μπορεί να κατεργάζεται σε ένα μόνο πήκτωμα, διευκολύνοντας έτσι την ευθεία σύγκριση των δειγμάτων που κατεργάστηκαν κάτω από όμοιες συνθήκες. Τέταρτον, και σημαντικότερο, τα επίπεδα πηκτώματα επιτρέπουν την εφαρμογή τεχνικών δύο διαστάσεων». Αυτές οι δηλώσεις είναι τόσο αληθινές σήμερα όσο ήταν και το 1964 και είναι η βάση για την μοντέρνα 2D-PAGE. Ο Raymond χρησιμοποίησε πηκτώματα ακρυλαμιδίου για τα 2-D πειράματά του, τα οποία ονόμασε «ορθογώνια ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων ή Orthacryl». Σύμφωνα με τον Raymond «η χρήση πηκτωμάτων ακρυλαμιδίου σε δύο ορθογώνιες κατευθύνσεις, έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη ευκρίνεια και πληροφορίες για το μοριακό βάρος και το σχήμα των σχετικών πρωτεϊνών». Οι παραπάνω πρωτοποριακές προσεγγίσεις (όπως και πολλές άλλες), που εφαρμόστηκαν στον διαχωρισμό των πρωτεϊνών του ορού, έδωσαν έναν μικρό αριθμό πρωτεϊνών κυρίως τις πιο άφθονες. Η εισαγωγή από τον O' Farrell της 2D-E για διαχωρισμό των κυτταρικών πρωτεϊνών κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, επέτρεψαν τον διαχωρισμό εκατοντάδων πρωτεϊνών και είναι η βάση της μοντέρνας 2D-E. Η αρχή της διαδικασίας είναι Ισοηλεκτρική Εστίαση (Isoelectrofocusing- IEF) στην πρώτη διάσταση, ακολουθούμενη από ηλεκτροφόρηση με παρουσία sodium dodecyl sulphate (SDS), για διαχωρισμό των πρωτεϊνών κατά βάρος στην δεύτερη διάσταση. Η Ισοηλεκτρική Εστίαση (IEF) είναι μία διαδικασία απλή στην κατανόηση και εφαρμογή. Το πρωτεϊνικό δείγμα αναμιγνύεται με το μείγμα μεταφορικών αμφολυτών στο επιθυμητό εύρος pH, μέσα σε μία εστιακή μονάδα. Εάν σε αυτή την μονάδα εφαρμοστεί ηλεκτρικό



ρεύμα, οι πρωτεΐνες θα μεταναστεύσουν σε μία θέση εντός της βαθμίδωσης του pH, αντίστοιχη με το αντίστοιχό τους ισοηλεκτρικό σημείο (pI). Το αποτέλεσμα είναι η «εστίαση» των πρωτεϊνών σε στενές ζώνες στις τιμές του pI τους. Η τεχνική της IEF εφαρμόζεται με διάφορους τύπους συσκευών όπως με τα Rotofors, όπου οι πρωτεΐνες και το αμφολυτικό διάλυμα βρίσκονται στην υγρή φάση και οι επακόλουθες ζώνες pI λαμβάνονται ως υγρά κλάσματα. Επίσης υπάρχει και η τεχνική με χρήση λεπτών κυλινδρικών πηκτωμάτων ακρυλαμιδίου, τα οποία πηκτώματα τοποθετούνται σε ορθή γωνία πάνω σε επίπεδα πηκτώματα για την δεύτερη διάσταση αφού στερεωθούν με διάλυμα αγαρόζης. Η σύγχρονη προσέγγιση της 2D-PAGE δηλώνει ότι παρόλο που μία από τις δυνατότητές της είναι η ικανότητά της να παρέχει μία αναπαράσταση του πρωτεομικού δείγματος με ένα μόνο πείραμα διαχωρισμού, είναι αποδεκτό ότι υπάρχουν περισσότερες πρωτεΐνες παρούσες σε ένα πολύπλοκο πρωτεομικό δείγμα απ' ό,τι μπορούν να απεικονισθούν σε ένα μόνο πηκτώμα. Για τον λόγο αυτό οι Hoving *et al* ^[34] ανέπτυξαν μία μέθοδο 2D-PAGE όπου χρησιμοποιούν λουρίδες στενού εύρους ακινητοποιημένης βαθμίδωσης pH (immobilized pH gradient – IPG) για την πρώτη διάσταση. Αυτή η μέθοδος βασίστηκε στην μέθοδο των Bjellqvist *et al* ^[35], οι οποίοι ανέπτυξαν τις λουρίδες IPG το 1982 και έδωσαν πολλά πλεονεκτήματα στην 2D-PAGE. Τα κυριότερα από αυτά ήταν ότι οι λουρίδες IPG έδιναν υψηλή ευκρίνεια και δυνατότητα φόρτωσης μεγαλύτερης ποσότητας δείγματος, ομοιόμορφη αγωγιμότητα και η ιοντική τους δύναμη ήταν γνωστή και ελεγχόμενη. Οι Hoving *et al* λοιπόν με την χρήση των IPG στενού εύρους pH (3.5-5, 4.5-5.5, 5-6, 5.5-6.7, 6.2-8.2 και 7-10) κατάφεραν να δουν συνολικά περίπου 5000 στίγματα στα αντίστοιχα πηκτώματα δεύτερης διάστασης σε αντίθεση με το πηκτώμα που προήλθε από ένα IPG εύρους pH 3-10, στο οποίο έβλεπαν περίπου 1500 στίγματα. Επίσης, ενώ μόνο 0.8 mg πρωτεΐνης



μπορούσαν να φορτωθούν σε ένα πήκτωμα, με τα υπερανλυτικά πηκτώματα μπορούσαν να φορτώσουν 11 mg ολικής πρωτεΐνης. Πρέπει να τονισθεί ότι ενώ η παραπάνω μέθοδος δεν συνίσταται όταν είναι περιορισμένη η ποσότητα του δείγματος, δίνει παρόλα αυτά μεγαλύτερη ευαισθησία στην εντόπιση μεγαλύτερου αριθμού πρωτεϊνών και ειδικότερα των λιγότερο άφθονων, όταν βέβαια η ποσότητα του δείγματος δεν είναι πρόβλημα.

Συμπερασματικά λοιπόν, ενώ η τεχνική της 2D-E είναι ικανή να διακρίνει χιλιάδες πρωτεΐνες, οι πιο άφθονες είναι αυτές που τελικά διακρίνονται μέσο της χρώσης και αναγνωρίζονται από την σύγκριση πηκτωμάτων σε δημοσιευμένες βάσεις δεδομένων και προσδιορισμό αλληλουχίας του N-άκρου και με μεθόδους φασματογραφίας μάζας^[33, 36]. Σε ενίσχυση αυτής της διαπίστωσης αναφέρετε ο Vuong *et al*^[36] λέγοντας ότι μέθοδοι εντόπισης όπως ο φθορισμός, οι χρώσεις ιμαδιζόλης/ψευδαργύρου ή νιτρικού αργύρου δεν μπορούν να εντοπίσουν πρωτεΐνες με παρουσία λιγότερη από 1000 μόρια ανά κύτταρο^[33, 36]. Παρ' όλους τους περιορισμούς της η 2D-E είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη πολυδιάστατη τεχνική διαχωρισμού και ανάλυσης πρωτεϊνών. Μία από τις βασικές της δυνάμεις, είναι η δυνατότητα που δίνει στους ερευνητές να συγκρίνουν αξιόπιστα και γρήγορα τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης σε υγιή και ασθενή δείγματα. Η 2D-PAGE έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση ενός τεράστιου αριθμού πολύπλοκων συστημάτων όπως πλάσμα από ασθενείς με Alzheimer, κυτταρικές σειρές από καρκίνο του παχέος εντέρου, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, μεμβρανικές πρωτεΐνες, κ.α.^[37]



ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η συγκριτική μελέτη των κυτταροπλασματικών και μεμβρανικών πρωτεϊνών και ο εντοπισμός διαφορών, μεταξύ καρκινικών και μη καρκινικών ιστών που προέρχονται από ασθενείς με καρκίνο του μαστού, με την μέθοδο της Ηλεκτροφόρησης Δύο-Επιπέδων (Two-Dimensional Electrophoresis – 2D-E)



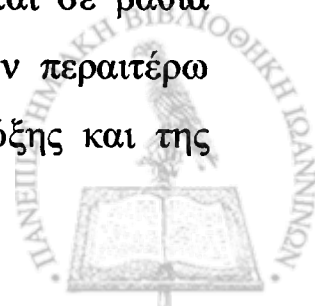
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συλλογή και αρχική επεξεργασία ιστών

Στην διατριβή αυτή μελετήθηκαν 75 ιστοί εκ των οποίων 50 ήταν καρκίνοι διαφόρων τύπων και 25 φυσιολογικοί, οι οποίοι προήλθαν από την Κλινική Μαστού του Αντικαρκινικού Νοσοκομείου «Ο Άγιος Σάββας». Οι καρκινικοί ιστοί προήλθαν από ασθενείς με καρκίνο του μαστού όλων των Grade και σε ποσοστό 92.5% ήταν είτε διηθητικό πορογενές καρκίνωμα μη ειδικού τύπου, είτε διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα. Το υπόλοιπο 7.5% ήταν 1 σωληνώδες καρκίνωμα, 2 βλεννώδη καρκινώματα και τέλος 1 μυελοειδές καρκίνωμα. Οι φυσιολογικοί ιστοί ήταν σε ποσοστό 100% ινοαδενώματα. Πιο αναλυτικά οι καρκινικοί ιστοί ταξινομούνται ως εξής:

1. **Grade I:** 5 δείγματα
2. **Grade II:** 20 δείγματα
3. **Grade III:** 25 δείγματα

Τα τμήματα των ιστών αμέσως μετά την χειρουργική τους εκτομή τοποθετούνται σε κρύο (4° C) φυσιολογικό ορό. Μετά την μεταφορά τους στο εργαστήριο, οι ιστοί ξύνονται με ένα νυστέρι για να απομακρυνθεί τυχόν λίπος και πλένονται δύο έως τρεις φορές με κρύο φυσιολογικό ορό (4° C), για την απομάκρυνση αίματος και κομματιών λίπους. Η διαδικασία αυτή είναι σημαντική γιατί η παρουσία λίπους και αίματος κάνουν την μελέτη του δείγματος δύσκολη. Για τον λόγο αυτόν πρέπει να είναι διεξοδική. Κατόπιν αυτού, τοποθετούνται σε πλαστικό δοχείο το οποίο περιέχει παγωμένο ισοπεντάνιο (-80° C), το οποίο βυθίζεται σε υγρό άζωτο. Οι παγωμένοι ιστοί φυλάσσονται σε βαθιά κατάψυξη (- 80° C) μέσα σε πλαστικά τριβλία μέχρι την περαιτέρω χρήση τους. Η διαδικασία αυτή του καθαρισμού, της ψύξης και της



φύλαξης πρέπει να γίνεται σε διάστημα το πολύ μισής με μίας ώρας ($1/2 - 1$ h) από την ώρα της εκτομής, αλλιώς υπάρχει κίνδυνος καταστροφής των πρωτεϊνών του ιστού από πρωτεάσες.

2.2 Ομογενοποίηση ιστών

Ο παγωμένος ιστός που πρόκειται να αναλυθεί, τοποθετείται σε δοχείο με πάγο και παραμένει έως ότου φθάσει την θερμοκρασία των -4° C. Αμέσως μετά, ο ιστός κόβεται σε μικρά τεμάχια και τοποθετείται σε χειροκίνητο ομογενοποιητή των 5 ml τύπου Potter – Elvehjem. Οι ομογενοποιητές αυτοί έχουν την δυνατότητα, λόγω της τραχιάς εσωτερικής επιφάνειας του γυαλιού του σωλήνα και της μύτης του γυάλινου εμβόλου, να συνθλίβουν τον συνδετικό ιστό του μαστού με αποτέλεσμα να υπάρχει η μέγιστη απόδοση των ουσιών του δείγματος. Στον ομογενοποιητή προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης I και κατόπιν αυτού ομογενοποιείται ο ιστός με χρήση συνολικής ποσότητας 8 ml ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης I (δύο (2) δόσεις των 4 ml). Το διάλυμα που προκύπτει διηθείται με nylon γάζα (40 threads/cm) για απομάκρυνση τυχόν κομματιών του ιστού που έχουν αναμιχτεί με το διάλυμα και μεταγγίζεται σε σωλήνες τύπου Falcon των 50 ml. Η όλη διαδικασία πρέπει να γίνεται στον πάγο για τους προαναφερθέντες λόγους παρόλο που το ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης I περιέχει αναστολείς πρωτεασών όπως το PMSF.

2.3 Απομόνωση κυτταροπλασματικού και μεμβρανικού υλικού

2.3.1 Απομάκρυνση πυρήνων

Το ομογενοποίημα τοποθετείται σε σωλήνες των 50 ml, τύπου Oakridge, και φυγοκεντρείται στα 1000g για 15 λεπτά στους 4° C σε επιταρξία



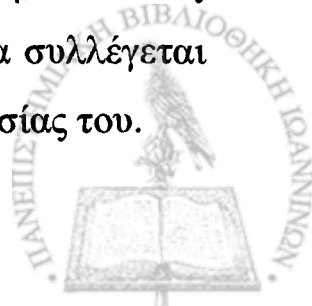
ψυχόμενη φυγόκεντρο (Biofuge 28RS, Heraeus) για να απομακρυνθεί το πυρηνικό υλικό των κυττάρων καθώς και άθραυστα κύτταρα.

2.3.2 Διαχωρισμός κυτταροπλασματικού και μεμβρανικού υλικού

Το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει μεμβρανικό και κυτταροπλασματικό υλικό, συλλέγεται και μεταγγίζεται σε σωλήνες επιδαπέδιας υπερφυγοκέντρου. Οι σωλήνες με τα πώματά τους ισοζυγίζονται σε ζυγό ακριβείας με ζητούμενη ακρίβεια τριών δεκαδικών ψηφίων, για αποφυγή σοβαρού ατυχήματος λόγω ανισορροπίας των σωλήνων. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρείται στα 100.000g (35.000 rpm) για 1 ώρα στους 4°C, προκειμένου να κατακρημνιστεί το μεμβρανικό υλικό και να συλλεχθεί με την μορφή ιζήματος.

2.3.3 Ανταλλαγή διαλυμάτων

Το υπερκείμενο δείγμα συλλέγεται και τοποθετείται σε Snake Skin Dialysis Membrane (Pierce). Η μεμβράνη τοποθετείται σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως στο οποίο έχουν προστεθεί 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης II. Η μεμβράνη αναδεύεται με μαγνητικό αναδευτήρα για μία (1) ώρα σε θάλαμο ψύξης (cold room) στους 4° C. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές με ανανέωση κάθε φορά του ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης II (σύνολο 3X100 ml = 300 ml ρυθμιστικού διαλύματος). Το αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής είναι η απομάκρυνση του ρυθμιστικού διαλύματος ομογενοποίησης I το οποίο περιέχει σουκρόζη, της οποίας η παρουσία δεν είναι επιθυμητή μιας και το δείγμα στην συνέχεια λυοφιλοποιείτε σε λυοφιλοποιητή ... καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας. Η παρουσία σουκρόζης στο δείγμα θα είχε ως αποτέλεσμα την κολλώδη υφή του δείγματος μετά την λυοφιλοποίηση, κάνοντας αδύνατη την περαιτέρω επεξεργασία του. Το λυοφιλοποίημα συλλέγεται και φυλάσσεται στους - 80° C μέχρι της περαιτέρω επεξεργασίας του.



2.3.4 Διαλυτοποίηση του μεμβρανικού ιζήματος

Το ίζημα της υπερφυγοκέντρωσης συλλέγεται σε σωλήνες του 1.5 ml τύπου Eppendorf στους οποίους προστίθεται ανάλογη ποσότητα ReadyPrep Sequential Extraction Kit Reagent 3 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Η ποσότητα του ReadyPrep Sequential Extraction Kit Reagent 3 καθορίζεται από την ποσότητα του ιζήματος, με έμφαση στην μικρή αραίωση του δείγματος. Τα Eppendorfs καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να διαλυθούν οι μεμβράνες και οι πρωτεΐνες να περάσουν στην υγρή φάση. Την επομένη το διάλυμα φυγοκεντρείται σε επιτραπέζια ψυχόμενη φυγόκεντρο (Biofuge 28RS, Heraeus) στα 39.000g για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου για να απομακρυνθούν όλα τα αδιάλυτα σωματίδια. Το υπερκείμενο συλλέγεται και φυλάσσεται στους -80°C .

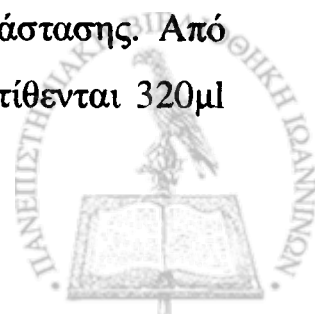
2.4 Ποσοτικός καθορισμός πρωτεΐνης

Το κυτταροπλασματικό κλάσμα το οποίο προέκυψε από την μέθοδο 2.3.3 διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ουρίας (CSB). Μετά την διάλυση, καθορίζεται η ποσότητα του πρωτεϊνικού περιεχομένου σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford με χρώση του δείγματος με Coomassie Brilliant Blue G250 (Sigma), σε φωτόμετρο τύπου Hitachi 2000 με μήκος κύματος 580nm. Ο καθορισμός της πρωτεϊνικής ποσότητας του μεμβρανικού κλάσματος που προέκυψε από τη μέθοδο 2.3.4, γίνεται με την ίδια μέθοδο με την μόνη διαφορά ότι το δείγμα δεν διαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα ουρίας μιας και το ReadyPrep Sequential Extraction Kit Reagent 3 περιέχει ουρία.

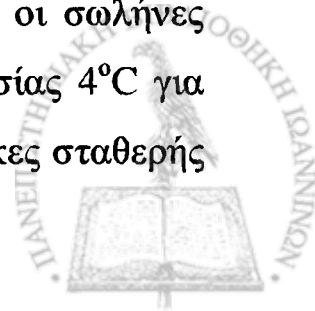
2.5 Ηλεκτροφόρηση Δύο Διαστάσεων

2.5.1 Ισοηλεκτρική Εστίαση (Isoelectrofocusing)

Παρασκευάζονται 16ml διαλύματος ακρυλαμιδίου $1^{\text{ης}}$ διάστασης. Από αυτό το διάλυμα χρησιμοποιούνται 8ml, στα οποία προστίθενται 320μl



αμφολύτη pH 4-7 (BDH Laboratories) και 80μl αμφολύτη pH 3-10 (BDH Laboratories). Το διάλυμα απαερώνεται με χρήση αντλίας κενού για περίπου 15min. Πρέπει να σημειωθεί ότι το κενό πρέπει να εφαρμόζεται στο διάλυμα σταδιακά αλλιώς υπάρχει κίνδυνος κρυστάλλωσης της ουρίας που περιέχεται στο διάλυμα. Μετά την απαέρωση προστίθενται στο διάλυμα 12.8μl από διάλυμα 10% Ammonium Persulfate (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) και 10.4μl TEMED (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Το διάλυμα φορτώνεται σε γυάλινους σωλήνες εσωτερικής διαμέτρου 1.5mm και μήκους 180mm, των οποίων το κάτω άκρο έχει σφραγιστεί με Parafilm και αφήνεται να πήξει για περίπου δύομισι ώρες. Μετά την πάροδο αυτού του χρόνου οι σωλήνες τοποθετούνται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης 1^{ης} διάστασης Model 175 Tube Gel Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Στην συνέχεια παρασκευάζονται τα ρυθμιστικά διαλύματα ηλεκτροφόρησης. Το διάλυμα καθόδου είναι καυστικό νάτριο (NaOH), με το οποίο καθαρίζεται η πάνω πλευρά, όπως έχει φορτωθεί το πήκτωμα, του σωλήνα ή αλλιώς το όξινο άκρο του πηκτώματος. Το διάλυμα καθόδου έχει όγκο 500ml το οποίο εκχέετε στο πάνω διαμέρισμα της συσκευής. Το διάλυμα ανόδου είναι φωσφορικό οξύ, όγκου 4.5lt, με το οποίο καθαρίζεται η κάτω πλευρά του σωλήνα ή αλλιώς το βασικό άκρο του πηκτώματος. Στη συνέχεια το υπόλοιπο διάλυμα ανόδου εκχέετε στο κάτω διαμέρισμα της συσκευής. Το πάνω τμήμα της συσκευής βυθίζεται αργά στο κάτω τμήμα που περιέχει το διάλυμα ανόδου για αποφυγή δημιουργίας φυσαλίδων στο κάτω άκρο των σωλήνων. Στη συνέχεια φορτώνονται 75μg ολικής πρωτεΐνης στο πάνω άκρο του κάθε σωλήνα, συνδέονται τα ηλεκτρόδια στο τροφοδοτικό ρεύματος PowerPac 3000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), καθώς επίσης και οι σωλήνες του ανακυκλοφορητή νερού που παρέχουν νερό θερμοκρασίας 4°C για ψύξη της συσκευής και γίνεται η ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες σταθερής



τάσης 700V για δεκαεννέα ώρες (19h). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης τα πηκτώματα αφαιρούνται από τους σωλήνες και φυλάσσονται μέσα σε Parafilm, με σημειωμένο το όξινο άκρο τους, στους -80°C.

2.5.2 Ηλεκτροφόρηση Πηκτώματος Ακρυλαμιδίου (SDS – PAGE)

Παρασκευάζεται διάλυμα SDS – ακρυλαμιδίου. Το διάλυμα απαερώνεται για περίπου 15min. Παράλληλα ετοιμάζεται και το πακέτο των επίπεδων τζαμιών ηλεκτροφόρησης και των διαχωριστικών (spacers) του 1.5mm, μέσα στο Multi-Gel Casting Chamber (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Με το πέρας της απαέρωσης προστίθενται στο διάλυμα 500μl Ammonium Persulfate (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) καθώς και 50μl TEMED (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Το διάλυμα εκχέεται μέσα στο Multi-Gel Casting Chamber. Στην συνέχεια προστίθενται περίπου 2ml υδατοκορεσμένης ισοβουτανόλης στην κορυφή του διαλύματος ούτως ώστε να απομακρυνθούν τυχόν φυσαλίδες από την έκχυση του διαλύματος και για να δημιουργηθεί επίπεδη μεσόφαση στο άνω άκρο του πηκτώματος. Το διάλυμα αφήνεται να πήξει για περίπου δύο ώρες. Μετά την πάροδο των δύο ωρών απομακρύνεται η ισοβουτανόλη και το άνω άκρο του πηκτώματος πλένεται με δις απεσταγμένο νερό για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα ισοβουτανόλης. Στα τζάμια με το πήκτωμα τοποθετούνται οι σφικκτήρες, αφού έχουν πρώτα καθαριστεί από τυχόν υπολείμματα πηκτώματος στην εξωτερική τους πλευρά. Στην συνέχεια τοποθετείται στο άνω άκρο του πηκτώματος το πήκτωμα της 1^{ης} διάστασης το οποίο έχουμε τοποθετήσει προηγουμένως σε 1ml διαλύματος εξισορόπησης για 5min. Εν συνέχεια στερεώνεται στην θέση του με διάλυμα αγαρόζης. Συναρμολογείται η διάταξη της συσκευής και αφού συνδεθεί με τον ανακυκλοφορητή νερού και προστεθεί στο δοχείο της συσκευής 3.5lt ρυθμιστικό διάλυμα



ηλεκτροφόρησης, συνδέονται τα ηλεκτρόδια και γίνεται η ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες σταθερής έντασης 35mA/πήκτωμα για περίπου τρεισήμισι (3.5h) ώρες. Με το τέλος της ηλεκτροφόρησης τα πηκτώματα αφαιρούνται προσεκτικά από τα τζάμια και τοποθετούνται σε 300ml διαλύματος μονιμοποίησης για αποφυγή διάχυσης των πρωτεϊνών μέσα στο πήκτωμα.

2.5.3 Χρώση νιτρικού αργύρου (Silver Staining)

Τα πηκτώματα αφαιρούνται από το διάλυμα μονιμοποίησης και βάφονται με χρώση νιτρικού αργύρου (Silver Stain) βάση του πρωτοκόλλου της Sigma-Aldrich.

2.5.4 Επεξεργασία πηκτωμάτων

Τα πηκτώματα τοποθετούνται στο πυκνόμετρο GS-700 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) για ψηφιοποίηση της εικόνας τους. Τα πρωτεϊνικά προφίλ που εμφανίστηκαν στο πήκτωμα επεξεργάζονται εν συνέχεια σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με το λογισμικό Melanie έκδοση 4 (Genebio, Geneva, Switzerland), το οποίο με την βοήθεια εξειδικευμένων αλγορίθμων μετρώντας τα επίπεδα του γκριζου στην ψηφιοποιημένη εικόνα του πηκτώματος είναι σε θέση να μας δώσει τιμή όγκου της πρωτεΐνης στο στίγμα (spot) και μας παρέχει πληροφορίες για τυχόν ποσοτικές και ποιοτικές διαφορές στην έκφραση των πρωτεϊνών.



3. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

3.1 Παρασκευή διαλυμάτων

1. Ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης I

Για την παρασκευή 200ml διαλύματος ομογενοποίησης I απαιτούνται:

- 1) 0.25M Σουκρόζη: 17,115gr
- 2) 10mM Tris : 0.2422gr
- 3) 25mM KCl : 0.3728gr
- 4) 5mM MgCl₂ : 0.2033gr
- 5) 0.077mg/ml DTT: 0.0134gr
- 6) 2.5μl PMSF*/ml διαλύματος: 0.5ml (φρέσκο)

* Για το PMSF διαλύουμε με ανάδευση 0.069gr PMSF σε 5ml ισοπροπυλικής αλκοόλης.

2. Ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης II

Για την παρασκευή 1000ml διαλύματος ομογενοποίησης II απαιτούνται:

- 1) 10mM Tris : 2.11gr
- 2) 0.077mg/ml DTT: 0.067gr
- 3) 2.5μl PMSF*/ml διαλύματος: 2.5ml (φρέσκο)
- 4) * Για το PMSF διαλύουμε με ανάδευση 0.069gr PMSF σε 5ml ισοπροπυλικής αλκοόλης.

3. Χρωστική Coomassie Brilliant Blue

Για την παρασκευή 1000ml χρωστικής Coomassie Brilliant Blue απαιτούνται:

- 1) 100mg Coomassie Brilliant Blue G250
- 2) 150ml Αιθυλικής Αλκοόλης
- 3) 100ml Ορθοφωσφορικού Οξέος

Τα παραπάνω αναμιγνύονται με ανάδευση για 15'. Εν συνεχεία συμπληρώνουμε με δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O) έως τα 1000ml.



Το διάλυμα χρωστικής αφήνεται να αναδεύεται κατά την διάρκεια της νύχτας. Την επόμενη μέρα διηθείται. Η χρωστική φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο μπουκάλι.

4. Ρυθμιστικό διάλυμα ουρίας (CSB)

Για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος ουρίας (CSB) απαιτούνται:

- 1) Ουρία: 5.4gr
- 2) ddH₂O: 6.5ml

Τα παραπάνω διαλύονται με ανάδευση για 1 ώρα. Εν συνεχεία προστίθενται στο διάλυμα:

- 3) CHAPS: 0.4gr
- 4) DTT: 0.1gr
- 5) Resolyte 3-10: 100μl
- 6) Resolyte 4-7: 400μl

Μετά την διάλυση και των παραπάνω προστίθενται στο διάλυμα 100μl Βρομοφαινόλης Μπλε και το διάλυμα μοιράζεται σε σωλήνες Eppendorf σε κλάσματα των 700μl, τα οποία φυλάσσονται στους -70°C.

Για την παρασκευή Bovine Serum Albumin Urea (BSA urea) για χρήση στην μέθοδο Bradford, ακολουθούμε την παραπάνω διαδικασία μόνο στην θέση της Βρομοφαινόλης Μπλε προσθέτουμε 50mg Bovine Serum Albumin (BSA) σε 10 ml CSB.



5. Ρυθμιστικό διάλυμα εξισορόπησης ισοηλεκτρικής εστίασης

Για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος εξισορόπησης απαιτούνται:

- | | |
|---------------------------------------|--------|
| 1) 10% Sodium Dodecyl Sulphate (SDS): | 8ml |
| 2) Tris pH 6,8: | 2ml |
| 3) ddH ₂ O: | 14,4ml |
| 4) DTT: | 0,13gr |
| 5) Βρομοφαινόλη Μπλε: | 800μl |

6. Ρυθμιστικό διάλυμα ισοηλεκτρικής εστίασης

1) Ρυθμιστικό διάλυμα καθόδου

Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος καθόδου απαιτούνται:

- i. NaOH (ξηρό): 2gr
- ii. ddH₂O: 500ml

Το διάλυμα απεερώνεται για περίπου 15'.

2) Ρυθμιστικό διάλυμα ανόδου

Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος ανόδου απαιτούνται:

- i. Φωσφορικό οξύ (85%): 3.06ml
- ii. ddH₂O: 4.5lt



7. Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης 2^{ης} διάστασης

Για την παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης απαιτούνται:

- | | |
|-----------------------------------|------|
| 1) Tris base: | 15gr |
| 2) Γλυκίνη: | 72gr |
| 3) Sodium Dodecyl Sulphate (SDS): | 5gr |

Τα παραπάνω διαλύονται και έρχονται σε τελικό όγκο 1lt με την προσθήκη δις απεσταγμένου νερού (ddH₂O).

8. Διάλυμα αγαρόζης

Για την παρασκευή 100ml διαλύματος αγαρόζης απαιτούνται:

- | | |
|-----------------------------------|----------|
| 1) Tris: | 0,3028gr |
| 2) Γλυκίνη: | 1,4413gr |
| 3) Sodium Dodecyl Sulphate (SDS): | 0,1gr |
| 4) Αγαρόζη: | 0,5gr |

Το παραπάνω διάλυμα έρχεται σε τελικό όγκο 100ml με την προσθήκη ddH₂O και φυλάσσεται σε σωλήνες Falcon σε κλάσματα των 20ml στους 4°C.

3.2 Παρασκευή πηκτωμάτων

1. Πήκτωμα ισοηλεκτρικής εστίασης

Για την παρασκευή πηκτώματος ισοηλεκτρικής εστίασης απαιτούνται:

- | | |
|------------------------|-------|
| 1) Ουρία: | 10gr |
| 2) Ακρυλαμίδιο 30%: | 3ml |
| 3) ddH ₂ O: | 7,4ml |



Τα παραπάνω διαλύονται με ανάδευση για 1 ώρα. Εν συνεχεία προστίθενται 0,3gr CHAPS και το διάλυμα διηθείται με φίλτρο της Nalgene με διάμετρο πόρου 0,22μm.

Παίρνουμε 8μl διαλύματος στα οποία προσθέτουμε:

1) Resolyte 3-10: 80μl

2) Resolyte 4-7: 320μl

Το διάλυμα απαερώνεται για περίπου 15' και κατόπιν προστίθενται τα ακόλουθα:

1) Ammonium Persulphate (APS) 10%: 12,8μl

2) TEMED: 10,4μl

2. Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης 2^{ης} διάστασης

Για την παρασκευή πηκτώματος ηλεκτροφόρησης απαιτούνται:

1) ddH₂O: 33,5ml

2) 1,5M Tris-HCl pH 8.82: 25ml

3) 10% Sodium Dodecyl Sulphate (SDS): 1ml

4) Ακρυλαμίδιο 30%: 40ml

Το παραπάνω διάλυμα απαερώνεται για περίπου 15'. Εν συνεχεία προστίθενται τα ακόλουθα:

1) 10% Ammonium Persulphate (APS): 500μl

2) TEMED: 50μl

Η παραπάνω διαδικασία μας δίνει ικανή ποσότητα διαλύματος για την παρασκευή δύο (2) πηκτωμάτων ακρυλαμίδης. Για περισσότερα



πηκτώματα αρκεί να πολλαπλασιάσουμε τις ποσότητες ανάλογα με τον αριθμό των πηκτωμάτων που επιθυμούμε να παρασκευάσουμε.

Παρασκευή 1: 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

1) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

2) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

3) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

4) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

5) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

6) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

7) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

8) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

9) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

10) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

11) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

12) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

13) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

14) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

15) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

16) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

17) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

18) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

19) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

20) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

21) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

22) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

23) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

24) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

25) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

26) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

27) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

28) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

29) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

30) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

31) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

32) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

33) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

34) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

35) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

36) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

37) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

38) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

39) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα

40) 100 ml 1% υδατικό διάλυμα



4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

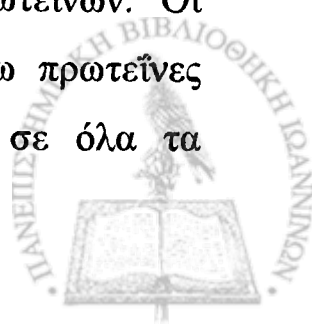
4.1 Ηλεκτροφόρηση Δύο Διαστάσεων

Τα πηκτώματα των ιστών που προκύπτουν από την τεχνική της Ηλεκτροφόρησης Δύο Διαστάσεων αποτελούν το πρωτεϊνικό αποτύπωμα του κάθε ασθενούς και χρησιμοποιώντας χρώση Νιτρικού Αργύρου, υπάρχει η δυνατότητα να γίνουν ορατά 1000 – 1500 πρωτεϊνικά στίγματα ταυτόχρονα πάνω στο πήκτωμα ακρυλαμιδίου.

Στην παρούσα μελέτη μελετώνται κυτταροπλασματικές και μεμβρανικές πρωτεΐνες, που προέρχονται από κλασματοποίηση του κυττάρου.

Σε κάθε ηλεκτροφόρημα που προέρχεται από καρκινικό ιστό παρατηρήθηκαν δύο είδη διαφορών. Η πρώτη διαφορά μεταξύ των καρκινικών και μη καρκινικών δειγμάτων είναι ποιοτική και αφορά στην έκφραση ενός αριθμού συγκεκριμένων πρωτεϊνών που παρατηρούνται μόνο στα πηκτώματα των καρκινικών δειγμάτων ενώ απουσιάζουν από τα πηκτώματα των μη καρκινικών δειγμάτων (καρκινικό δείγμα Εικ.1, μη καρκινικό δείγμα Εικ. 2). Συγκεκριμένα παρατηρούνται στα ηλεκτροφορήματα προερχόμενα από τα κυτταροπλασματικά κλάσματα των καρκινικών ιστών τέσσερις πρωτεΐνες, οι οποίες ονομάστηκαν **Pr1**, **Pr2**, **Pr3**, **Pr4** (Εικ. 3) και δεν παρατηρούνται στην πλειοψηφία των αντίστοιχων μεμβρανικών κλασμάτων. Επίσης παρατηρήθηκαν στα ηλεκτροφορήματα προερχόμενα από τα μεμβρανικά κλάσματα των καρκινικών ιστών δύο πρωτεΐνες, οι οποίες ονομάστηκαν **Pr5**, **Pr6** (Εικ. 4), οι οποίες δεν παρατηρούνται στα αντίστοιχα κυτταροπλασματικά κλάσματα των καρκινικών δειγμάτων.

Η δεύτερη διαφορά μεταξύ των καρκινικών και των μη καρκινικών ηλεκτροφορημάτων, είναι η ποσοτική έκφραση των πρωτεϊνών. Οι διαφορές στην ποσοτική έκφραση, αφορούν τις παραπάνω πρωτεΐνες καθώς και πέντε γνωστές πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν σε όλα τα



ηλεκτροφορήματα, οι οποίες αναγνωρίστηκαν με αντιπαραβολή των μοριακών τους βαρών και των ισοηλεκτρικών τους σημείων με την βάση δεδομένων 2D της Swiss Prot οι οποίες παρουσιάζουν ενδιαφέρον ως προς την ποσοτική τους διαφοροποίηση ανάλογα με τον βαθμό κακοήθειας και τον εντοπισμό τους στο κύτταρο. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι η Calreticulin (MW 58700, pI 4.40), η Peroxiredoxin-2 (MW 21646 pI 5.38), η Hemoglobin β -chain (MW 12036 pI 6.87), η Ubiquitin (MW 8761 pI 6.84), και η Thioredoxin (MW 12130 pI 4.86) (Εικ. 5, 6).

4.2 Ποιοτικές διαφορές (Άγνωστες Πρωτεΐνες)

4.2.1 Δείγματα ιστών βαθμού κακοήθειας I (Grade I)

Στα δείγματα ιστών βαθμού κακοήθειας (Grade I) μελετήθηκαν πέντε ιστοί εκ των οποίων οι τρεις ήταν βλεννώδη καρκινώματα και οι άλλοι δύο ήταν σωληνώδη καρκινώματα. Κανένα από τα δείγματα δεν είχε μεταστατικούς λεμφαδένες

Από τις ποιοτικές πρωτεΐνες παρατηρήθηκαν και στους δύο τύπους καρκινώματος, δύο από τις τέσσερις πρωτεΐνες του κυτταροπλασματικού κλάσματος, η **Pr3** (MW 37530–37610 pI: 6.67–6.71) και η **Pr4** (MW 37620–38010 pI: 6.62–6.67) (Εικ. 7), ενώ δεν παρατηρήθηκαν η Pr1 και Pr2. Οι τιμές όγκου των Pr3 και Pr4 φαίνονται στον Πίνακα 1.

4.2.2 Δείγματα ιστών βαθμού κακοήθειας II (Grade II)

Στα δείγματα βαθμού κακοήθειας II (Grade II) μελετήθηκαν είκοσι δείγματα εκ των οποίων τα έντεκα ήταν πορογενή διηθητικά καρκινώματα μη ειδικού τύπου (ένα από αυτά είχε σε συνύπαρξη πορογενές *in situ* καρκίνωμα και ένα άλλο σωληνώδες καρκίνωμα) και τα εννέα ήταν λοβιακά διηθητικά καρκινώματα (το ένα από αυτά με



συνύπαρξη πορογενούς *in situ* καρκινώματος και σωληνολοβιακού καρκινώματος).

Στα ηλεκτροφορήματα τους εντοπίστηκαν τα 4 άγνωστα πολυπεπτίδια τα οποία παρατηρούνται στα κυτταροπλασματικά κλάσματα. Επίσης παρατηρούνται τα 2 πολυπεπτίδια στα μεμβρανικά κλάσματα, τα οποία δεν παρατηρούνται στα κυτταροπλασματικά κλάσματα. Τα πολυπεπτίδια αυτά υπάρχουν και στα δείγματα από διηθητικό πορογενές καρκίνωμα μη ειδικού τύπου καθώς και στα δείγματα από διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα, ενώ δεν εμφανίζονται στα αντίστοιχα μη καρκινικά δείγματα.

Τα 4 πολυπεπτίδια των κυτταροπλασματικών δειγμάτων των πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μη ειδικού τύπου, βρίσκονται στα ακόλουθα μοριακά βάρη και pI: **Pr1**: MW 42109–43786 pI 5.80–5.88, **Pr2**: MW 40459–41880 pI 5.80–5.87, **Pr3**: MW 35460–38464 pI 6.50–6.63 και **Pr4**: MW 34160–37533 pI 6.53–6.69 (Εικ. 8, 9).

Τα 2 πολυπεπτίδια των μεμβρανικών δειγμάτων των ίδιων δειγμάτων, βρίσκονται στα ακόλουθα μοριακά βάρη και pI: **Pr5**: MW 31819–37105 pI 4.81–5.09 και **Pr6**: MW 31819–37105 pI 4.75–5.16 (Εικ. 10, 11).

Στα κυτταροπλασματικά κλάσματα των λοβιακών διηθητικών καρκινωμάτων παρατηρήθηκαν η **Pr1**: MW 42189–43756 pI 5.80–5.84, **Pr2**: MW 40356–41885 pI 5.80–5.86, **Pr3**: MW 36540–37194 pI 6.59–6.63 και **Pr4**: MW 35890–37455 pI 6.62–6.69 (Εικ. 12).

Στα μεμβρανικά τους κλάσματα παρατηρήθηκαν η **Pr5**: MW 32829–34219 pI 4.81–4.86 και **Pr6**: MW 32919–34385 pI 4.85–4.94 (Εικ.13).

4.2.3 Δείγματα ιστών βαθμού κακοήθειας III (Grade III)

Στα δείγματα ιστών βαθμού κακοήθειας III (Grade III) μελετήθηκαν είκοσι πέντε ιστοί εκ των οποίων οι δεκαέξι ήταν πορογενή διηθητικά



καρκινώματα μη ειδικού τύπου, οκτώ λοβιακά διηθητικά καρκινώματα και ένα μυελοειδές καρκίνωμα. Στα δείγματα των Grade III λοβιακών διηθητικών καρκινωμάτων μελετήθηκε και ένα δείγμα με τον αντίστοιχο καθρέφτη βιοψίας.

Τα 4 πολυπεπτίδια των κυτταροπλασματικών δειγμάτων βρίσκονται και στα πορογενή διηθητικά και στα λοβιακά διηθητικά καρκινώματα στα ακόλουθα μοριακά βάρη και pI: **Pr1**: MW 38819–43947 pI 5.63–5.83, **Pr2**: MW 36983–42385 pI 5.66– 5.84, **Pr3**: MW 37645–39184 pI 6.50–6.68 και **Pr4**: MW 36957–38587 pI 6.56–6.79 (Εικ. 14, 15, 16).

Τα 2 πολυπεπτίδια των μεμβρανικών δειγμάτων βρίσκονται στα ακόλουθα μοριακά βάρη και pI: **Pr5**: MW 29975–33609 pI 4.82–4.93, **Pr6**: MW 29890–33267 pI 4.89–5.02 (Εικ. 17, 18, 19).

Στο λοβιακό διηθητικό καρκίνωμα με τον αντίστοιχο καθρέφτη βιοψίας παρατηρήθηκαν στο κυτταροπλασματικό κλάσμα του καρκινικού δείγματος τα τέσσερα πολυπεπτίδια στις εξής συντεταγμένες: **Pr1**: MW 40710 pI 5.70, **Pr2**: MW 38692 pI 5.70, **Pr3**: MW 37463 pI 6.63 και **Pr4**: MW 36758 pI 6.69 (Εικ. 20).

Στο κυτταροπλασματικό κλάσμα του καθρέφτη βιοψίας εντοπίζονται και τα 4 πολυπεπτίδια Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 στις παρακάτω συντεταγμένες μοριακού βάρους και ισοηλεκτρικού σημείου: **Pr1**: MW 37932 pI 5.52, **Pr2**: MW 36251 pI 5.56, **Pr3**: MW 37405 pI 6.58 και **Pr4**: MW 37722 pI 6.66 (Εικ. 21).

Στο δείγμα μυελοειδούς καρκινώματος έχουμε με τα ακόλουθα ευρήματα:

Στο κυτταροπλασματικό δείγμα οι παραπάνω πρωτεΐνες εντοπίζονται στα εξής σημεία: **Pr1**: MW 47545 pI 5.63, **Pr2**: MW 46059 pI 5.62, **Pr3**: MW 35643 pI 6.61 και **Pr4**: MW 34783 pI 6.65 (Εικ. 22).



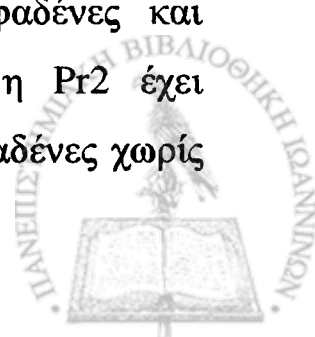
Στο μεμβρανικό δείγμα οι πρωτεΐνες εντοπίζονται ως εξής: **Pr1:** MW 44223 pI 5.74, **Pr2:** MW 42692 pI 5.76, **Pr5:** MW 29725 pI 5.00 και **Pr6:** MW 29906 pI 5.10 (Εικ. 23).

4.3 Ποσοτικές διαφορές

4.3.1 Άγνωστες πρωτεΐνες

4.3.1.1 Δείγματα ιστών βαθμού κακοήθειας II (Grade II)

Στον Πίνακα 2 βλέπουμε τις μεταβολές των τιμών όγκου στα πηκτώματα πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μη ειδικού τύπου. Στα κυτταροπλασματικά κλάσματα των πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μη ειδικού τύπου, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση των Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4, στα δείγματα με μεταστατικούς λεμφαδένες μειώνεται σε σχέση με τα δείγματα χωρίς μεταστατικούς λεμφαδένες. Αντιθέτως η έκφραση των ίδιων πρωτεϊνών είναι σημαντικά μεγαλύτερη στα δείγματα με μεταστατικούς λεμφαδένες και συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος σε σχέση με τα δείγματα χωρίς μεταστατικούς λεμφαδένες, με μοναδική εξαίρεση την Pr4 η οποία παρουσιάζει μεγαλύτερη έκφραση στα δείγματα χωρίς μεταστατικούς λεμφαδένες. Στα αντίστοιχα μεμβρανικά τους κλάσματα η έκφραση των Pr5 και Pr6 αυξάνεται σταθερά, με μικρότερη έκφραση στα δείγματα χωρίς μεταστατικούς λεμφαδένες και μεγαλύτερη στα δείγματα με μεταστατικούς λεμφαδένες και συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος. Αντίστοιχα η επιμέρους ανάλυση των πολυπεπτιδίων αυτών στα ηλεκτροφορήματα των λοβιακών διηθητικών καρκινωμάτων έδωσε τιμές όγκου που φαίνονται στον Πίνακα 3. Η έκφραση των Pr1, Pr3 και Pr4 είναι μεγαλύτερη στα δείγματα με μεταστατικούς λεμφαδένες και συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος, ενώ αντίθετα η Pr2 έχει μεγαλύτερη έκφραση στα δείγματα με μεταστατικούς λεμφαδένες χωρίς



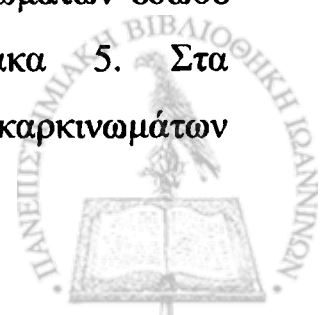
συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος. Η έκφραση των Pr5 και Pr6 είναι μεγαλύτερη στα δείγματα με μεταστατικούς λεμφαδένες χωρίς συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος.

4.3.1.2 Δείγματα ιστών βαθμού κακοήθειας III (Grade III)

Η επιμέρους ανάλυση των πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μη ειδικού τύπου έδωσε τα αποτελέσματα όγκου που φαίνονται στον Πίνακα 4. Στα κυτταροπλασματικά κλάσματα των πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μη ειδικού τύπου η έκφραση των Pr1, Pr2 και Pr3 είναι μεγαλύτερη στα δείγματα με τον μικρότερο αριθμό μεταστατικών λεμφαδένων, ενώ αντίθετα η Pr4 έχει μεγαλύτερη έκφραση στα δείγματα με τον μεγαλύτερο αριθμό μεταστατικών λεμφαδένων.

Στα μεμβρανικά κλάσματα τους όμως παρατηρείται μια σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με τα δείγματα βαθμού κακοήθειας II. Στα δείγματα βαθμού κακοήθειας III έχουμε εμφάνιση των τεσσάρων κυτταροπλασματικών πολυπεπτιδίων και στα μεμβρανικά κλάσματα. Συγκεκριμένα, όσον αφορά τις Pr5 και Pr6, η μεν Pr5 παρουσιάζει μεγαλύτερη έκφραση στα δείγματα με τον μεγαλύτερο αριθμό μεταστατικών λεμφαδένων ενώ αντίθετα η Pr6 έχει μεγαλύτερη έκφραση στα δείγματα με τον μικρότερο αριθμό μεταστατικών λεμφαδένων. Στα δείγματα με χαμηλό αριθμό μεταστατικών λεμφαδένων παρατηρούνται και οι Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 ενώ στα δείγματα με υψηλό αριθμό μεταστατικών λεμφαδένων παρατηρούνται οι Pr2, Pr3 και Pr4. Με εξαίρεση την Pr3, η έκφραση των Pr1, Pr2 και Pr4 είναι μεγαλύτερη στα δείγματα με χαμηλό αριθμό μεταστατικών λεμφαδένων.

Η επιμέρους ανάλυση των λοβιακών διηθητικών καρκινωμάτων έδωσε μεγέθη όγκου, τα οποία φαίνονται στον Πίνακα 5. Στα κυτταροπλασματικά κλάσματα των λοβιακών διηθητικών καρκινωμάτων



παρατηρείται μεγαλύτερη έκφραση των Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 στα δείγματα με μεταστατικούς λεμφαδένες χωρίς συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος.

Σε αντίθεση με τα πορογενή διηθητικά καρκινώματα μη ειδικού τύπου, στα μεμβρανικά τους κλάσματα παρατηρούνται μόνο οι Pr5 και Pr6 όπου η έκφραση τους είναι ελάχιστα μεγαλύτερη στα δείγματα με μεταστατικούς λεμφαδένες και συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος.

Η επιμέρους ανάλυση του διηθητικού λοβιακού καρκινώματος σε συνδυασμό με τον καθρέφτη βιοψίας του δείγματος έδωσε τα αποτελέσματα όγκου που φαίνονται στον Πίνακα 6. Σε αυτά τα δείγματα παρατηρούνται οι Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 και στα δύο κυτταροπλασματικά κλάσματα με τις Pr1 και Pr2 να έχουν μεγαλύτερη έκφραση στον καθρέφτη βιοψίας, ενώ οι Pr3 και Pr4 έχουν μεγαλύτερη έκφραση στο καρκινικό δείγμα.

Η επιμέρους ανάλυση του μυελοειδούς καρκινώματος έδωσε τα αποτελέσματα όγκου που φαίνονται στον Πίνακα 7. Στο κυτταροπλασματικό του κλάσμα παρατηρούνται οι Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 με μεγαλύτερη σε έκφραση, με σημαντική διαφορά, την Pr3. Στο μεμβρανικό του κλάσμα παρατηρούνται οι Pr5 και Pr6, καθώς και οι Pr1 και Pr2 με μικρότερη έκφραση σε σχέση με το κυτταροπλασματικό δείγμα.

4.3.2 Γνωστές Πρωτεΐνες

4.3.2.1 Μη καρκινικοί ιστοί

Στους μη καρκινικούς ιστούς παρατηρήθηκαν οι πέντε προαναφερθείσες αναγνωρισμένες ή γνωστές πρωτεΐνες με τις τιμές όγκου που περιγράφονται στον Πίνακα 8.



4.3.2.2 Δείγματα ιστών βαθμού κακοήθειας I (Grade I)

Στα βλεννώδη καρκινώματα παρατηρήθηκαν οι πέντε προαναφερθείσες γνωστές πρωτεΐνες (Εικ. 24) με τις τιμές όγκου που περιγράφονται στον Πίνακα 9.

Σε αντίθεση στα σωληνώδη καρκινώματα παρατηρήθηκαν οι δύο από τις πέντε πρωτεΐνες στις τιμές όγκου που περιγράφονται στον Πίνακα 9.

4.3.2.3 Δείγματα ιστών βαθμού κακοήθειας II (Grade II)

Στα πορογενή διηθητικά καρκινώματα μη ειδικού τύπου παρατηρήθηκαν οι πέντε προαναφερθείσες γνωστές πρωτεΐνες με τις τιμές όγκου που φαίνονται στον Πίνακα 10, όπου φαίνεται ότι υπάρχουν διαφορές στην ποσοτική τους έκφραση (Εικ. 25, 26, 27, 28).

Στα λοβιακά διηθητικά καρκινώματα οι πέντε γνωστές πρωτεΐνες παρατηρήθηκαν με διαφοροποιήσεις στις τιμές όγκου τους, που φαίνονται στον Πίνακα 11 (Εικ. 29, 30).

4.3.2.4 Δείγματα ιστών βαθμού κακοήθειας III (Grade III)

Στα πορογενή διηθητικά καρκινώματα μη ειδικού τύπου παρατηρήθηκαν οι πέντε προαναφερθείσες γνωστές πρωτεΐνες με τις ποσοτικές διαφορές που αναγράφονται στον Πίνακα 12 (Εικ. 31, 32, 33, 34).

Στα λοβιακά διηθητικά καρκινώματα οι πέντε γνωστές πρωτεΐνες παρατηρήθηκαν στις τιμές όγκου που φαίνονται στον Πίνακα 13 (Εικ. 35, 36)

Στα λοβιακό διηθητικό καρκίνωμα σε συνδυασμό με τον καθρέφτη βιοψίας οι πέντε γνωστές πρωτεΐνες παρατηρήθηκαν σε διαφορετική ποσοτική έκφραση, που φαίνεται στον Πίνακα 14 (Εικ. 37, 38).

Στο μυελοειδές καρκίνωμα οι πέντε γνωστές πρωτεΐνες παρατηρήθηκαν στις τιμές όγκου που φαίνονται στον Πίνακα 15 (Εικ. 39, 40).



4.4 Σχέση βαθμού κακοήθειας και συνύπαρξης άλλου τύπου καρκινώματος με την πρωτεϊνική έκφραση

4.4.1 Ποιοτικές διαφορές

4.4.1.1 Δείγματα ιστών Grade I

Στα δείγματα ιστών Grade I παρατηρούνται μόνο οι πρωτεΐνες Pr3 και Pr4 των κυτταροπλασματικών κλασμάτων. Η Pr3 μετράται ελάχιστα πιο αυξημένη στα σωληνώδη καρκινώματα απ' ό τι στα βλεννώδη. Η Pr4, αντιθέτως, μετράται ελάχιστα πιο αυξημένη στα βλεννώδη απ' ό τι στα σωληνώδη (Διαγρ. 1). Στα δείγματα ιστών Grade I δεν υπήρχε συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος.

4.4.1.2 Δείγματα ιστών Grade II

Στα δείγματα ιστών Grade II παρατηρούνται οι πρωτεΐνες Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 μόνο στα κυτταροπλασματικά κλάσματα όλων των τύπων καρκίνου. Στα μεμβρανικά κλάσματα παρατηρούνται οι πρωτεΐνες Pr5 και Pr6. Η μόνη εξαίρεση είναι ένα δείγμα λοβιακού διηθητικού καρκινώματος με συνύπαρξη πορογενούς καρκινώματος *in situ* και σωληνολοβιακού καρκινώματος, όπου στο μεμβρανικό του κλάσμα παρατηρείται και η Pr2.

Στα πορογενή διηθητικά καρκινώματα μη ειδικού τύπου οι Pr1 και Pr2 εμφανίζονται με την μεγαλύτερη αύξηση στα δείγματα στα οποία υπάρχει συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος. Αναλυτικότερα, στα κυτταροπλασματικά κλάσματα δειγμάτων με συνύπαρξη πορογενούς διηθητικού *in situ*, η έκφραση της Pr1 είναι σχεδόν διπλάσια απ' ό τι στα δείγματα χωρίς συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος. Στην περίπτωση της Pr2 η έκφραση είναι ακόμα μεγαλύτερη. Η Pr3 παρουσιάζει και αυτή περίπου διπλάσια έκφραση απ' ό τι τα δείγματα χωρίς συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος. Αντιθέτως η Pr4 είναι η μόνη από τις τέσσερις



πρωτεΐνες η οποία έχει μεγαλύτερη έκφραση στα δείγματα χωρίς συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος (Διαγρ. 2).

Στα μεμβρανικά κλάσματα των ίδιων δειγμάτων η Pr5 και Pr6 παρουσιάζουν και οι δύο μεγαλύτερη έκφραση στα δείγματα με συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος (Διαγρ. 3).

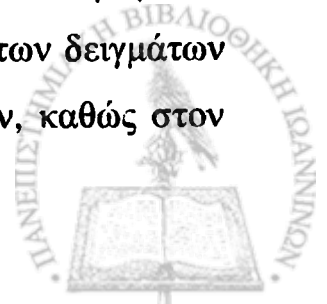
Στα κυτταροπλασματικά κλάσματα των λοβιακών διηθητικών καρκινωμάτων η Pr1 εκφράζεται σχεδόν στα ίδια επίπεδα είτε προέρχεται από δείγμα με συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος ή όχι. Η Pr2, στα δείγματα με συνύπαρξη καρκινώματος διαφορετικού τύπου μετράται κατά πολύ μειωμένη σε σχέση με την έκφρασή της σε δείγμα χωρίς συνύπαρξη. Οι Pr3 και Pr4 παρατηρούνται με μεγαλύτερη έκφραση στα δείγματα με συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος (Διαγρ. 4).

Στα μεμβρανικά κλάσματα οι Pr5 και Pr6, σε αντίθεση με τα πορογενή διηθητικά καρκινώματα μη ειδικού τύπου, παρουσιάζουν μεγαλύτερη έκφραση στα δείγματα χωρίς συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος. Στην περίπτωση του δείγματος με την συνύπαρξη πορογενούς καρκινώματος *in situ* και σωληνολοβιακού καρκινώματος που όπως αναφέρθηκε παρουσιάζει εκτός από τις Pr5 και Pr6, και την Pr2 στο μεμβρανικό του κλάσμα, αυτή μετράται με σχεδόν διπλάσια έκφραση απ' ότι στο κυτταροπλασματικό κλάσμα (Διαγρ. 5).

4.4.1.3 Δείγματα ιστών Grade III

Στα δείγματα ιστών Grade III, οι πρωτεΐνες Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 παρατηρούνται, εκτός από τα κυτταροπλασματικά κλάσματα όλων των δειγμάτων, και στα μεμβρανικά κλάσματα των πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μη ειδικού τύπου.

Αναλυτικότερα, στα κυτταροπλασματικά κλάσματα των πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων, η διαφορά έκφρασης μεταξύ των δειγμάτων εξαρτάται από τον αριθμό των μεταστατικών λεμφαδένων, καθώς στον



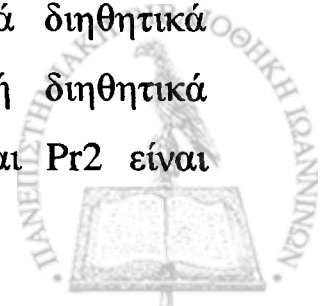
βαθμό κακοήθειας ΙΙΙ δεν υπήρχαν δείγματα με συνύπαρξη άλλου τύπου καρκίνου (Διαγρ. 6). Το ενδιαφέρον όμως εστιάζεται στο μεμβρανικό κλάσμα στο οποίο όπως αναφέρθηκε εμφανίζονται και οι πρωτεΐνες του κυτταροπλασματικού κλάσματος. Πιο συγκεκριμένα, η Pr1 εμφανίζεται με μικρότερη έκφραση απ' ότι στο κυτταροπλασματικό κλάσμα καθώς και η Pr3 και Pr4. Η Pr2 εμφανίζεται άλλοτε με μεγαλύτερη έκφραση από το κυτταροπλασματικό κλάσμα και άλλοτε με μικρότερη πάντα σε σχέση με τον αριθμό των μεταστατικών λεμφαδένων (Διαγρ. 7).

Στα κυτταροπλασματικά κλάσματα των λοβιακών διηθητικών καρκινωμάτων, έχουμε μεγαλύτερη έκφραση των Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4, στα δείγματα χωρίς συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος (Διαγρ. 8). Αντίθετα στα μεμβρανικά κλάσματα των ίδιων δειγμάτων οι Pr5 και Pr6 παρουσιάζουν οριακά μεγαλύτερη έκφραση στα δείγματα ιστών με συνύπαρξη άλλων τύπων καρκινωμάτων (Διαγρ. 9). Στα κλάσματα αυτά των λοβιακών διηθητικών καρκινωμάτων δεν υπάρχει εμφάνιση των τεσσάρων κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών.

Στο δείγμα μυελοειδούς καρκινώματος, οι Pr1 και Pr2 εμφανίζονται και στο μεμβρανικό κλάσμα. Η έκφρασή τους σε σύγκριση με το κυτταροπλασματικό κλάσμα είναι περίπου η μισή (Διαγρ. 10).

Στο δείγμα του λοβιακού διηθητικού καρκινώματος και του αντίστοιχου καθρέφτη βιοψίας, παρατηρείται ότι οι Pr1 και Pr2 έχουν μεγαλύτερη έκφραση στο κυτταροπλασματικό κλάσμα του καθρέφτη βιοψίας, ενώ αντίθετα οι Pr3 και Pr4 έχουν μεγαλύτερη έκφραση στο κυτταροπλασματικό κλάσμα του λοβιακού διηθητικού καρκινώματος (Διαγρ. 11).

Εάν συγκριθεί η πλειοψηφία των δειγμάτων, τα οποία είναι πορογενή διηθητικά καρκινώματα μη ειδικού τύπου και λοβιακά διηθητικά καρκινώματα, παρατηρείται ότι, για τα μεν πορογενή διηθητικά καρκινώματα μη ειδικού τύπου η έκφραση των Pr1 και Pr2 είναι



μεγαλύτερη στα κυτταροπλασματικά κλάσματα των δειγμάτων βαθμού κακοήθειας II ενώ η έκφραση των Pr3 και Pr4 είναι μεγαλύτερη στα δείγματα βαθμού κακοήθειας III (Διαγρ. 29). Στα μεμβρανικά κλάσματα η έκφραση της Pr5 είναι μεγαλύτερη στα δείγματα βαθμού κακοήθειας III ενώ η Pr6 στα δείγματα βαθμού κακοήθειας II (Διαγρ. 30).

Στα δε λοβιακά διηθητικά καρκινώματα η έκφραση στα κυτταροπλασματικά κλάσματα των Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 είναι μεγαλύτερη στα δείγματα βαθμού κακοήθειας II (Διαγρ. 31). Το ίδιο ισχύει και στα μεμβρανικά κλάσματα τους, καθώς και η Pr5 και η Pr6 παρουσιάζουν μεγαλύτερη έκφραση στα δείγματα βαθμού κακοήθειας II (Διαγρ. 32).

4.4.2 Ποσοτικές διαφορές

Στις πέντε γνωστές πρωτεΐνες παρατηρείται συνολικά υπερέκφρασή τους σε σχέση με τους μη καρκινικούς ιστούς, των οποίων η έκφραση απεικονίζεται στο Διάγραμμα 12.

4.4.2.1 Δείγματα ιστών Grade I

Στα δείγματα ιστών Grade I η έκφραση των πέντε πρωτεϊνών κυμαίνεται περίπου στα ίδια ή και λίγο μεγαλύτερα επίπεδα αυτών των μη καρκινικών δειγμάτων. Στα μεν βλεννώδη έχουμε έκφραση και των πέντε πρωτεϊνών ενώ αντίθετα στα σωληνώδη παρατηρήθηκε έκφραση μόνο της β-αλυσίδας της αιμογλοβίνης (Hemoglobin β-chain) και της υπεροξειδοαναγωγάσης-2 (Peroxiredoxin – 2) (Διαγρ. 13). Και στους δύο τύπους ιστών η αιμογλοβίνη παρατηρείται με μικρότερη έκφραση απ' ότι στους μη καρκινικούς ιστούς (Διαγρ. 27). Αντίθετα η υπεροξειδοαναγωγάση-2 εκφράζεται σε μεγαλύτερα ποσοστά στους δύο τύπους ιστών σε σχέση με τα μη καρκινικά δείγματα (Διαγρ. 27).



4.4.2.2 Δείγματα ιστών Grade II

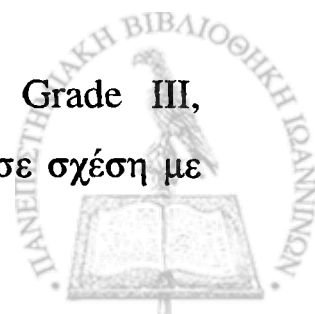
Στα κυτταροπλασματικά κλάσματα των δειγμάτων πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μη ειδικού τύπου βαθμού κακοήθειας II παρατηρούνται αυξημένα ποσοστά έκφρασης των πρωτεϊνών σε σχέση με τα μη καρκινικά δείγματα με εξαίρεση πάλι την αιμογλοβίνη που και εδώ παρατηρείται με μικρότερη έκφραση. Στα δείγματα με συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος παρατηρούμε αύξηση της έκφρασης σε σχέση με τα δείγματα χωρίς συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος και με μεταστατικούς λεμφαδένες, η οποία όμως είναι μικρότερη από την έκφραση των πρωτεϊνών σε δείγματα χωρίς συνύπαρξη και με αρνητικούς λεμφαδένες (Διαγρ. 14).

Στα λοβιακά διηθητικά καρκινώματα η έκφραση των πρωτεϊνών καλρετικουλίνη, υπεροξειδοαναγωγή και θειορεδοξίνη, είναι σημαντικά αυξημένη σε σχέση με τους μη καρκινικούς ιστούς. Αντίθετα η αιμογλοβίνη και η ουβικιτίνη (Ubiquitin) εκφράζονται σε χαμηλότερα επίπεδα απ' ότι στα μη καρκινικά δείγματα (Διαγρ. 33). Αντίστοιχα και η έκφραση των τριών πρωτεϊνών είναι μεγαλύτερη και στα δείγματα με συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος σε σχέση με τα δείγματα χωρίς συνύπαρξη, ενώ η έκφραση των άλλων δύο είναι μικρότερη στα δείγματα χωρίς συνύπαρξη (Διαγρ. 15).

4.4.2.3 Δείγματα ιστών Grade III

Στα δείγματα των πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μη ειδικού τύπου βαθμού κακοήθειας III, όλες οι πρωτεΐνες εκφράζονται σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με τους μη καρκινικούς ιστούς, με μοναδική εξαίρεση την αιμογλοβίνη της οποίας η έκφραση είναι μικρότερη από τους μη καρκινικούς ιστούς (Διαγρ. 34).

Στα δείγματα των λοβιακών διηθητικών καρκινωμάτων Grade III, παρατηρείται αύξηση της έκφρασης σε όλες τις πρωτεΐνες σε σχέση με



τους μη καρκινικούς ιστούς (Διαγρ. 35). Πρέπει να σημειωθεί ότι οι αντίστοιχες πρωτεΐνες στα μεμβρανικά κλάσματα, παρότι είναι αυξημένες σε σχέση με τις τιμές στα μη καρκινικά δείγματα, η έκφρασή τους στα μεμβρανικά κλάσματα είναι μειωμένη σε σχέση με την έκφραση στα κυτταροπλασματικά κλάσματα (Διαγρ. 18).

Μία ενδιαφέρουσα σύγκριση στα λοβιακά διηθητικά καρκινώματα είναι αυτή μεταξύ των κυτταροπλασματικών κλασμάτων ενός δείγματος λοβιακού διηθητικού καρκινώματος και του αντίστοιχου καθρέφτη βιοψίας (Διαγρ. 19). Εδώ παρατηρείται ότι όλες οι πρωτεΐνες εκτός της καλρετικουλίνης έχουν έστω και ελάχιστα μεγαλύτερη έκφραση στο δείγμα του καθρέφτη βιοψίας.

Στα δείγματα των μυελοειδών καρκινωμάτων η έκφραση όλων των πρωτεϊνών με εξαίρεση την αιμογλοβίνη, παρουσιάζεται αυξημένη σε σχέση με τα δείγματα από μη καρκινικούς ιστούς (Διαγρ. 36). Στη σύγκριση μεταξύ των κυτταροπλασματικών και μεμβρανικών κλασμάτων του ίδιου δείγματος παρατηρείται ότι η καλρετικουλίνη, η υπεροξειδοαναγωγή και η θειορεδοξίνη παρουσιάζουν μεγαλύτερη έκφραση στα μεμβρανικά κλάσματα (Διαγρ. 20).

Συγκρίνοντας τα πορογενή διηθητικά καρκινώματα μη ειδικού τύπου και τα λοβιακά διηθητικά καρκινώματα, τα οποία ήταν η πλειοψηφία των δειγμάτων, παρατηρείται ότι στα μεν πορογενή διηθητικά καρκινώματα μη ειδικού τύπου η πρωτεϊνική έκφραση αυξάνεται από Grade II σε Grade III, με εξαίρεση την καλρετικουλίνη και την θειορεδοξίνη οι οποίες παρουσιάζονται με μεγαλύτερη έκφραση στα δείγματα βαθμού κακοήθειας II (Διαγρ. 21). Στα δε λοβιακά διηθητικά καρκινώματα όλες οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση στα δείγματα βαθμού κακοήθειας III σε σχέση με τα δείγματα βαθμού κακοήθειας II (Διαγρ. 22).



Στην παρούσα μελέτη οι δύο εκ των πέντε πρωτεϊνών και ειδικότερα η καλρετικουλίνη και η θειορεδοξίνη παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω του ρόλου τους στον καρκίνο του μαστού.

Η καλρετικουλίνη παρουσιάζει αυξανόμενη τάση έκφρασης από τη μη καρκινική κατάσταση μέχρι τον βαθμό κακοήθειας ΙΙΙ (Διαγρ. 37). Στα δείγματα πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων η αύξηση αυτή παρατηρείται μεγαλύτερη στα δείγματα βαθμού κακοήθειας ΙΙ και στα κυτταροπλασματικά τους κλάσματα (Διαγρ. 23). Αντιθέτως στα μεμβρανικά κλάσματα η αύξηση παρατηρείται εντονότερη στα δείγματα βαθμού κακοήθειας ΙΙΙ (Διαγρ. 38).

Στα δείγματα των λοβιακών διηθητικών καρκινωμάτων η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρείται στα δείγματα βαθμού κακοήθειας ΙΙΙ και στα κυτταροπλασματικά τους κλάσματα (Διαγρ. 24). Αντιθέτως στα μεμβρανικά κλάσματα η αύξηση είναι μεγαλύτερη στα δείγματα βαθμού κακοήθειας ΙΙ (Διαγρ. 39).

Στα δείγματα βαθμού κακοήθειας Ι η έκφραση είναι ελάχιστη αυξημένη σε σχέση με τα μη καρκινικά δείγματα (Διαγρ. 28).

Η θειορεδοξίνη παρατηρείται αυξημένη, με τη μεγαλύτερη αύξηση να παρατηρείται στα μεν πορογενή διηθητικά καρκινώματα στα δείγματα βαθμού κακοήθειας ΙΙ (Διαγρ. 25), στα δε λοβιακά διηθητικά καρκινώματα στα δείγματα βαθμού κακοήθειας ΙΙΙ (Διαγρ. 40).

Σε αντίθεση με την καλρετικουλίνη, η αύξηση αυτή παρατηρείται με το ίδιο πρότυπο και στα κυτταροπλασματικά κλάσματα και στα μεμβρανικά. Έχουμε δηλαδή αύξηση έκφρασης στα μεν πορογενή διηθητικά καρκινώματα στα δείγματα βαθμού κακοήθειας ΙΙ (Διαγρ. 41), στα δε λοβιακά διηθητικά καρκινώματα στα δείγματα βαθμού κακοήθειας ΙΙΙ (Διαγρ. 42).



4.5 Σχέση ύπαρξης μεταστατικών λεμφαδένων με την πρωτεϊνική έκφραση

Στην παρούσα μελέτη μόνο τα δείγματα βαθμού κακοήθειας II και III από όλους του τύπους καρκίνου, έχουν μεταστατικούς λεμφαδένες. Η ύπαρξη ή όχι μεταστατικών λεμφαδένων επηρεάζει την πρωτεϊνική έκφραση και εξαρτάται από τον αριθμό των μεταστατικών λεμφαδένων.

Συγκεκριμένα παρατηρήθηκαν οι εξής αλλαγές:

4.5.1 Ποιοτικές διαφορές

4.5.1.1 Δείγματα Πορογενών Διηθητικών Καρκινωμάτων Grade II

Η ύπαρξη μεταστατικών λεμφαδένων στα δείγματα αυτού του τύπου επηρεάζει την έκφραση των Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4. Συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες αυτές υποεκφράζονται σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα χωρίς μεταστατικούς λεμφαδένες (Διαγρ. 2). Αντιθέτως στις Pr5 και Pr6 παρατηρείται μικρή αύξηση της έκφρασης τους σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα χωρίς την ύπαρξη μεταστατικών λεμφαδένων (Διαγρ. 3).

Στα δείγματα αυτού του τύπου στα οποία υπάρχει συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος η πρωτεϊνική έκφραση δεν επηρεάζεται από την ύπαρξη μεταστατικών λεμφαδένων όπως στα δείγματα χωρίς συνύπαρξη, αντιθέτως η έκφραση των Pr1, Pr2, Pr3, Pr4, Pr5 και Pr6 είναι μεγαλύτερη από αυτήν των δειγμάτων χωρίς μεταστατικού λεμφαδένες και συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος (Διαγρ. 2 και 3).

4.5.1.2 Δείγματα Λοβιακών Διηθητικών Καρκινωμάτων Grade II

Στα δείγματα των λοβιακών διηθητικών καρκινωμάτων η ύπαρξη μεταστατικών λεμφαδένων επηρεάζει την έκφραση των πρωτεϊνών Pr1, Pr3 και Pr4 αρνητικά (υποέκφραση), σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα χωρίς μεταστατικούς λεμφαδένες. Αντιθέτως οι πρωτεΐνες Pr2, Pr5 και Pr6 παρουσιάζουν αύξηση σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα (Διαγρ. 4 και 5).



Στα δείγματα αυτού του τύπου καρκινώματος, η συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος επηρεάζει την έκφραση των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα το δείγμα λοβιακού διηθητικού καρκινώματος που έχει συνύπαρξη *in situ* πορογενούς και σωληνολοβιακού με αρνητικούς λεμφαδένες, παρουσιάζει μικρή αύξηση στις Pr1 και Pr3, σημαντική μείωση της Pr2 και σημαντική αύξηση της Pr4, του κυτταροπλασματικού κλάσματος (Διαγρ. 4). Στο μεμβρανικό κλάσμα παρατηρείται η Pr2 με μεγαλύτερη ένταση σε σχέση με το κυτταροπλασματικό κλάσμα, ενώ η Pr5 και Pr6 παρουσιάζουν μείωση σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα με ύπαρξη μεταστατικών λεμφαδένων (Διάγραμμα 5).

4.5.1.3 Δείγματα Πορογενών Διηθητικών Καρκινωμάτων Grade III

Η ύπαρξη μεταστατικών λεμφαδένων στα δείγματα αυτού του τύπου επηρεάζει την έκφραση των Pr1, Pr2 και Pr3 στα κυτταροπλασματικά τους κλάσματα. Συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες αυτές υποεκφράζονται στα δείγματα εκείνα που έχουν μεγάλο αριθμό μεταστατικών λεμφαδένων. Η Pr4 αντιθέτως αυξάνεται σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα χωρίς μεταστατικούς λεμφαδένες ή με μικρότερο αριθμό μεταστατικών λεμφαδένων (Διαγρ. 6). Το ίδιο ισχύει και στο μεμβρανικό κλάσμα για την Pr5, ενώ αντιθέτως μειώνεται η έκφραση της Pr6 σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα χωρίς την ύπαρξη μεταστατικών λεμφαδένων ή με μικρότερο αριθμό μεταστατικών λεμφαδένων (Διαγρ. 7).

4.5.1.4 Δείγματα Λοβιακών Διηθητικών Καρκινωμάτων Grade III

Στα δείγματα αυτού του τύπου η πρωτεϊνική έκφραση επηρεάζεται από την ύπαρξη μεταστατικών λεμφαδένων. Όσο αυξάνεται ο αριθμός των μεταστατικών λεμφαδένων, παρατηρείται μείωση στις τιμές των Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 (Διαγρ. 8). Αντιθέτως υπάρχει μικρή αύξηση στις Pr5 και Pr6 (Διαγρ. 9). Στα δείγματα στα οποία υπάρχει συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος η πρωτεϊνική έκφραση επηρεάζεται από την ύπαρξη μεταστατικών λεμφαδένων. Οι Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 παρουσιάζουν



μείωση σε αναλογία με τα δείγματα χωρίς συνύπαρξη κάποιου άλλου τύπου καρκινώματος (Διαγρ. 8). Οι Pr5, Pr6 παρουσιάζουν μικρή αύξηση σε σχέση με τα αντίστοιχα δείγματα χωρίς συνύπαρξη (Διαγρ. 9).

4.5.2 Ποσοτικές διαφορές

4.5.2.1 Δείγματα Πορογενών Διηθητικών Καρκινωμάτων Grade II και III

Η θειορεδοξίνη δείχνει να επηρεάζεται από την ύπαρξη ή μη μεταστατικών λεμφαδένων. Στα δείγματα πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μη ειδικού τύπου βαθμού κακοήθειας II η έκφραση της θειορεδοξίνης αυξάνεται ανάλογα με τον αριθμό των μεταστατικών λεμφαδένων. Μεγαλύτερος αριθμός λεμφαδένων συνεπάγεται αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης (Διαγρ. 14). Στα ίδια δείγματα βαθμού κακοήθειας III παρατηρείται το ίδιο. Όσο αυξάνεται ο αριθμός των μεταστατικών λεμφαδένων, αυξάνεται και η έκφραση της πρωτεΐνης (Διαγρ. 16).

Στην περίπτωση της καλρετικουλίνης στα δείγματα πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μη ειδικού τύπου βαθμού κακοήθειας II παρατηρείται αύξηση της έκφρασης όταν υπάρχουν μεταστατικοί λεμφαδένες (Διαγρ. 14). Στα ίδια δείγματα βαθμού κακοήθειας III συμβαίνει το ίδιο και η έκφραση της πρωτεΐνης αυξάνεται ανάλογα με τον αριθμό των μεταστατικών λεμφαδένων (Διάγραμμα 16).

4.5.2.2 Δείγματα Λοβιακών Διηθητικών Καρκινωμάτων Grade II και III

Στα λοβιακά διηθητικά καρκινώματα βαθμού κακοήθειας II παρατηρείται το αντίθετο όσο αυξάνει ο αριθμός των μεταστατικών λεμφαδένων μειώνεται η έκφραση της θειορεδοξίνης (Διαγρ. 15). Στα δείγματα βαθμού κακοήθειας III όσο μεγαλώνει ο αριθμός των μεταστατικών



λεμφαδένων, παρουσιάζεται και αύξηση στην έκφραση της πρωτεΐνης (Διαγρ. 18 και 19).

Στα δείγματα των λοβιακών διηθητικών καρκινωμάτων βαθμού κακοήθειας II η καλρετικουλίνη μειώνεται όταν υπάρχουν μεταστατικοί λεμφαδένες (Διαγρ. 15), ενώ αντιθέτως στα δείγματα βαθμού κακοήθειας III, παρατηρείται αύξηση της πρωτεΐνης ανάλογα με τον αριθμό των μεταστατικών λεμφαδένων (Διάγραμμα 18 και 19).



5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη των κυτταροπλασματικών και μεμβρανικών πρωτεϊνών των καρκινικών και μη καρκινικών κυττάρων μαστού, προερχόμενα από τους αντίστοιχους ιστούς, και την εύρεση διαφορών μεταξύ τους. Η μελέτη αυτή έγινε με την χρήση της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης δύο επιπέδων (2D-E).

Η συγκεκριμένη τεχνική είναι ευρέως διαδεδομένη και χρησιμοποιείται από πολλούς ερευνητές για την απεικόνιση και ανάλυση πρωτεϊνών ^[38-45]. Αποτελεί την ενδεδειγμένη μέθοδο για εντοπισμό διαφορών στην πρωτεϊνική έκφραση ^[2, 33, 37, 46, 47] συγκεκριμένων πρωτεϊνών ^[48, 49] μεταξύ διαφορετικών τύπων κυττάρων.

Οι διαφορές αυτές απεικονίζονται στα ηλεκτροφόρήματα με κηλίδες (spots) και μπορεί να είναι είτε ποιοτικές (ύπαρξη ή μη κάποιας πρωτεϊνικής κηλίδας στο δείγμα σε συγκεκριμένο pH και μοριακό βάρος), είτε ποσοτικές (διαφορά στην ένταση μιας κηλίδας το οποίο υποδηλώνει μικρότερη ή μεγαλύτερη ποσότητα έκφρασης της πρωτεΐνης). Αυτό αποδίδεται στο ότι κάποιες πρωτεΐνες, για λόγους όπως η φυσιολογική ή η καρκινική κατάσταση του κυττάρου, ο βαθμός κακοήθειας ή ο αριθμός των μεταστατικών λεμφαδένων, είτε παράγονται από το κύτταρο σε μεγαλύτερη ποσότητα (υπερέκφραση), είτε μειώνεται η παραγωγή τους (υποέκφραση) ή δεν εκφράζονται καθόλου.

Επίσης μπορεί να παρατηρηθούν διαφορές στον κυτταρικό εντοπισμό μιας πρωτεΐνης, δηλαδή διαφορά στο σημείο του κυττάρου που εκφράζεται μια πρωτεΐνη και το οποίο δεν είναι το σύνηθες ^[10, 25, 49-52].

Αυτές οι διαφορές που προκύπτουν από τα ηλεκτροφόρήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εύρεση των αλλαγών στις οποίες υπόκειται το κύτταρο και αυτές οι αλλαγές αφού μελετηθούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή ειδικών καρκινικών δεικτών, οι οποίοι θα είναι χρήσιμοι στην καλύτερη κλινική αντιμετώπιση της ασθενούς.

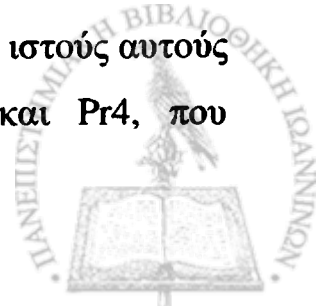


Στην παρούσα διατριβή, εντοπίστηκαν δύο ειδών διαφορές και στα κυτταροπλασματικά και στα μεμβρανικά κλάσματα των ιστών που μελετήθηκαν. Ποιοτικές διαφορές μεταξύ των καρκινικών και μη καρκινικών ιστών, καθώς και ποσοτικές διαφοροποιήσεις στην έκφραση πρωτεϊνών μεταξύ των καρκινικών και μη καρκινικών ιστών.

Η πιο σημαντική διαφορά που παρατηρήθηκε στα ηλεκτροφορήματα των μη καρκινικών και καρκινικών ιστών, είναι η ύπαρξη ορισμένων πρωτεϊνικών κηλίδων, οι οποίες παρατηρούνται μόνο στα ηλεκτροφορήματα των καρκινικών δειγμάτων. Εμφανίζονται σε σχεδόν σταθερές συντεταγμένες pI και μοριακού βάρους με πολύ μικρή απόκλιση και διαφοροποιούνται ως προς την ποσότητά τους ανάλογα με τον τύπο του καρκίνου, των βαθμό κακοήθειας, την συνύπαρξη ή όχι άλλου τύπου καρκίνου και την ύπαρξη ή όχι μεταστατικών λεμφαδένων. Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκαν συνολικά έξι πρωτεΐνες εκ των οποίων τέσσερις, οι **Pr1**, **Pr2**, **Pr3** και **Pr4**, παρατηρούνται στο κυτταροπλασματικό κλάσμα μόνο των καρκινικών δειγμάτων και δύο, οι **Pr5** και **Pr6**, παρατηρούνται στο μεμβρανικό κλάσμα μόνο των καρκινικών δειγμάτων. Η αντιπαραβολή των μοριακών τους βαρών και των pI τους με την βάση δεδομένων 2D της Swiss-Prot δεν επέστρεψε κάποια αποτελέσματα, άρα τις θεωρούμε ως άγνωστες πρωτεΐνες. Επίσης δεν βρέθηκαν στην βιβλιογραφική αναζήτηση, αναφορές άλλων ερευνητών για ύπαρξη πρωτεϊνών στις συγκεκριμένες συντεταγμένες.

Κατά την μελέτη αυτών των πρωτεϊνών παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην έκφρασή τους και στον υποκυτταρικό εντοπισμό τους, ανάλογα κυρίως με τον τύπο καρκίνου και τον βαθμό κακοήθειας.

Στα δείγματα Grade I, μελετήθηκαν βλεννώδη και σωληνώδη καρκινώματα. Κατά την ιστολογική τους εξέταση, κανένα από τα δείγματα δεν είχε δώσει μεταστατικούς λεμφαδένες. Στους ιστούς αυτούς παρουσιάστηκαν σε πολύ χαμηλή έκφραση οι **Pr3** και **Pr4**, που



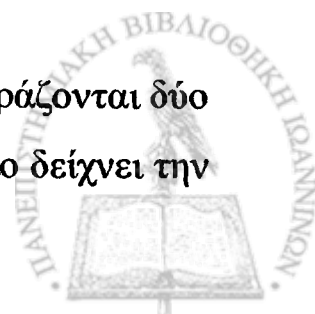
εμφανίζονται μόνο στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών ιστών. Δεν υπήρχε καμία άλλη μεταβολή στην πρωτεϊνική αποτύπωση των ιστών αυτών καθώς οι μεταβολές που υφίσταται το κύτταρο στον βαθμό κακοήθειας I είναι μικρές σε σχέση με τους μη καρκινικούς ιστούς ^[5, 6].

Στα δείγματα Grade II, μελετήθηκαν πορογενή διηθητικά καρκινώματα μη ειδικού τύπου και λοβιακά διηθητικά καρκινώματα. Σε αυτόν τον βαθμό κακοήθειας οι αλλαγές και οι αλλοιώσεις που έχουν επέλθει στο κύτταρο λόγω των μηχανισμών του καρκίνου είναι σημαντικές ^[5, 6].

Παρατηρείται εμφάνιση των τεσσάρων νέων πρωτεϊνών στα κυτταροπλασματικά κλάσματα των ιστών καθώς και δύο νέες μεμβρανικές πρωτεΐνες, οι Pr1, Pr2, Pr3, Pr4 και Pr5, Pr6 αντίστοιχα. Η ιστολογική εξέταση των ιστών είχε δώσει μεταστατικούς λεμφαδένες στην πλειοψηφία των δειγμάτων, καθώς και σε ορισμένα δείγματα συνύπαρξη άλλων τύπου *in situ* καρκινωμάτων. Το γεγονός αυτό επηρεάζει την πρωτεϊνική έκφραση σε αρκετά σημαντικό βαθμό.

Στα πορογενή διηθητικά καρκινώματα μη ειδικού τύπου παρατηρούνται οι τέσσερις νέες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4, γεγονός το οποίο καταδεικνύει τις βιοχημικές μεταβολές στις οποίες υπεισέρχεται το καρκινικό κύτταρο ^[5]. Η έκφραση νέων πρωτεϊνών στο κύτταρο προκαλείται από τις καρκινικές διαδικασίες από τις οποίες περνάει το κύτταρο με απώτερο σκοπό την επιβίωση και εξάπλωση του καρκινικού κυττάρου μέσω πρωτεϊνών που με την έκφρασή τους βοηθούν το καρκινικό κύτταρο να αντεπεξέλθει στις ανάγκες του και στην δημιουργία των κατάλληλων συνθηκών για την επιβίωσή του. Στις περισσότερες όμως περιπτώσεις το ποια είναι η βιοχημική οδός και η βιοχημική διαδικασία για την παραγωγή τους είναι άγνωστη ^[5, 6, 9, 10, 15, 27, 32, 47].

Η πιο σημαντική όμως παρατήρηση είναι το γεγονός ότι εκφράζονται δύο νέες μεμβρανικές πρωτεΐνες, οι Pr5 και Pr6, γεγονός το οποίο δείχνει την



προσπάθεια του καρκινικού κυττάρου για επικοινωνία και εξάπλωση προς τα έξω.

Όλες οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που παρατηρούνται στα πορογενή διηθητικά καρκινώματα μη ειδικού τύπου επηρεάζονται από την ύπαρξη μεταστατικών λεμφαδένων. Παρατηρήσαμε ότι όταν υπάρχει παρουσία μεταστατικών λεμφαδένων η έκφραση των πρωτεϊνών μειώνεται ανάλογα με τον αριθμό των λεμφαδένων. Όσο μεγαλύτερος ο αριθμός των λεμφαδένων τόσο μειώνεται η πρωτεϊνική έκφραση. Στην περίπτωση όμως που υπάρχει συνύπαρξη και άλλου τύπου καρκινώματος η έκφραση αυξάνεται.

Στα κυτταροπλασματικά κλάσματα των λοβιακών διηθητικών καρκινωμάτων παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των Pr1, Pr3 και Pr4, στα δείγματα με συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος και η μόνη εξαίρεση είναι η Pr2 η οποία παρουσιάζει μια σημαντικά μειωμένη έκφραση στα δείγματα με συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος. Είναι εμφανές ότι η συνύπαρξη ενός άλλου τύπου καρκινώματος με το κυρίως καρκίνωμα προκαλεί μία υπερέκφραση κάποιων πρωτεϊνών των οποίων ο ρόλος όμως είναι άγνωστος.

Το αξιοσημείωτο στα λοβιακά διηθητικά καρκινώματα είναι στα μεμβρανικά κλάσματα των δειγμάτων. Οι πρωτεΐνες Pr5 και Pr6 εκφράζονται σε μεγαλύτερο βαθμό στα δείγματα χωρίς συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος.

Στα κυτταροπλασματικά κλάσματα των δειγμάτων των πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μη ειδικού τύπου Grade III με υψηλό αριθμό μεταστατικών λεμφαδένων παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης των Pr1, Pr2 και Pr3 ενώ αντίθετα η έκφραση της Pr4 είναι μεγαλύτερη.

Στα μεμβρανικά κλάσματα, η εικόνα είναι τελείως διαφορετική από τα δείγματα βαθμού κακοήθειας II. Ερευνητές έχουν αποδείξει ότι στον βαθμό κακοήθειας III, οι αλλοιώσεις του κυττάρου είναι πολύ



σημαντικές και ταυτόχρονα καταστροφικές για τις περισσότερες από τις δομές του κυττάρου [5, 6, 32, 53]. Με συγκεχυμένες τις περισσότερες από τις εσωτερικές του μεμβράνες, με τα περισσότερα οργανίδια διογκωμένα, είναι προφανές ότι πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος μπορούν να εκφραστούν ή να μετατοπιστούν σε σημεία άσχετα με τον συνήθη κυτταρικό τους εντοπισμό.

Στα μεμβρανικά κλάσματα λοιπόν, των πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων παρατηρήθηκαν εκτός από τις Pr5 και Pr6, όλες οι πρωτεΐνες των κυτταροπλασματικών κλασμάτων. Οι Pr1, Pr3 και Pr4 παρατηρήθηκαν στα δείγματα με χαμηλό αριθμό μεταστατικών λεμφαδένων με έκφραση χαμηλότερη απ' ό τι στα αντίστοιχα κυτταροπλασματικά κλάσματα. Η έκφραση της Pr2 μετρήθηκε με αρκετά μεγαλύτερη έκφραση από το αντίστοιχο κυτταροπλασματικό κλάσμα. Συνεπώς καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η Pr2 ενδέχεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία των καρκινικών κυττάρων και με αυτό τον τρόπο να εξηγείται και η μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης στα κυτταροπλασματικά κλάσματα αυτών των δειγμάτων. Είναι πιθανόν η Pr2 να μετακινείται από το κυτταρόπλασμα στην μεμβράνη μέσω κάποιων βιοχημικών οδών και να εμπλέκεται στην κυτταρική επικοινωνία μέσω της μεμβράνης.

Στα δείγματα με υψηλό αριθμό μεταστατικών λεμφαδένων δεν παρατηρείται στα μεμβρανικά κλάσματα η Pr1, ενώ παρατηρούνται οι Pr2, Pr3 και Pr4. Οι Pr2 και Pr4 παρατηρούνται σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα αντίστοιχα κυτταροπλασματικά κλάσματα, ενώ η Pr3 μετράται με διπλάσια έκφραση σε σχέση με τα αντίστοιχα κυτταροπλασματικά κλάσματα. Η Pr5 έχει μεγαλύτερη έκφραση στα δείγματα με μεγαλύτερο αριθμό μεταστατικών λεμφαδένων, ενώ αντίθετα η Pr6 στα δείγματα χαμηλού αριθμού μεταστατικών λεμφαδένων.



Στα κυτταροπλασματικά κλάσματα των λοβιακών διηθητικών καρκινωμάτων βαθμού κακοήθειας III παρατηρείται μεγαλύτερη έκφραση των Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 στα δείγματα με χαμηλό αριθμό μεταστατικών λεμφαδένων σε αντίθεση με τα κυτταροπλασματικά κλάσματα των δειγμάτων με υψηλό αριθμό μεταστατικών λεμφαδένων και συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος. Στα αντίστοιχα μεμβρανικά κλάσματα παρατηρήθηκε έκφραση μόνο των Pr5 και Pr6 με οριακά μεγαλύτερη έκφραση στα δείγματα με υψηλό αριθμό μεταστατικών λεμφαδένων και συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος.

Στα μυελοειδή καρκινώματα Grade III, παρατηρήθηκαν οι Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 στα κυτταροπλασματικά τους κλάσματα καθώς και οι Pr1 και Pr2 στα μεμβρανικά τους κλάσματα με μικρότερη όμως έκφραση σε σχέση με τα κυτταροπλασματικά κλάσματα. Επίσης παρατηρήθηκαν και οι Pr5 και Pr6 των μεμβρανικών κλασμάτων με μεγαλύτερη σε έκφραση την Pr6.

Στα δείγματα βαθμού κακοήθειας III μελετήθηκε και ένα δείγμα λοβιακού διηθητικού καρκινώματος με 4/11 μεταστατικούς λεμφαδένες και ο αντίστοιχος καθρέφτης βιοψίας του δείγματος. Παρατηρήθηκαν οι Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 τόσο στο καρκινικό δείγμα όσο και στον καθρέφτη βιοψίας, με τις Pr1 και Pr2 να παρουσιάζουν μεγαλύτερη έκφραση στο κυτταροπλασματικό κλάσμα του καθρέφτη βιοψίας. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με τα ευρήματα άλλων ερευνητών ^[32] και δείχνει ότι ένας καθρέφτης βιοψίας βρίσκεται στα όρια πριν την καρκινογένεση παρόλο που ιστολογικά θεωρείται μη καρκινικός ιστός. Και αυτό συμβαίνει διότι από την στιγμή που στον μαστό αντιδιαμετρικά του καθρέφτη βιοψίας έχουμε καρκινικό όγκο, είναι προφανές ότι ο ιστός στην περιοχή έχει μπει σε διαδικασία καρκινογένεσης. Η άποψη αυτή ενισχύεται και από το γεγονός ότι σε καλοήθεις όγκους δεν παρατηρήθηκε έκφραση των Pr1, Pr2, Pr3, Pr4, Pr5 και Pr6.



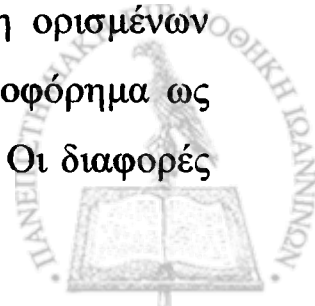
Στην παρούσα μελέτη οι δύο κύριοι τύποι καρκινικών ιστών ήταν τα πορογενή διηθητικά καρκινώματα μη ειδικού τύπου και τα λοβιακά διηθητικά καρκινώματα.

Στην σύγκριση μεταξύ πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μη ειδικού τύπου Grade II και Grade III, στα μεν κυτταροπλασματικά τους κλάσματα παρατηρήθηκε ότι οι Pr1 και Pr2 παρουσιάζουν μεγαλύτερη έκφραση στα δείγματα βαθμού κακοήθειας III, με μεγαλύτερη σε ποσοστό έκφρασης την Pr2. Αντιθέτως οι Pr3 και Pr4 παρουσιάζουν μεγαλύτερη έκφραση στα δείγματα βαθμού κακοήθειας II. Στα δε μεμβρανικά κλάσματα παρατηρήθηκε η Pr5 με μεγαλύτερη έκφραση στα δείγματα βαθμού κακοήθειας III, ενώ η Pr6 στα δείγματα βαθμού κακοήθειας II.

Στην σύγκριση μεταξύ λοβιακών διηθητικών καρκινωμάτων Grade II και Grade III, παρατηρήθηκε μια πιο ομαλή εικόνα στην έκφραση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Στα κυτταροπλασματικά κλάσματα παρατηρήθηκαν οι Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 με μεγαλύτερη έκφραση στα δείγματα βαθμού κακοήθειας II. Η ίδια εικόνα αποτυπώνεται και στα πηκτώματα των μεμβρανικών κλασμάτων. Οι Pr5 και Pr6 παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στα δείγματα βαθμού κακοήθειας II.

Αυτές οι συγκριτικές διαφορές στην έκφραση των πρωτεϊνών από τον βαθμό κακοήθειας II στον βαθμό κακοήθειας III, καθώς και οι διαφορές στην έκφραση των πρωτεϊνών μεταξύ των διαφορετικών τύπων καρκινικού ιστού, θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα είδος καρκινικού δείκτη για την πρόιμη διάγνωση και αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού.

Στα πηκτώματα των καρκινικών και μη καρκινικών ιστών, παρατηρήθηκαν επίσης ποσοτικές διαφορές στην έκφραση ορισμένων γνωστών πρωτεϊνών, οι οποίες αποτυπώνονται στο ηλεκτροφόρημα ως διαφορές στην ένταση των κηλίδων των πρωτεϊνών αυτών. Οι διαφορές



αυτές ποικίλλουν, ανάλογα με την πρωτεΐνη, τον τύπο του καρκινώματος, τον βαθμό κακοήθειάς του και την ύπαρξη ή μη μεταστατικών λεμφαδένων, καθώς και την συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος. Οι πρωτεΐνες που μελετήθηκαν ήταν πέντε και πιο συγκεκριμένα η θειορεδοξίνη (Thioredoxin), η καλρετικουλίνη (Calreticulin), η υπεροξειρεδοξίνη-2 (Peroxiredoxin-2), η β-αλυσίδα της αιμογλοβίνης (Hemoglobin β -chain), και η ουβικουτίνη (Ubiquitin).

Τα δείγματα βαθμού κακοήθειας I παρουσιάζουν όλες τις πρωτεΐνες σε μικρή αύξηση εκτός της β-αλυσίδας της αιμογλοβίνης. Η καλρετικουλίνη και η θειορεδοξίνη σε αυτόν τον βαθμό κακοήθειας παρουσιάζουν μικρή και ελάχιστη αύξηση αντίστοιχα, σε σχέση με τα μη καρκινικά δείγματα.

Στα δείγματα των λοβιακών διηθητικών καρκινωμάτων βαθμού κακοήθειας II παρατηρείται αύξηση της καλρετικουλίνης, σημαντική αύξηση της υπεροξειρεδοξίνης-2 καθώς και της θειορεδοξίνης, ενώ παράλληλα παρατηρείται σημαντική μείωση της β-αλυσίδας της αιμογλοβίνης καθώς και μικρή μείωση της ουβικουτίνης (Διαγρ.33).

Στα δείγματα των πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μη ειδικού τύπου Grade III, παρατηρείται σημαντική αύξηση όλων των πρωτεϊνών με εξαίρεση την β-αλυσίδα της αιμογλοβίνης όπου παρατηρείται μικρή μείωση της έκφρασής της σε σχέση με τα μη καρκινικά δείγματα (Διαγρ. 34).

Στα λοβιακά διηθητικά καρκινώματα βαθμού κακοήθειας III παρατηρείται αύξηση όλων των πρωτεϊνών σε σχέση με τα μη καρκινικά δείγματα (Διαγρ. 35).

Στα μυελοειδή καρκινώματα Grade III παρατηρείται και εδώ αύξηση όλων των πρωτεϊνών σε σχέση με τα μη καρκινικά δείγματα με εξαίρεση την β-αλυσίδα της αιμογλοβίνης η οποία παρουσιάζει σημαντική μείωση (Διαγρ. 36).



Τα ευρήματά μας αυτά συμφωνούν με αποτελέσματα άλλων ερευνητών, οι οποίοι παρατηρούν γενικά, αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων έκφρασης σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως ο καρκίνος του εντέρου, του στομάχου, του μαστού, του παγκρέατος, του πνεύμονα και του τραχήλου της μήτρας^[16, 54-56].

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τις γνωστές πρωτεΐνες που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή τα βιβλιογραφικά δεδομένα είναι αρκετά αλλά όχι πολλά και ειδικότερα αυτά που αναφέρονται σε κύτταρα προερχόμενα από ανθρώπινους ιστούς μαστού. Παρόλα αυτά η διαπίστωση ότι υπάρχει αύξηση της έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών δεν αλλάζει. Όσο μεγαλύτερος ο βαθμός κακοήθειας, τόσο μεγαλύτερη και η αύξηση της έκφρασης.

Η ουβικουτίνη (Ubiquitin-Ub), είναι μια πρωτεΐνη παρούσα σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και αποτελείται από μία υψηλά διατηρητέα αλληλουχία 76 αμινοξέων. Απαντάται είτε σε ελεύθερη μορφή ή να είναι ενωμένη με ομοιοπολικό δεσμό με μια πλειάδα κυτταροπλασματικών, πυρηνικών και μεμβρανικών πρωτεϊνών και είναι απαραίτητη για την αποδόμησή τους^{[55], [57, 58]}. Η αποδόμηση των πρωτεϊνών μέσω της ουβικουτίνης επιτυγχάνεται μέσω ενεργοποίησης και σύζευξης αυτής με τις υποψήφιες προς αποδόμηση πρωτεΐνες με την βοήθεια ενός ενζύμου-ενεργοποιητή της ουβικουτίνης, ενός ενζύμου σύζευξης της ουβικουτίνης και της λιγάσης της ουβικουτίνης (E3)^[59]. Η E3 πρωτεΐνη ελέγχει την διαδικασία και κατευθύνει την σύζευξη της ουβικουτίνης σε μία ή περισσότερες λυσίνες της υποψήφιας πρωτεΐνης. Η ουβικουτίνη μπορεί να δημιουργήσει αλυσίδες ουβικουτίνης, όπου το κάθε μόριο ουβικουτίνης συνδέεται στην λυσίνη-48 του προηγούμενου μορίου. Η σήμανση μιας πρωτεΐνης με μια αλυσίδα τεσσάρων ή περισσότερων μορίων ουβικουτίνης είναι ικανό για να τη καταστήσει στόχο για αποδόμηση από το πρωτεόσωμα. Επίσης οι πρωτεΐνες μπορούν να έχουν

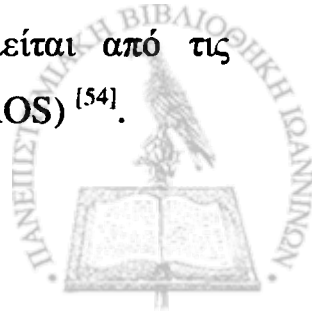
συνδεδεμένο ένα μόριο ουβικουτίνης ή μια αλυσίδα ουβικουτίνης συνδεδεμένες στην λυσίνη 63 της αλληλουχίας της ουβικουτίνης. Σε αυτή την περίπτωση η ουβικουτίνη χρησιμεύει στην πρωτεϊνική κυκλοφορία ή λειτουργία ^{[60], [61]}.

Στον καρκίνο παρατηρείται και από άλλους ερευνητές αύξηση των επιπέδων έκφρασης της ουβικουτίνης στο κύτταρο. Το σύστημα ουβικουτίνης-πρωτεοσώματος ^[60, 62-65] είναι υπεύθυνο για την ρύθμιση πολλών ογκοαναστολέων όπως η p53 και η p27, η EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)^[66]. Συνεπώς ενδέχεται η σήμανση με ουβικουτίνη και η αποδόμηση των παραπάνω πρωτεϊνών ^[67], να παίζει σημαντικό ρόλο στην ογκογένεση, αν και δεν είναι γνωστός ο τρόπος με τον οποίον συμπεριφέρεται η ουβικουτίνη ή άλλα κομμάτια του συστήματος κατά την διάρκεια της ογκογένεσης ^[55, 56, 60].

Μια ακόμα πρωτεΐνη στην οποία παρατηρείται σημαντική αύξηση στην παρούσα διατριβή είναι η υπεροξειρεδοξίνη-2 (peroxiredoxin-2, Prx-II). Ανήκει σε μια καινούργια οικογένεια υπεροξειδασών οι οποίες έχουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα και εκ των οποίων κάποιες επηρεάζουν την κυτταρική διαφοροποίηση και την απόπτωση.

Εντοπίζονται σε διάφορα σημεία του κυττάρου και ανάγουν τα υπεροξείδια στις αντίστοιχες αλκοόλες (η νερό) όπως και οι άλλες υπεροξειδάσες. Μια σημαντική όμως διαφορά αυτής της οικογένειας, είναι ότι όταν ανάγουν τα υπεροξείδια, οξειδώνονται και οι ίδιες. Εν συνεχεία ανάγονται κυρίως από την θειορεδοξίνη, εκτός από την Prx-VI της οποίας ο δότης ηλεκτρονίου είναι ακόμα άγνωστος.

Η υπεροξειρεδοξίνη-2 που μελετήθηκε είναι κυτταροπλασματική πρωτεΐνη και μαζί με τις άλλες υπεροξειρεδοξίνες, προστατεύει το κύτταρο από οξειδωτικό στρες και συνεπώς την απόπτωση που είναι επακόλουθο των αλλοιώσεων του DNA που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS) ^[54].

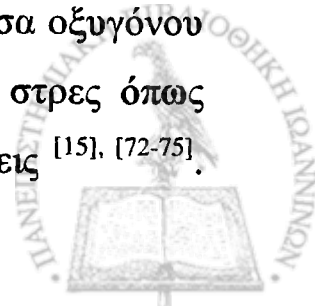


Παρατηρήθηκαν λοιπόν αυξημένα επίπεδα της υπεροξειρεδοξίνης-2 στα δείγματά μας το οποίο συμφωνεί και με τα ευρήματα άλλων ερευνητών, οι οποίοι επίσης αναφέρουν ότι η υπερέκφρασή της στον καρκίνο του μαστού μπορεί να εξηγηθεί λόγω της αντι-αποπτωτικής και πολλαπλασιαστικής επίδρασης της πρωτεΐνης. Για αυτό τον λόγο μπορούν να εξηγηθούν και τα αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης σε μεγαλύτερους όγκους, ως αποτέλεσμα της αντι-αποπτωτικής ικανότητάς της που δίνει αυξητικό πλεονέκτημα στα καρκινικά κύτταρα ^[68-70].

Στην παρούσα διατριβή δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση σε δύο πρωτεΐνες, την θειορεδοξίνη και την καλρετικουλίνη, καθώς φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του μαστού.

Η θειορεδοξίνη είναι κυρίως κυτταροπλασματική πρωτεΐνη και παρόλο που δεν διαθέτει γνωστή ακολουθία πυρηνικού εντοπισμού, έχει ανιχνευθεί στους πυρήνες καρκινικών κυττάρων. Έκθεση κυττάρων σε H_2O_2 , PMA και υπεριώδη ακτινοβολία ^[71], έχει ως αποτέλεσμα την μεταφορά της θειορεδοξίνης από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα. Ο μηχανισμός αυτής της μεταφοράς δεν είναι γνωστός, αλλά θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της μεταφοράς της θειορεδοξίνης από άλλη πρωτεΐνη η οποία διαθέτει ακολουθία πυρηνικού εντοπισμού. Μια τέτοια υποψήφια μεταφορική πρωτεΐνη είναι ο πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας NF-κΒ, ο οποίος ενεργοποιείται από τις παραπάνω συνθήκες και στον οποίο είναι γνωστό ότι προσκολλάται η θειορεδοξίνη. Η θειορεδοξίνη συσχετίζεται ακόμα, με τις κυτταρικές μεμβράνες πιθανόν στην εξωτερική επιφάνεια των κυττάρων ^[9].

Η θειορεδοξίνη προτάθηκε ως προστάτης του κυττάρου, λόγω του γεγονότος ότι καθάριζε το κύτταρο από αντιδρώντα ενδιάμεσα οξυγόνου τα οποία είχαν προκληθεί από διάφορα είδη οξειδωτικού στρες όπως ακτινοβολία UV και ακτίνες X, καθώς και ιογενείς λοιμώξεις ^{[15], [72-75]}.



Τα αντιδρώντα ενδιάμεσα οξυγόνου ή αλλιώς ελεύθερες ρίζες, είναι αντιδρώντα μόρια τα οποία περιέχουν ένα ή περισσότερα αντιδρώντα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στο εξωτερικό τους τροχιακό. Εξαιτίας αυτού είναι ικανές να αντιδρούν με τα μακρομόρια των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων και των νουκλεϊνικών οξέων, προκαλώντας έτσι ενζυματικές αντιδράσεις και πιθανές αλλαγές στην μεμβρανική δομή και στο πυρηνικό γονιδίωμα του κυττάρου. Τα ενεργά είδη οξυγόνου (Reactive Oxygen Species – ROS) συμπεριλαμβάνουν ελεύθερες ρίζες όπως το υπεροξείδιο, το ιόν του υδροξυλίου και το νιτρικό οξύ, καθώς επίσης και άλλους ενεργούς μεταβολίτες όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Τα ROS δημιουργούνται κυρίως στα μιτοχόνδρια κατά την διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και σχηματίζονται σε διάφορες καταστάσεις ασθένειας όπως φλεγμονές, ανοσολογικές αντιδράσεις και ισχαιμία ^[76, 77]. Λόγω των βλαβερών συνεπειών τους, έχουν εξελιχθεί συστήματα για την εξουδετέρωσή τους. Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα (Antioxidative Enzymes – AOE) προσφέρουν ένα από αυτούς τους τρόπους εξουδετέρωσης.

Τα AOE συμπεριλαμβάνουν τις δισμουτάσες του υπεροξειδίου ^[78-80], τις καταλάσες, τις υπεροξειδάσες της γλουταθιόνης και τις υπεροξειδοαναγωγάσες ^{[48], [81, 82]}.

Επίσης προτάθηκε ως αναγωγικό του υπεροξειδίου του υδρογόνου και δότης ηλεκτρονίων στην περοξειδάση της γλουταθιόνης του ανθρώπινου ορού ^[9].

Από την άλλη μεριά η θειορεδοξίνη παίζει σημαντικό ρόλο στο να ελέγχει την αύξηση των καρκινικών κυττάρων ^[10]. Έτσι ερευνήθηκε όχι μόνο ως προστάτης του κυττάρου αλλά και ως προαγωγέας ανάπτυξης ^[15]. Η θειορεδοξίνη ενεργεί ως παράγοντας ανάπτυξης και παράγεται από μια ποικιλία κυττάρων όπως τα μεταμορφωμένα Β κύτταρα του ιού Epstein-Barr, τα κύτταρα υβριδώματος T-κυττάρων MP6 και τα κύτταρα



ηπατώματος. Εκκρίνεται από λεμφοκύτταρα, ηπατοκύτταρα, ινοβλαστικά και καρκινικά κύτταρα. Ο μηχανισμός έκκρισης δεν είναι γνωστός. Παρόλα αυτά λόγω του ότι η θειορεδοξίνη δεν διαθέτει αλληλουχία οδηγό, προκύπτει ένας νέος δρόμος ανεξάρτητος του δρόμου του ενδοπλασματικού δικτύου και του συστήματος Golgi.

Η θειορεδοξίνη προκαλεί την αύξηση λεμφοκυττάρων, φυσιολογικών ινοβλαστικών κυττάρων και μια ποικιλία καρκινικών κυτταρικών σειρών ^[9]. Ρυθμίζει την δραστηριότητα δέσμευσης στο DNA των παραγόντων μεταγραφής συμπεριλαμβανομένων της ενεργοποιητικής πρωτεΐνης I, του πυρηνικού παράγοντα κB (NF-κB) και του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών ^{[15], [83, 84]}. Ο πυρηνικός παράγοντας κB συμμετέχει στην κυτταρική αντίδραση στο οξειδωτικό στρες, στην απόπτωση και στην ογκογένεση ^[85-87]. Η δέσμευση του DNA από τον NF-κB αναστέλλεται σε οξειδωτικές συνθήκες. Η θειορεδοξίνη αυξάνει την δέσμευση του DNA από τον NF-κB και είναι πιο δραστική από την L-κυστεΐνη, αναγόμενη γλουταθιόνη και μη φυσικές αναγωγικές ουσίες όπως την N-ακέτυλο-κυστεΐνη, την 2-μερκαπτοεθανόλη και την διθειοθρεϊτόλη ^[9]. Ο Hayashi *et al.* ανέφεραν ότι η Trx βελτίωνε την δραστηριότητα δέσμευσης στο DNA του υποδοχέα οιστρογόνου σε μια κυτταρική σειρά από ανθρώπινο καρκίνο του μαστού ^[88].

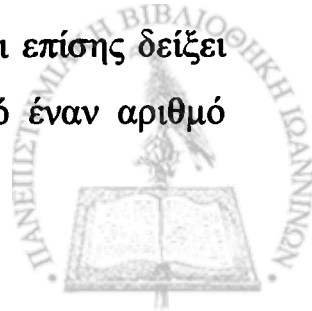
Πρόσθετη θειορεδοξίνη προκαλεί αναστολή της απόπτωσης των λεμφοειδών κυττάρων η οποία προκαλείται από την μείωση της L-κυστεΐνης και της γλουταθιόνης. Η αναστολή της απόπτωσης λόγω της επιμόλυνσης με θειορεδοξίνη είναι παρόμοια με το πρότυπο της αναστολής της απόπτωσης η οποία προκαλείται από την επιμόλυνση των κυττάρων με το αντιαποπτωτικό ογκογονίδιο *bcl-2*. Η διαφορά όμως με το συγκεκριμένο ογκογονίδιο είναι ότι, το *bcl-2* προσφέρει πλεονέκτημα επιβίωσης στο κύτταρο αλλά χρειάζεται άλλους γενετικούς παράγοντες για να προκαλέσει ανάπτυξη όγκου, ενώ η θειορεδοξίνη προσφέρει και

επιβίωση αλλά και πλεονέκτημα αύξησης σε όγκους *in vivo*. Η παραπάνω διαφορά ενισχύεται ακόμα περισσότερο με την διαπίστωση ότι η ευαισθησία ενηλίκων T-κυττάρων από κυτταρικές σειρές λευχαιμίας, στην δοξορουβουκίνη, μειώνεται στις κυτταρικές σειρές με τα υψηλότερα επίπεδα θειορεδοξίνης ^[89].

Πολλοί ερευνητές έχουν παρατηρήσει, ότι μια ποικιλία από ανθρώπινους πρωτογενείς όγκους ^[90-94], έχουν δείξει υπερέκφραση της θειορεδοξίνης στους όγκους σε σύγκριση με τους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς ^[16, 17, 95-99]. Αυτό παρατηρείται και στα ευρήματα αυτής της μελέτης. Σε σχέση με τους μη καρκινικούς ιστούς τα δείγματα βαθμού κακοήθειας I παρουσιάζουν μικρή αύξηση ενώ εν συνεχεία στα δείγματα βαθμού κακοήθειας II και III η αύξηση στην έκφραση της θειορεδοξίνης είναι σημαντική (Διαγρ. 43).

Πρέπει να σημειωθεί ότι στα πορογενή διηθητικά καρκινώματα μη ειδικού τύπου Grade II η έκφραση της θειορεδοξίνης είναι μεγαλύτερη από αυτήν στα ίδια δείγματα Grade III. Αυτή η μείωση της έκφρασης ίσως οφείλεται στην εκτεταμένη πλέον καταστροφή της δομής των κυττάρων και στην μειωμένη ικανότητα των εκφραστικών μηχανισμών του κυττάρου. Σε αντίθεση τα λοβιακά διηθητικά καρκινώματα παρουσιάζουν μεγαλύτερη έκφραση της θειορεδοξίνης στα δείγματα βαθμού κακοήθειας III.

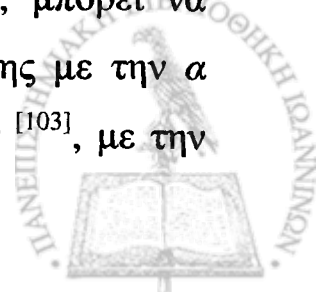
Οι επιδράσεις της θειορεδοξίνης ως διεγέρτης αύξησης και μεταμόρφωσης, μαζί με το γεγονός ότι υπερεκφράζεται από έναν αριθμό ανθρώπινων πρωτογενών όγκων βοηθάει τα καρκινικά κύτταρα να αποφεύγουν τον κυτταρικό μηχανισμό που εμποδίζει τον ανεξέλεγκτο και συνεχόμενο πολλαπλασιασμό ^[99], και έτσι δημιουργεί την πιθανότητα να είναι παράγοντας που οδηγεί σε επιθετική αύξηση ενός όγκου και φτωχής πρόγνωσης του ασθενούς ^[16, 50, 96, 99]. Η θειορεδοξίνη έχει επίσης δείξει ότι αναστέλλει την απόπτωση, η οποία προκαλείται από έναν αριθμό



αντικαρκινικών φαρμάκων και ότι είναι αιτία αντίστασης στην κυτταροτοξικότητα αυτών των φαρμάκων. Για τον λόγο αυτό, είναι πιθανό ότι τα αυξημένα επίπεδα θειορεδοξίνης είναι αιτία αντίστασης στην χημειοθεραπεία. Αυτό το γεγονός κάνει την θειορεδοξίνη έναν υποψήφιο στόχο για την ανάπτυξη φαρμάκων αναστολής της αύξησης των καρκινικών κυττάρων ^[9, 16].

Η καλρετικουλίνη εντοπίστηκε αρχικά ως μεμβρανική πρωτεΐνη του ενδοπλασματικού/σαρκοπλασματικού δικτύου ^{[100], [49]}. Αυτό οφείλεται κυρίως στην ύπαρξη της ακολουθίας σηματοδότησης ανάκτησης KDEL ER στο C-άκρο ^[51], λόγω της οποίας οι περισσότερες αναφορές εντοπίζουν την καλρετικουλίνη εντός του ενδοπλασματικού δικτύου ^[101, 102] (συμπεριλαμβανομένου του πυρηνικού φακέλου και του λείου ενδοπλασματικού δικτύου). Παρόλα αυτά, έχουν αναφερθεί και πρόσθετοι εντοπισμοί της πρωτεΐνης, στην εκκριτική οδό ή στην κυτταρική επιφάνεια, ακόμα και στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα ή και στα δύο. Το ερώτημα εάν η καλρετικουλίνη έχει την δυνατότητα να μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα ή στον πυρήνα, παρότι βασικό, παραμένει αναπάντητο.

Έχει διαπιστωθεί ότι η καλρετικουλίνη αλληλεπιδρά *in vitro* με την ακολουθία αμινοξέων GXFFKR που βρίσκεται στην κυτταροπλασματική ουρά της α υπομονάδας των ιντεγγρινών και στην περιοχή πρόσδεσης του DNA των πυρηνικών υποδοχέων ^{[25], [49]}. Επίσης έχει την σηματοδότηση για πυρηνικό εντοπισμό και με την προϋπόθεση ότι είναι παρούσα στο κυτταρόπλασμα, μπορεί να μετατοπιστεί στον πυρήνα. Επομένως, η εξαρτώμενη από την καλρετικουλίνη ρύθμιση της κυτταρικής πρόσφυσης ^[28] και της γονιδιακής έκφρασης, μπορεί να οφείλεται σε απευθείας αλληλεπίδραση της καλρετικουλίνης με την α υπομονάδα των ιντεγγρινών και των πυρηνικών υποδοχέων ^[103], με την



προϋπόθεση ύπαρξης μετατόπισης της πρωτεΐνης από τον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου στο κυτταρόπλασμα. Μέχρι σήμερα όμως δεν υπάρχουν βιοχημικοί μηχανισμοί που θα μπορούσαν να εξηγήσουν αυτή τη μετατόπιση ^[25]. Νεότερες αναφορές, σημειώνουν ότι ο πυρηνικός εντοπισμός της καλρετικουλίνης είναι πιθανά τεχνούργημα της ανοσολογικής χρώσης. Παρόλα αυτά υπάρχουν ικανές αποδείξεις για την ύπαρξη της καλρετικουλίνης στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου, παρόλο που είναι ακόμα άγνωστο πως μετατοπίζεται η πρωτεΐνη από το ενδοπλασματικό δίκτυο στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου ^[27]. Άλλες πάλι αναφορές, σημειώνουν πως έχουν βρει εστίες καλρετικουλίνης και στο κυτταρόπλασμα, την οποία έχουν απομονώσει με την χρήση αντιδραστηρίων που απελευθερώνουν μόνο κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες ^[104], και άλλες πάλι αναφέρουν ότι έχουν εντοπίσει την πρωτεΐνη και στον πυρηνικό σκελετό ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων ^[52] καθώς και στον πυρήνα καρκινικών κυττάρων MCF-7 όπου παρατηρήθηκε ότι η πρωτεΐνη φαίνεται να ρυθμίζει υποδοχείς πυρηνικών ορμονών, οι οποίες καθορίζουν την γονιδιακή έκφραση ^[105, 106].

Στην παρούσα μελέτη είναι εμφανής η ύπαρξη της καλρετικουλίνης τόσο μέσα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, όσο και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων. Ειδικότερα στα καρκινικά κύτταρα παρατηρήθηκε ότι η έκφραση της καλρετικουλίνης αυξάνεται σε σχέση με τον βαθμό κακοήθειας του καρκινικού ιστού. Μεγαλύτερος βαθμός κακοήθειας μεταφράζεται σε μεγαλύτερη έκφραση της καλρετικουλίνης σε σχέση με τα μη καρκινικά δείγματα (Διαγρ. 37). Επίσης παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης σε όλα τα μεμβρανικά κλάσματα των κυττάρων, γεγονός που συνάδει με τον ισχυρισμό άλλων ερευνητών ότι η καλρετικουλίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική πρόσφυση και επικοινωνία των καρκινικών κυττάρων.



Η ευρεία διασπορά της καλρετικουλίνης, η υψηλή διατήρηση της ακολουθίας αμινοξέων της και η εκπληκτική διατήρηση της γενομικής της οργάνωσης, συνιστούν έναν σημαντικό ρόλο της καλρετικουλίνης στα κύτταρα ^[25]. Η καλρετικουλίνη έχει συσχετιστεί με συμμετοχή σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες. Αυτό το γεγονός αναδεικνύει τον κεντρικό ρόλο που έχει το ενδοπλασματικό δίκτυο στις κυτταρικές λειτουργίες ^[107]. Συνεπώς, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι, οποιεσδήποτε αλλαγές στην έκφραση και στην λειτουργία της καλρετικουλίνης, έχουν σημαντικές επιπτώσεις σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες ^[100].

Ένας από τους ρόλους της καλρετικουλίνης, αν και όχι ξεκάθαρος, είναι ο ρόλος της στην κυτταρική επιφάνεια. Η καλρετικουλίνη δεν έχει διαμεμβρανική περιοχή στην ακολουθία της, αλλά είναι ξεκάθαρο ότι ελέγχει έναν αριθμό κυτταρικών λειτουργιών από την κυτταρική επιφάνεια, συμπεριλαμβανομένου της κυτταρικής πρόσφυσης και μετανάστευσης. Η καλρετικουλίνη μπορεί να ρυθμίζει την κυτταρική πρόσφυση μέσα από το κύτταρο μέσω αλληλεπίδρασης με τις ουρές των ιντεγγρινών ή μέσω ρύθμισης πρωτεϊνών συσχετισμένων με εστιακή πρόσφυση καθώς και με ρύθμιση των κυτταροπλασματικών επιπέδων φωσφοτυροσίνης ^[108-113]. Άλλη μία πιθανότητα είναι ότι η καλρετικουλίνη μπορεί να ρυθμίζει την κυτταρική πρόσφυση από την εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου.

Ο ρόλος που παίζει η καλρετικουλίνη στην κυτταρική πρόσφυση, έχει συσχετιστεί πρόσφατα με την ανακάλυψη ότι η καλρετικουλίνη ή τμήματά της, αναστέλλουν την αγγειογένεση και περιορίζουν την ανάπτυξη των όγκων. Η ανάπτυξη των όγκων και η δημιουργία μεταστάσεων είναι άμεσα εξαρτώμενες από την επαρκή αιμάτωση και επομένως η δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων (αγγειογένεση) είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του όγκου. Η καλρετικουλίνη διαταράσσει



αυτή την λειτουργία, αναστέλλοντας συγκεκριμένα τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων ^[27].

Έχει αναφερθεί από διάφορους ερευνητές η αύξηση των επιπέδων έκφρασης της καλρετικουλίνης σε καρκινικούς ιστούς ^{[52], [46]} και ειδικότερα σε καρκινικούς όγκους μαστού ^{[114], [47]}. Αυτή η πρωτεΐνη εμφανίζεται ως ένα κοινό στοιχείο όλων των ιστών που έχουν αναφερθεί σε βάσεις δεδομένων 2D-PAGE μέχρι στιγμής ^[53].

Στην παρούσα διατριβή παρατηρήθηκε στα πορογενή διηθητικά καρκινώματα μη ειδικού τύπου στα μεν κυτταροπλασματικά κλάσματα των δειγμάτων μεγαλύτερη έκφραση της καλρετικουλίνης στα δείγματα Grade II (Διαγρ. 23), στα δε μεμβρανικά κλάσματα παρατηρήθηκε μεγαλύτερη έκφραση στα δείγματα Grade III (Διαγρ. 38).

Αντιθέτως στα λοβιακά διηθητικά καρκινώματα στα κυτταροπλασματικά κλάσματα παρατηρείται μεγαλύτερη έκφραση της καλρετικουλίνης στα δείγματα βαθμού κακοήθειας III (Διαγρ. 24), ενώ στα μεμβρανικά κλάσματα παρατηρείται μεγαλύτερη έκφραση στα δείγματα βαθμού κακοήθειας II (Διαγρ. 39).

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η αύξηση της καλρετικουλίνης ενέχεται στην ανάπτυξη κακοήθειας και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μελλοντικά ως δείκτης ή σε συνδυασμό με άλλους δείκτες, ως ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για την ανίχνευση καρκίνων. Επίσης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και ιστολογικός δείκτης για την λήψη αποφάσεων όσον αφορά στην πιθανότητα κακοήθειας ιστολογικών βιοψιών και θα μπορούσε να είναι χρήσιμη κλινικά για πολλά είδη καρκίνου ^[49].

Από τα παραπάνω δεδομένα και τα αποτελέσματα της μελέτης των πρωτεϊνών της παρούσας διατριβής καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι τα πορογενή διηθητικά καρκινώματα μη ειδικού τύπου είναι τα πιο επιθετικά μιας και σε αυτά παρατηρήθηκαν οι μεγαλύτερες αυξήσεις των



πρωτεϊνών που μελετήσαμε σε σύγκριση με τα υπόλοιπα είδη, εύρημα το οποίο συμφωνεί και με αναφορές άλλων ερευνητών[43].

Πρέπει να τονιστεί όμως ότι όπως αναφέρουν και άλλοι ερευνητές ^[16, 17, 19, 42-45, 68, 99, 105], ο εντοπισμός γνωστών πρωτεϊνών συμβαίνει συνήθως σε προχωρημένα στάδια της νόσου με αποτέλεσμα την φτωχή πρόγνωση του ασθενούς.

Είναι επιτακτική ανάγκη λοιπόν η περαιτέρω μελέτη των πρωτεϊνών αυτών και ιδιαίτερα των αγνώστων πρωτεϊνών που συνιστούν ποιοτική διαφορά μεταξύ μη καρκινικού και καρκινικού κυττάρου, με μεθόδους όπως η φασματογραφία μάζας ^[115-118], η οποία βοηθάει στον χαρακτηρισμό τους και συνεπώς στην έρευνα για την λειτουργικότητά τους ^[39-41].

Με αυτόν τον τρόπο θα μπορούν να δημιουργηθούν εξειδικευμένοι καρκινικοί δείκτες ^[119, 120], οι οποίοι θα βοηθούν στην καλύτερη και έγκαιρη πρόγνωση της νόσου, στην καλύτερη και πιο στοχευμένη αντιμετώπισή της καθώς και στην καλύτερη παρακολούθηση της ασθενούς μετά την θεραπεία.



6.ΥΠΟΜΝΗΜΑ

6.1 Πίνακες αποτελεσμάτων

6.1.1 Ποιοτικές διαφορές

6.1.1.1 Δείγματα ιστών Grade I

Πίνακας 1

Βλεννώδες Καρκίνωμα Grade I		Σωληνώδες Καρκίνωμα Grade I	
Μεταστατικοί Λεμφαδένες		(-)	(-)
Συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος		OXI	OXI
Πρωτεΐνη	Pr1	--	--
	Pr2	--	--
	Pr3	21.60	23.14
	Pr4	26.35	25.22



6.1.1.2 Δείγματα ιστών Grade II**Πίνακας 2**

Πορογενές Διηθητικό Καρκίνωμα Μη Ειδικού Τύπου Grade II				
Μεταστατικοί Λεμφαδένες		(-)	5/19	2/9
Συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος		ΟΧΙ	ΟΧΙ	Πορογενές <i>in situ</i>
Κυτταροπλασματικό Κλάσμα				
Πρωτεΐνη	Pr1	35.56	3.75	60.96
	Pr2	19.92	10.92	74.02
	Pr3	44.30	22.19	84.37
	Pr4	84.76	44.76	69.40
Μεμβρανικό Κλάσμα				
Πρωτεΐνη	Pr5	52.34	66.98	142.04
	Pr6	35.24	37.62	204.74



Πίνακας 3

Λοβιακό Διηθητικό Καρκίνωμα Grade II			
Μεταστατικοί Λεμφαδένες		31/35	(-)
Συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος		ΟΧΙ	Πορογενές <i>in situ</i> και σωληνολοβιακό
Κυτταροπλασματικό Κλάσμα			
Πρωτεΐνη	Pr1	15.56	16.16
	Pr2	34.32	6.76
	Pr3	45.26	56.23
	Pr4	27.40	60.57
Μεμβρανικό Κλάσμα			
Πρωτεΐνη	Pr2	--	28.33
	Pr5	88.14	60.95
	Pr6	104.54	21.56



6.1.1.3 Δείγματα ιστών Grade III**Πίνακας 4**

Πορογενές Διηθητικό Καρκίνωμα Μη Ειδικού Τύπου Grade III			
Μεταστατικοί		6/6	21/21
Λεμφαδένες			
Συνύπαρξη άλλου		ΟΧΙ	ΟΧΙ
τύπου καρκινώματος			
Κυτταροπλασματικό Κλάσμα			
Πρωτεΐνη	Pr1	48.86	11.76
	Pr2	40.87	38.76
	Pr3	21.56	6.92
	Pr4	26.96	33.82
Μεμβρανικό Κλάσμα			
Πρωτεΐνη	Pr1	35.58	--
	Pr2	53.69	7.71
	Pr3	16.35	30.10
	Pr4	20.15	11.96
	Pr5	76.72	99.88
	Pr6	48.09	21.90

Πίνακας 5

Λοβιακό Διηθητικό Καρκίνωμα Grade III			
Μεταστατικοί Λεμφαδένες		5/6	14/14
Συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος		ΟΧΙ	Πορογενές <i>in situ</i>
Κυτταροπλασματικό Κλάσμα			
Πρωτεΐνη	Pr1	10.56	8.21
	Pr2	16.37	13.42
	Pr3	27.65	24.66
	Pr4	23.48	21.60
Μεμβρανικό Κλάσμα			
Πρωτεΐνη	Pr5	64.26	66.45
	Pr6	37.95	38.21



Πίνακας 6

Μυελοειδές Καρκίνωμα Grade III		
Μεταστατικοί Λεμφαδένες		1/1
Συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος		ΟΧΙ
Κυτταροπλασματικό Κλάσμα		
Πρωτεΐνη	Pr1	6.42
	Pr2	8.83
	Pr3	43.78
	Pr4	9.02
Μεμβρανικό Κλάσμα		
Πρωτεΐνη	Pr1	1.84
	Pr2	3.05
	Pr3	--
	Pr4	--
	Pr5	11.37
	Pr6	40.08



Πίνακας 7

Λοβιακό Διηθητικό Καρκίνωμα Grade III			Καθρέφτης Βιοψίας
Μεταστατικοί Λεμφαδένες		4/11	(-)
Συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος		OXI	OXI
Κυτταροπλασματικό Κλάσμα			
Πρωτεΐνη	Pr1	14.00	23.72
	Pr2	14.03	35.64
	Pr3	33.49	10.37
	Pr4	44.02	25.58

6.1.2 Ποσοτικές διαφορές**6.1.2.1 Μη καρκινικοί ιστοί****Πίνακας 8**

Μη καρκινικοί ιστοί			
Μεταστατικοί Λεμφαδένες		(-)	(-)
Συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος		OXI	OXI
Κυτταροπλασματικό Κλάσμα			
Πρωτεΐνη	Calreticulin	13.10	26.27
	Peroxiredoxin – 2	26.06	12.50
	Hemoglobin β-chain	225.73	231.87
	Ubiquitin	29.60	25.75
	Thioredoxin	22.99	11.65



6.1.2.1 Δείγματα ιστών Grade I**Πίνακας 9**

Βλεννώδες Καρκίνωμα Grade I		Σωληνώδες Καρκίνωμα Grade I	
Μεταστατικοί Λεμφαδένες		(-)	(-)
Συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος		OXI	OXI
Πρωτεΐνη	Calreticulin	34.91	-
	Peroxiredoxin - 2	51.18	12.52
	Hemoglobin β-chain	136.35	188.44
	Ubiquitin	44.43	-
	Thioredoxin	12.97	-

6.1.2.2 Δείγματα ιστών Grade II**Πίνακας 10**

Πορογενές Καρκίνωμα Grade II			
Μεταστατικοί Λεμφαδένες		(-)	5/19
Συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος		OXI	OXI
Πρωτεΐνη	Calreticulin	90.60	117.87
	Peroxiredoxin - 2	73.52	44.77
	Hemoglobin β-chain	209.55	151.93
	Ubiquitin	83.73	55.81
	Thioredoxin	71.27	130.08



Πίνακας 11

Λοβιακό Καρκίνωμα Grade II			
Μεταστατικοί Λεμφαδένες		31/35	(-)
Συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος		OXI	Πορογενές <i>in situ</i>
Πρωτεΐνη	Calreticulin	34.61	49.07
	Peroxiredoxin - 2	27.17	95.72
	Hemoglobin β-chain	274.31	51.73
	Ubiquitin	20.70	18.74
	Thioredoxin	13.16	73.12



6.1.2.3 Δείγματα ιστών Grade III**Πίνακας 12**

Πορογενές Καρκίνωμα Grade III			
Μεταστατικοί Λεμφαδένες		6/6	21/21
Συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος		OXI	OXI
Κυτταροπλασματικό Κλάσμα			
Πρωτεΐνη	Calreticulin	75.13	90.60
	Peroxiredoxin - 2	28.21	73.52
	Hemoglobin β-chain	333.05	209.55
	Ubiquitin	237.75	83.73
	Thioredoxin	14.80	71.27
Μεμβρανικό Κλάσμα			
Πρωτεΐνη	Calreticulin	80.23	133.89
	Peroxiredoxin - 2	31.65	47.29
	Hemoglobin β-chain	81.35	37.96
	Ubiquitin	57.26	194.01
	Thioredoxin	15.22	44.57

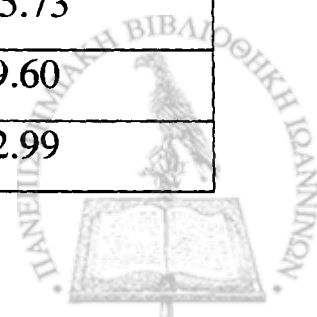


Πίνακας 13

Λοβιακό Καρκίνωμα Grade III		
Μεταστατικοί Λεμφαδένες		14/14
Συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος		Πορογενές <i>in situ</i>
Κυτταροπλασματικό Κλάσμα		
Πρωτεΐνη	Calreticulin	57.42
	Peroxiredoxin - 2	42.97
	Hemoglobin β-chain	289.78
	Ubiquitin	216.07
	Thioredoxin	20.07
Μεμβρανικό Κλάσμα		
Πρωτεΐνη	Calreticulin	45.83
	Peroxiredoxin - 2	28.55
	Hemoglobin β-chain	89.03
	Ubiquitin	110.56
	Thioredoxin	51.54

Πίνακας 14

Λοβιακό Διηθητικό Καρκίνωμα Grade III			Καθρέφτης Βιοψίας
Μεταστατικοί Λεμφαδένες		4/11	(-)
Συνύπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος		OXI	OXI
Κυτταροπλασματικό Κλάσμα			
Πρωτεΐνη	Calreticulin	26.27	13.10
	Peroxiredoxin - 2	12.50	26.06
	Hemoglobin β-chain	31.87	225.73
	Ubiquitin	25.75	29.60
	Thioredoxin	11.65	22.99

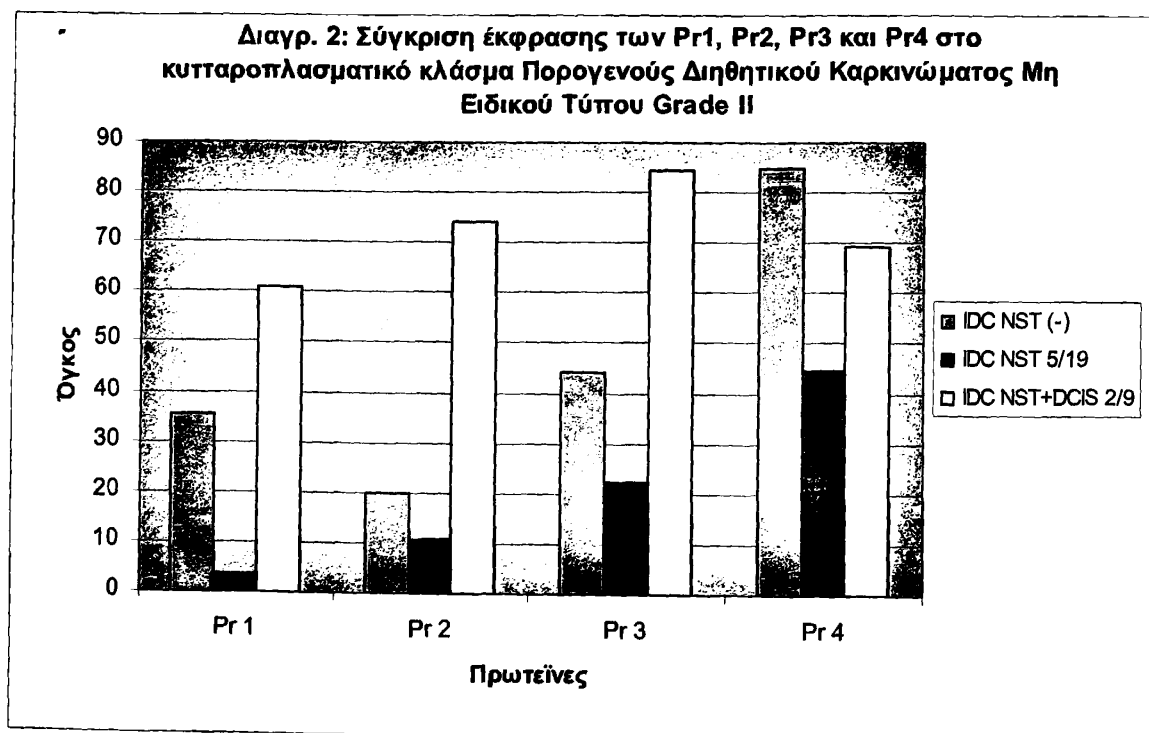
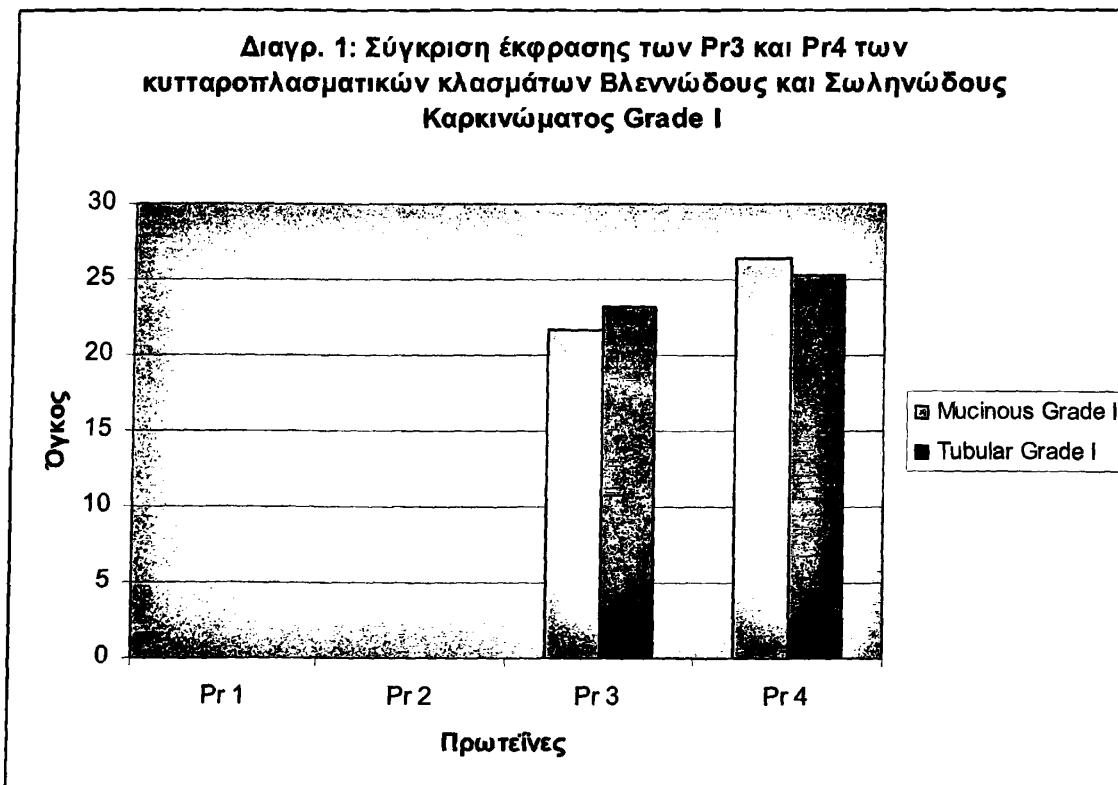


Πίνακας 15

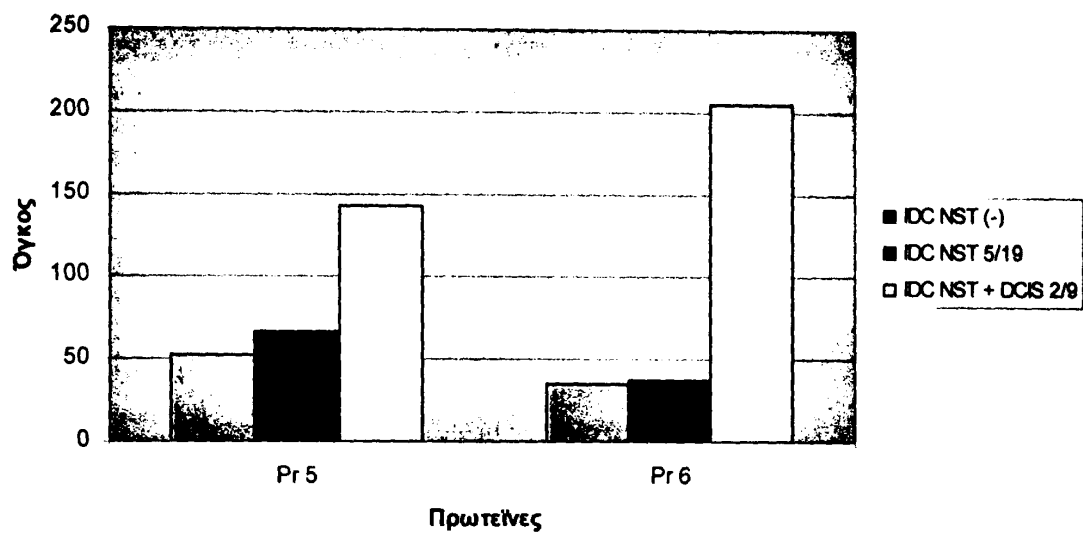
Μυελοειδές Καρκίνωμα Grade III		
Μεταστατικοί Λεμφαδένες		1/1
Συνόπαρξη άλλου τύπου καρκινώματος		ΟΧΙ
Κυτταροπλασματικό Κλάσμα		
Πρωτεΐνη	Calreticulin	53.37
	Peroxiredoxin - 2	48.50
	Hemoglobin β-chain	104.46
	Ubiquitin	77.21
	Thioredoxin	18.11
Μεμβρανικό Κλάσμα		
Πρωτεΐνη	Calreticulin	156.40
	Peroxiredoxin - 2	59.25
	Hemoglobin β-chain	45.09
	Ubiquitin	59.17
	Thioredoxin	32.96



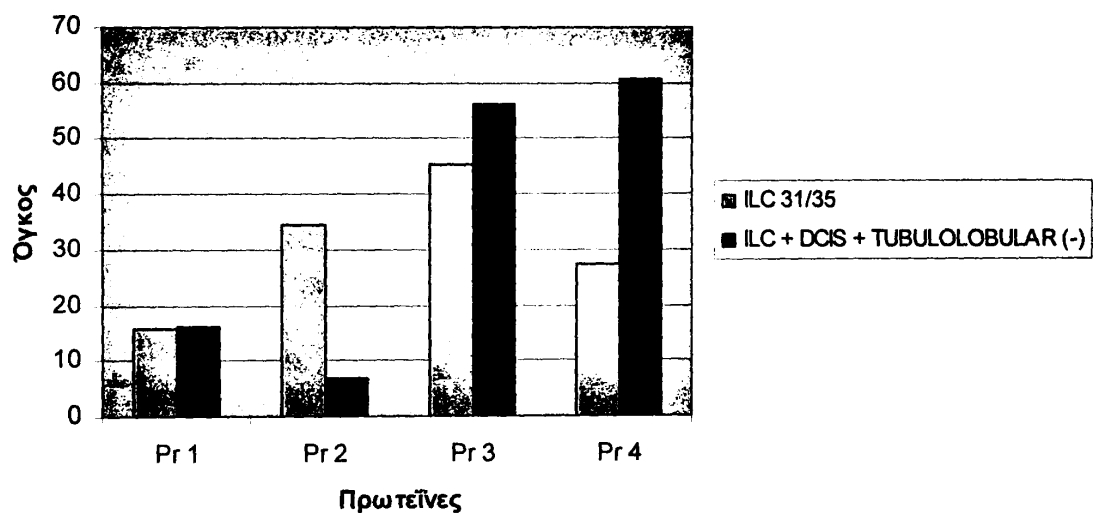
6.2 Διαγράμματα αποτελεσμάτων



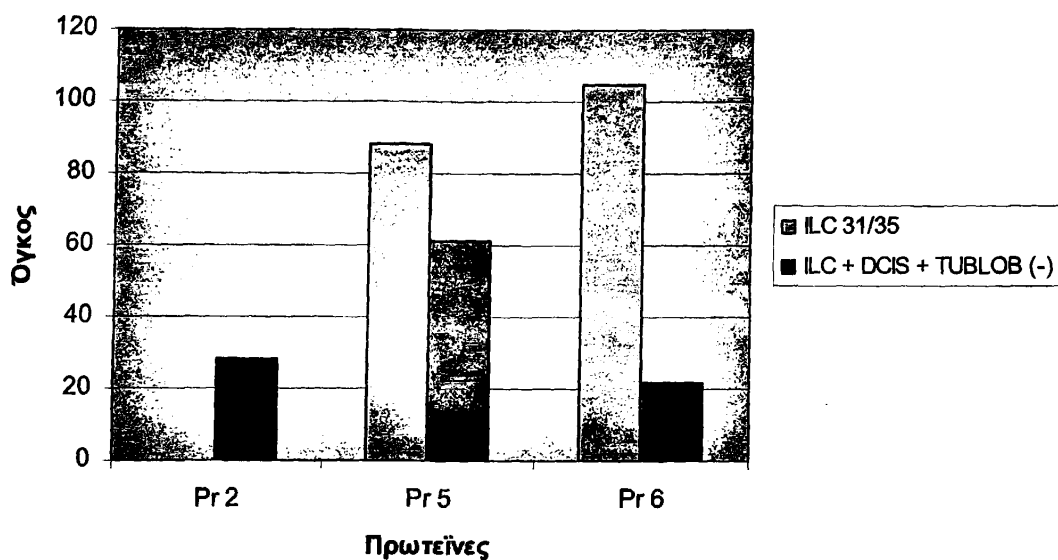
Διαγρ. 3: Σύγκριση έκφρασης των Pr5 και Pr6 στο μεμβρανικό κλάσμα Πορογενών Διηθητικών Καρκινωμάτων Μη Ειδικού Τύπου Grade II



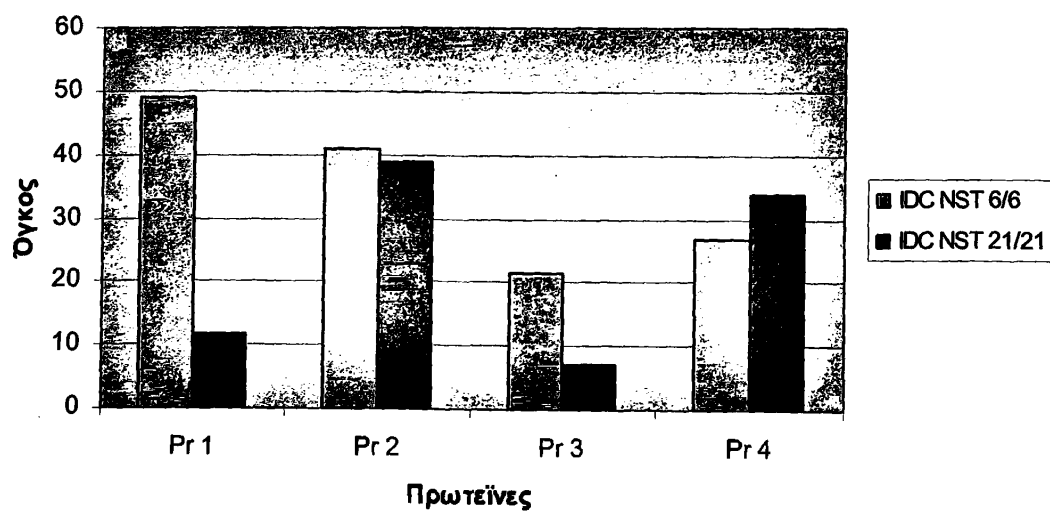
Διαγρ. 4: Σύγκριση έκφρασης των Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 των κυτταροπλασματικών κλασμάτων Λοβιακών Διηθητικών Καρκινωμάτων Grade II



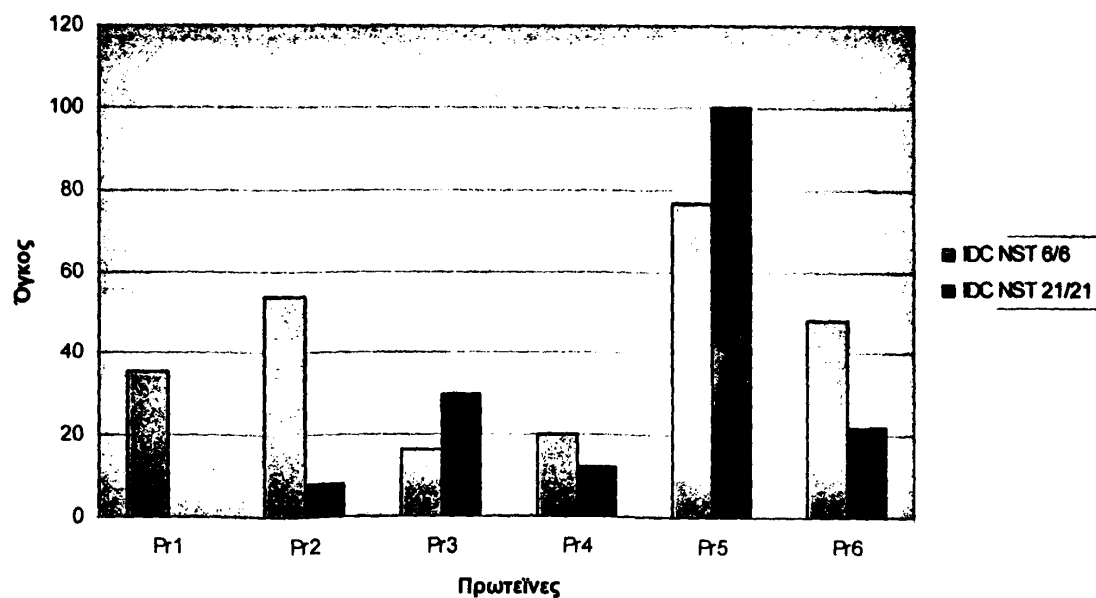
Διαγρ. 5: Σύγκριση έκφρασης των Pr2, Pr5 και Pr6 των μεμβρανικών κλασμάτων Λοβιακών Διηθητικών Καρκινωμάτων Grade II



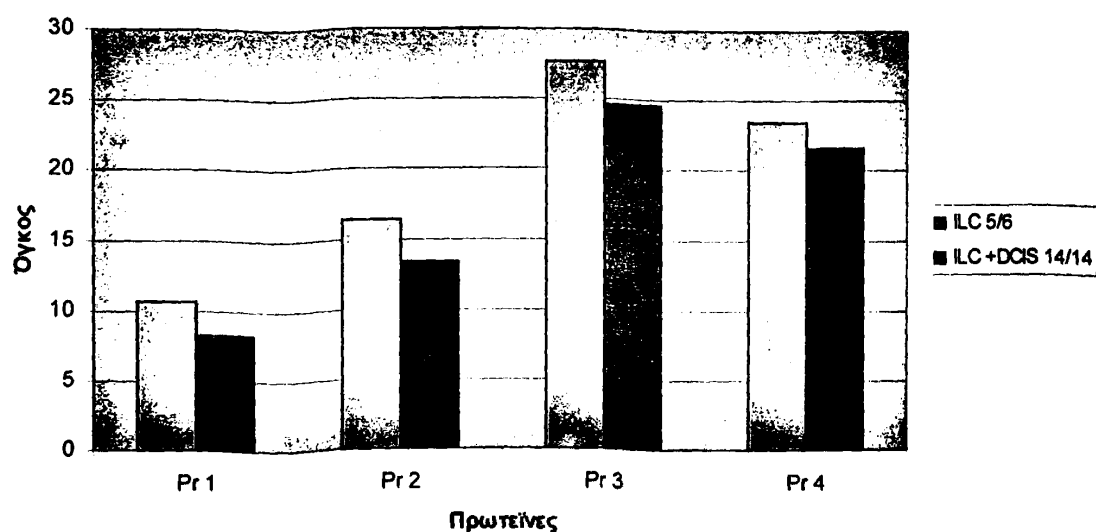
Διαγρ. 6: Σύγκριση έκφρασης των Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 των κυτταροπλασματικών κλασμάτων Πορογενών Διηθητικών Καρκινωμάτων Μη Ειδικού Τύπου Grade III



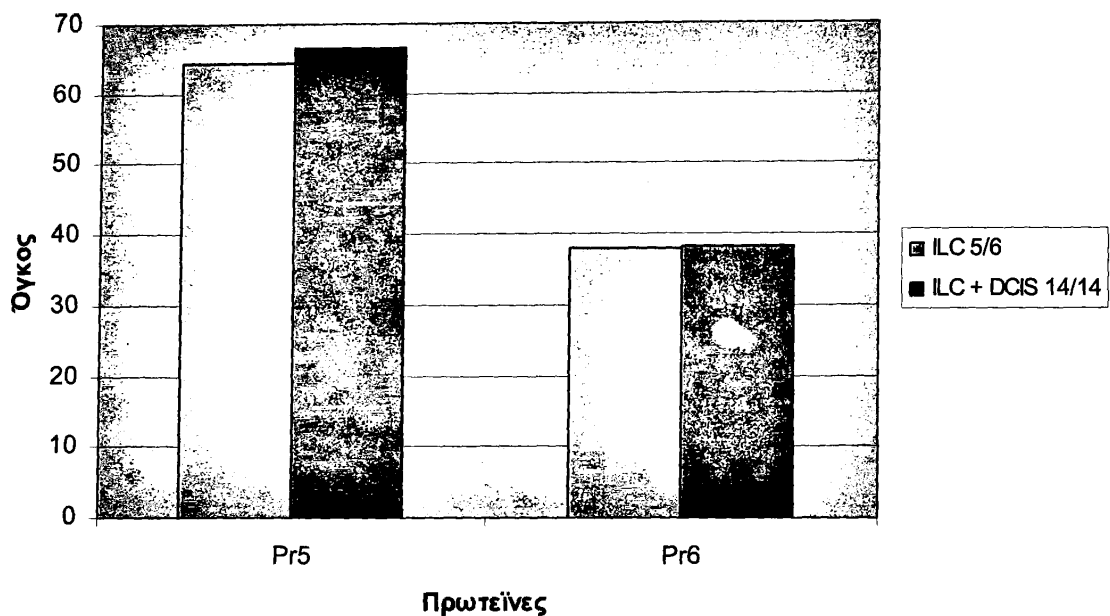
Διαγρ. 7: Σύγκριση έκφρασης των Pr1, Pr2, Pr3, Pr4, Pr5 και Pr6 των μεμβρανικών καλσμάτων Πορογενών Διηθητικών Καρκινωμάτων Μη Ειδικού Τύπου Grade III



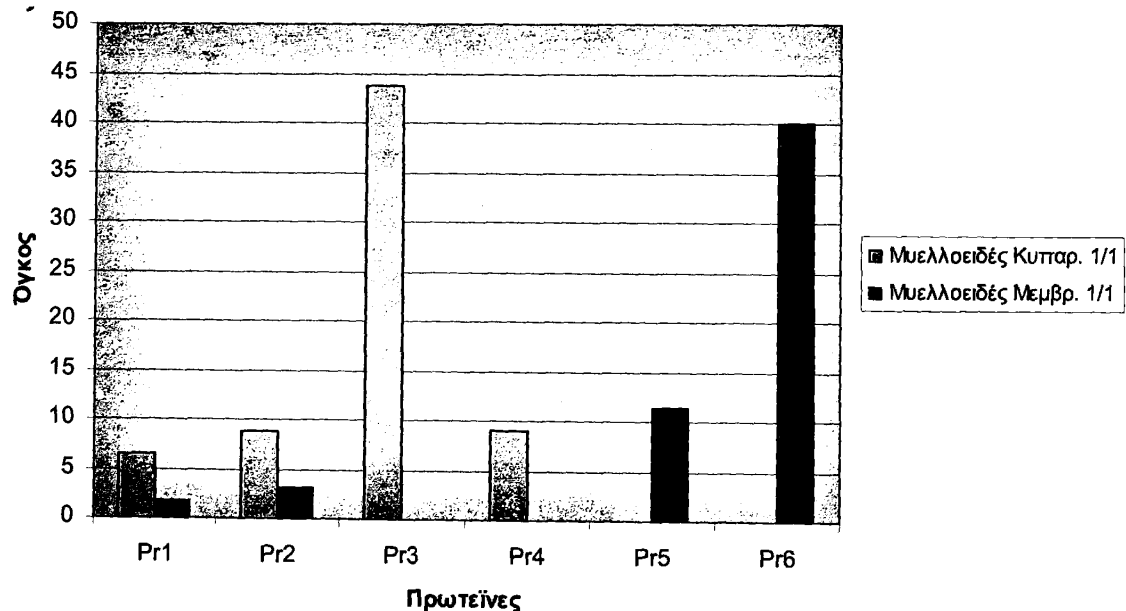
Διαγρ. 8: Σύγκριση έκφρασης των Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 των κυτταροπλασματικών κλασμάτων Λοβιακών Διηθητικών Καρκινωμάτων Grade II



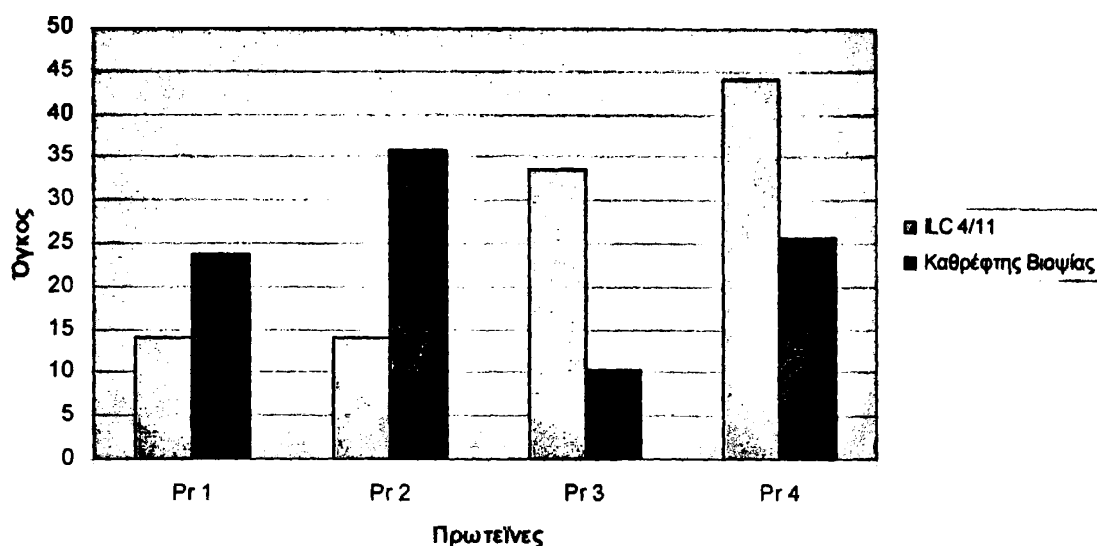
Διαγρ. 9: Σύγκριση έκφρασης των Pr5 και Pr6 των μεμβρανικών κλασμάτων Λοβιακών Διηθητικών Καρκινωμάτων Grade III



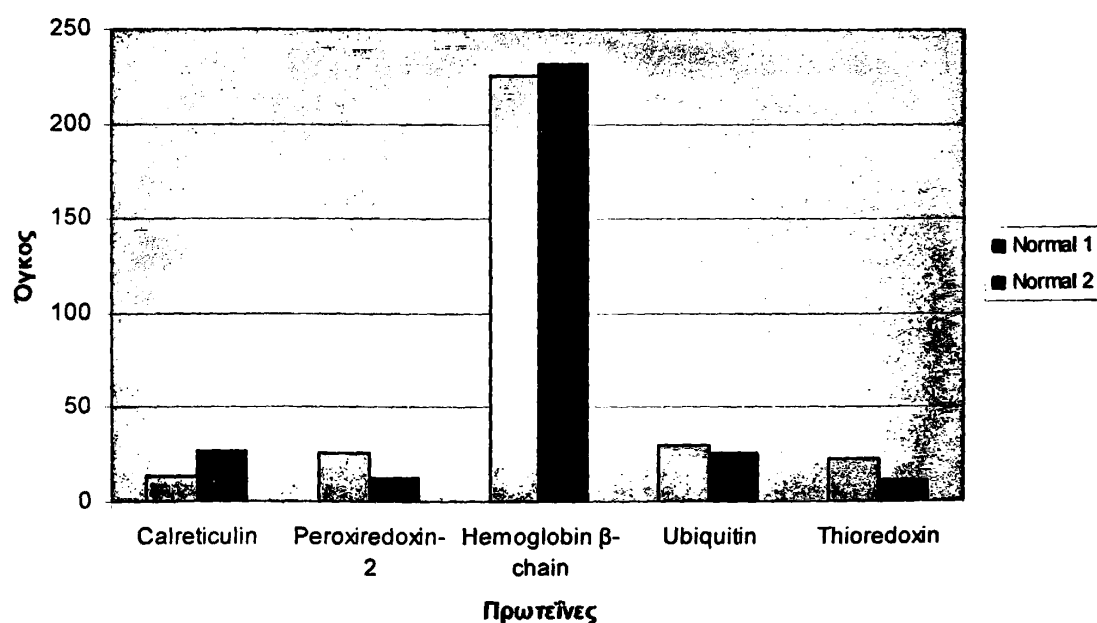
Διαγρ. 10: Σύγκριση έκφρασης των Pr1, Pr2, Pr3, Pr4, Pr5 και Pr6 μεταξύ κυτταροπλασματικού και μεμβρανικού κλάσματος Μυελλοειδούς Καρκινώματος Grade III



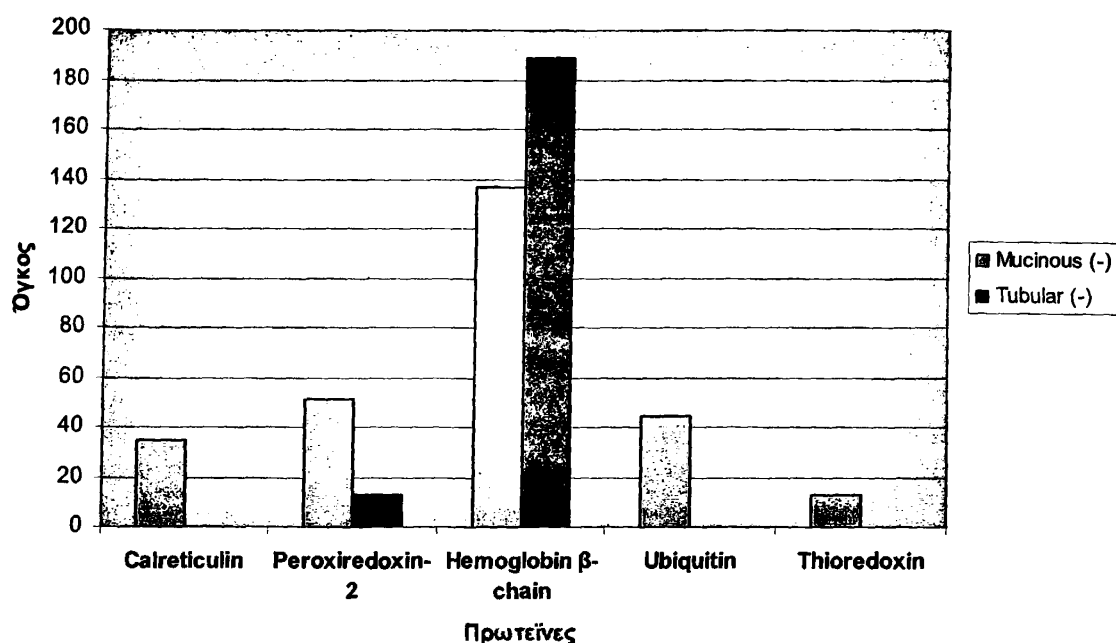
Διαγρ. 11: Σύγκριση έκφρασης των Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 των κυτταροπλασματικών κλασμάτων Λοβιακού Διηθητικού Καρκινώματος Grade III και του αντίστοιχου Καθρέφτη Βιοψίας



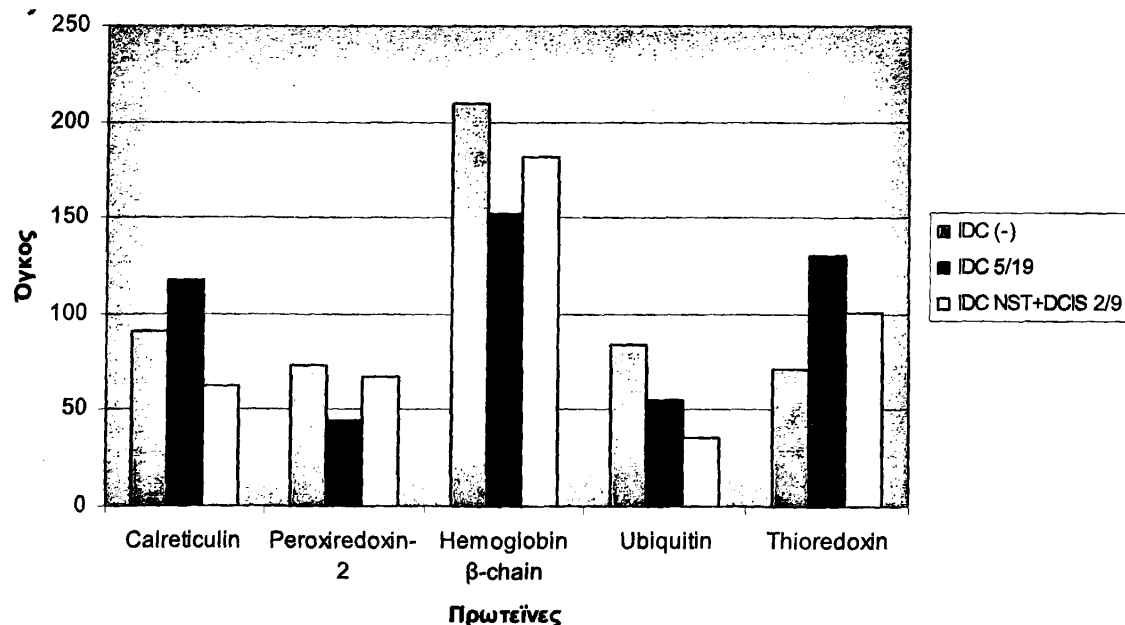
Διαγρ. 12: Σύγκριση έκφρασης γνωστών πρωτεϊνών των κυτταροπλασματικών κλασμάτων μη καρκινικών ιστών



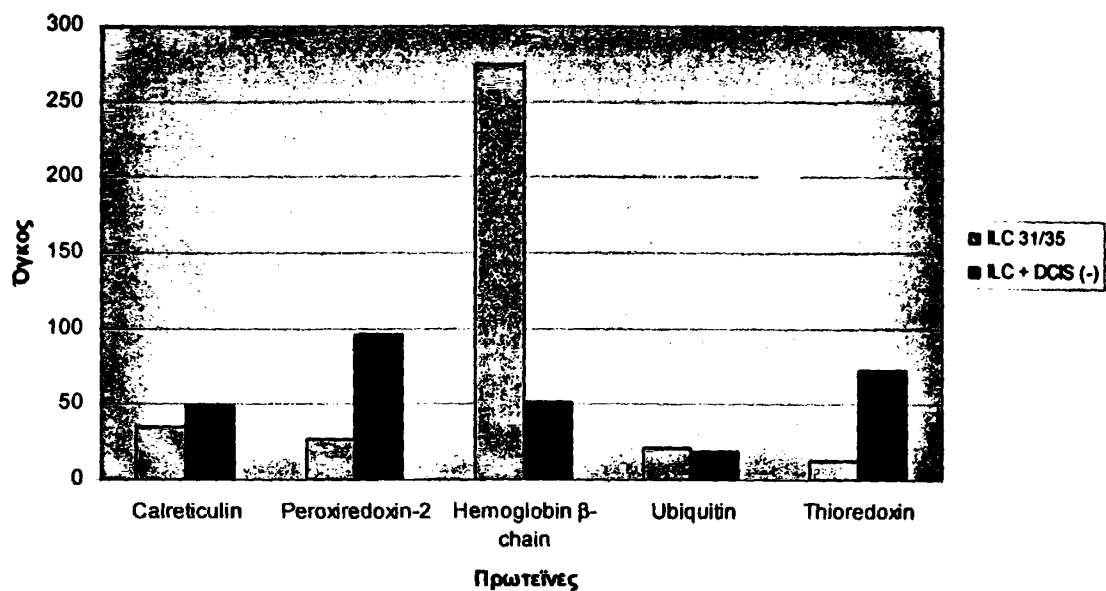
Διαγρ. 13: Σύγκριση έκφρασης πρωτεϊνών μεταξύ κυτταροπλασματικών κλασμάτων Βλεννώδους και Σωληνώδους Καρκινώματος Grade I



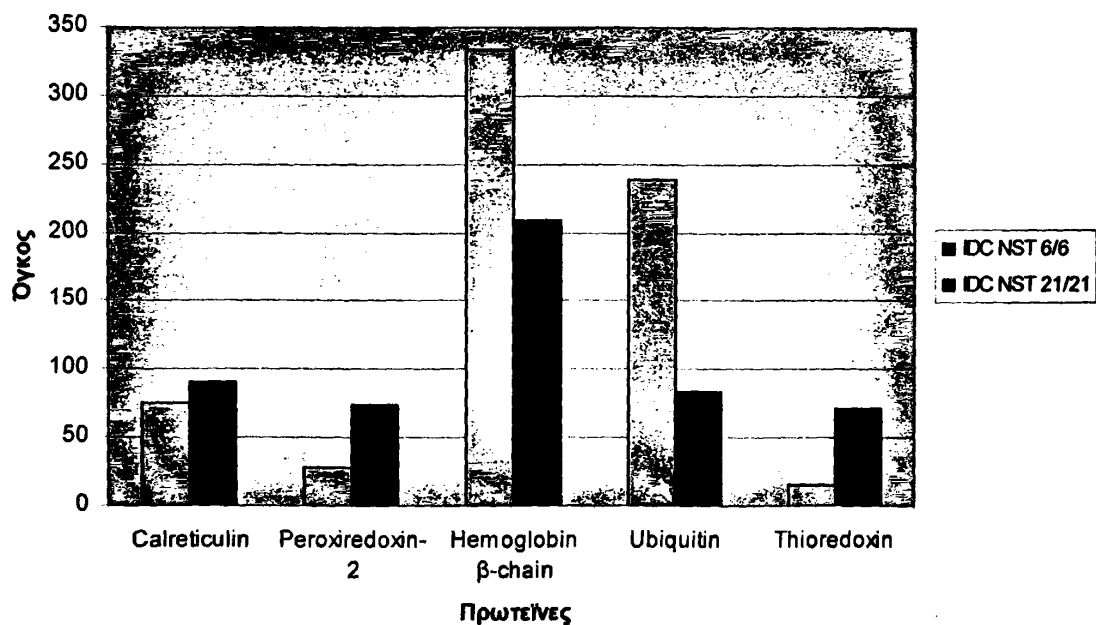
Διαγρ. 14: Σύγκριση έκφρασης γνωστών πρωτεϊνών των κυτταροπλασματικών κλασμάτων Πορογενών Διηθητικών Καρκινωμάτων Μη Ειδικού Τύπου Grade II



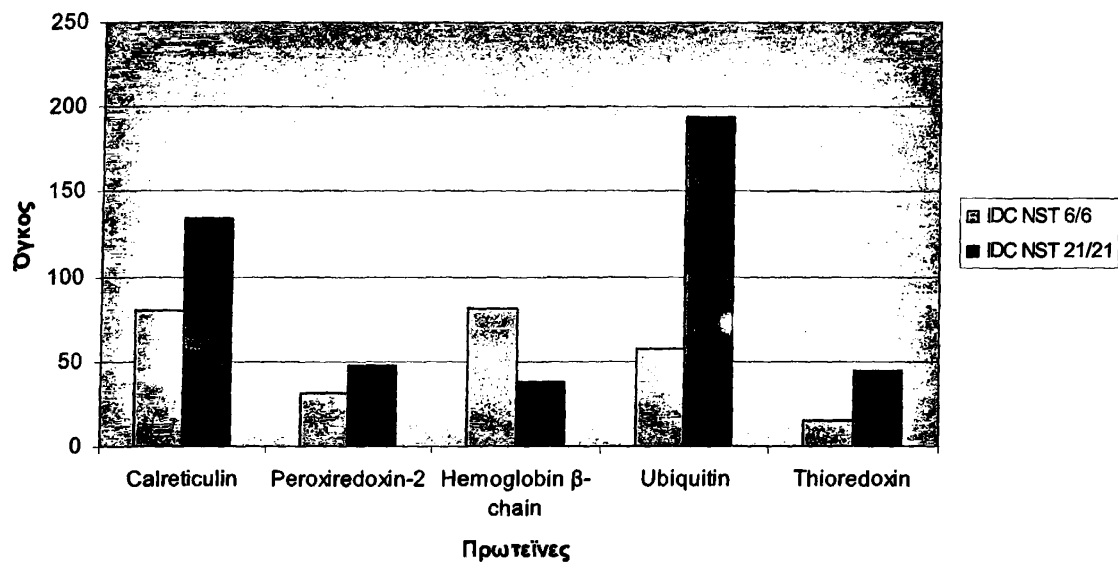
Διαγρ. 15: Σύγκριση έκφρασης γνωστών πρωτεϊνών των κυτταροπλασματικών κλασμάτων Λοβιακών Διηθητικών Καρκινωμάτων Grade II



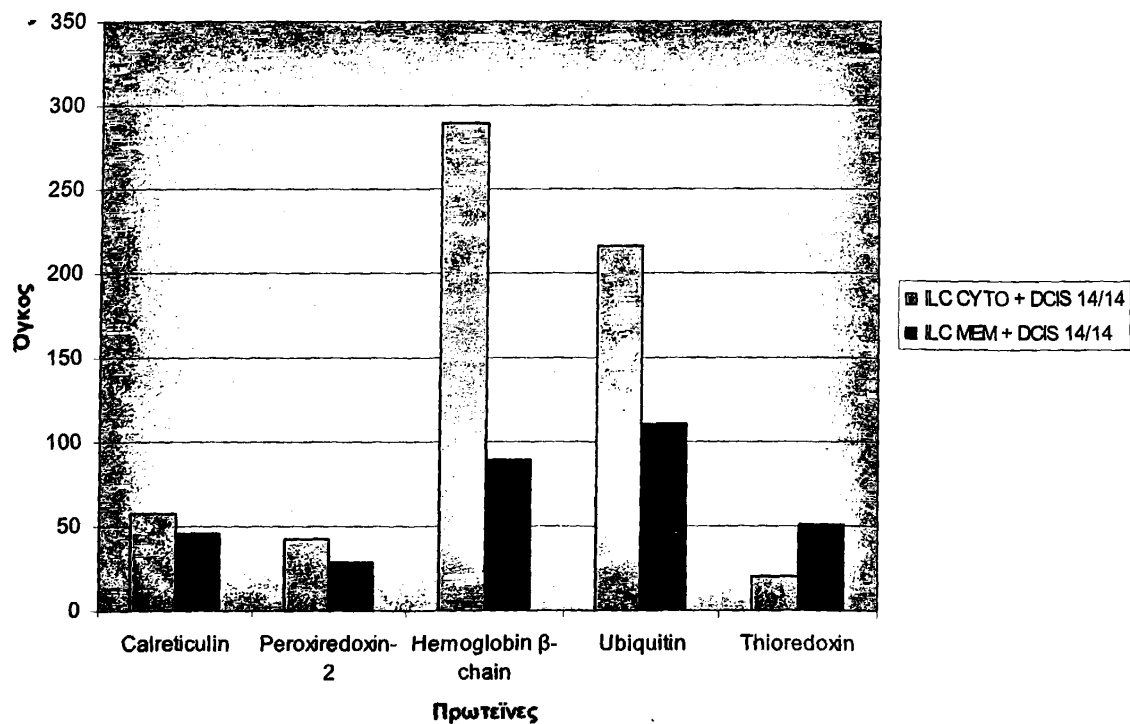
Διαγρ. 16: Σύγκριση έκφρασης γνωστών πρωτεϊνών των κυτταροπλασματικών κλασμάτων Πορογενών Διηθητικών Καρκινωμάτων Μη Ειδικού Τύπου Grade III



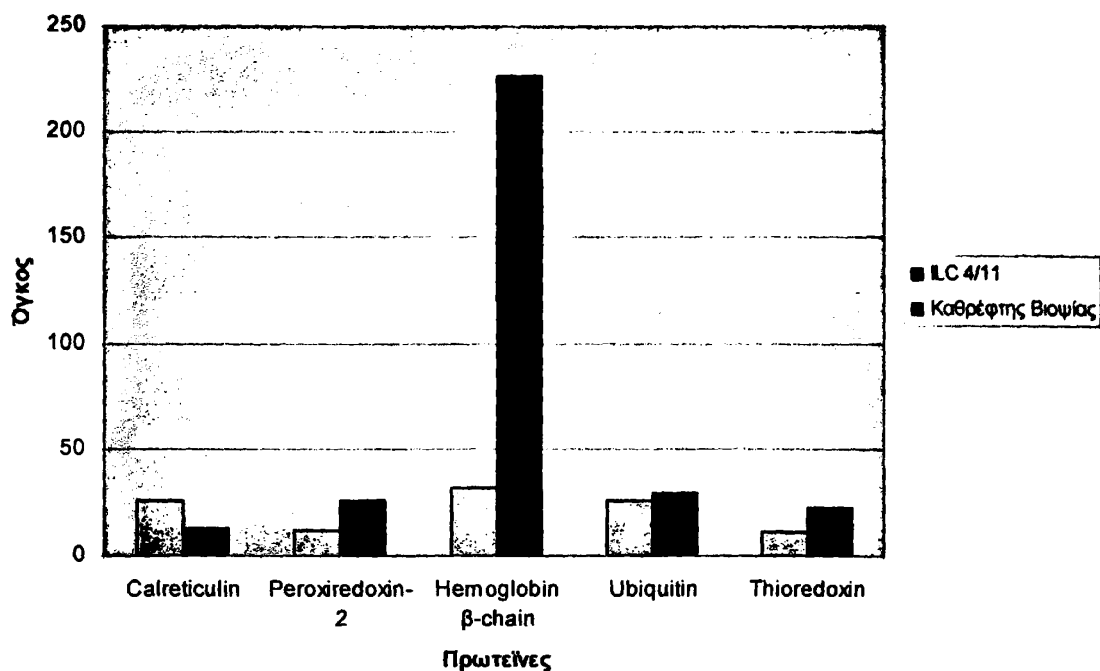
Διαγρ. 17: Σύγκριση έκφρασης γνωστών πρωτεϊνών των μεμβρανικών κλασμάτων Πορογενών Διηθητικών Καρκινωμάτων Μη Ειδικού Τύπου Grade III



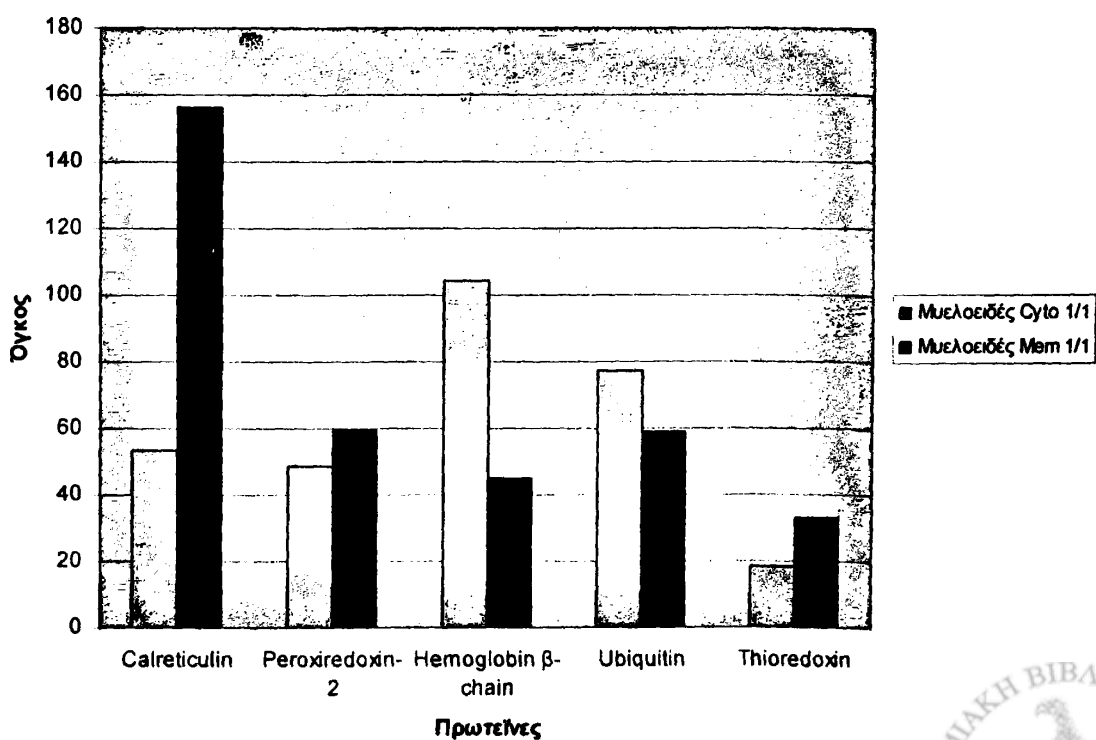
Διαγρ. 18: Σύγκριση έκφρασης γνωστών πρωτεϊνών των κυτταροπλασματικών και μεμβρανικών κλασμάτων Λοβιακού Διηθητικού Καρκινώματος Grade III



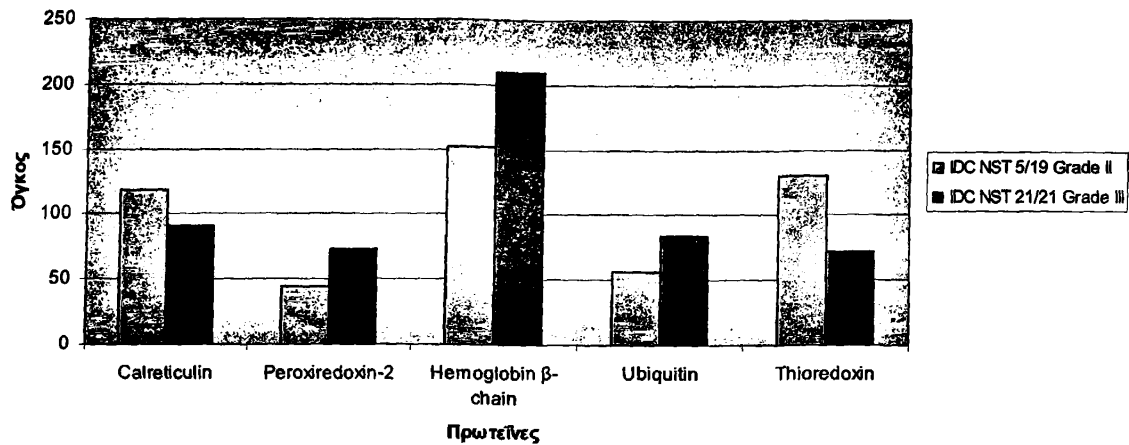
Διαγρ. 19: Σύγκριση έκφρασης γνωστών πρωτεϊνών των κυτταροπλασματικών κλασμάτων Λοβιακού Διηθητικού Καρκινώματος Grade III και του αντίστοιχου Καθρέφτη Βιοψίας



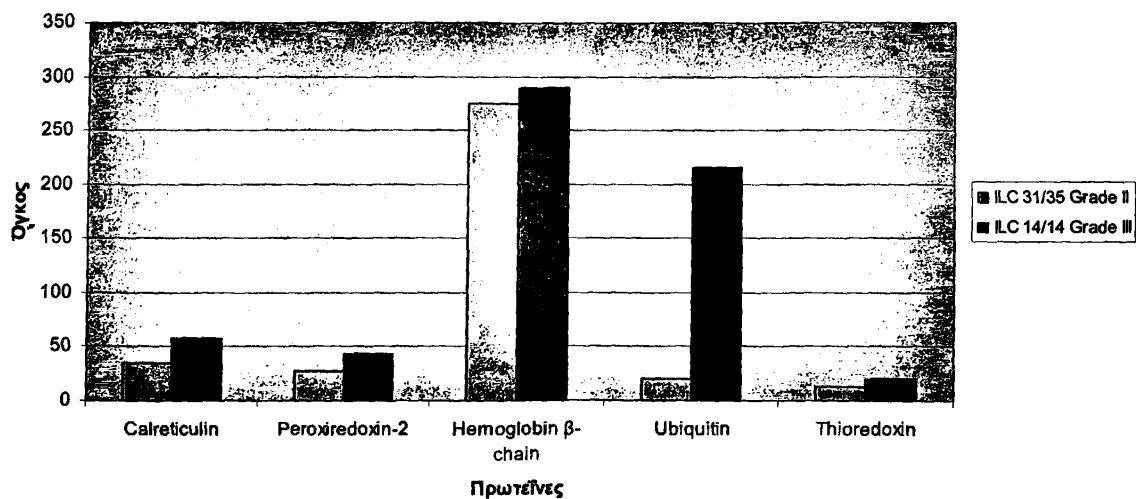
Διαγρ. 20: Σύγκριση έκφρασης γνωστών πρωτεϊνών των κυτταροπλασματικών και μεμβρανικών κλασμάτων Μυελοειδούς Καρκινώματος Grade III



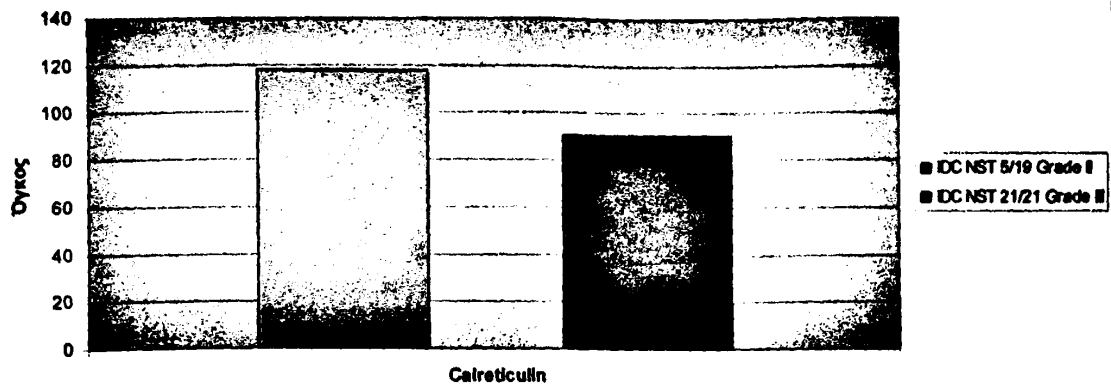
Διαγρ. 21: Σύγκριση έκφρασης γνωστών πρωτεϊνών σε Πορογενή Διηθητικά Καρκινώματα Μη Ειδικού Τύπου Grade II και Grade III



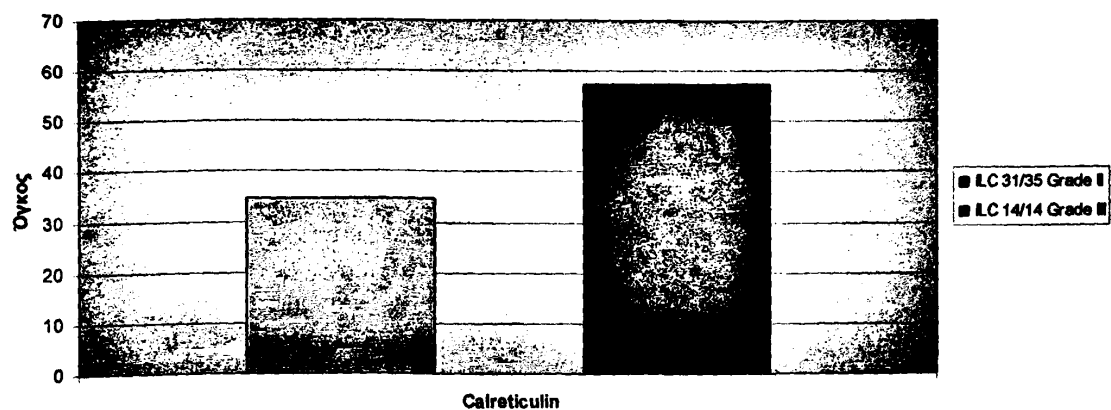
Διαγρ. 22: Σύγκριση έκφρασης γνωστών πρωτεϊνών Λοβιακών Διηθητικών Καρκινωμάτων Grade II και Grade III



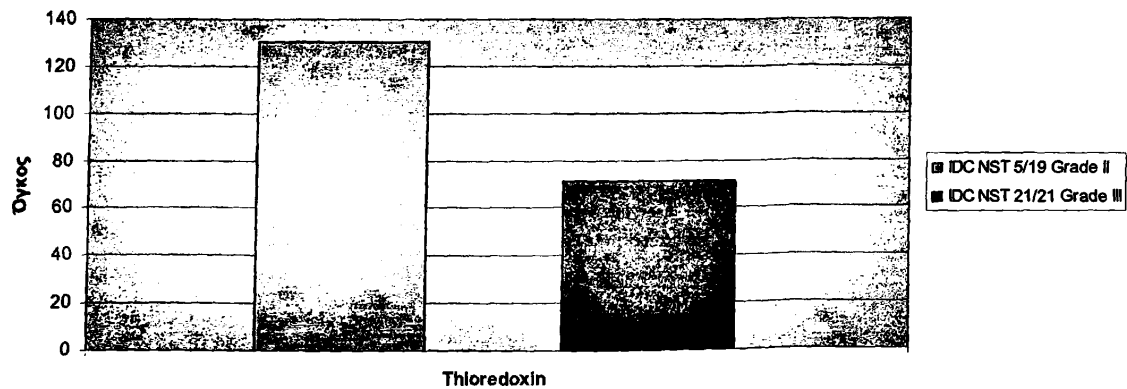
Διαγρ. 23: Σύγκριση έκφρασης της Καλρετικουλίνης Πορογενών Διηθητικών Καρκινωμάτων Grade II και Grade III



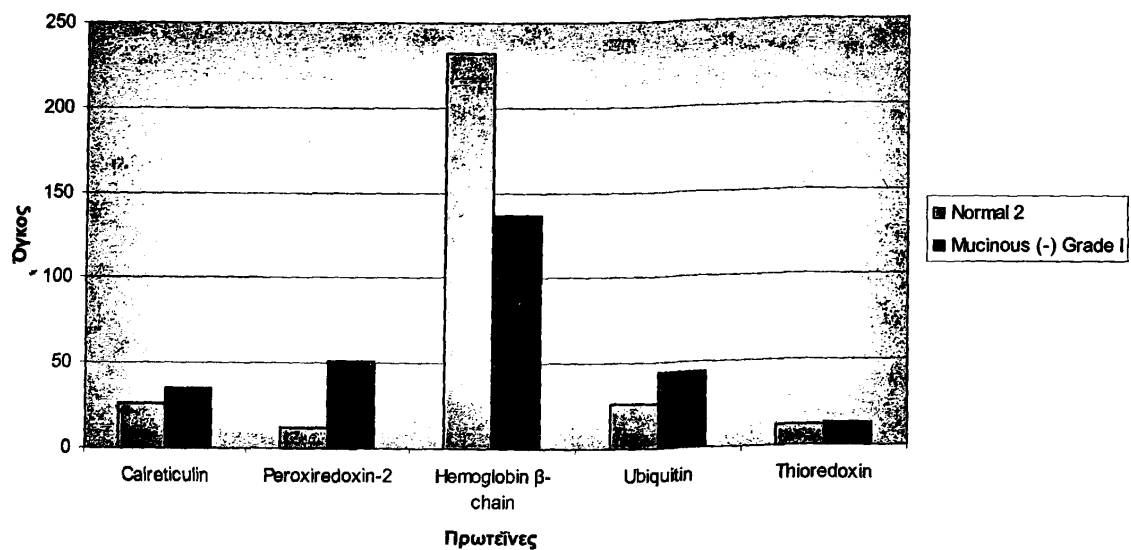
Διαγρ. 24: Σύγκριση έκφρασης της Καλρετικουλίνης Λοβιακών Διηθητικών Καρκινωμάτων Grade II και Grade III



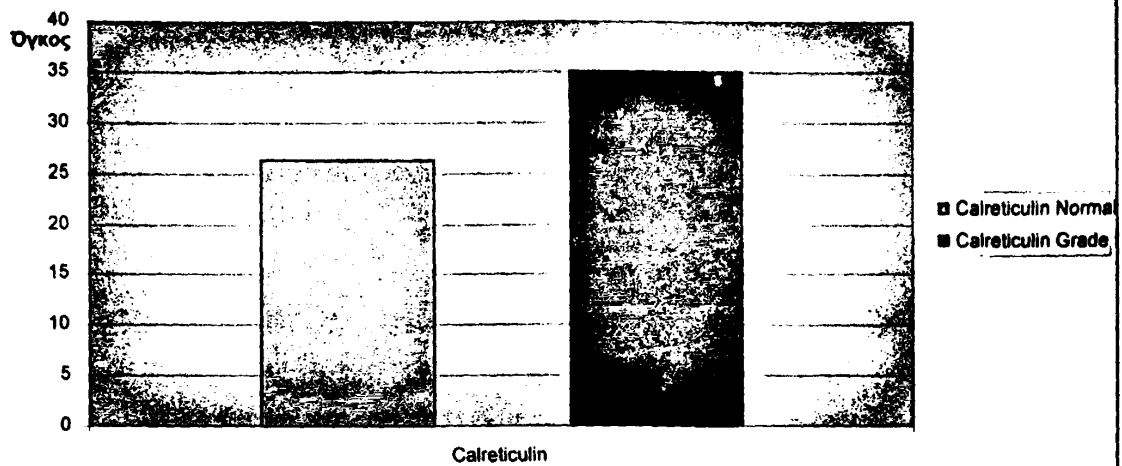
Διαγρ. 25: Σύγκριση έκφρασης της Θειορεδοξίνης Πορογενών Διηθητικών Καρκινωμάτων Grade II και Grade III



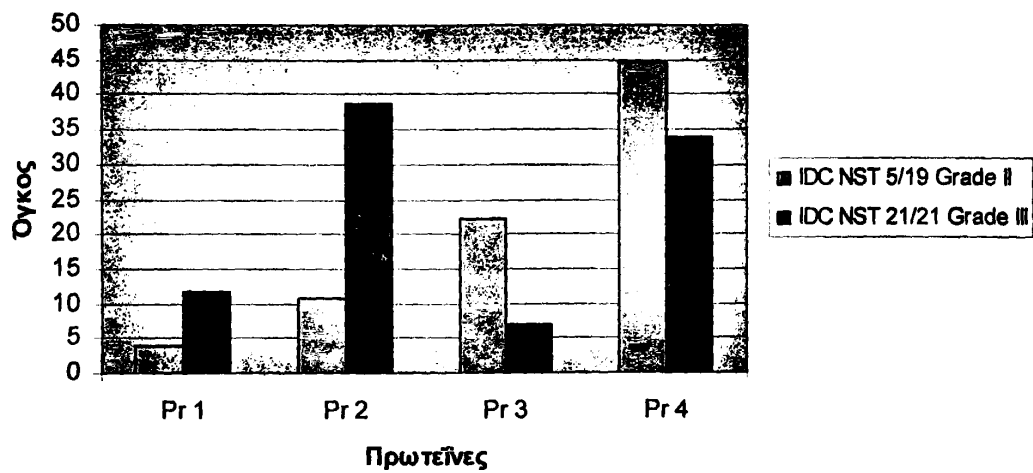
Διαγρ. 27: Σύγκριση έκφρασης γνωστών πρωτεϊνών κυτταροπλασματικών κλασμάτων μεταξύ μη καρκινικού ιστού και Βλεννώδους Καρκινώματος Grade I



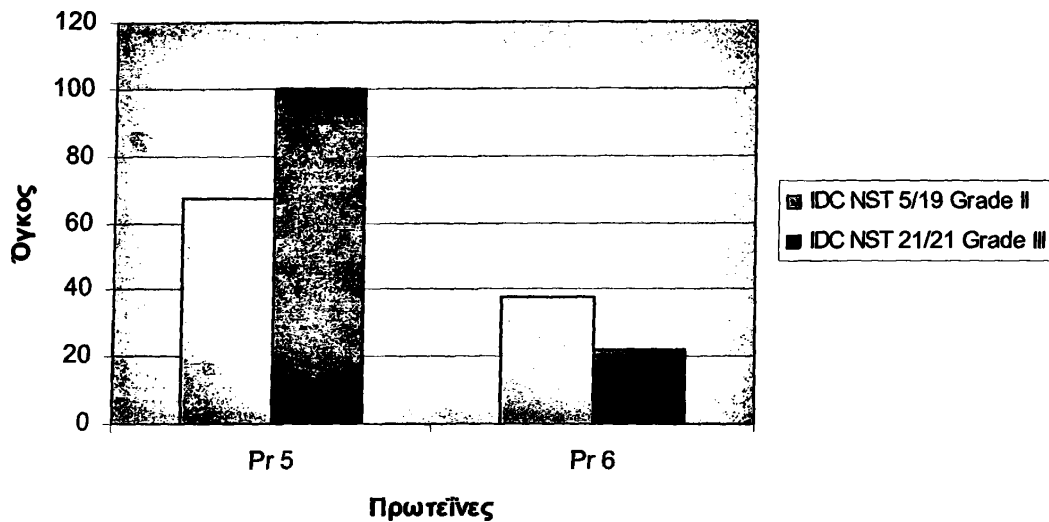
Διαγρ. 28: Σύγκριση έκφρασης της Καλρετικουλίνης μεταξύ μη καρκινικού ιστού και Βλεννώδους Καρκινώματος Grade I



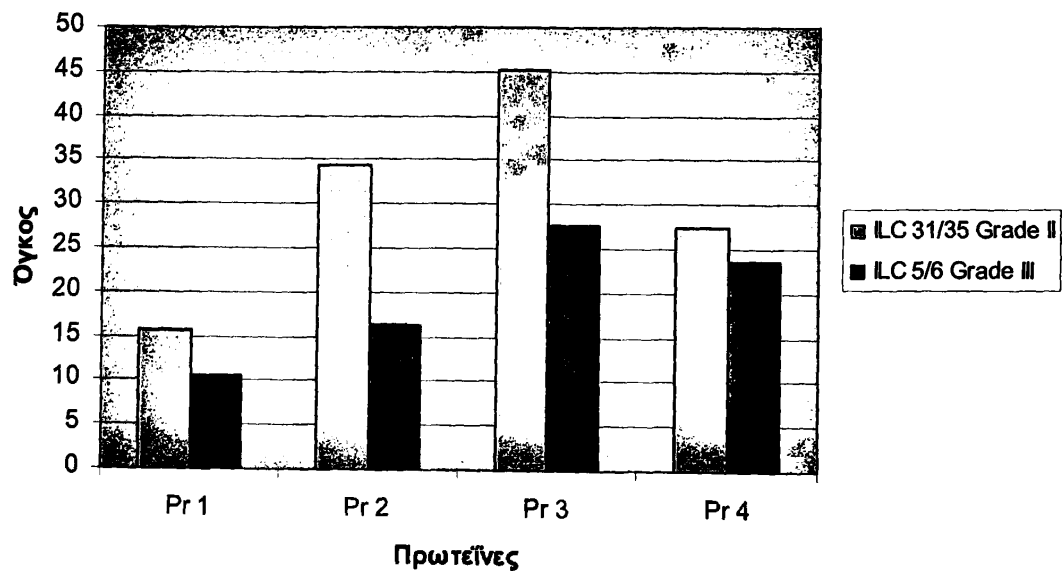
Διαγρ. 29: Σύγκριση έκφρασης των Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 των κυτταροπλασματικών κλασμάτων Πορογενών Διηθητικών Καρκινωμάτων Μη Ειδικού Τύπου Grade II και Grade III



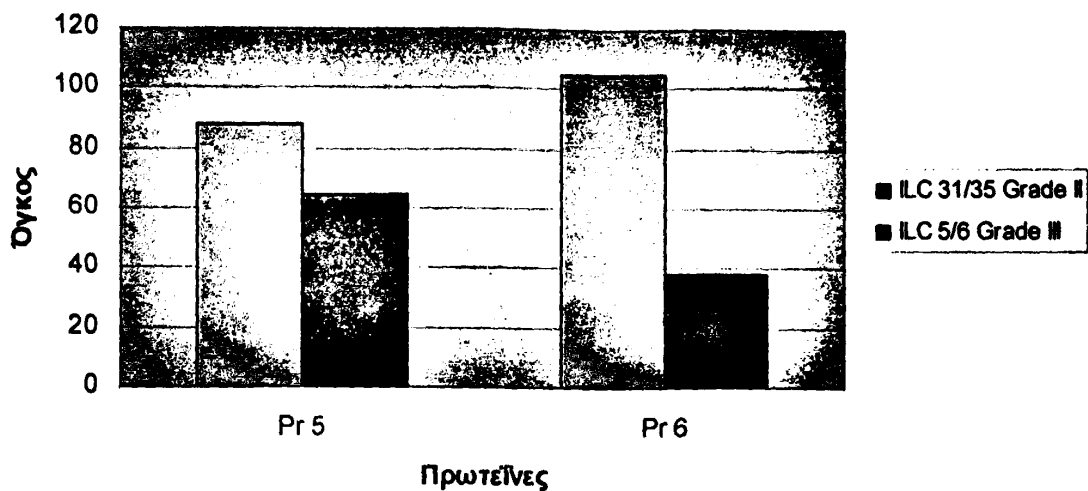
Διαγρ. 30: Σύγκριση έκφρασης των Pr5 και Pr6 των μεμβρανικών κλασμάτων Πορογενών Διηθητικών Καρκινωμάτων Μη Ειδικού Τύπου Grade II και Grade III



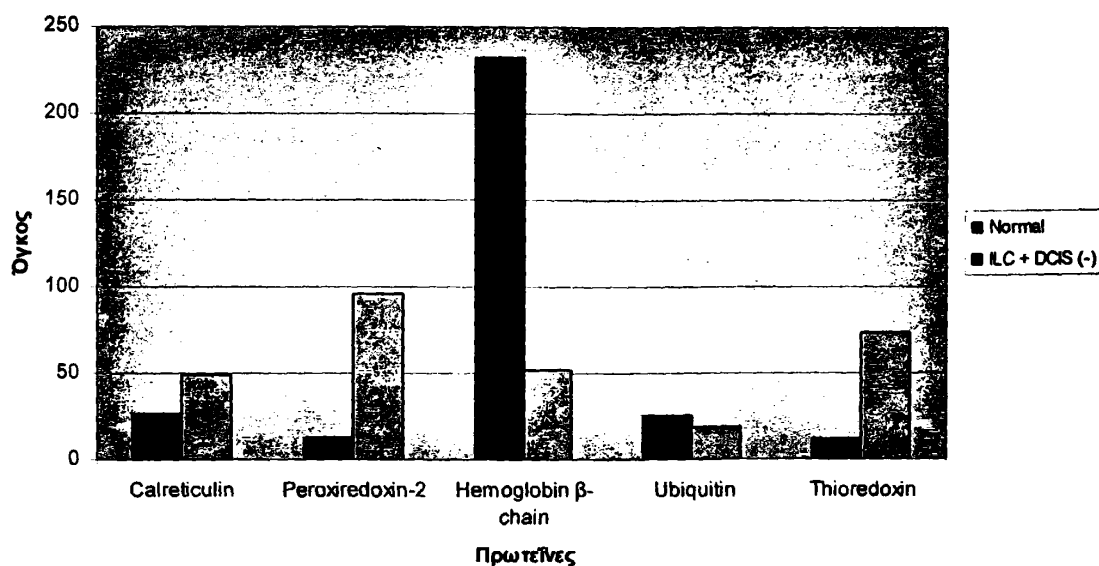
Διαγρ. 31: Σύγκριση έκφρασης των Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 των κυτταροπλασματικών κλασμάτων Λοβιακών Διηθητικών Καρκινωμάτων Grade II και Grade III



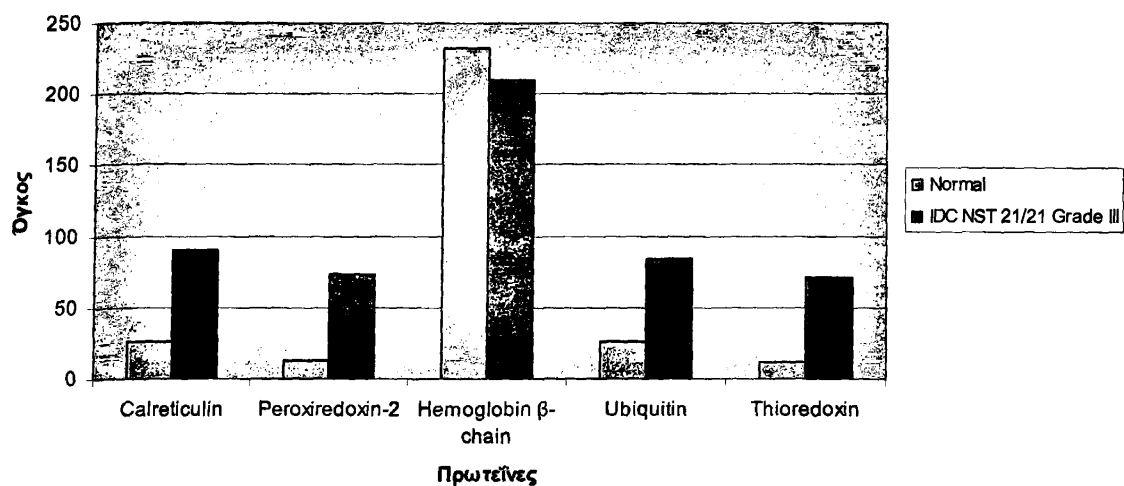
Διαγρ. 32: Σύγκριση έκφρασης των Pr5 και Pr6 των μεμβρανικών κλασμάτων Λοβιακών Διηθητικών Καρκινωμάτων Grade II και Grade III



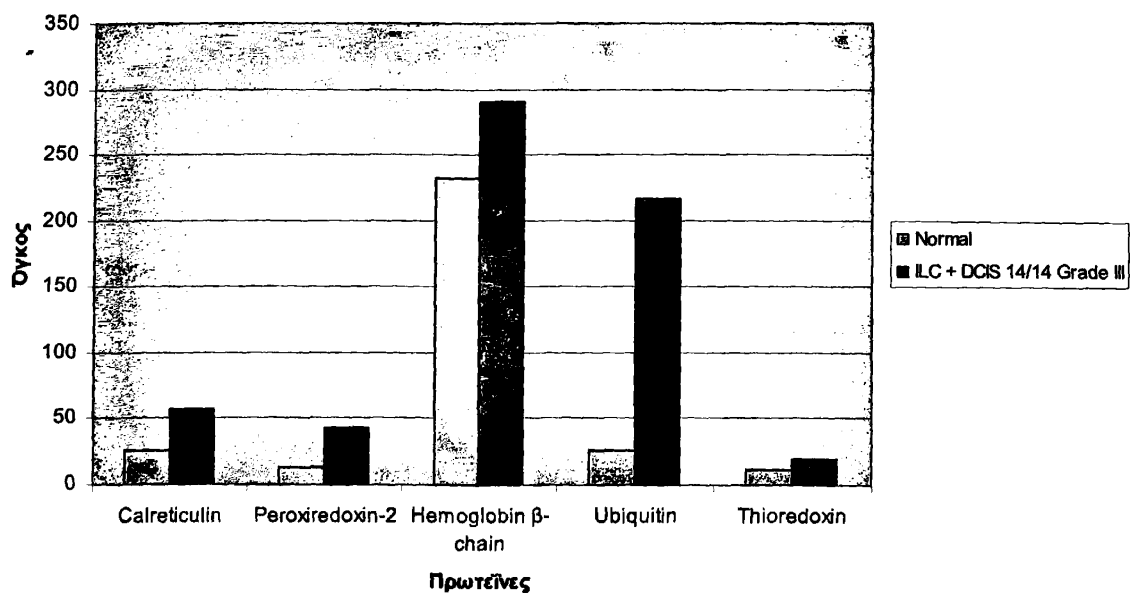
Διαγρ. 33: Σύγκριση έκφρασης γνωστών πρωτεϊνών των κυτταροπλασματικών κλασμάτων Λοβιακών Διηθητικών Καρκινωμάτων Grade II και μη καρκινικών ιστών



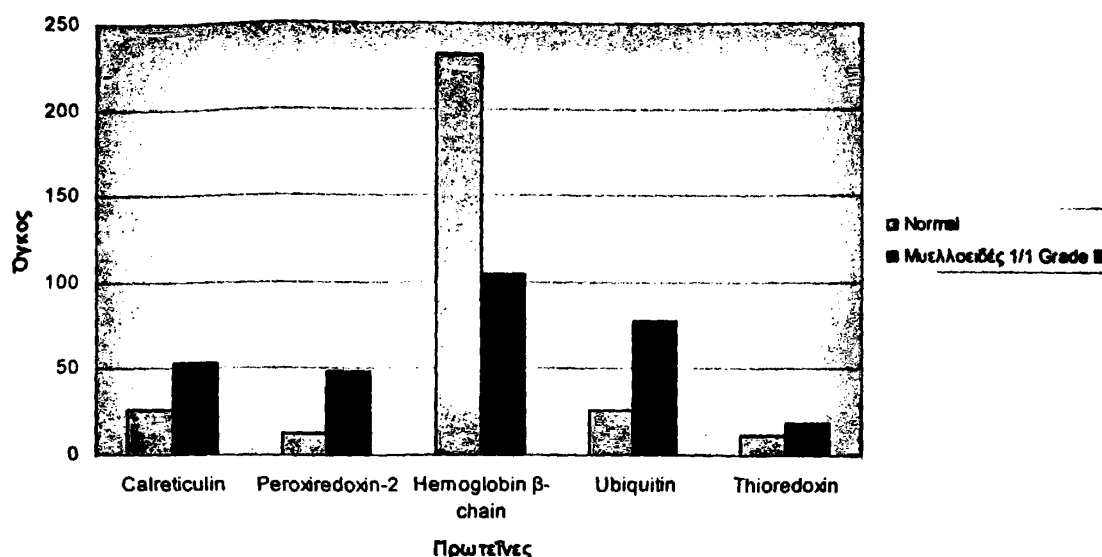
Διαγρ. 34: Σύγκριση έκφρασης γνωστών πρωτεϊνών των κυτταροπλασματικών κλασμάτων μη καρκινικού ιστού και πορογενούς διηθητικού καρκινώματος μη ειδικού τύπου Grade III



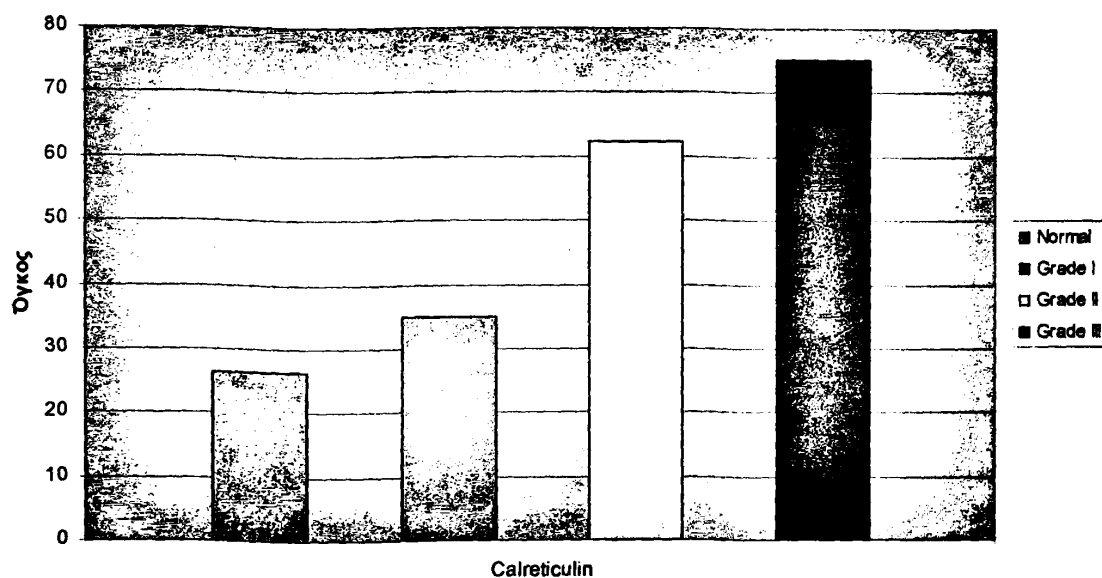
Διαγρ. 35: Σύγκριση έκφρασης γνωστών πρωτεϊνών των κυτταροπλασματικών κλασμάτων μη καρκινικού ιστού και Λοβιακού διηθητικού Καρκινώματος Grade III



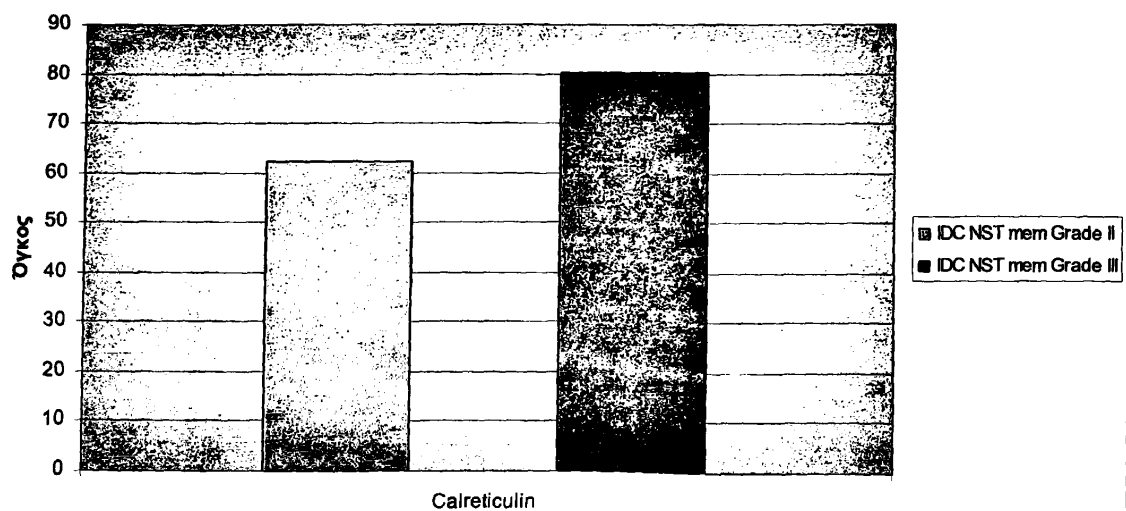
Διαγρ. 36: Σύγκριση έκφρασης γνωστών πρωτεϊνών των κυτταροπλασματικών κλασμάτων μη καρκινικών ιστών και μυελοειδούς καρκινώματος Grade III



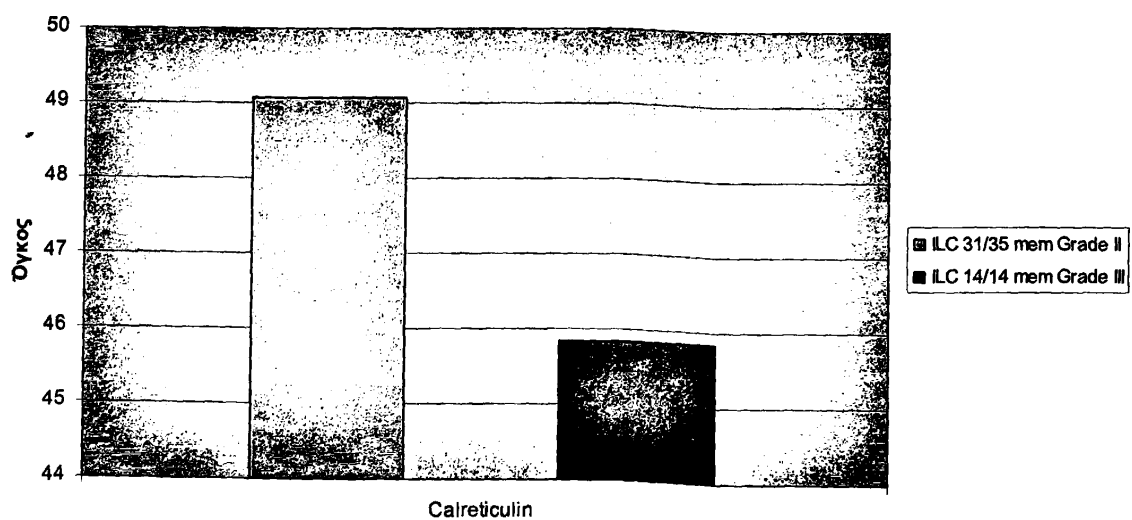
Διαγρ. 37: Σύγκριση έκφρασης της καλρετικουλίνης μεταξύ δειγμάτων από μη καρκινικούς ιστούς και δείγματα ιστών Grade I, Grade II και Grade III



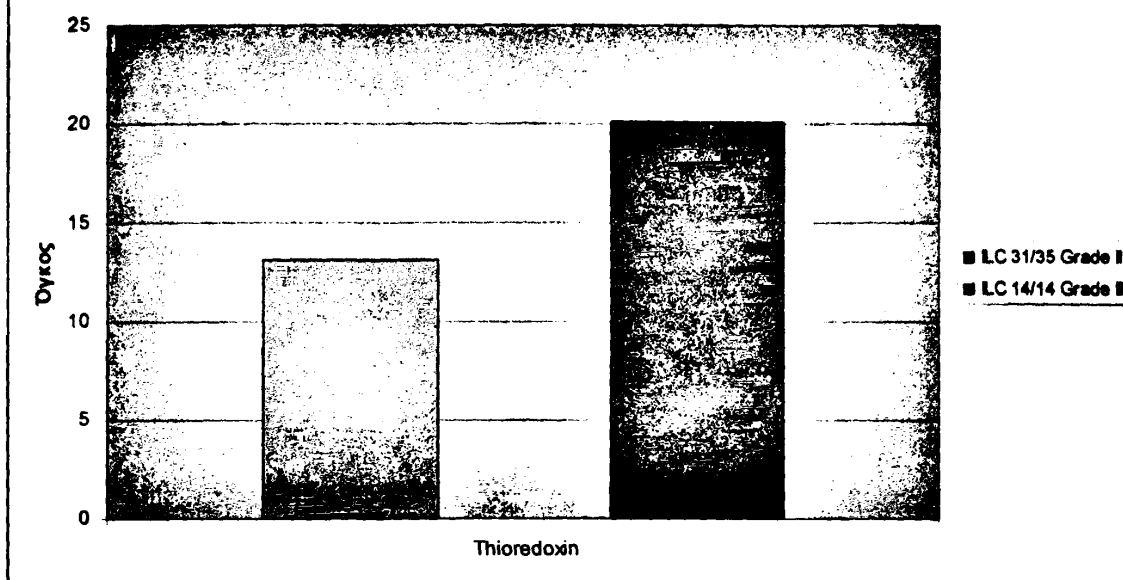
Διαγρ. 38: Σύγκριση έκφρασης της καλρετικουλίνης στα μεμβρανικά κλάσματα πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων Grade II και Grade III



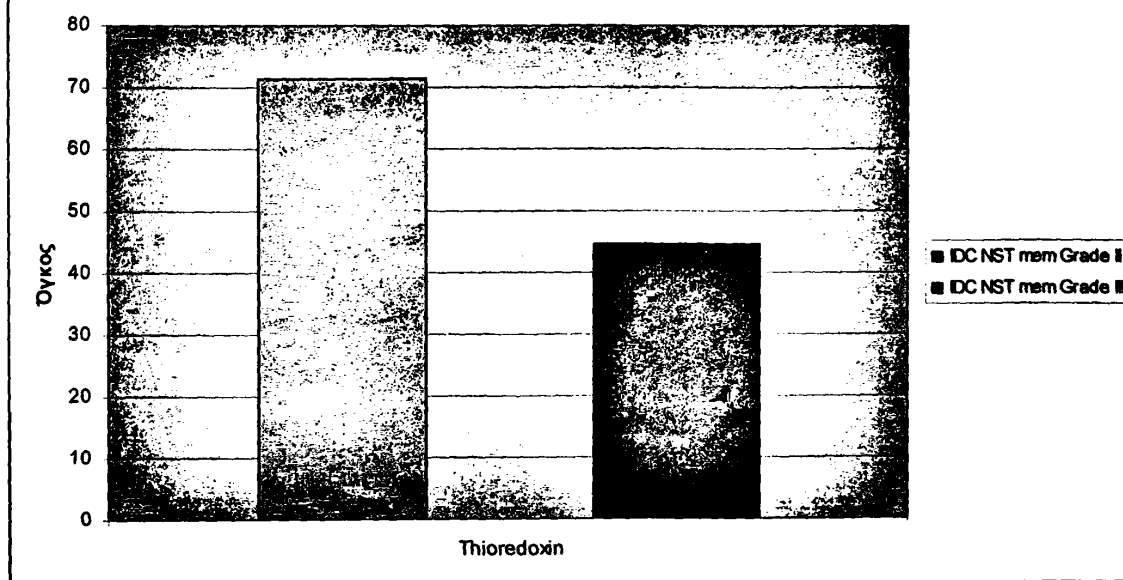
Διαγρ. 39: Σύγκριση της καλρετικουλίνης στα μεμβρανικά κλάσματα λοβιακών διηθητικών καρκινωμάτων Grade II και Grade III



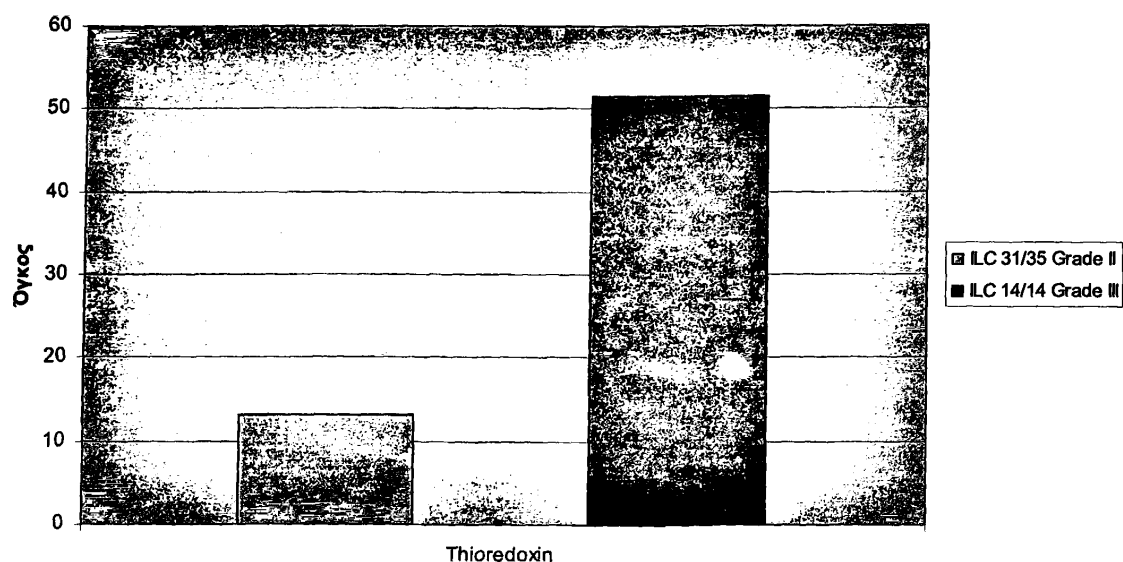
Διαγρ. 40: Σύγκριση έκφρασης της θειορεδοξίνης των κυτταροπλασματικών κλασμάτων λοβιακών διηθητικών καρκινωμάτων Grade II και Grade III



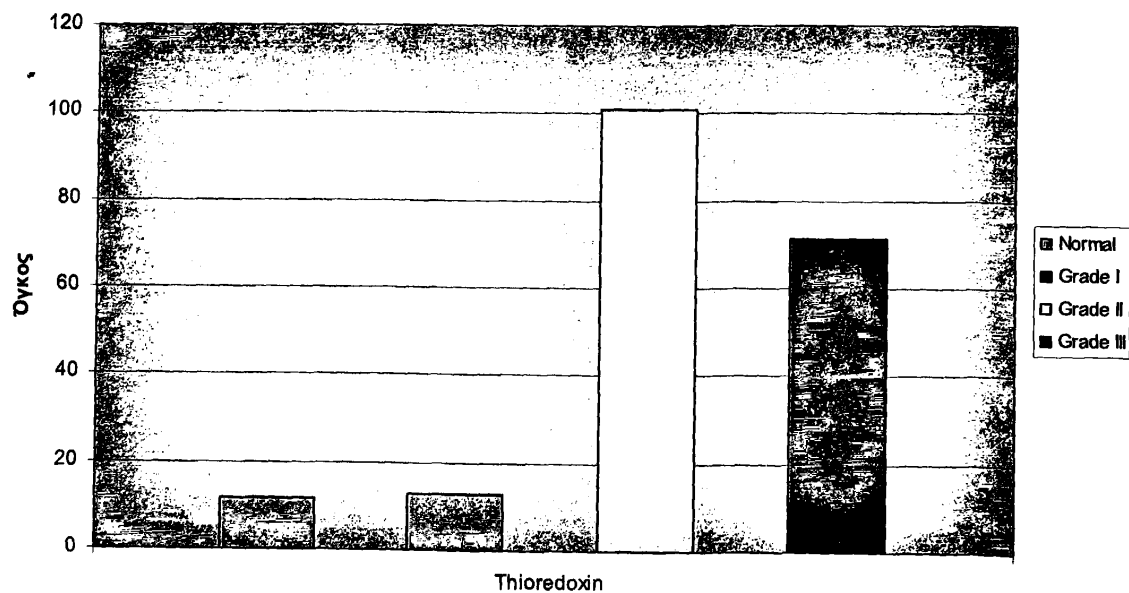
Διαγρ. 41: Σύγκριση έκφρασης της θειορεδοξίνης των μεμβρανικών κλασμάτων πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μη ειδικού τύπου Grade II και Grade III



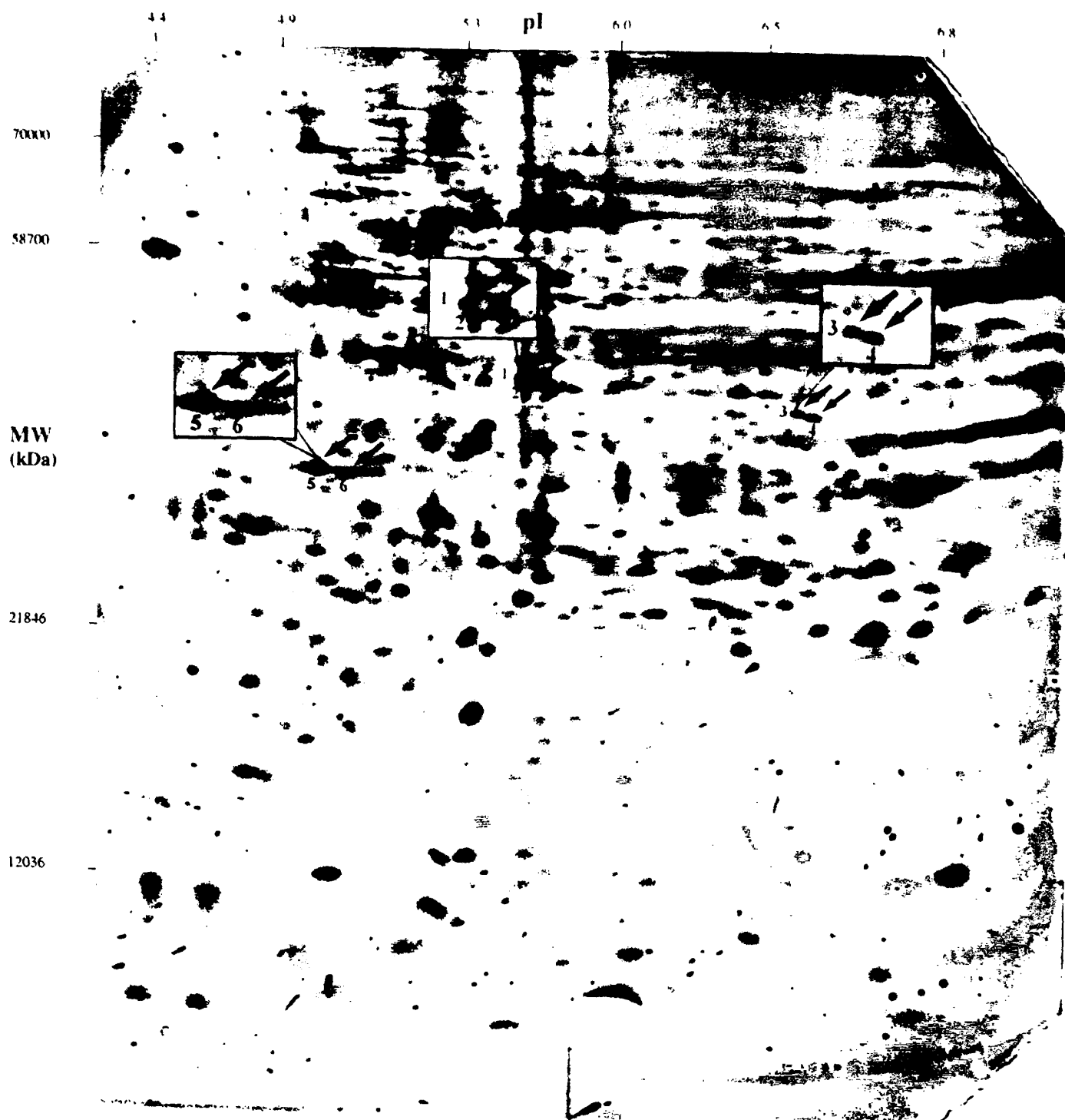
Διαγρ. 42: Σύγκριση έκφρασης της θειορεδοξίνης των μεμβρανικών κλασμάτων λοβιακών διηθητικών καρκινωμάτων Grade II και Grade III



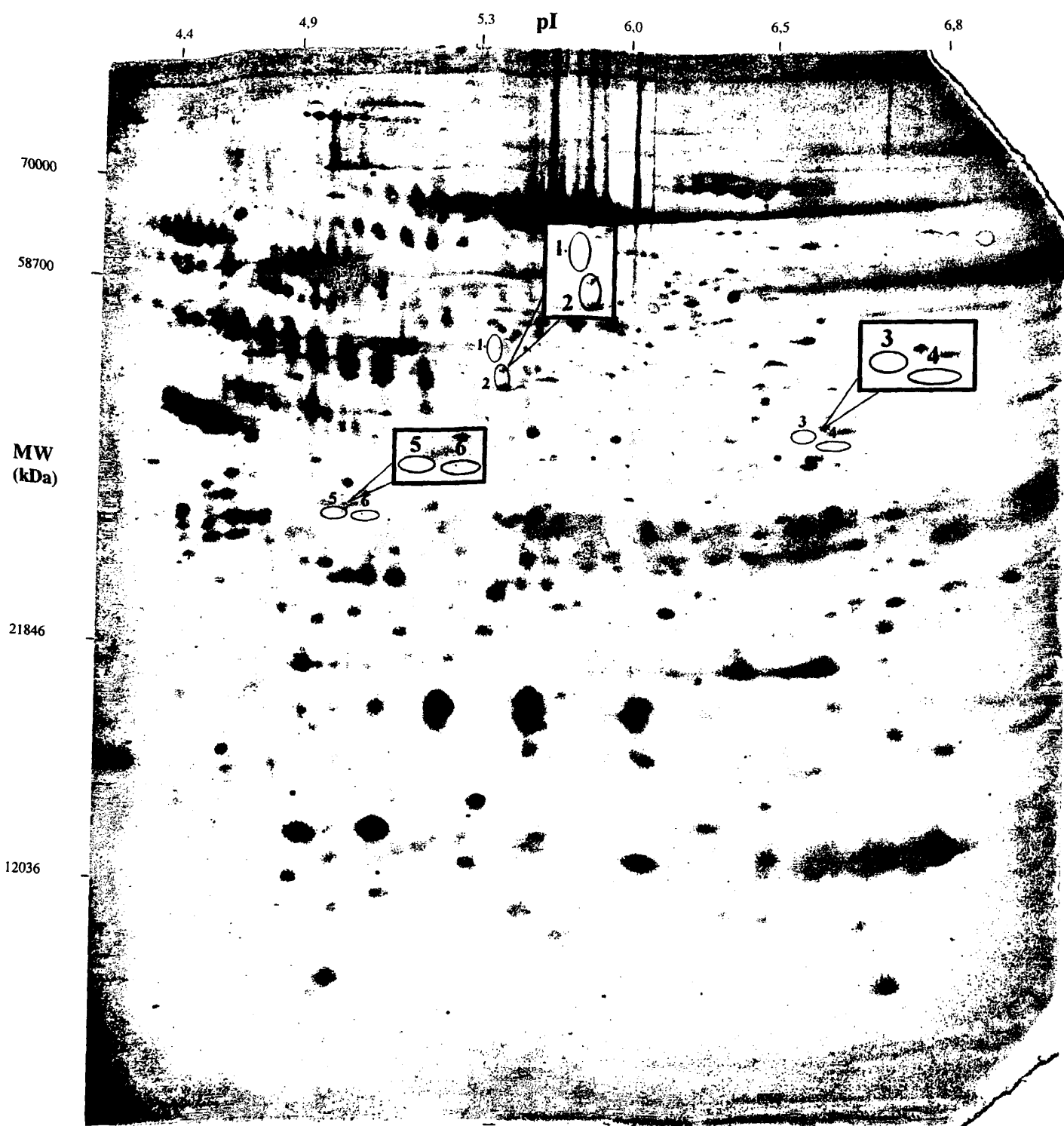
Διαγρ. 43: Σύγκριση έκφρασης της θειορεδοξίνης μεταξύ δειγμάτων από μη καρκινικούς ιστούς και δείγματα ιστών Grade I, Grade II και Grade III



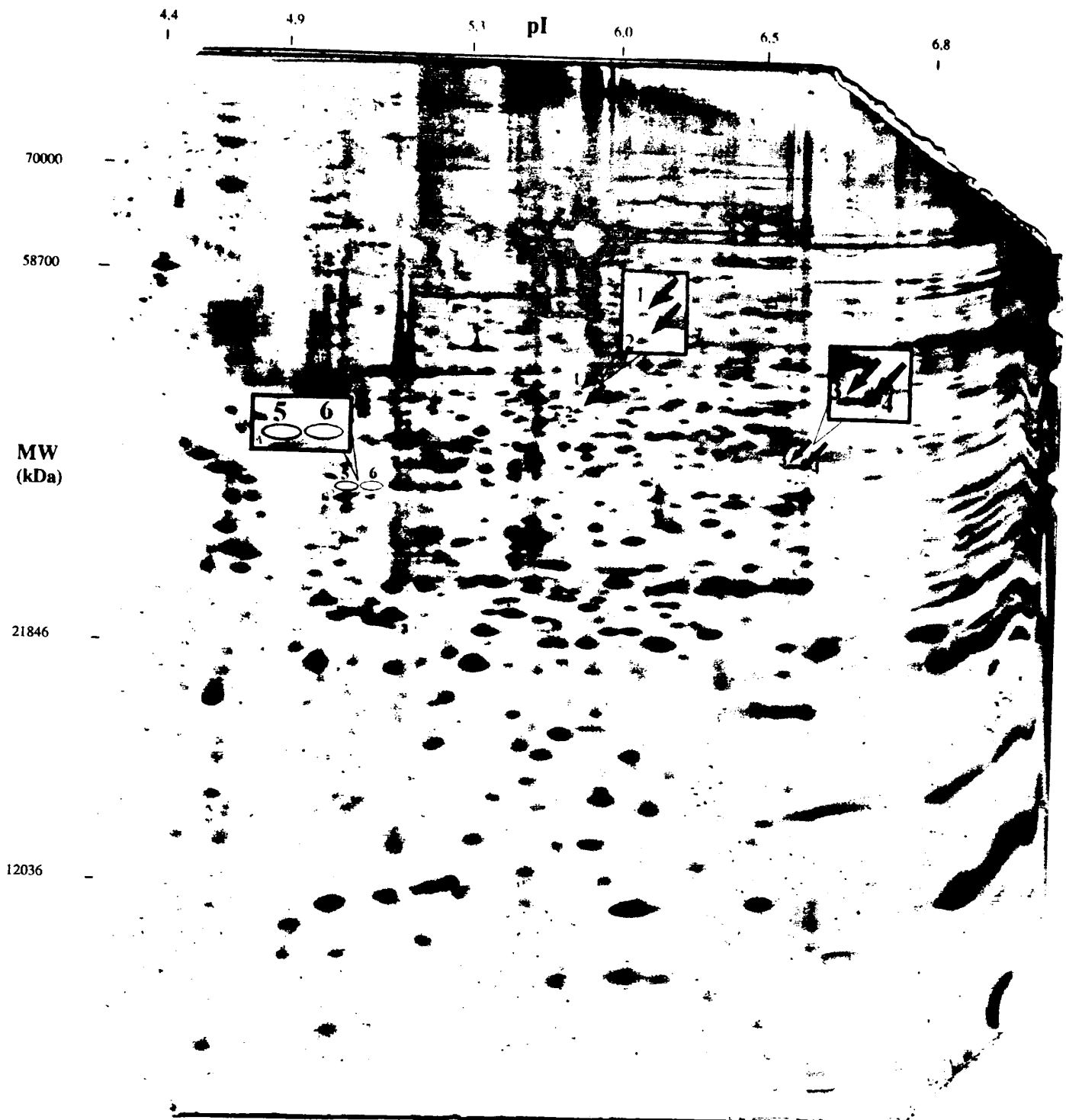
6.3 Εικόνες



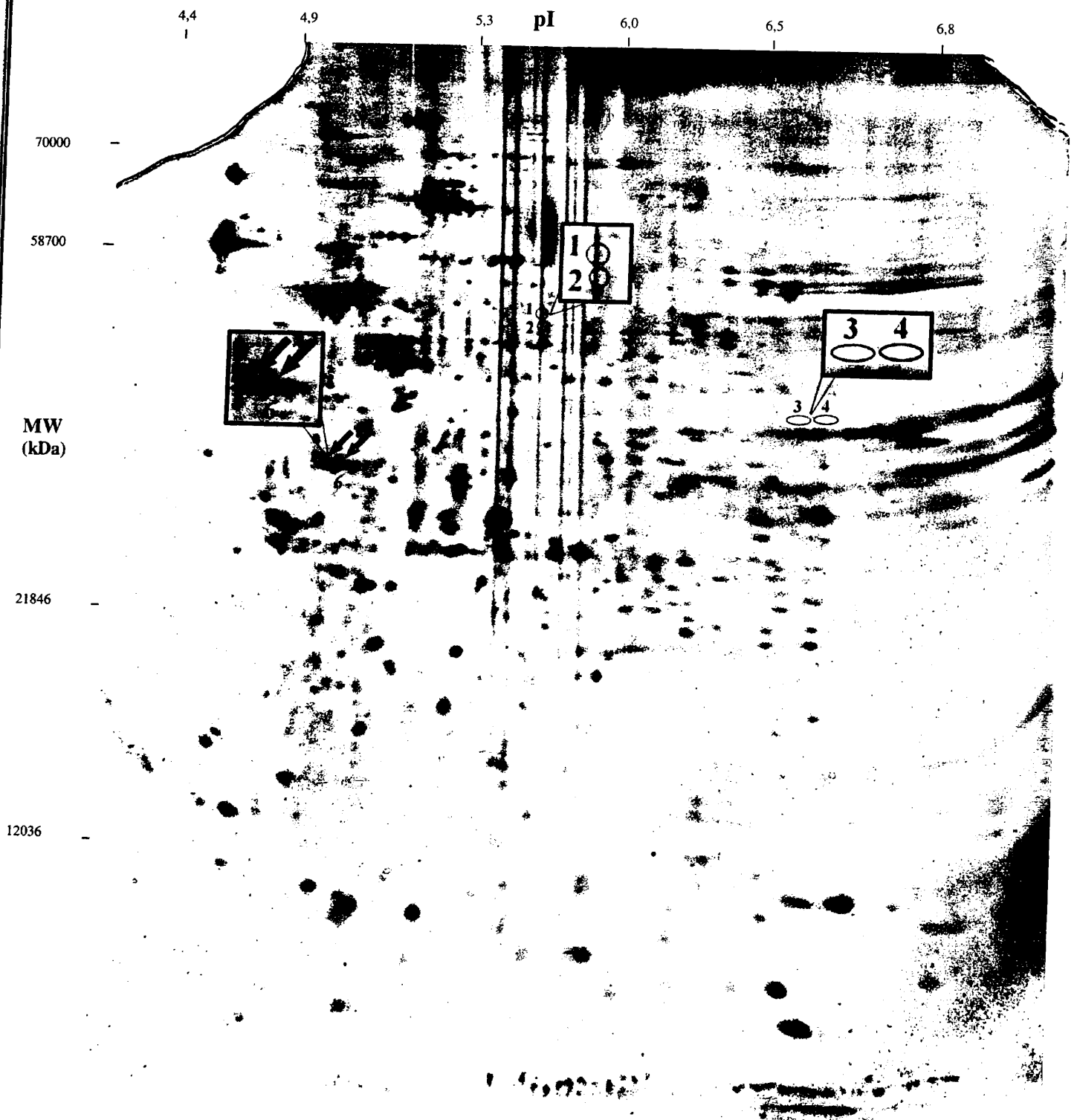
Εικ. 1: Ηλεκτροφόρημα καρκινικού ιστού, όπου απεικονίζονται οι πρωτεΐνες που εκφράζονται μόνο στα καρκινικά κύτταρα (χοντρά βέλη, ποιοτικές διαφορές).



Εικ. 2: Ηλεκτροφόρημα μη καρκινικού ιστού όπου φαίνεται η απουσία των πρωτεϊνών που εκφράζονται μόνο στα καρκινικά δείγματα (κύκλοι).



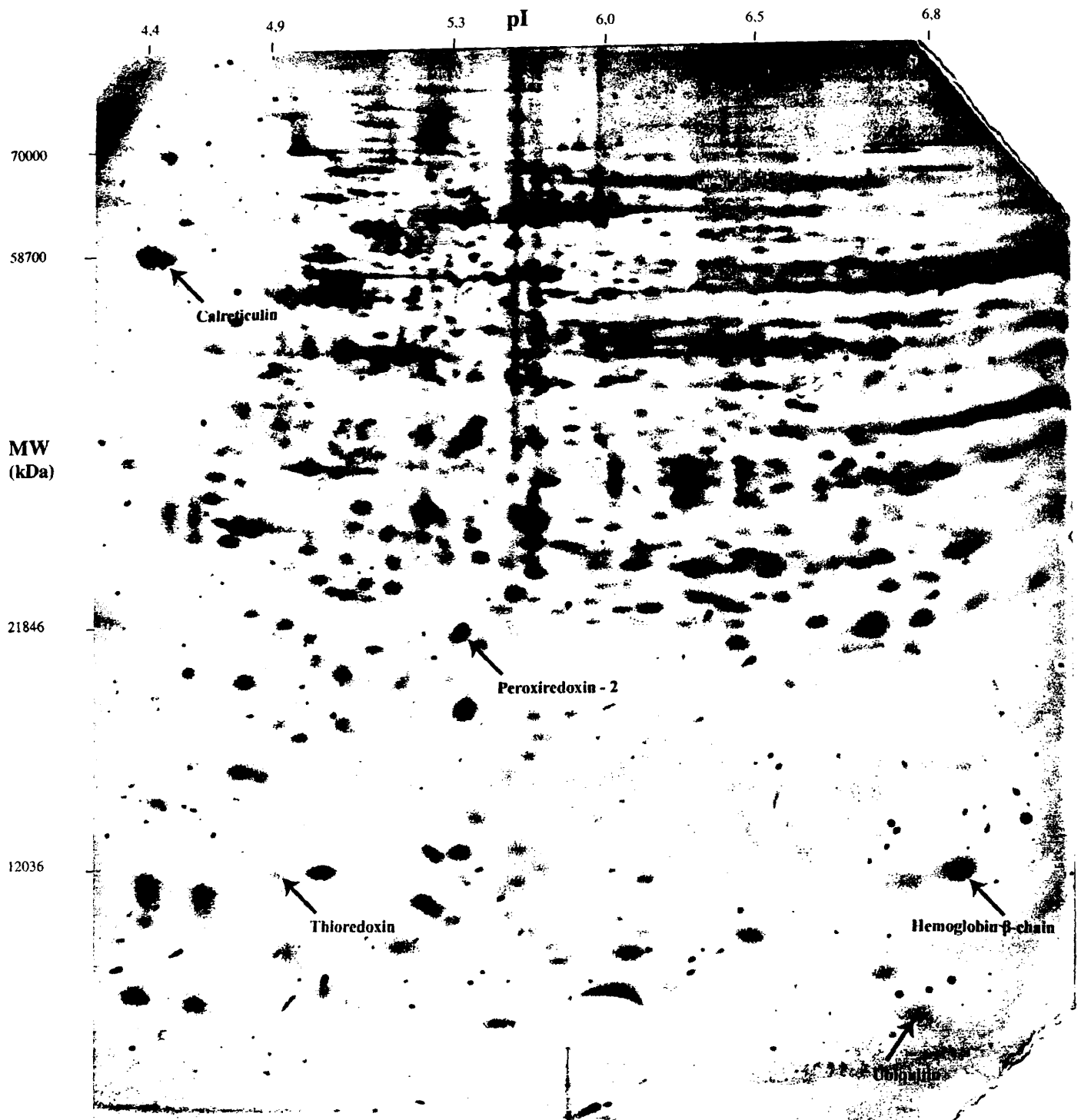
Εικ. 3: Ηλεκτροφόρημα κυτταροπλασματικού κλάσματος καρκινικού ιστού όπου απεικονίζονται οι πρωτεΐνες Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 (χοντρά βέλη).



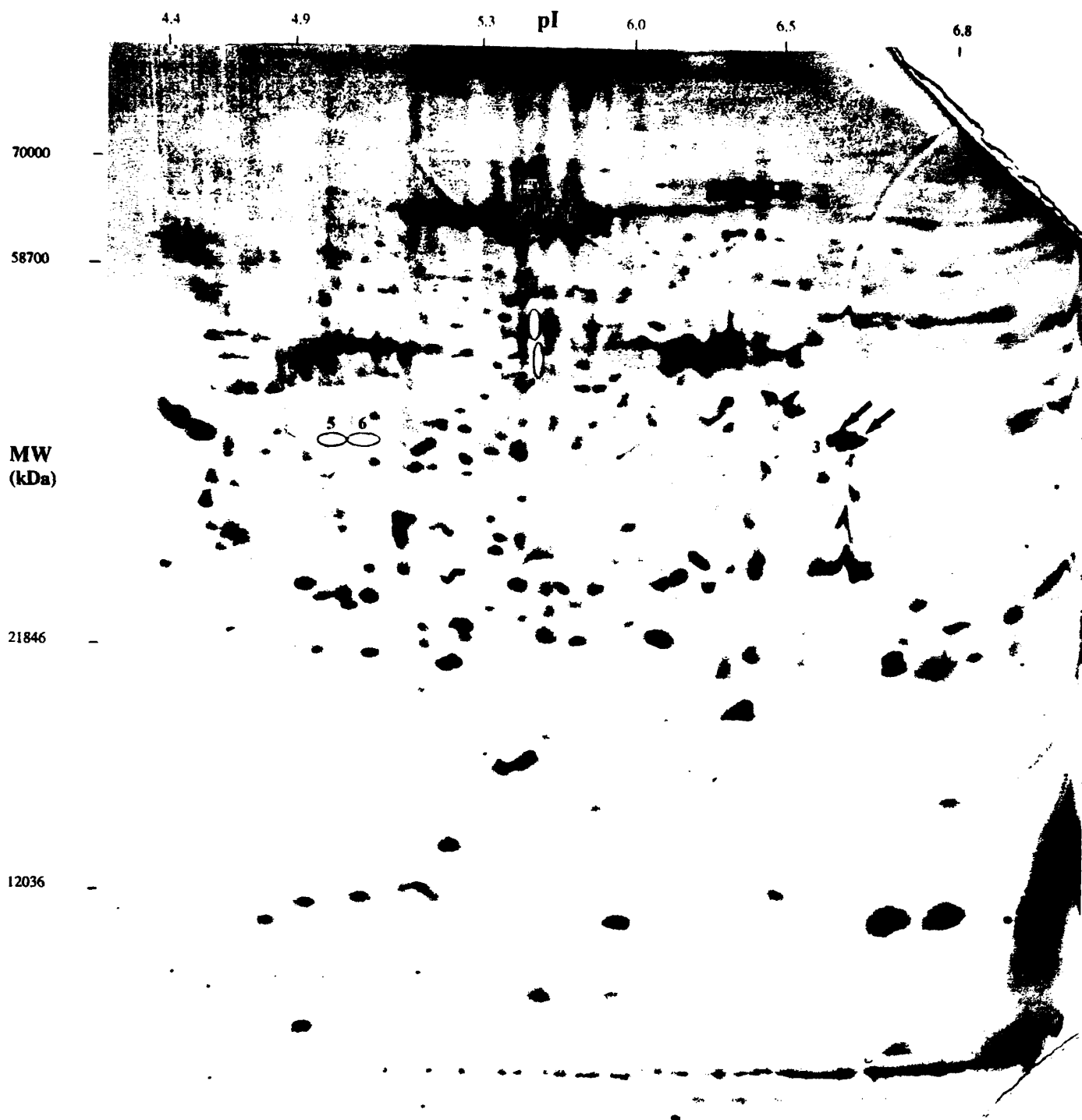
Εικ. 4: Ηλεκτροφόρημα μεμβρανικού κλάσματος καρκινικού ιστού όπου απεικονίζονται οι πρωτεΐνες Pr5 και Pr6 (χοντρά βέλη).



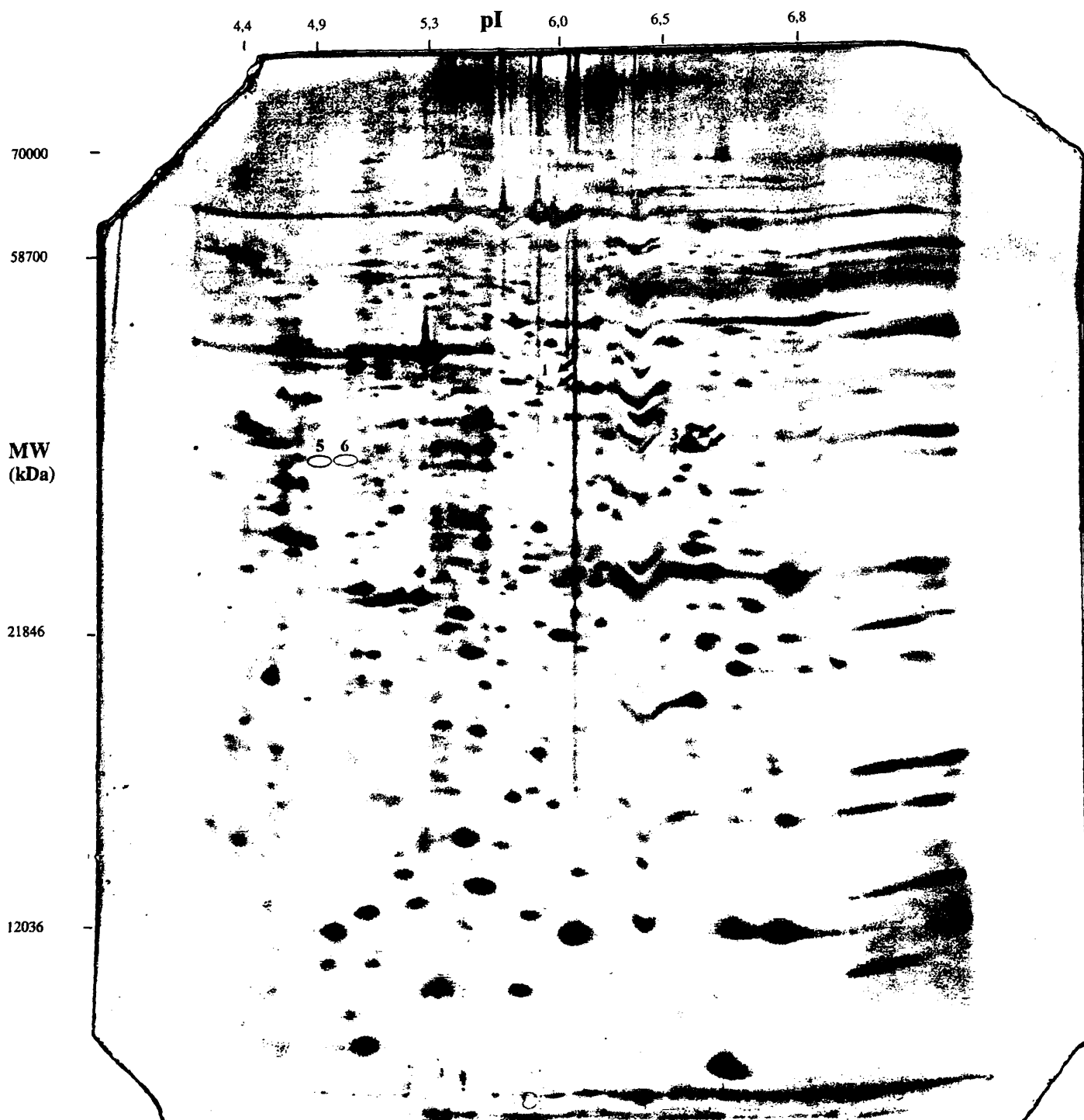
Εικ. 5: Ηλεκτροφόρημα μη καρκινικού ιστού όπου απεικονίζονται πέντε αναγνωρισμένες πρωτεΐνες (λεπτά βέλη), οι οποίες παρουσιάζονται με ποσοτική διαφοροποίηση και στους μη καρκινικούς και στους καρκινικούς ιστούς.



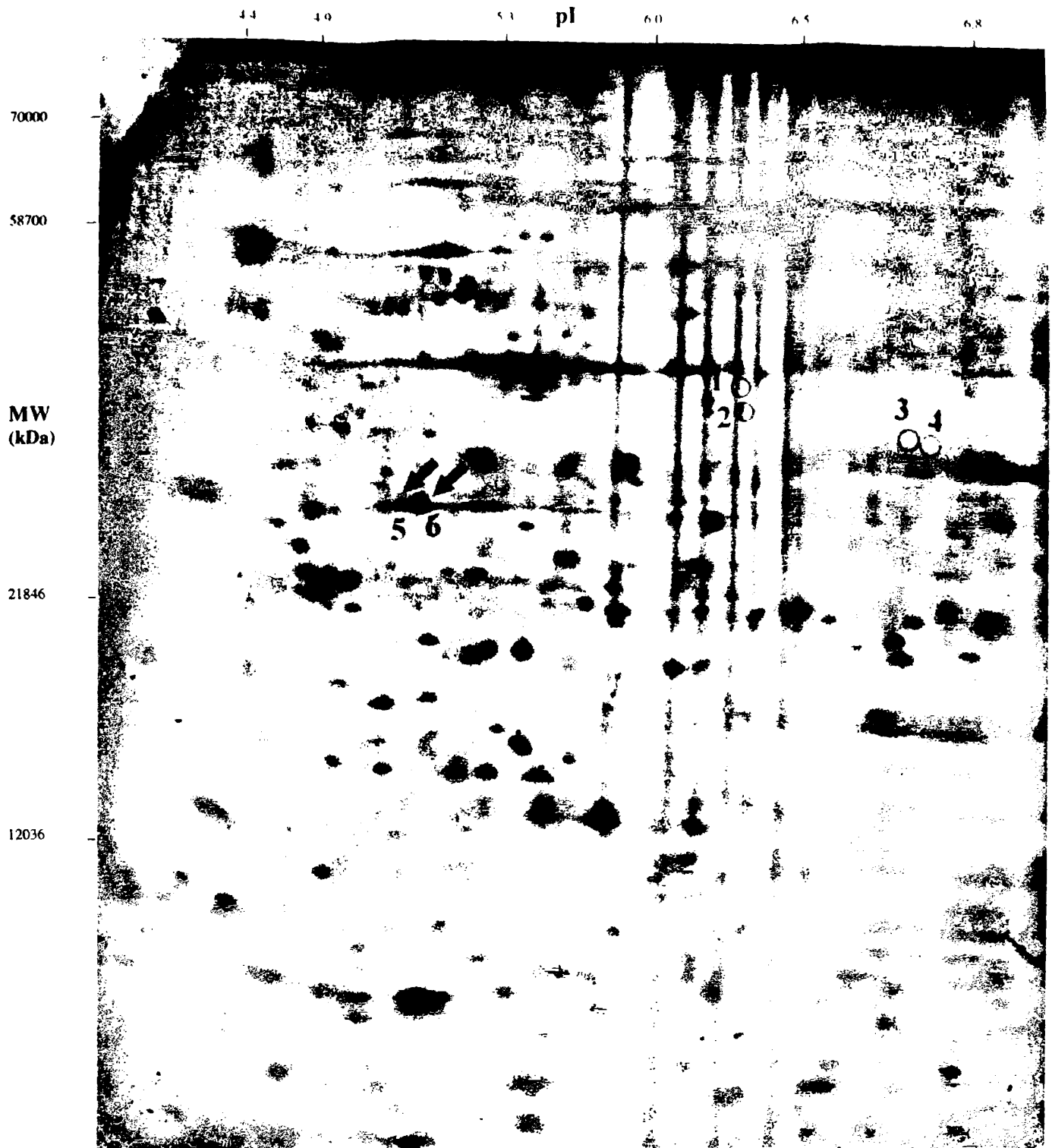
Εικ. 6: Ηλεκτροφόρημα καρκινικού ιστού, όπου απεικονίζονται πέντε αναγνωρισμένες πρωτεΐνες (λεπτά βέλη), οι οποίες παρουσιάζονται με ποσοτική διαφοροποίηση και στους μη καρκινικούς και στους καρκινικούς ιστούς.



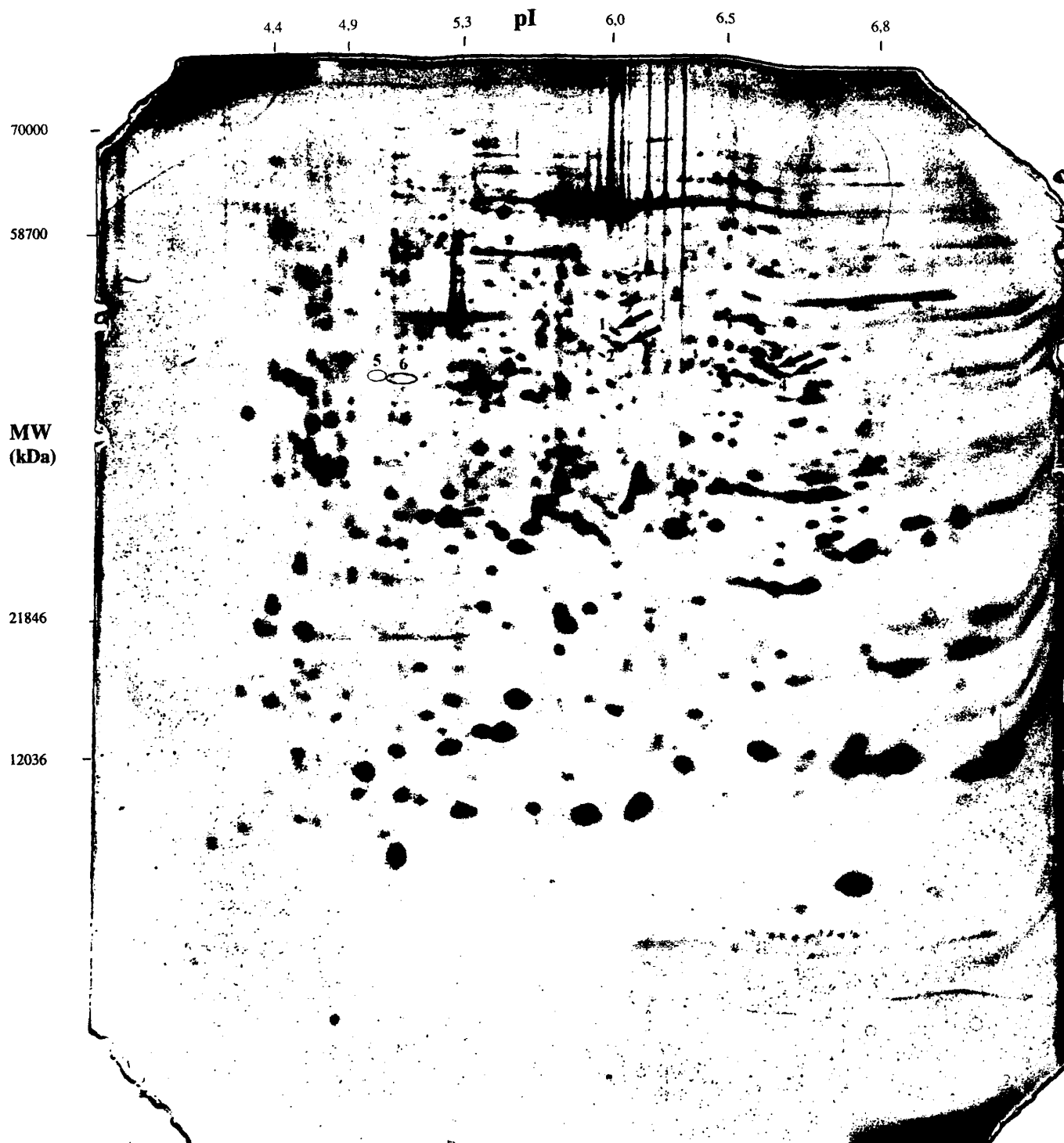
Εικ. 7: Ηλεκτροφόρημα κυτταροπλασματικού κλάσματος βλεννώδους καρκινώματος Grade I, όπου φαίνεται η απουσία των Pr1 και Pr2 (κύκλοι) και οι πρωτεΐνες Pr3 και Pr4 (χοντρά βέλη).



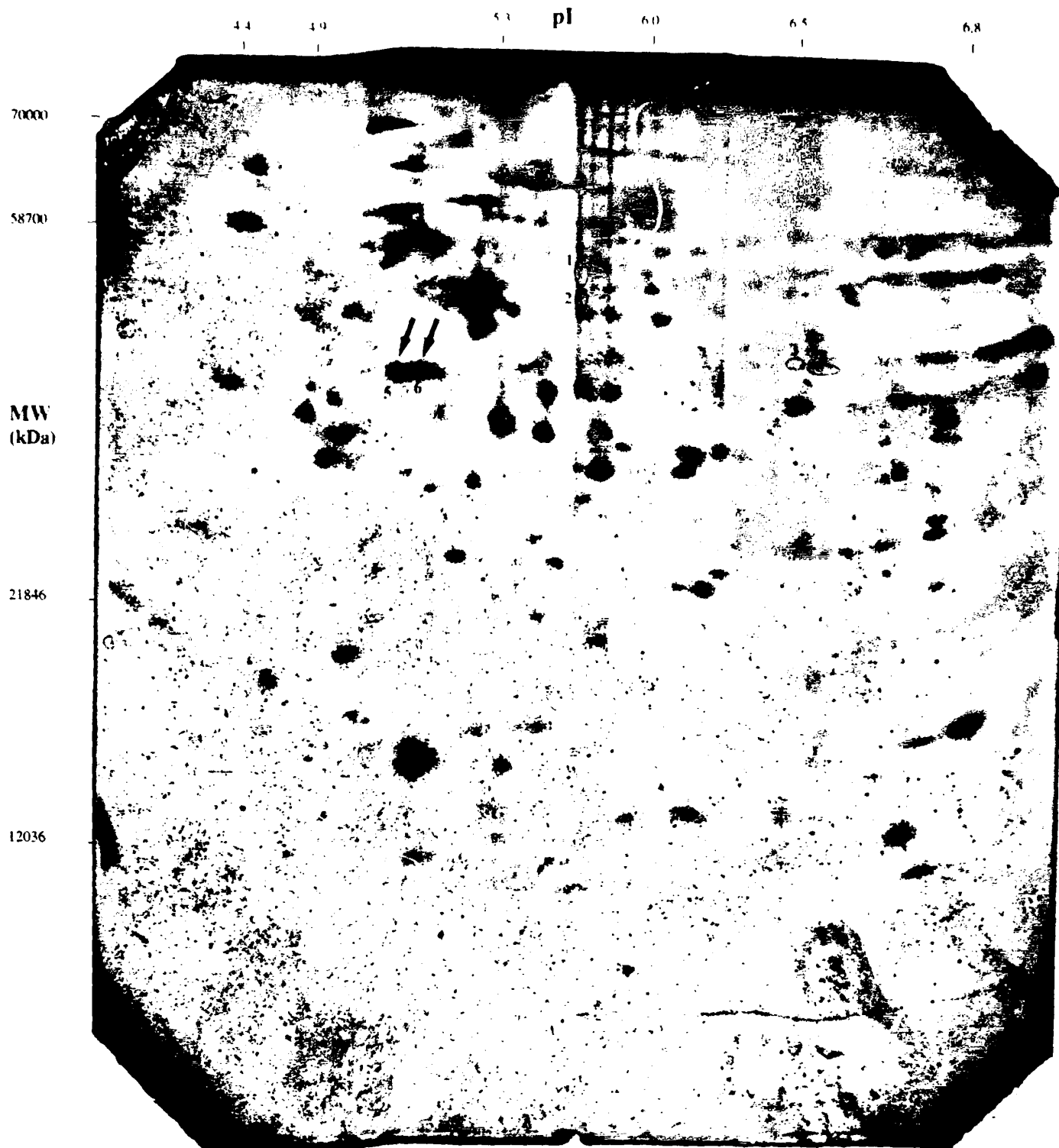
Εικ. 8: Ηλεκτροφόρημα κυτταροπλασματικού κλάσματος πορογενούς διηθητικού καρκινώματος μη ειδικού τύπου με 5/19 μεταστατικούς λεμφαδένες Grade II, όπου διακρίνονται οι πρωτεΐνες Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 (χοντρά βέλη), καθώς και η απουσία των Pr5 και Pr6 (κύκλοι).



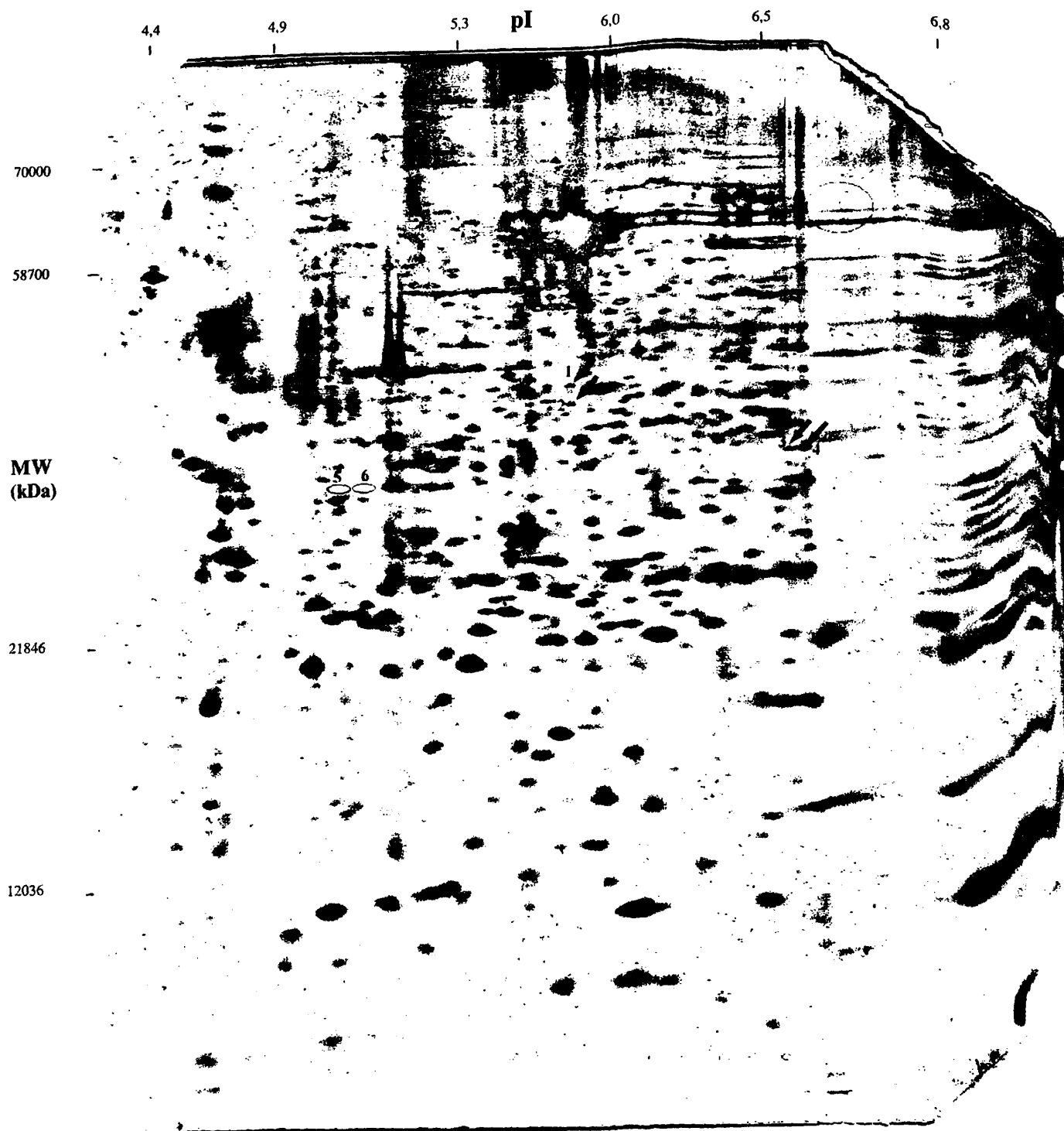
Εικ. 9: Ηλεκτροφόρημα μεμβρανικού κλάσματος του ίδιου πορογενούς διηθητικού καρκινώματος μη ειδικού τύπου με 5/19 μεταστατικών λεμφαδένες Grade II, όπου διακρίνεται η απουσία των Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 (κύκλοι), καθώς και η ύπαρξη των πρωτεϊνών Pr5 και Pr6 (χοντρά βέλη).



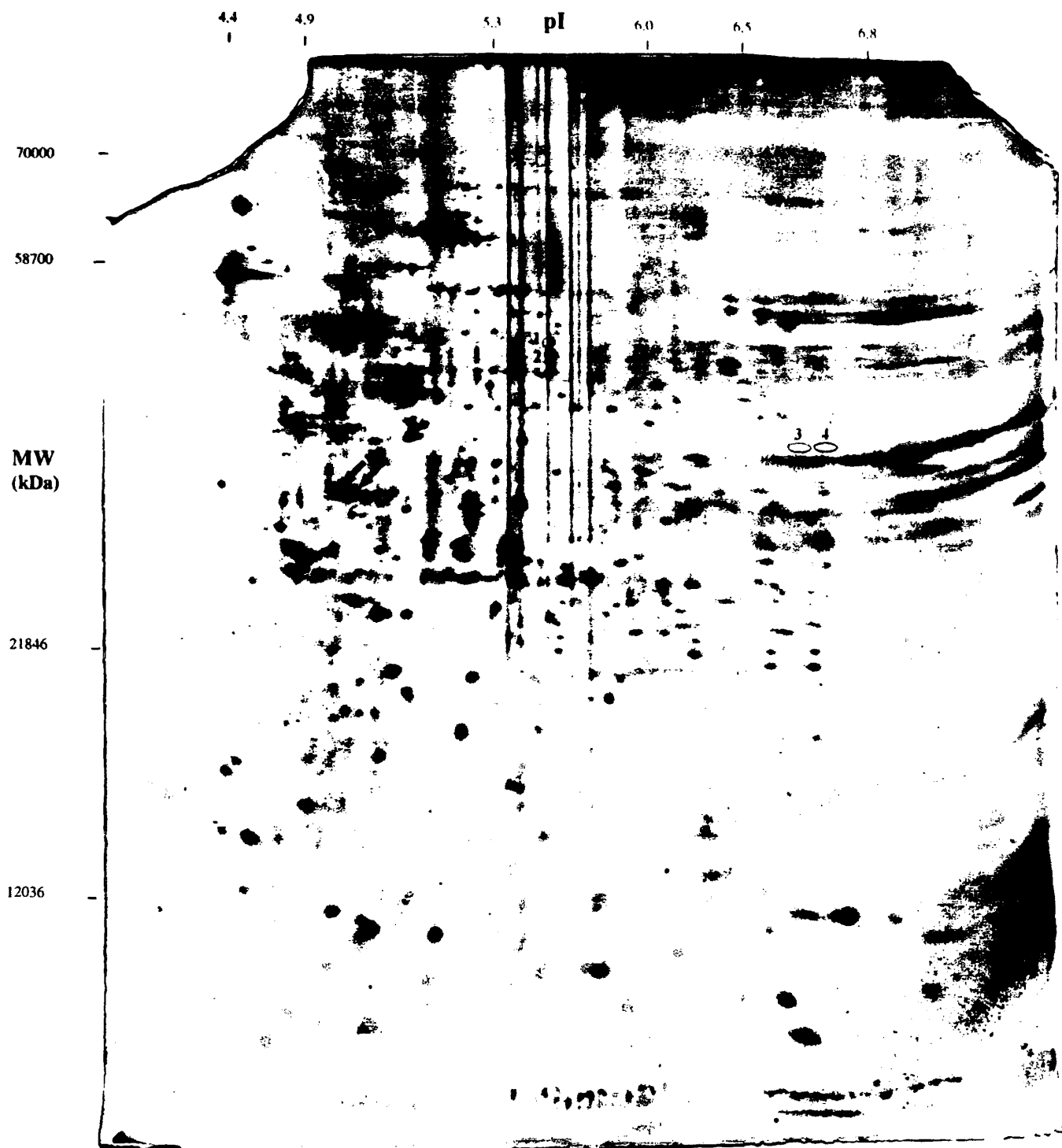
Εικ. 10: Ηλεκτροφόρημα κυτταροπλασματικού κλάσματος πορογενούς διηθητικού καρκινώματος μη ειδικού τύπου με 2/9 μεταστατικούς λεμφαδένες και συνύπαρξη πορογενούς *in situ* καρκινώματος Grade II, όπου διακρίνονται οι πρωτεΐνες Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 (χοντρά βέλη), και η απουσία των Pr5 και Pr6 (κύκλοι).



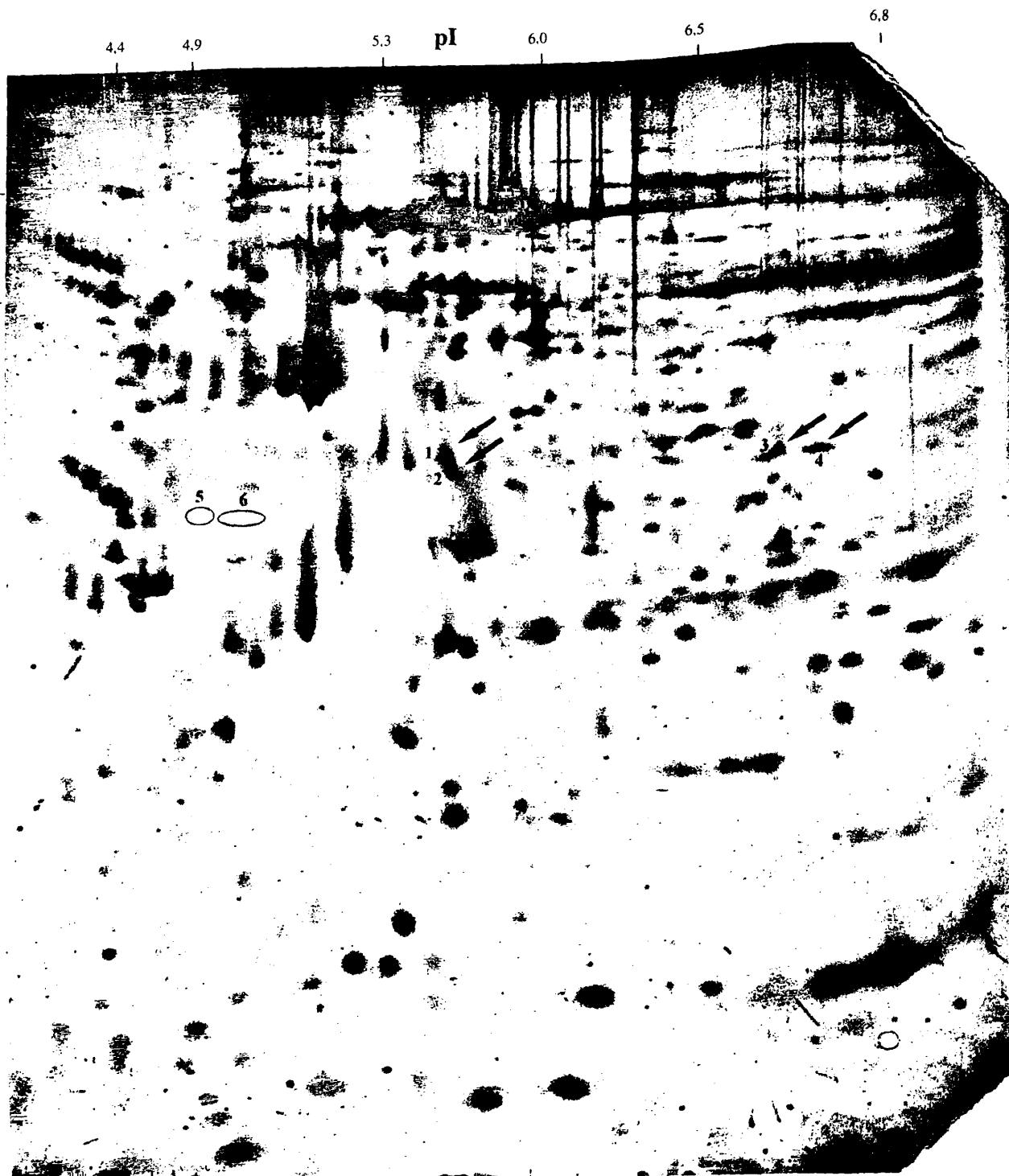
Εικ. 11: Ηλεκτροφόρημα μεμβρανικού κλάσματος του ίδιου πορογενούς διηθητικού καρκινώματος μη ειδικού τύπου με 2/9 μεταστατικούς λεμφαδένες και συνύπαρξη πορογενούς *in situ* καρκινώματος Grade II, όπου διακρίνεται η απουσία των Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 (κύκλοι), καθώς και η ύπαρξη των πρωτεϊνών Pr5 και Pr6 (χοντρά βέλη).



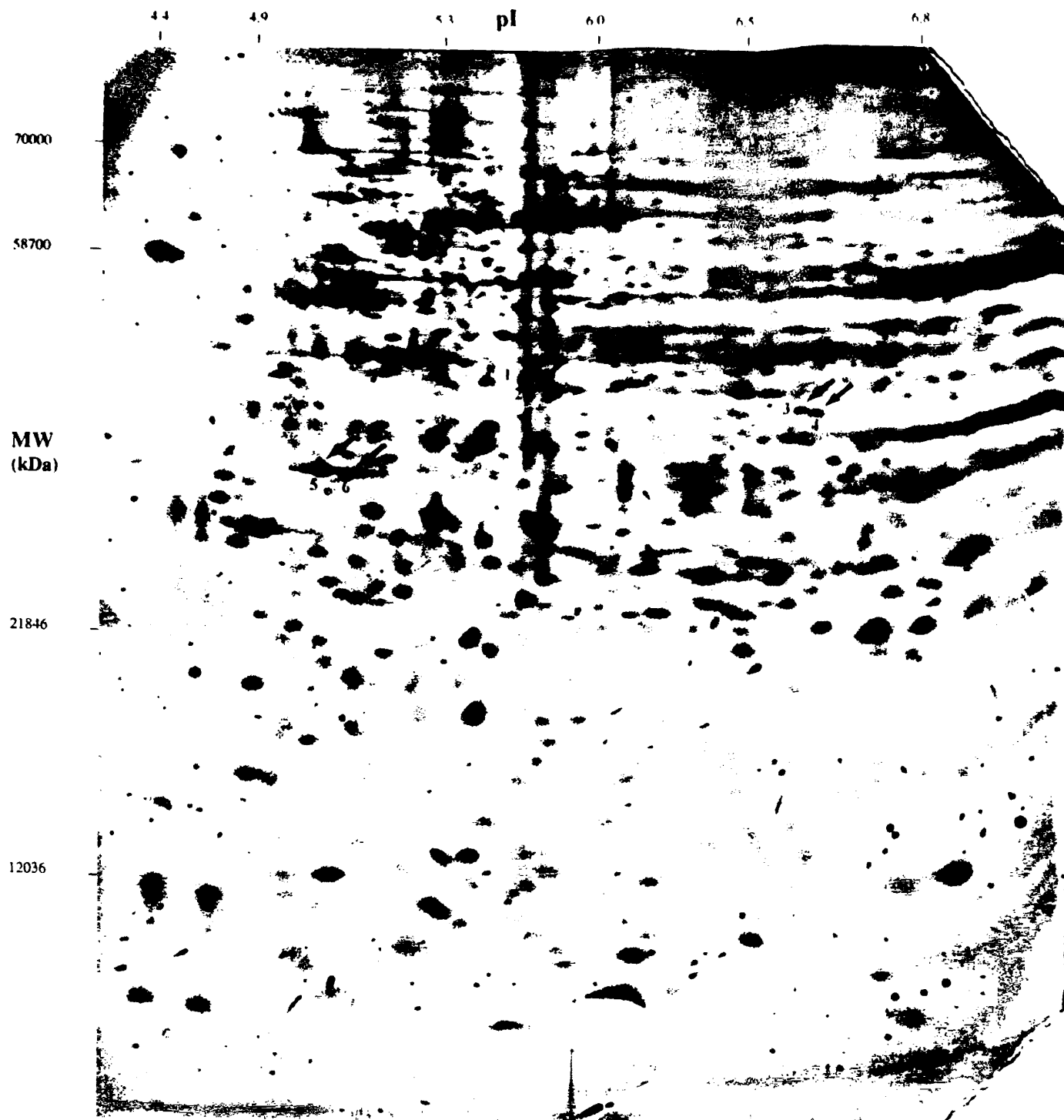
Εικ. 12: Ηλεκτροφόρημα κυτταροπλασματικού κλάσματος λοβιακού διηθητικού καρκινώματος με αρνητικούς λεμφαδένες και συνύπαρξη πορογενούς *in situ* καρκινώματος και σωληνολοβιακού καρκινώματος Grade II, όπου διακρίνονται οι πρωτεΐνες Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 (χοντρά βέλη), και η απουσία των Pr5 και Pr6 (κύκλοι).



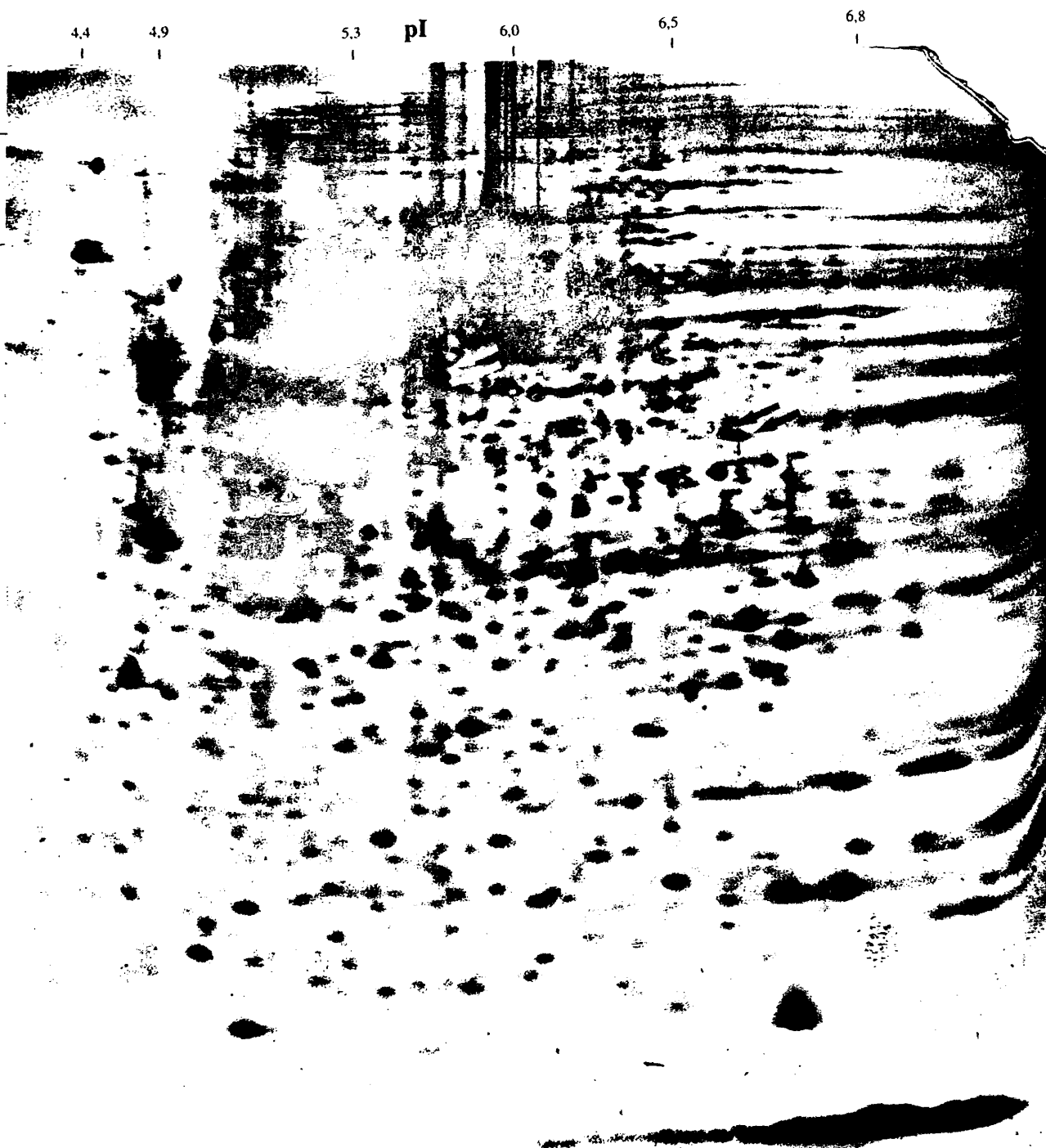
Εικ. 13: Ηλεκτροφόρημα μεμβρανικού κλάσματος του ίδιου λοβιακού διηθητικού καρκινώματος με αρνητικούς λεμφαδένες και συνύπαρξη πορογενούς *in situ* καρκινώματος και σωληνολοβιακού καρκινώματος Grade II, όπου διακρίνεται η απουσία των Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 (κύκλοι), καθώς και η ύπαρξη των πρωτεϊνών Pr5 και Pr6 (χοντρά βέλη).



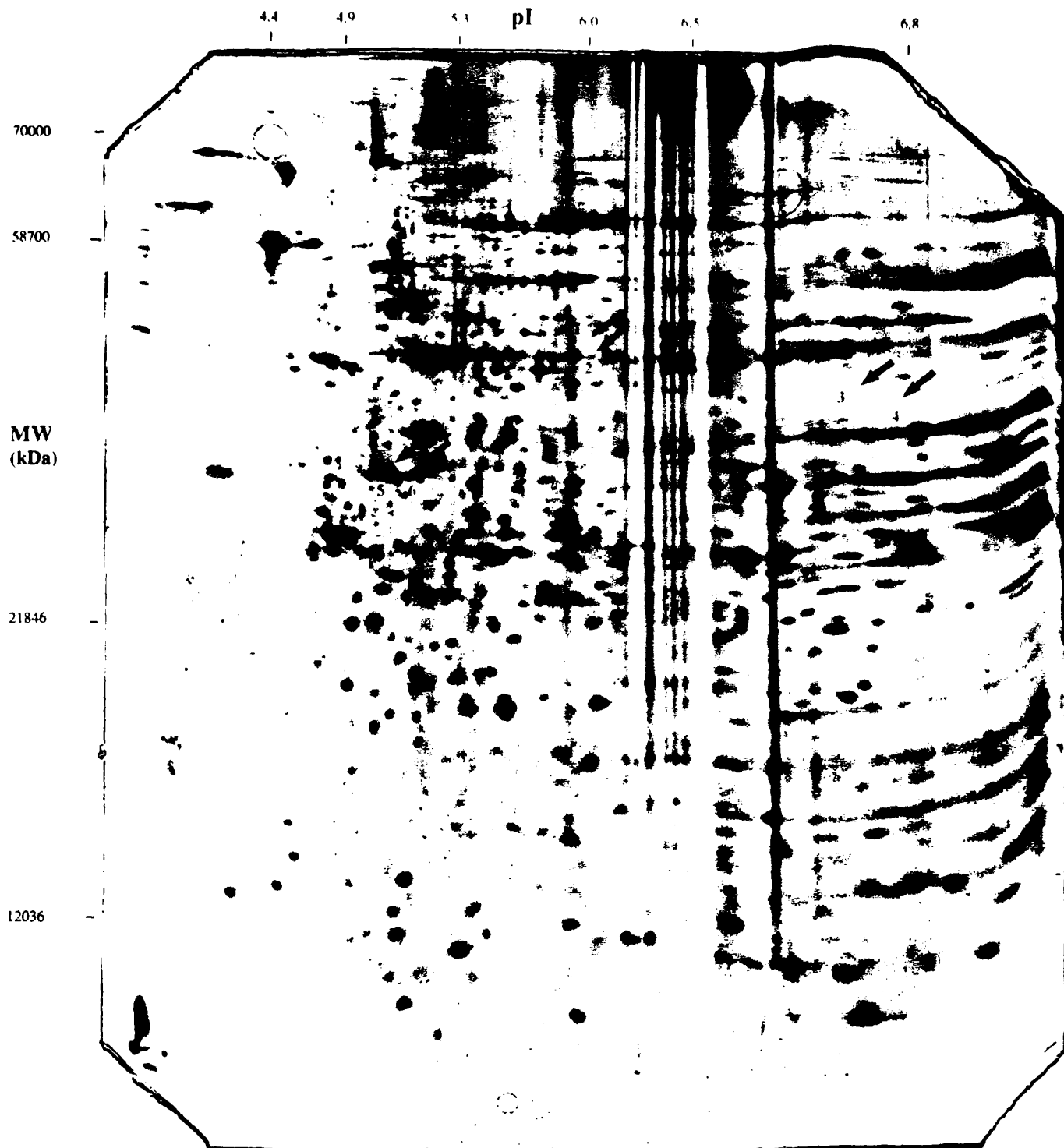
Εικ. 14: Ηλεκτροφόρημα κυτταροπλασματικού κλάσματος πορογενούς ιηθητικού καρκινώματος μη ειδικού τύπου με 6/6 μεταστατικούς εμφαδένες Grade III, όπου διακρίνονται οι πρωτεΐνες Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 (χοντρά βέλη), καθώς και η απουσία των Pr5 και Pr6 (κύκλοι).



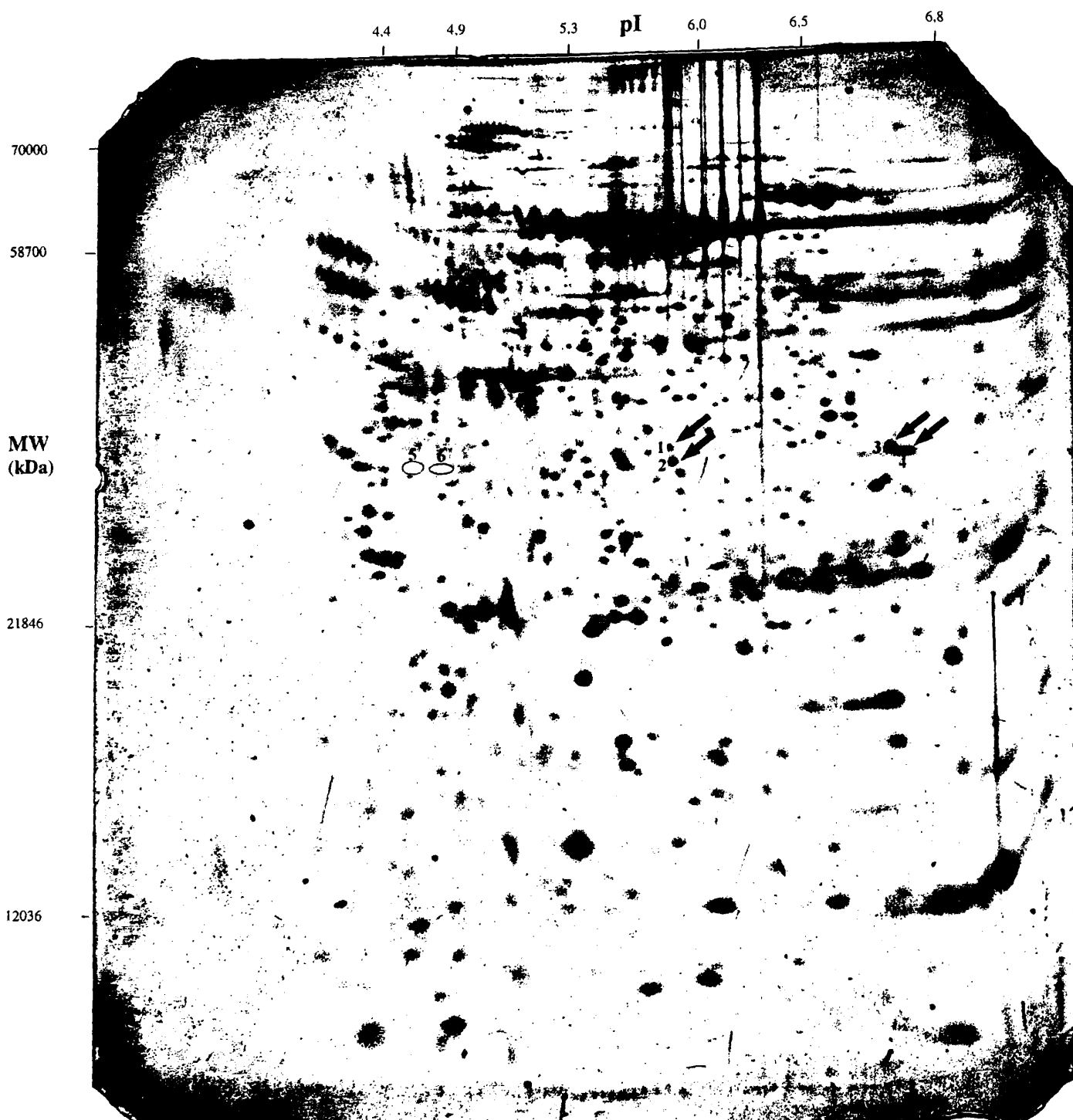
Εικ. 15: Ηλεκτροφόρημα μεμβρανικού κλάσματος του ίδιου πορογενούς διηθητικού καρκινώματος μη ειδικού τύπου με 6/6 μεταστατικούς λεμφαδένες Grade III, όπου διακρίνονται οι πρωτεΐνες Pr1, Pr2, Pr3, Pr4, Pr5 και Pr6 (χοντρά βέλη).



κ. 16: Ηλεκτροφόρημα κυτταροπλασματικού κλάσματος πορογενούς
 ρητικού καρκινώματος μη ειδικού τύπου με 21/21 μεταστατικούς
 μφιδένες Grade III, όπου διακρίνονται οι πρωτεΐνες Pr1, Pr2, Pr3 και
 4 (χοντρά βέλη), και η απουσία των Pr5 και Pr6 (κύκλοι).



Εικ. 17: Ηλεκτροφόρημα μεμβρανικού κλάσματος του ίδιου πορογενούς διηθητικού καρκινώματος μη ειδικού τύπου με 21/21 μεταστατικούς λεμφαδένες Grade III, όπου διακρίνονται οι πρωτεΐνες Pr1, Pr2, Pr3, Pr4, Pr5 και Pr6 (χοντρά βέλη), καθώς και οι πέντε αναγνωρισμένες πρωτεΐνες (λεπτά βέλη).



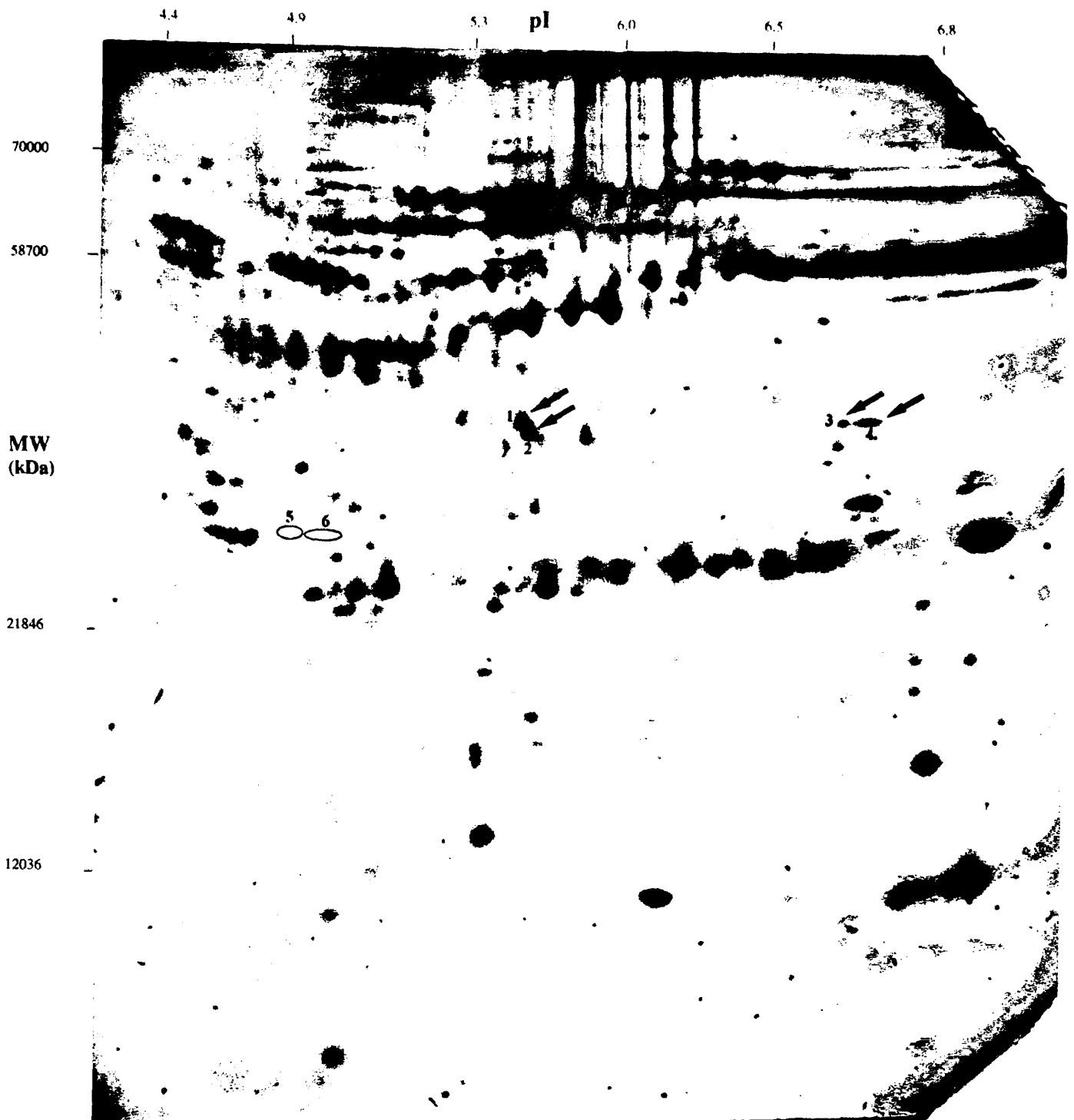
Εικ. 18: Ηλεκτροφόρημα κυτταροπλασματικού κλάσματος λοβιακού διηθητικού καρκινώματος με συνύπαρξη πορογενούς καρκινώματος *in situ* και 14/14 μεταστατικούς λεμφαδένες, Grade III, όπου διακρίνονται οι πρωτεΐνες Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 (χοντρά βέλη), και η απουσία των Pr5 και Pr6 (κύκλοι).



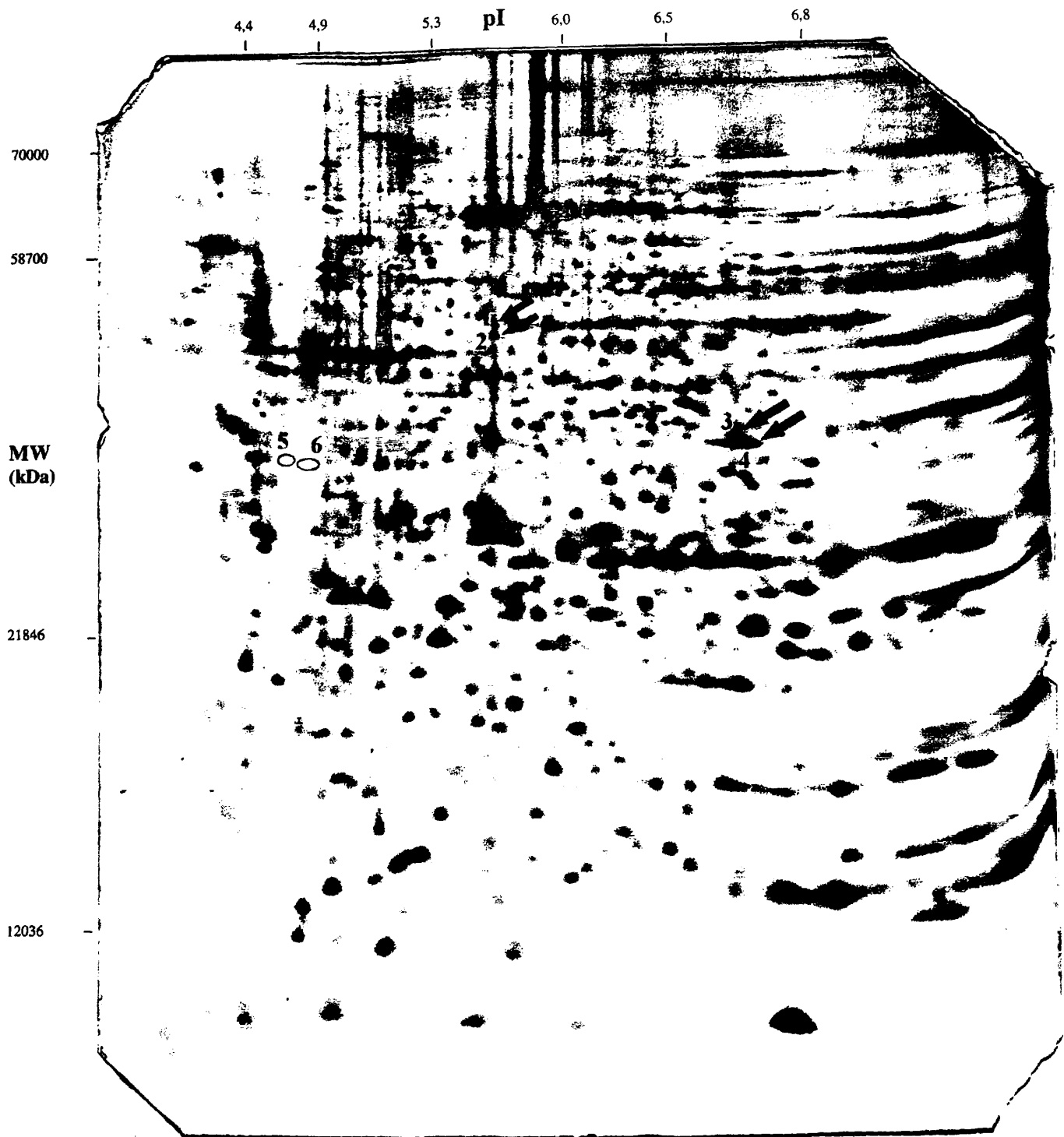
Εικ. 19: Ηλεκτροφόρημα μεμβρανικού κλάσματος λοβιακού διηθητικού καρκινώματος με συνύπαρξη πορογενούς καρκινώματος *in situ* και 14/14 μεταστατικούς λεμφαδένες, Grade III, όπου διακρίνεται η απουσία των Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 (κύκλοι), και η ύπαρξη των πρωτεϊνών Pr5 και Pr6 (χοντρά βέλη).



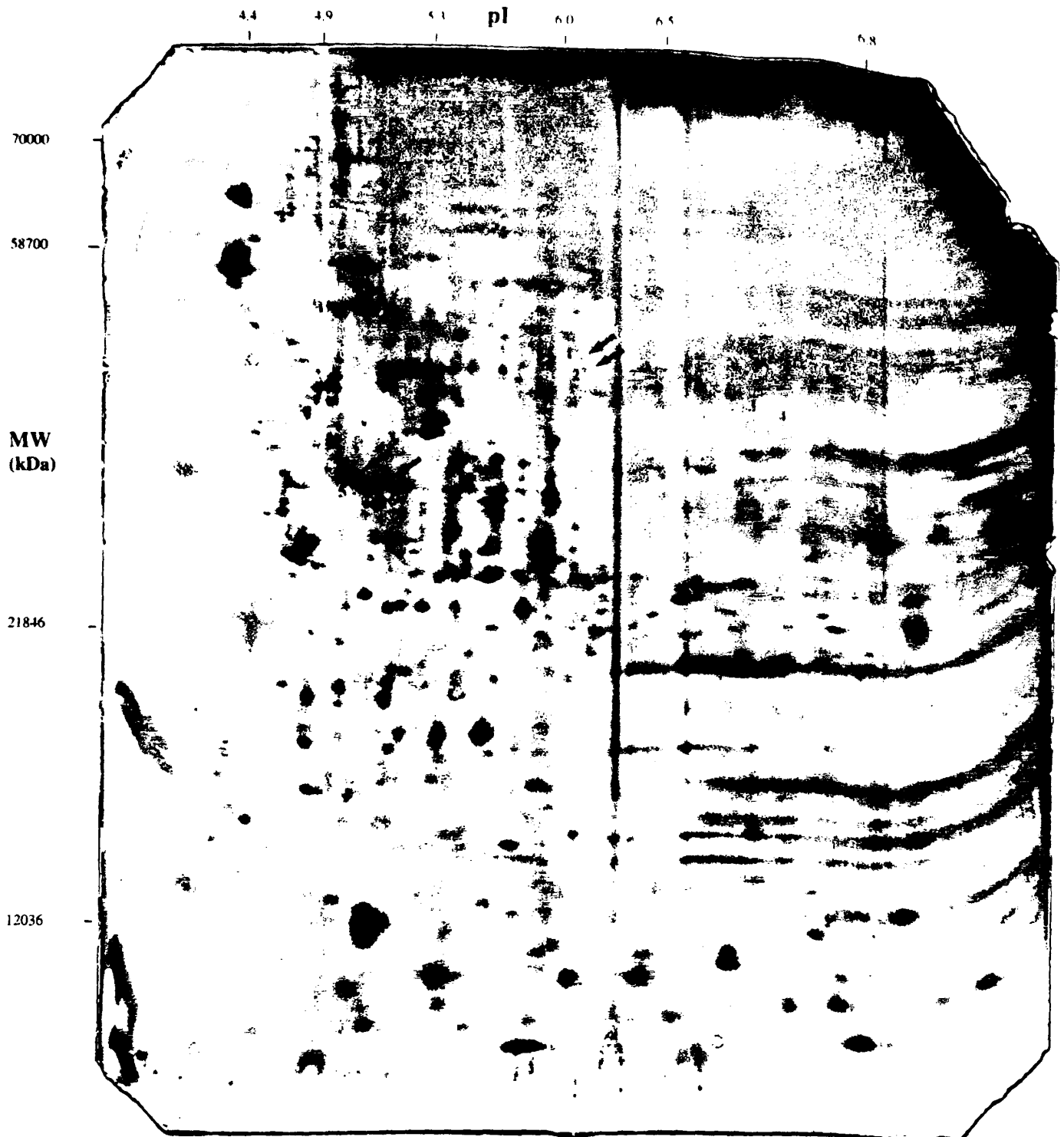
Εικ. 20: Ηλεκτροφόρημα κυτταροπλασματικού κλάσματος λοβιακού διηθητικού καρκινώματος με 4/11 μεταστατικούς λεμφαδένες Grade III, όπου διακρίνονται οι πρωτεΐνες Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 (χοντρά βέλη), και η απουσία των Pr5 και Pr6 (κύκλοι).



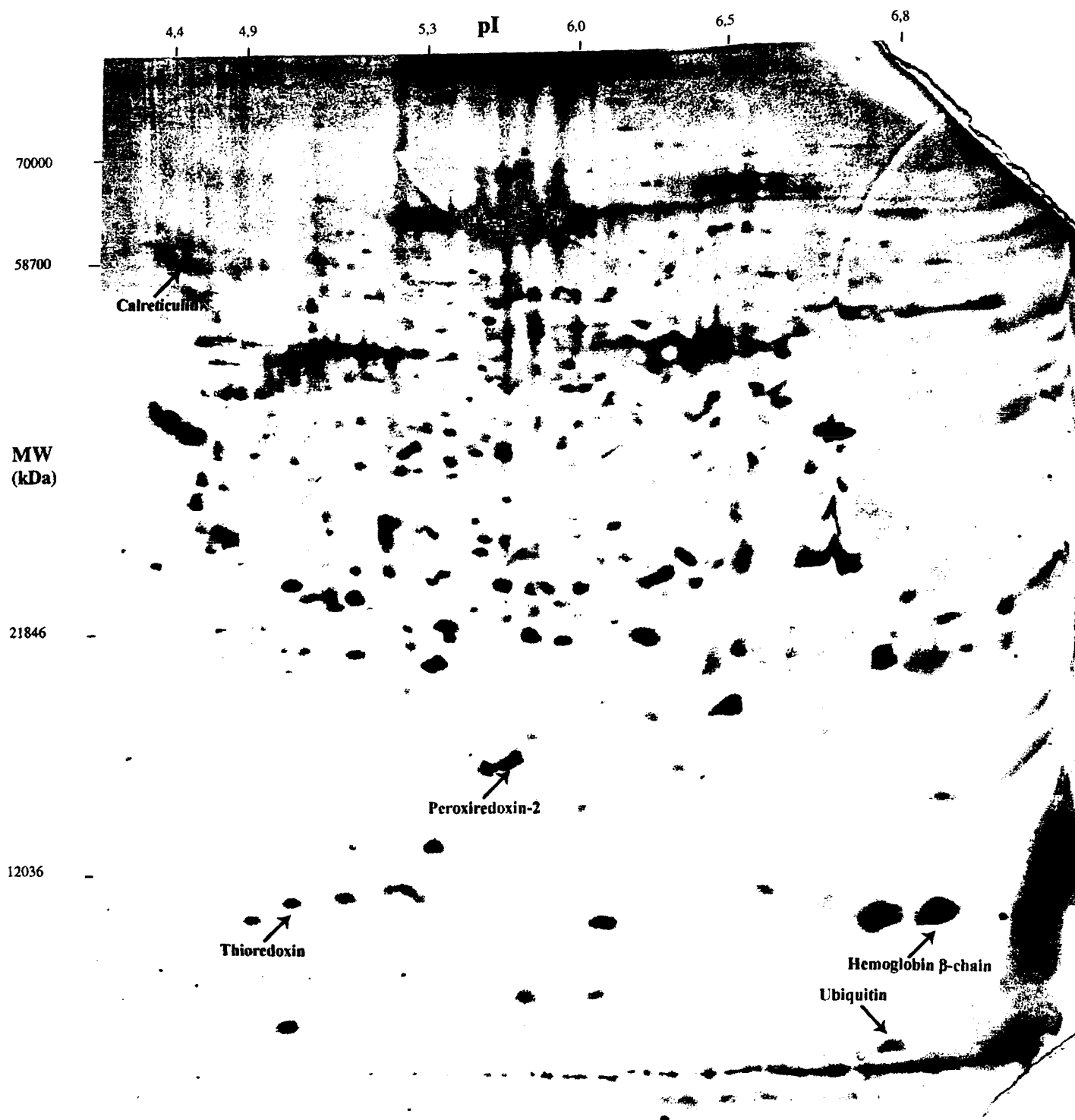
Εικ. 21: Ηλεκτροφόρημα του κυτταροπλασματικού κλάσματος του καθρέφτη βιοψίας του δείγματος της εικόνας 20, όπου διακρίνονται οι πρωτεΐνες Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 (χοντρά βέλη), και η απουσία των Pr5 και Pr6 (κύκλοι).



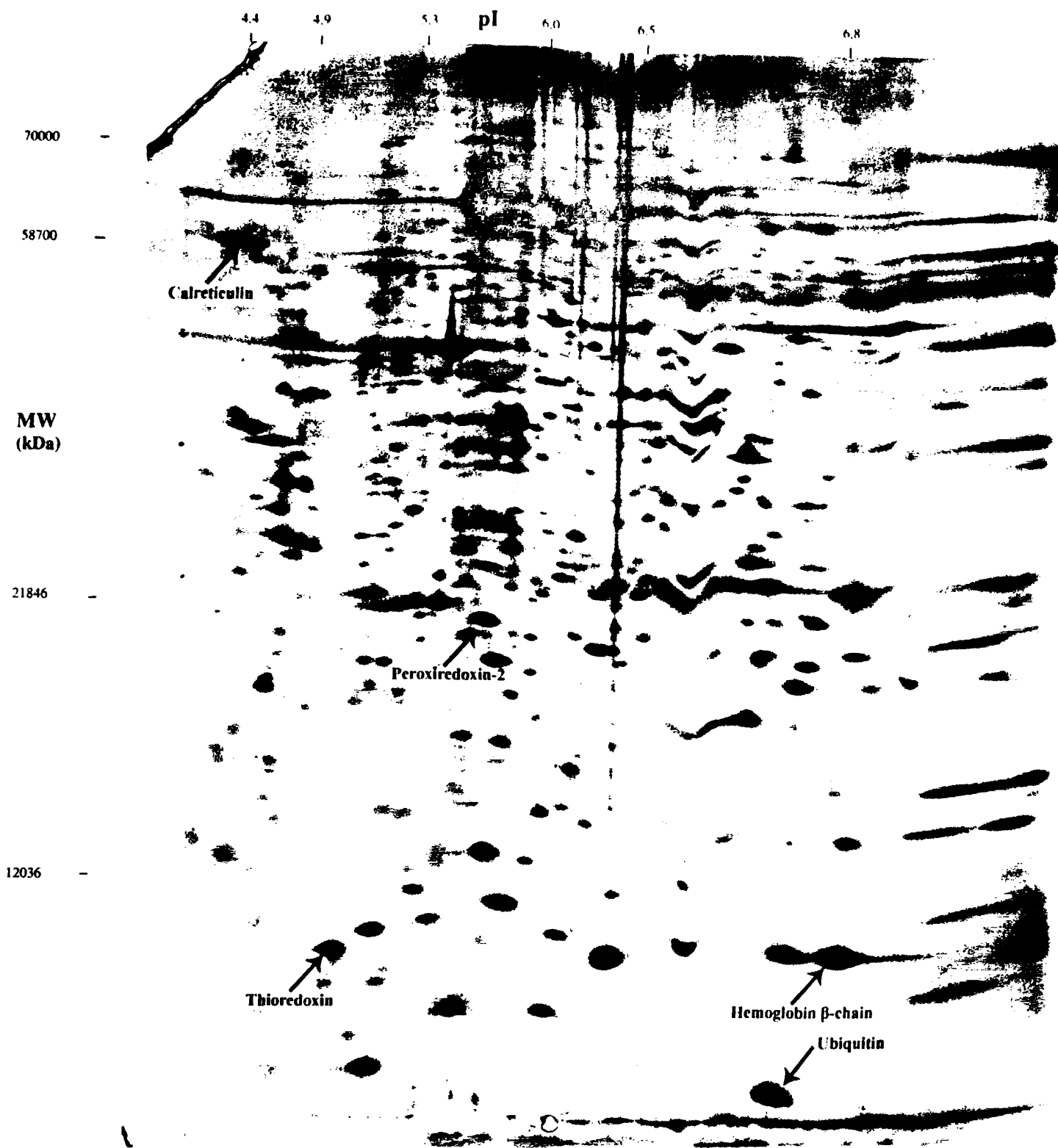
Εικ. 22: Ηλεκτροφόρημα του κυτταροπλασματικού κλάσματος μυελοειδούς καρκινώματος με 1/1 μεταστατικούς λεμφαδένες Grade III, όπου διακρίνονται οι πρωτεΐνες Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 (χοντρά βέλη), και η απουσία των Pr5 και Pr6 (κύκλοι).



Εικ. 23: Ηλεκτροφόρημα του μεμβρανικού κλάσματος μυελοειδούς καρκινώματος με 1/1 μεταστατικούς λεμφαδένες Grade III, όπου διακρίνονται οι πρωτεΐνες Pr1, Pr2, Pr5 και Pr5 (χοντρά βέλη), και η απουσία των Pr3 και Pr4 (κύκλοι).

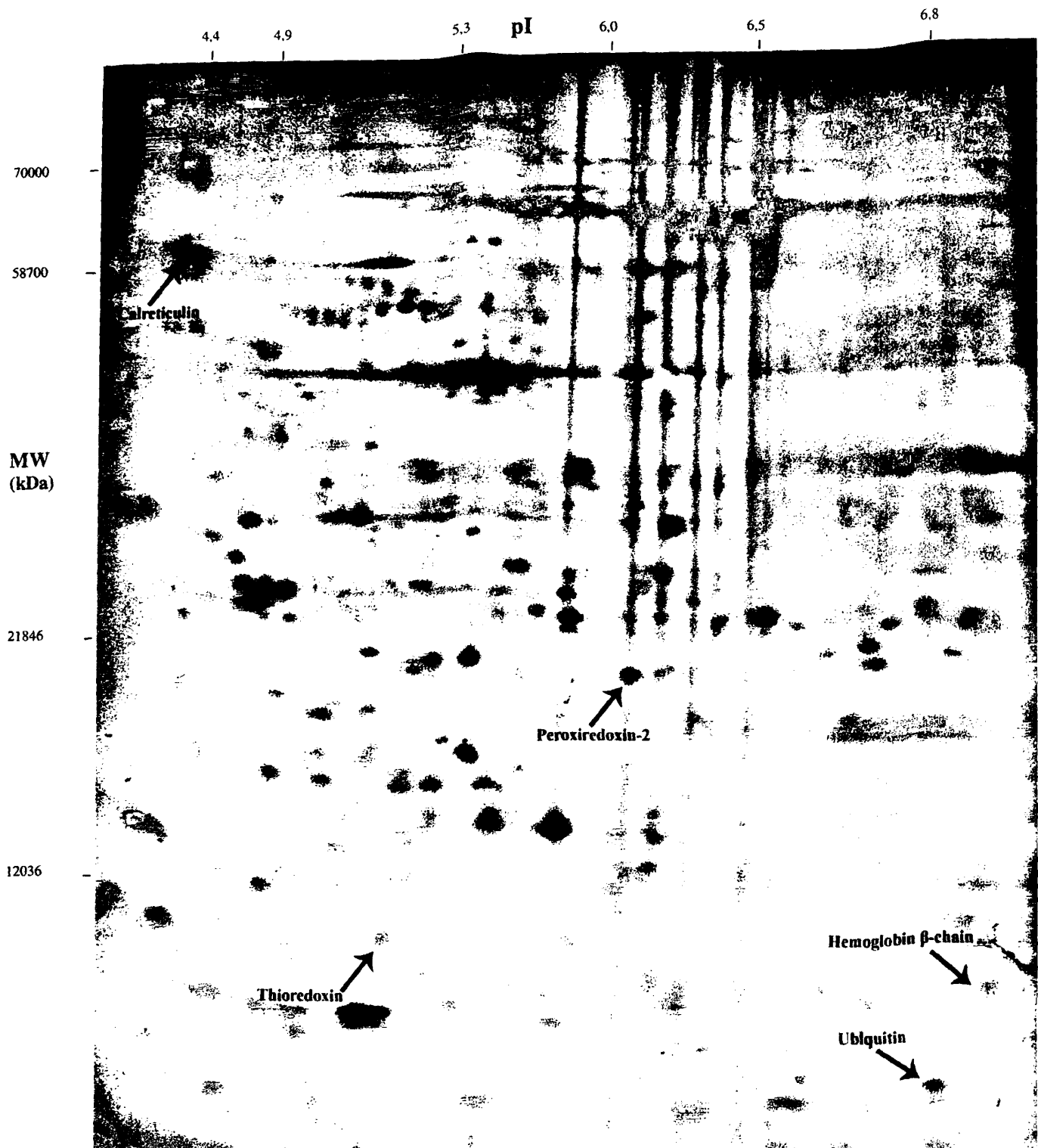


Εικ. 24: Ηλεκτροφόρημα κυτταροπλασματικού κλάσματος βλεννώδους καρκινώματος Grade I, όπου φαίνονται οι πέντε αναγνωρισμένες πρωτεΐνες (λεπτά βέλη).

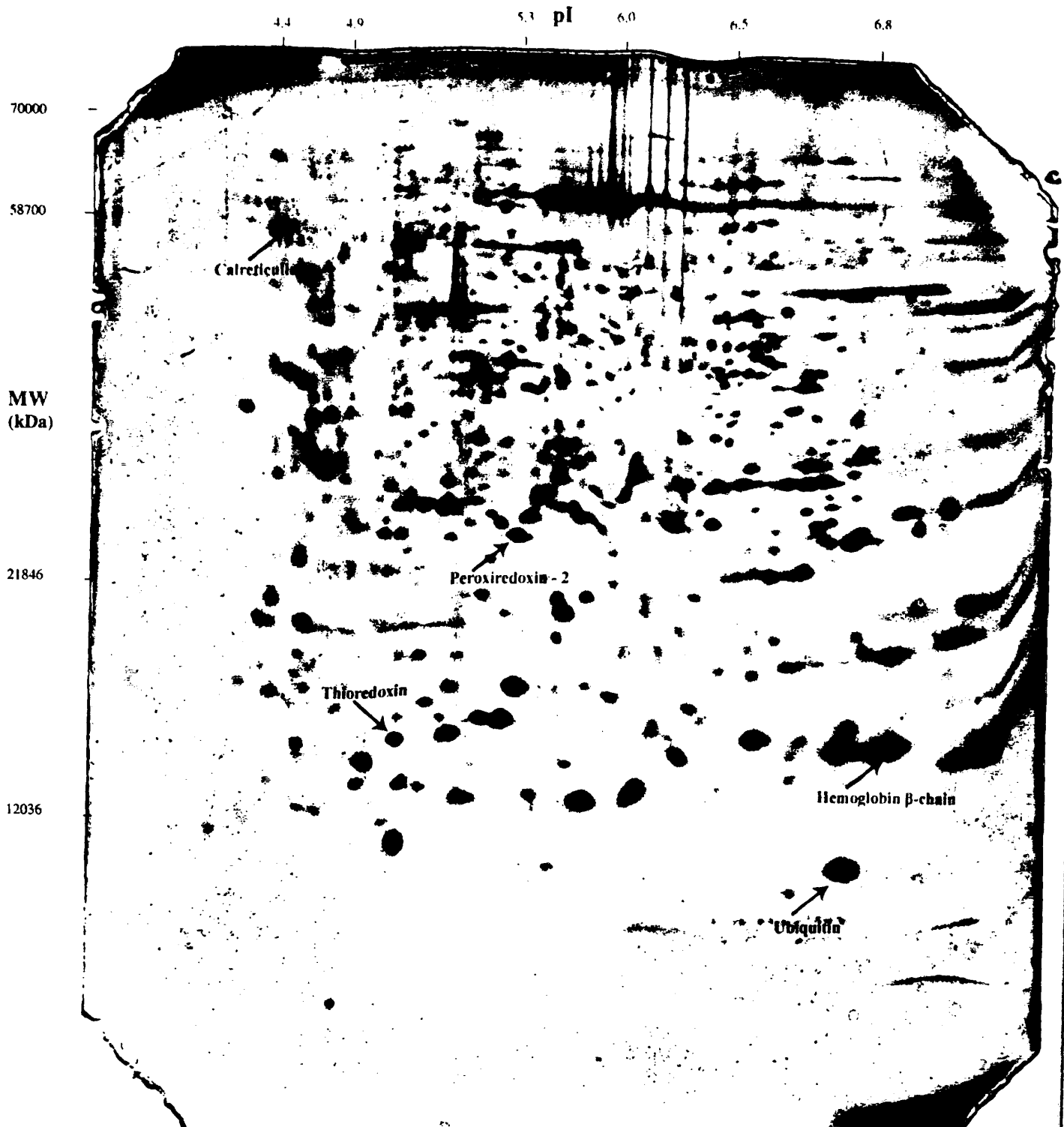


Εικ. 25: Ηλεκτροφόρημα κυτταροπλασματικού κλάσματος πορογενούς διηθητικού καρκινώματος μη ειδικού τύπου με 5/19 μεταστατικούς λεμφαδένες Grade II, όπου διακρίνονται οι πέντε αναγνωρισμένες πρωτεΐνες (λεπτά βέλη).

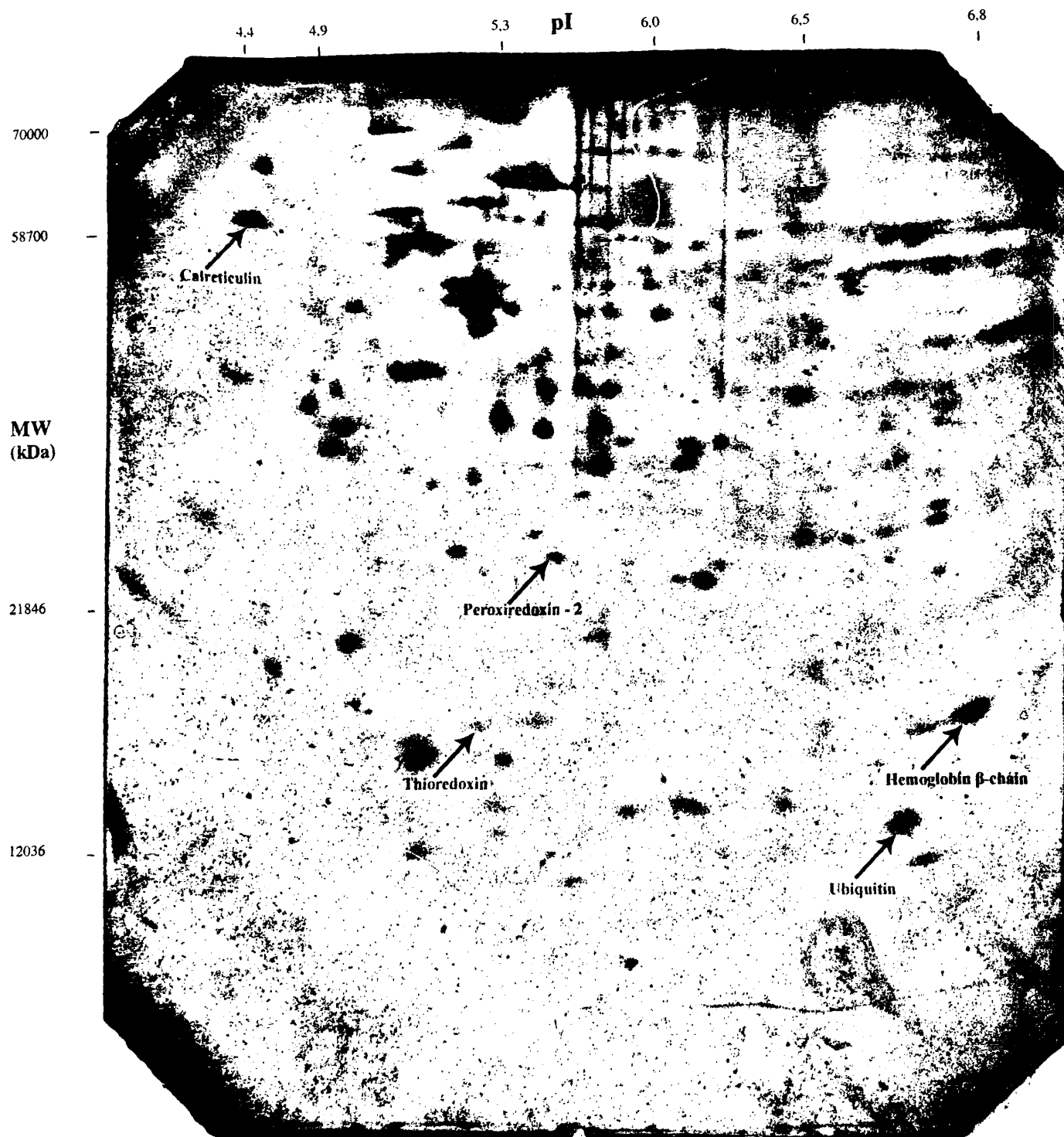




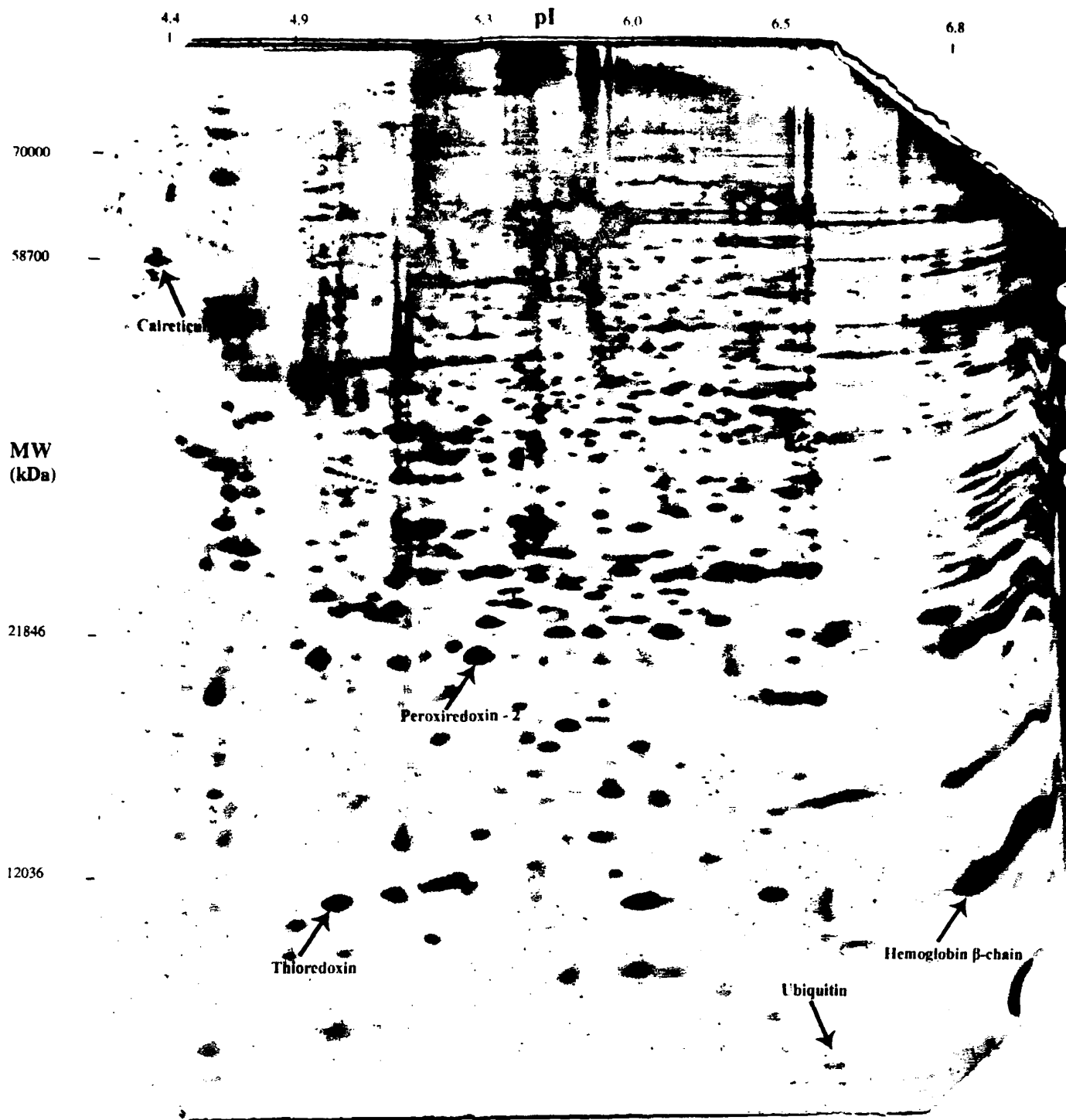
Εικ. 26: Ηλεκτροφόρημα μεμβρανικού κλάσματος του ίδιου πορογενούς διηθητικού καρκινώματος μη ειδικού τύπου με 5/19 μεταστατικούς λεμφαδένες Grade II, όπου διακρίνονται οι πέντε αναγνωρισμένες πρωτεΐνες (λεπτά βέλη).



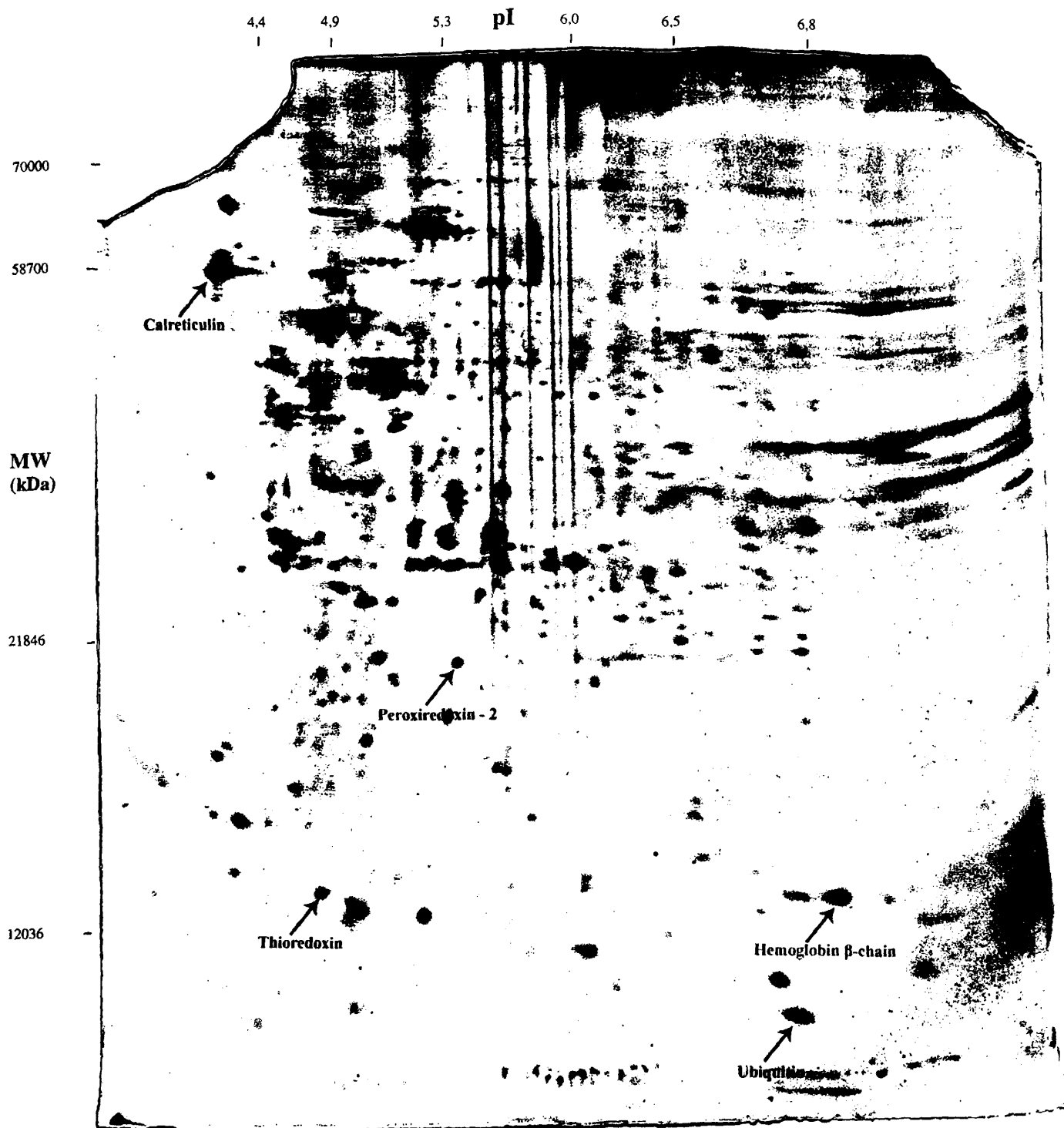
Εικ. 27: Ηλεκτροφόρημα κυτταροπλασματικού κλάσματος πορογενούς διηθητικού καρκινώματος μη ειδικού τύπου με 2/9 μεταστατικούς λεμφαδένες και συνύπαρξη πορογενούς *in situ* καρκινώματος Grade II, όπου διακρίνονται οι πέντε αναγνωρισμένες πρωτεΐνες (λεπτά βέλη).



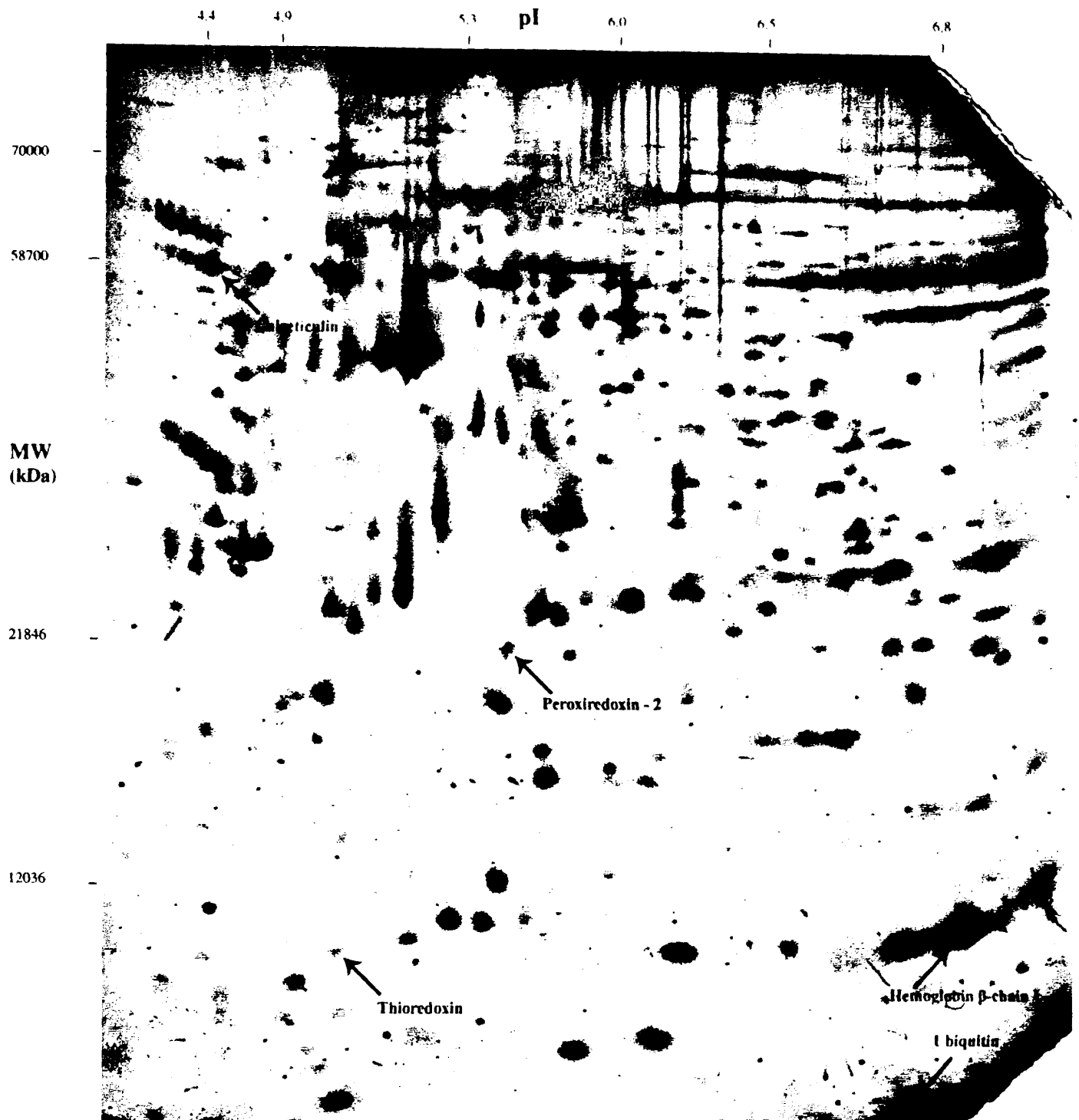
Εικ. 28: Ηλεκτροφόρημα μεμβρανικού κλάσματος του ίδιου πορογενούς διηθητικού καρκινώματος μη ειδικού τύπου με 2/9 μεταστατικούς λεμφαδένες και συνύπαρξη πορογενούς *in situ* καρκινώματος Grade II, όπου διακρίνονται οι πέντε αναγνωρισμένες πρωτεΐνες (λεπτά βέλη).



Εικ. 29: Ηλεκτροφόρημα κυτταροπλασματικού κλάσματος λοβιακού διηθητικού καρκινώματος με αρνητικούς λεμφαδένες και συνύπαρξη πορογενούς *in situ* καρκινώματος και σωληνολοβιακού καρκινώματος Grade II, όπου διακρίνονται οι πέντε αναγνωρισμένες πρωτεΐνες (λεπτά βέλη).



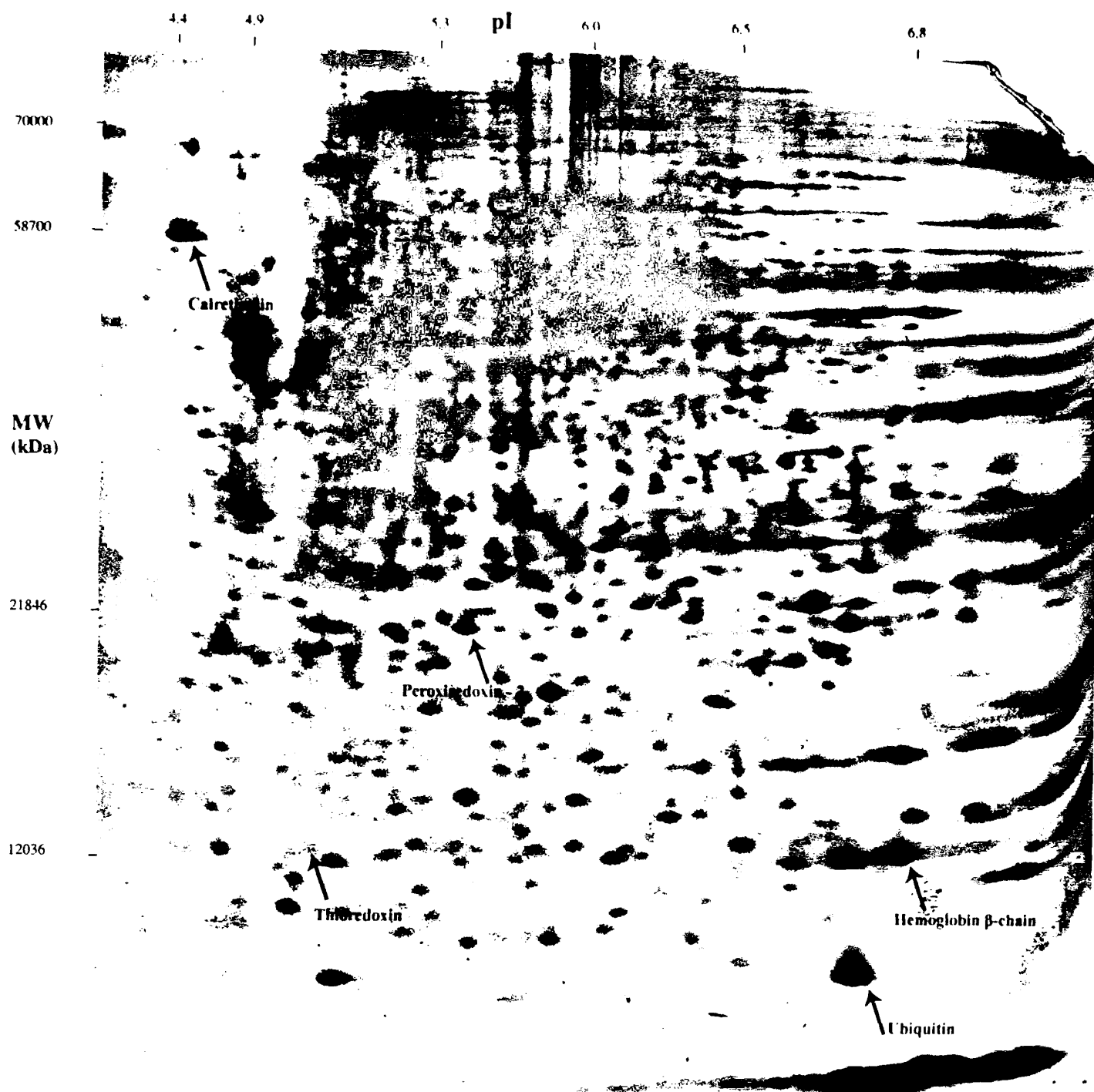
Εικ. 30: Ηλεκτροφόρημα μεμβρανικού κλάσματος του ίδιου λοβιακού διηθητικού καρκινώματος με αρνητικούς λεμφαδένες και συνύπαρξη πορογενούς *in situ* καρκινώματος και σωληνολοβιακού καρκινώματος Grade II, όπου διακρίνονται οι πέντε αναγνωρισμένες πρωτεΐνες (λεπτά βέλη).



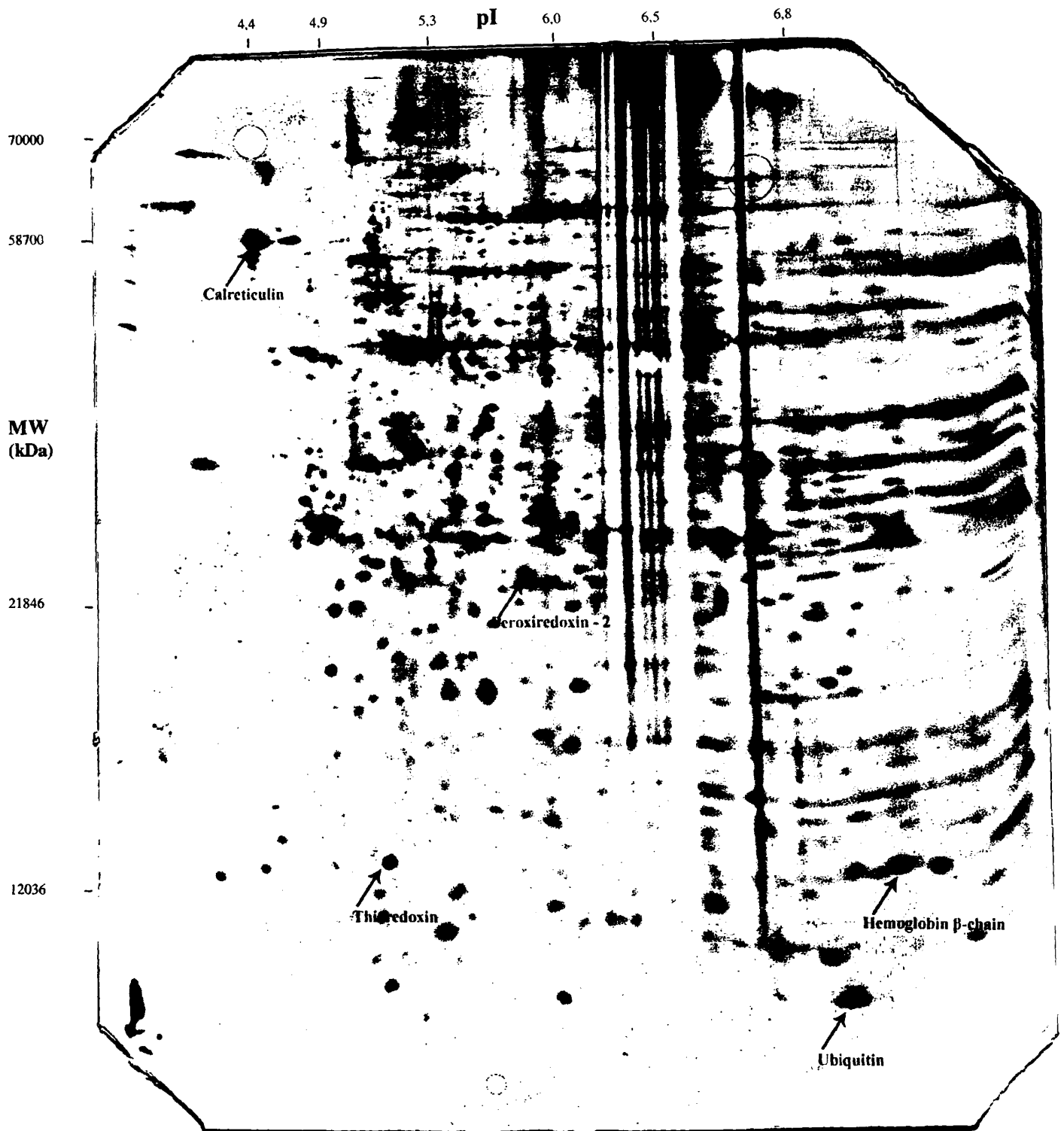
Εικ. 31: Ηλεκτροφόρημα κυτταροπλασματικού κλάσματος πορογενούς διηθητικού καρκινώματος μη ειδικού τύπου με 6/6 μεταστατικούς λεμφαδένες Grade III, όπου διακρίνονται οι πέντε αναγνωρισμένες πρωτεΐνες (λεπτά βέλη).



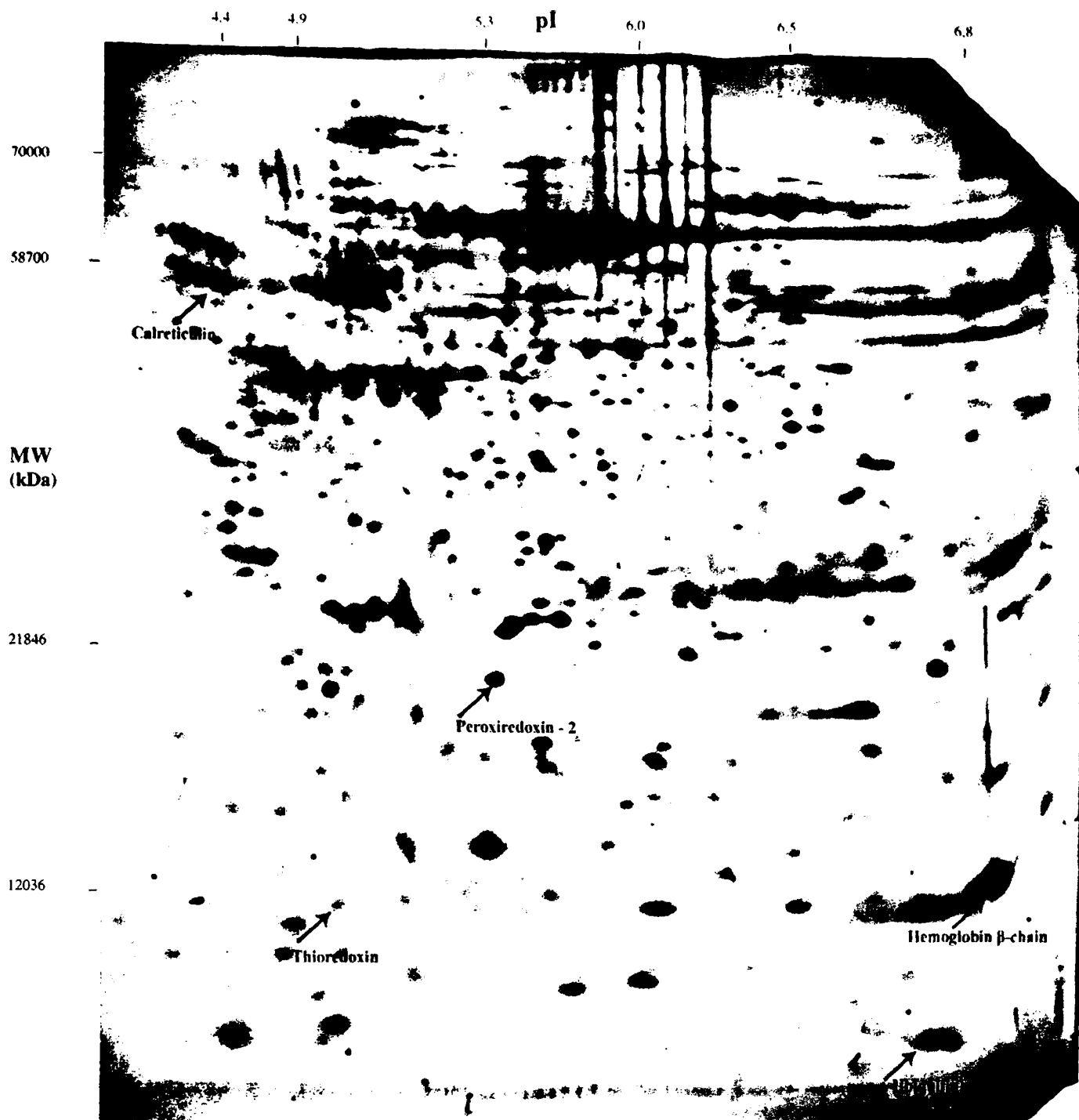
ικ. 32: Ηλεκτροφόρημα μεμβρανικού κλάσματος του ίδιου πορογενούς ηθητικού καρκινώματος μη ειδικού τύπου με 6/6 μεταστατικούς μφιδένες Grade III, όπου διακρίνονται οι πέντε αναγνωρισμένες ωτεΐνες (λεπτά βέλη).



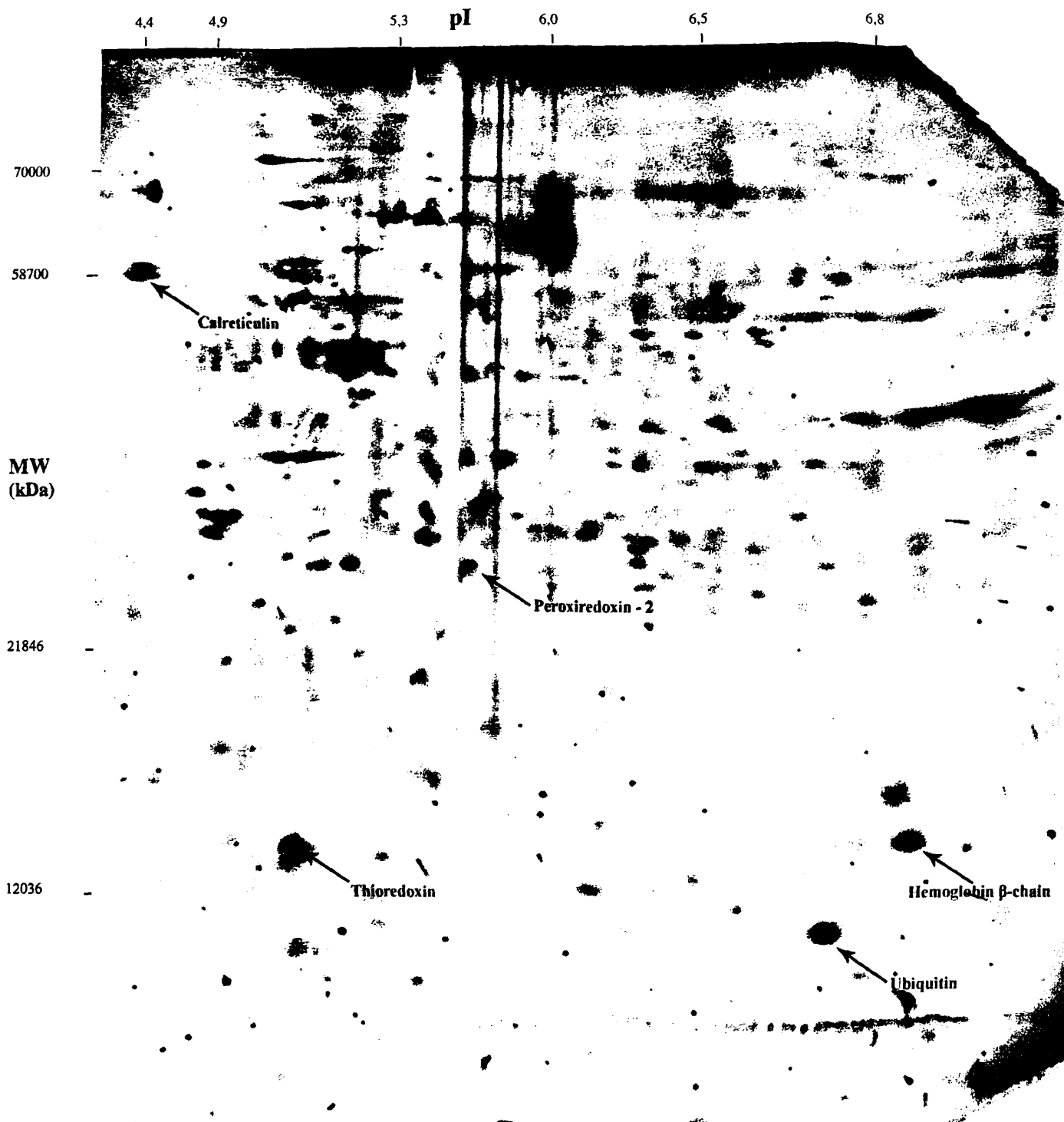
Εικ. 33: Ηλεκτροφόρημα κυτταροπλασματικού κλάσματος πορογενούς διηθητικού καρκινώματος μη ειδικού τύπου με 21/21 μεταστατικούς λεμφαδένες Grade III, όπου διακρίνονται οι πέντε αναγνωρισμένες πρωτεΐνες (λεπτά βέλη).



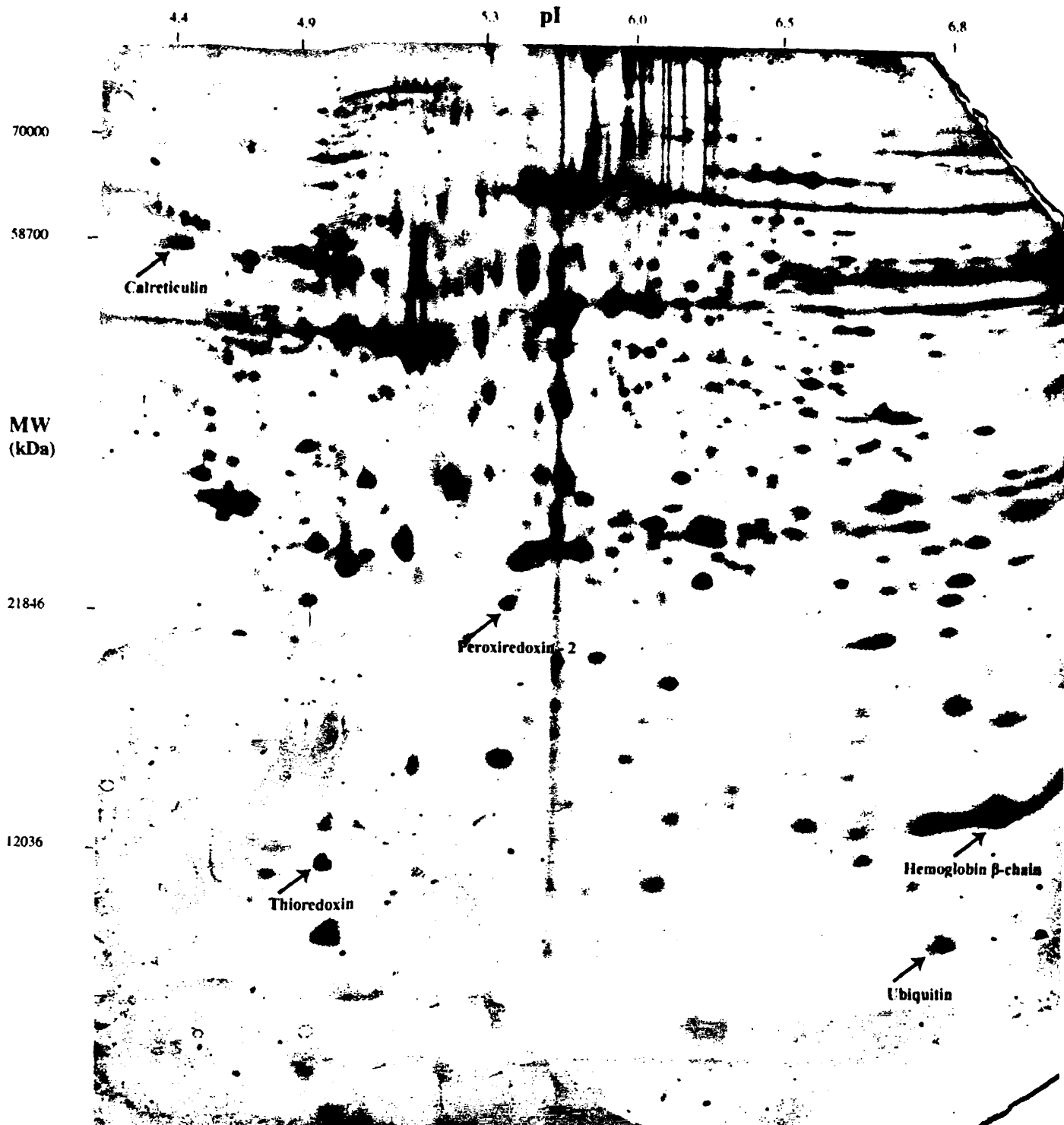
Εικ. 34: Ηλεκτροφόρημα μεμβρανικού κλάσματος του ίδιου πορογενούς διηθητικού καρκινώματος μη ειδικού τύπου με 21/21 μεταστατικών λεμφαδένες Grade III, όπου διακρίνονται οι πέντε αναγνωρισμένες πρωτεΐνες (λεπτά βέλη).



Εικ. 35: Ηλεκτροφόρημα κυτταροπλασματικού κλάσματος λοβιακού διηθητικού καρκινώματος με συνύπαρξη πορογενούς καρκινώματος *in situ* και 14/14 μεταστατικούς λεμφαδένες, Grade III, όπου διακρίνονται οι πέντε αναγνωρισμένες πρωτεΐνες (λεπτά βέλη).



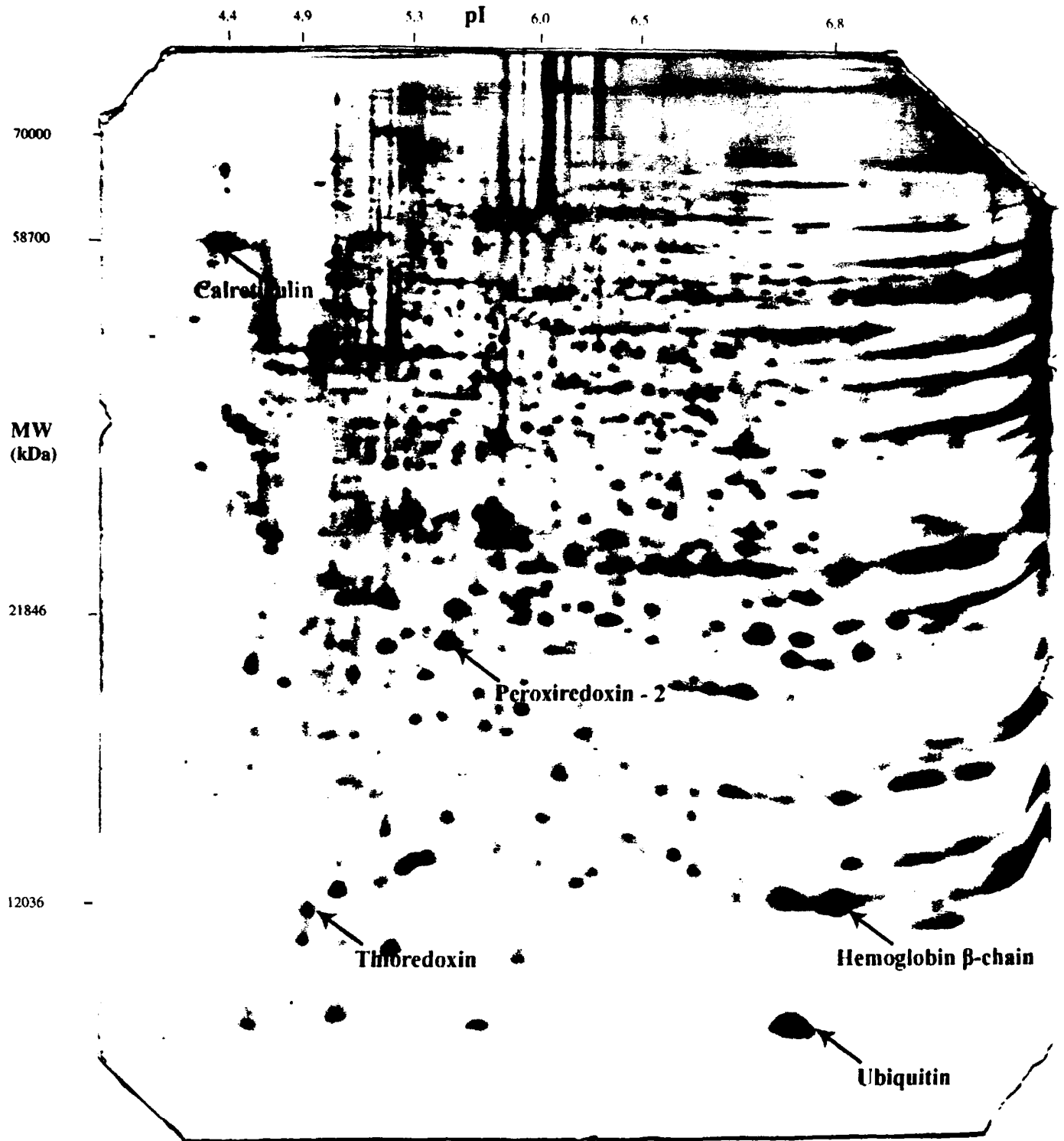
Εικ. 36: Ηλεκτροφόρημα μεμβρανικού κλάσματος λοβιακού διηθητικού καρκινώματος με συνύπαρξη πορογενούς καρκινώματος *in situ* και 14/14 μεταστατικούς λεμφαδένες, Grade III, όπου διακρίνονται οι πέντε αναγνωρισμένες πρωτεΐνες (λεπτά βέλη).



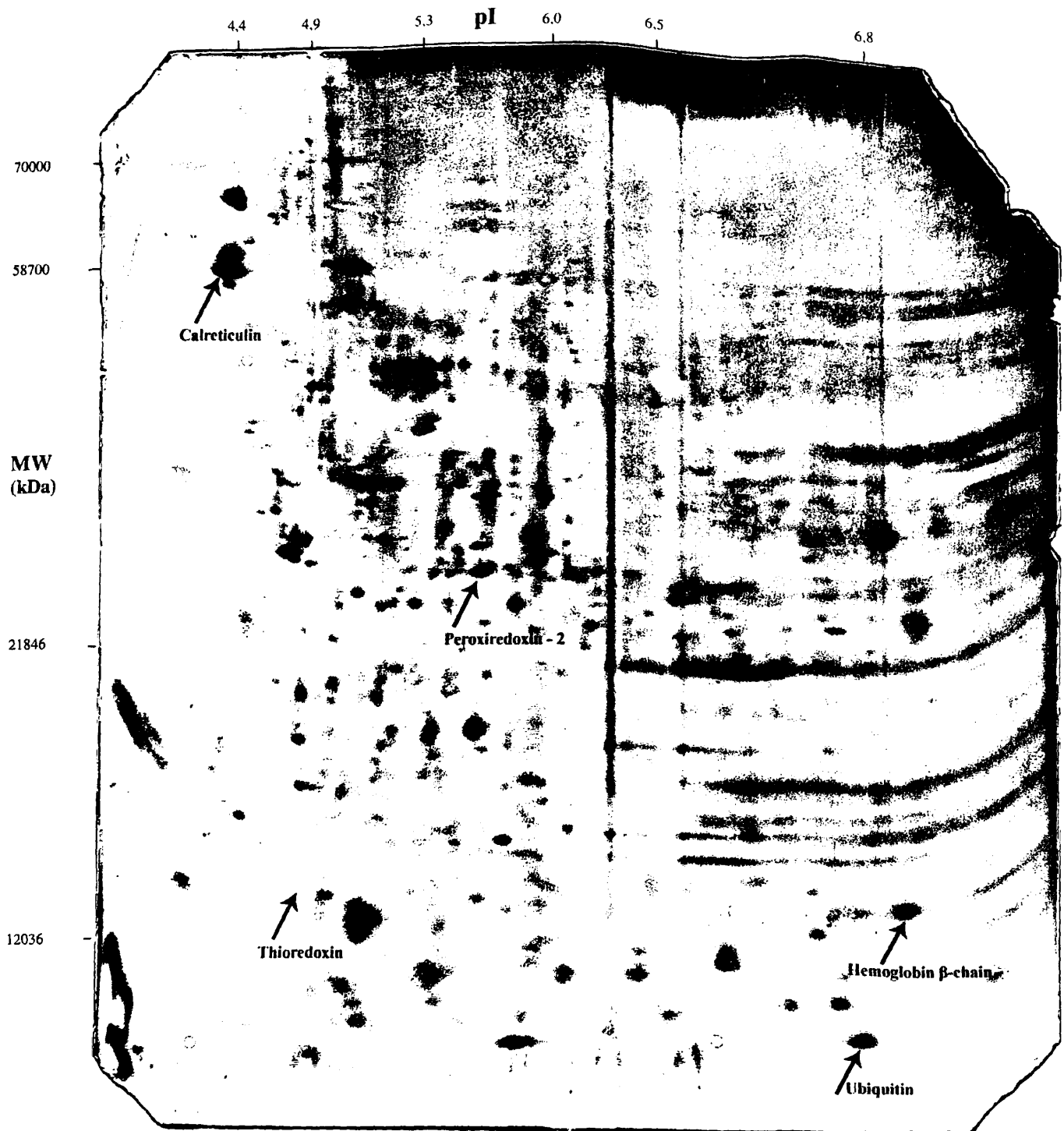
Εικ. 37: Ηλεκτροφόρημα κυτταροπλασματικού κλάσματος λοβιακού διηθητικού καρκινώματος με 4/11 μεταστατικούς λεμφαδένες Grade III, όπου διακρίνονται οι πρωτεΐνες Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4 (χοντρά βέλη), η απουσία των Pr5 και Pr6 (κύκλοι), καθώς και οι πέντε αναγνωρισμένες πρωτεΐνες (λεπτά βέλη).



Εικ. 38: Ηλεκτροφόρημα του κυτταροπλασματικού κλάσματος του καθρέφτη βιοψίας του δείγματος της εικόνας 36, όπου διακρίνονται οι πέντε αναγνωρισμένες πρωτεΐνες (λεπτά βέλη).



Εικ. 39: Ηλεκτροφόρημα του κυτταροπλασματικού κλάσματος μυελοειδούς καρκινώματος με 1/1 μεταστατικούς λεμφαδένες Grade III, όπου διακρίνονται οι πέντε αναγνωρισμένες πρωτεΐνες (λεπτά βέλη).

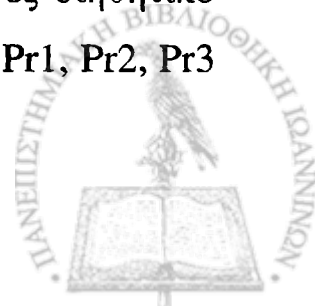


Εικ. 40: Ηλεκτροφόρημα του μεμβρανικού κλάσματος μυελοειδούς καρκινώματος με 1/1 μεταστατικούς λεμφαδένες Grade III, όπου διακρίνονται οι πέντε αναγνωρισμένες πρωτεΐνες (λεπτά βέλη).

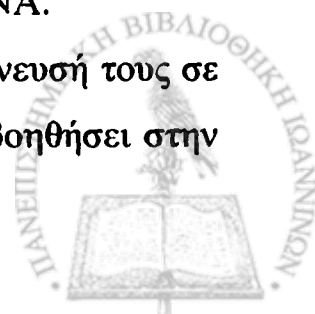
7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ηλεκτροφόρησης δύο-διαστάσεων (two-dimensional electrophoresis – 2-DE), για την μελέτη των κυτταροπλασματικών και μεμβρανικών πρωτεϊνών καρκινικών και μη καρκινικών ιστών, από ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Από την μελέτη αυτή προέκυψαν τα παρακάτω συμπεράσματα:

- Παρατηρήθηκαν ποιοτικές διαφορές (νέες πρωτεΐνες) μεταξύ των ηλεκτροφορημάτων των καρκινικών και μη καρκινικών ιστών, οι οποίες παρατηρούνται μόνο στα καρκινικά δείγματα. Οι ποιοτικές διαφορές είναι οι εξής:
 1. Στα κυτταροπλασματικά κλάσματα των καρκινικών δειγμάτων παρατηρήθηκαν τέσσερις άγνωστες πρωτεΐνες, που ονομάστηκαν **Pr1, Pr2, Pr3** και **Pr4**.
 2. Στα μεμβρανικά κλάσματα των καρκινικών δειγμάτων παρατηρήθηκαν δύο άγνωστες πρωτεΐνες, που ονομάστηκαν **Pr5** και **Pr6**.
- Στα κυτταροπλασματικά κλάσματα των δειγμάτων Grade I, παρατηρήθηκαν μόνο οι πρωτεΐνες Pr3 και Pr4. Στα μεμβρανικά κλάσματα δεν παρατηρήθηκαν οι δύο νέες μεμβρανικές πρωτεΐνες
- Στα κυτταροπλασματικά κλάσματα των δειγμάτων Grade II, παρατηρήθηκαν οι Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4. Στα μεμβρανικά κλάσματα των ίδιων δειγμάτων παρατηρήθηκαν οι Pr5 και Pr6.
- Στα κυτταροπλασματικά κλάσματα των δειγμάτων Grade III, παρατηρήθηκαν οι Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4. Στα μεμβρανικά κλάσματα των ίδιων δειγμάτων παρατηρήθηκαν οι Pr5 και Pr6. Στα μεμβρανικά κλάσματα των δειγμάτων από πορογενές διηθητικό καρκίνωμα μη ειδικού τύπου παρατηρήθηκαν και οι Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4.



- Η ποσοτική έκφραση των πρωτεϊνών αυτών, δείχνει να επηρεάζεται από τον τύπο του καρκινώματος, τον βαθμό κακοήθειας, την ύπαρξη ή μη μεταστατικών λεμφαδένων και την συνύπαρξη με το κυρίως καρκίνωμα, άλλου τύπου καρκινώματος.
- Παρατηρήθηκαν επίσης ποσοτικές διαφορές στην έκφραση πέντε γνωστών πρωτεϊνών, της θειορεδοξίνης (Thioredoxin), της καλρετικουλίνης (Calreticulin), της ουβικουτίνης (Ubiquitin), της υπεροξειρεδοξίνης-2 (peroxiredoxin-2) και της β-αλυσίδας της αιμογλοβίνης (Hemoglobin β -chain).
- Οι εντονότερες διαφορές μεταξύ μη καρκινικών και καρκινικών δειγμάτων παρατηρούνται στα δείγματα πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων Grade III, όπου οι πρωτεΐνες αυτές υπερεκφράζονται σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με τα μη καρκινικά δείγματα. Αυτό το γεγονός καθιστά τα δείγματα αυτά, σύμφωνα με τα ευρήματά μας, και τον πιο επιθετικό τύπο καρκίνου της παρούσας μελέτης.
- Οι πέντε αυτές πρωτεΐνες μπορούν να βοηθήσουν κλινικά στην αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού, ως καρκινικοί δείκτες για τους εξής λόγους:
 - i. Η θειορεδοξίνη και η υπεροξειρεδοξίνη-2 είναι πρωτεΐνες υπεύθυνες για την οξειδοαναγωγική ισορροπία του κυττάρου και ρυθμίζουν την λειτουργία πολλών πρωτεϊνών υπεύθυνων για την μεταγραφή του DNA ή για την έναρξη της απόπτωσης.
 - ii. Η καλρετικουλίνη και η ουβικουτίνη έχουν παρατηρηθεί να παίζουν ρόλο στην σήμανση πρωτεϊνών για λόγους όπως η αποδόμηση πρωτεϊνών ή η μεταγραφή του DNA.
 - iii. Συνεπώς με τις κατάλληλες μεθόδους, η ανίχνευσή τους σε πρώιμα στάδια της νόσου θα μπορούσε να βοηθήσει στην



καλύτερη πρόγνωση, αντιμετώπιση και ενδεχομένως στην θεραπεία της νόσου.

- Η εύρεση των αγνώστων πρωτεϊνών μας οδηγεί στην περαιτέρω μελέτη τους με τεχνικές Φασματογραφίας Μάζας και Μοριακής Βιολογίας, με τελικό σκοπό τον χαρακτηρισμό τους, εύρεση του ρόλου και της λειτουργικότητας τους στον καρκίνο του μαστού και την ενδεχόμενη χρήση τους ως καρκινικών δεικτών στην έγκαιρη πρόγνωση και αντιμετώπιση της νόσου.



8. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η συγκριτική μελέτη των κυτταροπλασματικών και μεμβρανικών πρωτεϊνών, μεταξύ καρκινικών και μη καρκινικών ιστών καρκίνου του μαστού. Για την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Ηλεκτροφόρησης Δύο Διαστάσεων (Two-Dimensional Electrophoresis – 2D-E).

Η τεχνική αυτή επιτρέπει στον ερευνητή να έχει μια σχεδόν πλήρη απεικόνιση της πρωτεϊνικής έκφρασης ενός δείγματος, από τη στιγμή που σε ένα ηλεκτροφόρημα απεικονίζονται περίπου 1000 με 1500 πρωτεϊνικές κηλίδες.

Από την μελέτη μας, προέκυψαν ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές μεταξύ των καρκινικών και μη καρκινικών ιστών.

Οι ποιοτικές διαφορές αφορούν στην έκφραση τεσσάρων αγνώστων πρωτεϊνών στα κυτταροπλασματικά κλάσματα μόνο των καρκινικών δειγμάτων, καθώς επίσης και δύο αγνώστων πρωτεϊνών στα μεμβρανικά κλάσματα μόνο των καρκινικών δειγμάτων. Οι κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες ονομάστηκαν **Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4** ενώ οι μεμβρανικές **Pr5 και Pr6**.

Στα κυτταροπλασματικά κλάσματα των δειγμάτων Grade I, παρατηρήθηκαν μόνο οι πρωτεΐνες Pr3 και Pr4. Στα μεμβρανικά κλάσματα δεν παρατηρήθηκαν οι δύο άγνωστες μεμβρανικές πρωτεΐνες. Στα κυτταροπλασματικά κλάσματα των δειγμάτων Grade II, παρατηρήθηκαν οι Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4. Στα μεμβρανικά κλάσμα των ίδιων δειγμάτων παρατηρήθηκαν οι Pr5 και Pr6.

Στα κυτταροπλασματικά κλάσματα των δειγμάτων Grade III, παρατηρήθηκαν οι Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4. Στα μεμβρανικά κλάσμα των ίδιων δειγμάτων παρατηρήθηκαν οι Pr5 και Pr6. Στα μεμβρανικά



κλάσματα των δειγμάτων από πορογενές διηθητικό καρκίνωμα μη ειδικού τύπου παρατηρήθηκαν και οι Pr1, Pr2, Pr3 και Pr4.

Η ποσοτική έκφραση των πρωτεϊνών αυτών, δείχνει να επηρεάζεται από τον τύπο του καρκινώματος, τον βαθμό κακοήθειας, την ύπαρξη ή μη μεταστατικών λεμφαδένων και την συνύπαρξη με το κυρίως καρκίνωμα, άλλου τύπου καρκινώματος.

Οι ποσοτικές διαφορές αφορούν στην ποσοτική έκφραση πέντε γνωστών πρωτεϊνών της της θειορεδοξίνης (Thioredoxin), της καλρετικουλίνης (Calreticulin), της ουβικουτίνης (Ubiquitin), της υπεροξειρεδοξίνης-2 (peroxiredoxin-2) και της β-αλυσίδας της αιμογλοβίνης (Hemoglobin β-chain).

Οι πέντε αυτές πρωτεΐνες μπορούν μελλοντικά να βοηθήσουν κλινικά στην αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού, ως καρκινικοί δείκτες με την χρήση κατάλληλων μεθόδων ανίχνευσής τους σε πρώιμα στάδια της νόσου, ως εργαλεία για την καλύτερη πρόγνωση, αντιμετώπιση και ενδεχομένως στην θεραπεία της νόσου.

Η εύρεση των αγνώστων πρωτεϊνών οδηγεί την έρευνά μας, στην περαιτέρω μελέτη τους με τεχνικές Φασματογραφίας Μάζας και Μοριακής Βιολογίας, με τελικό σκοπό τον χαρακτηρισμό τους, εύρεση του ρόλου και της λειτουργικότητας τους στον καρκίνο του μαστού και την ενδεχόμενη χρήση τους ως καρκινικών δεικτών στην έγκαιρη πρόγνωση και αντιμετώπιση της νόσου.



9. SUMMARY

The aim of this thesis is the comparative study of cytoplasmic and membrane protein expression, between malignant and non-malignant breast cancer tissues. In order to complete this study, we used the Two-Dimensional Electrophoresis (2D-E) technique.

This technique allows the researcher to have an almost complete visualization of the proteome of a sample, since there are approximately 1000-1500 protein spots visualized on a single gel.

In the course of this study, we derived qualitative and quantitative differences between malignant and non-malignant tissues.

The qualitative differences consist of four unknown cytoplasmic proteins expressed only in the cytosolic fractions of the malignant samples and two unknown membrane proteins expressed only in the membrane fractions of the malignant samples. These cytoplasmic proteins were termed **Pr1**, **Pr2**, **Pr3** and **Pr4**, while the membrane proteins were termed **Pr5** and **Pr6**.

In the cytoplasmic fractions of Grade I samples we observed proteins Pr3 and Pr4 only. We did not observe the unknown proteins in the membrane fractions.

In the cytoplasmic fractions of Grade II samples we observed proteins Pr1, Pr2, Pr3 and Pr4. In the membrane fractions of the same samples we observed proteins Pr5 and Pr6.

In the cytoplasmic fractions of Grade III samples we observed proteins Pr1, Pr2, Pr3 and Pr4. In the membrane fractions of the same samples we observed proteins Pr5 and Pr6. We also observed proteins Pr1, Pr2, Pr3 and Pr4 in the membrane fractions of infiltrating ductal carcinoma no special type samples.



The quantitative expression of these proteins seems to be affected by carcinoma type, grading of the sample, the existence or not of metastatic lymph nodes and the coexistence of other carcinoma types within the major carcinoma.

The quantitative differences concern the quantitative expression of five known proteins. These are Thioredoxin, Calreticulin, Ubiquitin, Peroxiredoxin-2 and Hemoglobin β -chain.

These five proteins can help clinically in the future, with the better treatment of breast cancer. They can be used as cancer markers which with the use of suitable detection methods can be observed in the early stages of the disease and be used as tools for the better prognosis, treatment and potential therapy of the disease.

The observation of the unknown proteins leads our research to their further studying with Mass Spectrometry and Molecular Biology techniques, with the eventual aim to characterize them, find their possible role and function in breast cancer and therefore their potential use as cancer markers in the early prognosis and treatment of the disease.



10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Σπανίδου-Καρβούνη Ε. and Καϊρη-Βασιλάτου Ε. *Ειδική Παθολογική Ανατομία*. Π. Δάβαρης και ΔΕΠ Π.Α. 1994: Πανεπιστήμιο Αθηνών.
2. Hubert Hondermarck, Anne Sophie, Varcouter Edouart, Francoise Revillion, et al., *Proteomics of breast cancer for marker discovery and signal pathway profiling*. Proteomics, 2001. 1: p. 1216-1232.
3. Collaborative group on hormonal factors in breast cancer, *Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58209 women with breast cancer and 101986 women without the disease*. Lancet, 2001. 358: p. 1389-99.
4. S. Omar, *Breast Cancer*. 2003. p. 1-7.
5. Page D. and Anderson T., *Diagnostic histopathology of the breast*. 1987: Churchill Livingstone. 193-235.
6. Βολουδάκης Γ. Ε. *Τοπογραφία της Κυτταρικής Μεμβράνης των Καρκινικών και Μη Καρκινικών Κυττάρων Μαστού*. 1999, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων-Ιατρική Σχολή: Ιωάννινα. p. 12-13.
7. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., et al., *Molecular Biology of the Cell*. Third ed. 1994: Garland Publishing Inc.
8. Dwek M. V., Ross H. A., and Leatham A. J. C., *Proteome and glycosylation mapping identifies post-translational modifications associated with aggressive breast cancer*. Proteomics, 2001. 1: p. 756-762.
9. Powis G., Mustacich D., and Coon A., *The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer*. Free Radical Biology & Medicine, 2000. 29(3/4): p. 312-322.
10. Ueno M., Matsutani Y., Nakamura H., Masutani H., et al., *Possible association of thioredoxin and p53 in breast cancer*. Immunology Letters, 2000. 75: p. 15-20.



11. Holmgren A. and Bjornstedt M., *Thioredoxin and thioredoxin reductase*. Methods in Enzymology, 1995. **252**: p. 199-208.
12. Powis G. and Montfort W. R., *Properties and biological activities of thioredoxins*. Annual Reviews in Biophysical and Biomolecular Structure, 2001. **30**: p. 421-455.
13. Arner E. S. and Holmgren A., *Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase*. European Journal of Biochemistry, 2000. **267**: p. 6102-6109.
14. A. Holmgren, *Thioredoxin and glutaredoxin systems*. Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**: p. 13963-13966.
15. Matsutani Y., Yamauchi A., Takahashi R., Ueno M., et al., *Inverse correlation of thioredoxin expression with estrogen receptor and p53-dependent tumor growth in breast cancer tissues*. Clinical Cancer Research, 2001. **7**: p. 3430-3436.
16. Engman L., Al-Maharik N., McNaughton M., Birmingham A., et al., *Thioredoxin Reductase and Cancer Cell Growth Inhibition by Organotellurium Compounds that Could be Selectively Incorporated into Tumor Cells*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2003. **11**: p. 5091-5100.
17. Bloomfield K. L., Osborne S. A., Kennedy D. D., Clarke F. M., et al., *Thioredoxin-mediated redox control of the transcription factor Sp1 and regulation of the thioredoxin gene promoter*. Gene, 2003. **319**: p. 107-116.
18. T. J. Ostwald and D. H. MacLennan, *Isolation of a high affinity calcium binding protein from sarcoplasmic reticulum*. Journal of Biological Chemistry, 1974. **249**: p. 974-979.
19. Tutuncu L., Stein P., Ord T. S., Jorgez C. J., et al., *Calreticulin on the mouse egg surface mediates transmembrane signaling linked to cell cycle resumption*. Developmental Biology, 2004. **270**: p. 246-260.
20. Dissemond J., Busch M., Kothen T., Mors J., et al., *Differential downregulation of endoplasmic reticulum-residing chaperones*



calnexin and calreticulin in human metastatic melanoma. Cancer Letters, 2004. **203**: p. 225-231.

21. M. Michalak, R. E. Milner, K. Burns, and M. Opas, *Calreticulin*. Biochemical Journal, 1992. **285**: p. 681-692.
22. Saito Y., Ihara Y., Leach M. R., and et al, *Calreticulin functions in vitro as a molecular chaperone for both glycosylated and non-glycosylated proteins*. EMBO Journal, 1999. **18**: p. 6718-6729.
23. Ellgaard L., Molinari M., and Helenius A., *Setting the standards: quality control in the secretory pathway*. Science, 1999. **286**: p. 1882-1888.
24. Yoshida Y., Chiba T., Tokunaga F., and et al, *E3 ubiquitin ligase that recognises sugar chains*. Nature, 2002. **418**: p. 438-442.
25. Karl-Heinz Krause and Marek Michalak, *Calreticulin*. Cell, 1997. **88**: p. 439-443.
26. Michalak M., Burns K., Andrin C., and et al, *Endoplasmic reticulum form of calreticulin modulates glucocorticoid-sensitive gene expression*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**: p. 29436-29445.
27. S. Johnson, M. Michalak, M. Opas, and P. Eggleton, *The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space*. Trends in Cell Biology, 2001. **11**(3): p. 122-129.
28. M. Michalak, J. M. Robert Parker, and M. Opas, *Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum*. Cell Calcium, 2002. **32**(5-6): p. 269-278.
29. Ostwald T. J. and MacLennan D. H., *Isolation of a high affinity calcium binding protein from sarcoplasmic reticulum*. Journal of Biological Chemistry, 1974. **249**: p. 974-979.
30. Bouvier Marlene, *Accessory proteins and the assembly of human class I MHC molecules: a molecular and structural perspective*. Molecular Immunology, 2003. **39**: p. 697-706.



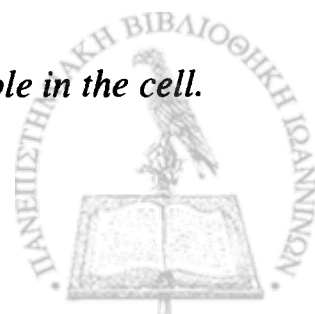
31. Robert C. Stein and Marketa J. Zvelebil, *The application of 2D gel-based proteomics methods to the study of breast cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2002. 7(4): p. 385-393.
32. I. E. Voloudakis-Baltatzis, V. Malliopoulou, H. Gaitanarou, S. Kapoula, et al., *Histological, Ultrastructural and Two-dimensional Gel Electrophoresis Studies of Human Breast Cancer*. Cancer Molecular Biology, 1995. 2(4): p. 597-611.
33. Julia D. Wulfschlegel, Kelley C. McLean, Cloud P. Paweletz, Dennis C. Sgroi, et al., *New approaches to proteomic analysis of breast cancer*. Proteomics, 2001. 1: p. 1205-1215.
34. Hoving S., Voshol H., and Oostrum J. V., *Towards high performance two-dimensional gel electrophoresis using ultrazoom gels*. Electrophoresis, 2000. 21: p. 2617-2621.
35. Bjellqvist B., Ek K., Righetti P. G., Gianazza E., et al., *Isoelectric focusing in immobilised pH gradients: Principle, methodology and some applications*. J. Biochem. Biophys. Methods, 1982. 6(4): p. 317-339.
36. Vuong G. L., Weiss S. M., Kammer W., Priemer M., et al., *Improved sensitivity proteomics by postharvest alkylation and radioactive labeling of proteins*. Electrophoresis, 2000. 21(13): p. 2594-2605.
37. Haleem J. Issaq, Thomas P. Conrads, George M. Janini, and Timothy D. Veenstra, *Methods for fractionation, separation and profiling of proteins and peptides*. Electrophoresis, 2002. 23: p. 3048-3061.
38. Journet A., Chapel A., Kieffer S., Roux F., et al., *Proteomic analysis of human lysosomes: Application to monocytic and breast cancer cells*. Proteomics, 2002. 2: p. 1026-1040.
39. Leimgruber R. M., Malone J. P., Radabaugh M. R., LaPorte M. L., et al., *Development of improved cell lysis, solubilisation and imaging approaches for proteomic analyses*. Proteomics, 2002. 2: p. 135-144.



40. Harris R. A., Yang A., Stein R. C., Lucy K., et al., *Cluster analysis of an extensive human breast cancer cell line protein expression map database*. Proteomics, 2002. **2**: p. 212-223.
41. Gharahdaghi F., Weinberg C. R., Meagher D. A., Imai B. S., et al., *Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity*. Electrophoresis, 1999. **20**: p. 601-605.
42. Choe L. H. and Lee K. H., *Quantitative and qualitative measure of intralaboratory two-dimensional protein gel reproducibility and the effects of sample preparation, sample load, and image analysis*. Electrophoresis, 2003. **24**: p. 3500-3507.
43. Pucci-Minafra I., Fontana S., Cancemi P., Basirico L., et al., *A contribution to breast cancer cell proteomics: Detection of new sequences*. Proteomics, 2002. **2**: p. 919-927.
44. Pleißner K. P., Hoffmann F., Kriegel K., Wenk C., et al., *New algorithmic approaches to protein spot detection and pattern matching in two-dimensional electrophoresis gel databases*. Electrophoresis, 1999. **20**: p. 755-765.
45. Somiari R., Sullivan A., Russell S., Somiari S., et al., *High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast*. Proteomics, 2003. **3**: p. 1863-1873.
46. A.R. Cole, H. Ji, and R. J. Simpson, *Proteomic analysis of colonic crypts from normal, multiple intestinal neoplasia and p53-null mice: A comparison with colonic polyps*. Electrophoresis, 2000. **21**: p. 1772-1781.
47. L. Bini, B. Magi, B. Marzocchi, F. Arcuri, et al., *Protein expression profiles in human breast ductal carcinoma and histologically normal tissue*. Electrophoresis, 1997. **18**: p. 2832-2841.
48. Turunen N., Karihtala P., Mantyniemi A., Sormunen R., et al., *Thioredoxin is associated with proliferation, p53 expression and negative estrogen and progesterone receptor status in breast carcinoma*. APMIS, 2004. **112**: p. 123-32.



49. G. Brunagel, U. Shah, R. E. Schoen, and R. H. Getzenberg, *Identification of Calreticulin as a Nuclear Matrix Protein Associated With Human Colon Cancer*. Journal Of Cellular Biochemistry, 2003. **89**: p. 238-243.
50. Gasdaska J.R., Berggren M., and Powis G., *Cell growth stimulation by the redox protein thioredoxin occurs by a novel helper mechanism*. Cell Growth Differ., 1995. **6**: p. 1643-1650.
51. F. A. Arosa, O. de Jesus, G. Porto, A. M. Carmo, et al., *Calreticulin is expressed on the cell surface of activated human peripheral blood T lymphocytes in association with Major Histocompatibility Complex Class I molecules*. The Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(24): p. 16917-16922.
52. G. S. Yoon, H. Lee, Y. Jung, E. Yu, et al., *Nuclear matrix of calreticulin in hepatocellular carcinoma*. Cancer Research, 2000. **60**: p. 1117-1120.
53. A. Bisca, C. D' Ambrosio, A. Scaloni, F. Puglisi, et al., *Proteomic evaluation of core biopsy specimens from breast lesions*. Cancer Letters, 2004. **204**: p. 79-86.
54. Karihtala P., Mantyniemi A., Kang S. W., Kinnula V. L., et al., *Peroxiredoxins in Breast Carcinoma*. Clinical Cancer Research, 2003. **9**: p. 3418-3424.
55. Iwaya K., Ogawa H., Mukai Y., Iwamatsu A., et al., *Ubiquitin-immunoreactive degradation products of cytokeratin 8/18 correlate with aggressive breast cancer*. Cancer Science, 2003. **94**(10): p. 864-870.
56. Burger A. M. and Seth A. K., *The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications*. European Journal of Cancer, 2004. **40**: p. 2217-2229.
57. - Glickman M. H. and Ciechanover A., *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction*. Physiology Reviews, 2002. **82**: p. 373-428.
58. J. Adams, *The proteasome: structure, function, and role in the cell*. Cancer Treatment Reviews, 2003. **29**: p. 3-9.



59. Weissman A. M., *Themes and variations on ubiquitylation*. Nat Rev Mol Cell Biology, 2001. **2**: p. 169-178.
60. S. Lipkowitz, *Ubiquitin mediated degradation of growth factor receptors in the pathogenesis and treatment of cancer*. Breast Cancer Research, 2003. **5**(1): p. 8-15.
61. L. Hicke, *Getting down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels*. Trends in Cell Biology, 1999. **9**: p. 107-112.
62. Seth A., Kitching R., Landberg G., and et al, *Identification of genes differentially expressed in ductal carcinoma in situ and invasive breast tumours*. Anticancer Research, 2003. **23**: p. 2043-2052.
63. Dutaud D., Aubry L., Henry L., and et al, *Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma*. Journal of Immunological Methods, 2002. **260**: p. 183-193.
64. Pray T. R., Parlatti F., Huang J., and et al, *Cell cycle regulatory E3 ubiquitin ligases as anticancer targets*. Drug Resist Updates, 2002. **5**: p. 249-258.
65. Nalepa G. and Harper W., *Therapeutic anti-cancer targets upstream of the proteasome*. Cancer Treatment Reviews, 2003. **29**: p. 49-57.
66. Blume-Jensen P. and Hunter T., *Oncogenic kinase signalling*. Nature, 2001. **411**: p. 355-365.
67. Hershko A Ciechanover A., *The ubiquitin system*. Annual Reviews in Biochemistry, 1998. **67**: p. 425-479.
68. Zhang P., Liu B., Kang S. W., Seo M. S., et al., *Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**: p. 30615-30618.
69. Noh D. Y., Ahn S. J., Lee R. A., Kim S. W., et al., *Overexpression of peroxiredoxin in human breast cancer*. Anticancer Research, 2001. **21**: p. 2085-2090.



70. Kim H., Lee T. H., Park E. S., Suh J. M., et al., *Role of peroxiredoxins in regulating intracellular hydrogen peroxide and hydrogen peroxide-induced apoptosis in thyroid cells*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**: p. 18266-18270.
71. Sasada T., Nakamura H., Ueda S., and et al, *Possible involvment of thioredoxin reductase as well as thioredoxin in cellular sensitivity to cis-diamminedichloroplatinun*. Free Radical Biology & Medicine, 1999. **27**: p. 504-514.
72. Mitsui A., Hirakawa T., and Yodoi J., *Reactive oxygen-reducing and protein-refolding activities of adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1992. **186**: p. 1220-1226.
73. Ohira A., Honda O., Gauntt C. D., and et al, *Adult T cell leukemia-derived factor/thioredoxin in the rat retina*. Lab Investigations, 1994. **70**: p. 279-285.
74. Nakamura H., Matsuda M., Furuke K., and et al, *Adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin protects endothelial F-2 cell injury caused by activated neutrophils or hydrogen peroxide*. Immunology Letters, 1994. **42**: p. 75-80.
75. Sasada T., Iwata S., Sato N., and et al, *Redox control of resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) (CDDP)*. Journal of Clinical Investigation, 1996. **97**: p. 2268-2276.
76. Nordberg J. and Arner E. S., *Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system*. Free Radical Biology & Medicine, 2001. **31**: p. 1287-1312.
77. Janssen Y. M., Van Houten B., Borm P. J., and et al, *Cell and tissue responses to oxidative damage*. Lab Investigations, 1993. **69**: p. 261-274.
78. L. Marklund S., *Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines*. Journal of Clinical Investigation, 1984. **74**: p. 1398-1403.
79. Fridovich I. and Freeman B., *Antioxidant defences in the lung*. Annual Reviews in Physiology, 1986. **48**: p. 693-702.

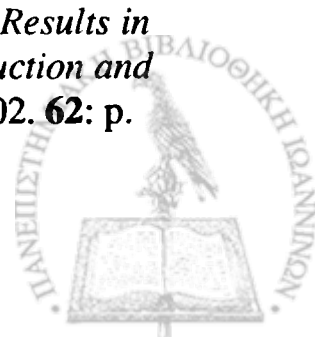


80. Crapo J. D., Oury T., Rabouille C., and et al, *Copper-zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells*. Proceedings of the National Academy Of Science USA, 1992. **89**: p. 10405-10409.
81. Kinnula V. L., Crapo J. D., and Raivio K. O., *Biology of disease: generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung*. Lab Investigations, 1995. **73**: p. 3-19.
82. Butterfield L. H., Meriona A., Golub S. H., and et al, *From cytoprotection to tumor supression: the multifactorial role of peroxiredoxins*. Antiox Redox Signal, 1999. **1**: p. 385-402.
83. Schenk H., Klein M., Erdbrugger W., and et al, *Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF- κ B and AP-1*. Proceedings of the National Academy Of Science USA, 1994. **91**: p. 1672-1676.
84. Makino Y., Okamoto K., Yoshikawa N., and et al, *Thioredoxin: a redox regulating cellular cofactor for glucocorticoid hormone action*. Journal of Clinical Investigation, 1996. **98**: p. 2469-2477.
85. Chen F., Castranova V., and Shi X., *New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation*. American Journal of Pathology, 2001. **159**: p. 387-397.
86. Webster G. A. and Perkins N. D., *Transcriptional cross talk between NF-kappa B and p53*. Molecular Cell Biology, 1999. **19**: p. 3485-3495.
87. Ravi R., Mookerjee B., Van Hensbergen Y., and et al, *p53-mediated repression of nuclear factor-kappaB RelA via the transcriptional intergrator p300*. Cancer Research, 1998. **58**: p. 4531-4536.
88. Hayashi S., Nakanishi K. H., Makino Y., Eguchi H., et al., *Functional modulation of estrogen receptor by redox state with reference to thioredoxin as a mediator*. Nucleic Acid Research, 1997. **25**: p. 4035-4040.
89. Wang J., Kobayashi M., Sakurada K., Imamura M., et al., *Possible roles of an adult T-cell leukemia (ATL)-derived factor/Thioredoxin*

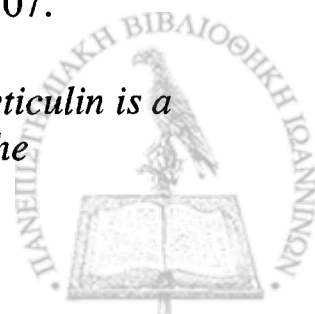


in the drug resistance of ATL to andriamycin. Blood, 1997. 89: p. 2480-2487.

90. Nakamura H., Bai J., Nishinaka Y., and et al, *Expression of thioredoxin and glutaredoxin, redox-regulating proteins, in pancreatic cancer. Cancer Detection & Prevention, 2000. 24: p. 53-60.*
91. Nakamura H., Masutani H., Tagaya Y., and et al, *Expression and growth-promoting effect of adult T-cell leukemia-derived factor: a human thioredoxin homologue in hepatocellular carcinoma. Cancer, 1992. 69: p. 2091-2097.*
92. Kahlos K., Soini Y., Saily M., and et al, *Up-regulation of thioredoxin and thioredoxin reductase in human malignant pleural mesothelioma. International Journal of Cancer, 2001. 95: p. 198-204.*
93. Grogan T. M., Fenoglio-Prieser C., Zeheb R., and et al, *Thioredoxin, a putative oncogene product, is overexpressed in gastric carcinoma and associated with increased proliferation and increased cell survival. Human Pathology, 2000. 31: p. 475-481.*
94. Fujii S., Nahbu Y., Nonogaki H., and et al, *Coexpression of adult T-cell leukaemia-derived factor, a human thioredoxin homologue, and human papillomavirus DNA in neoplastic cervical squamous epithelium. Cancer, 1991. 68(1583-1591).*
95. Brown P. H. and Lippman S. M., *Chemoprevention of breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment, 2000. 62: p. 1-17.*
96. Husbeck B., Stringer D. E., Gerner E. W., and Powis G., *Increased thioredoxin-1 inhibits SSAT expression in MCF-7 human breast cancer cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003. 306: p. 469-475.*
97. Welsh S. J., Bellamy W. T., Briehl M. M., and Powis G., *The Redox Protein Thioredoxin-1 (Trx-1) Increases Hypoxia-inducible Factor 1 α Protein Expression: Trx-1 Overexpression Results in Increased Vascular Endothelial Growth Factor Production and Enhanced Tumor Angiogenesis. Cancer Research, 2002. 62: p. 5089-5095.*



98. Raffel J., Bhattacharyya A. K., Gallegos A., Cui H., et al., *Increased expression of thioredoxin-1 in human colorectal cancer is associated with decreased patient survival*. Journal of Laboratory Clinical Medicine, 2003. **142**(1): p. 46-51.
99. Cook J. A., Gius D., Wink D. A., Krishna M. C., et al., *Oxidative Stress, Redox, and the Tumor Microenvironment*. Seminars in radiation Oncology, 2004. **14**(3): p. 259-266.
100. M. Michalak, E. F. Corbett, N. Mesaeli, K. Nakamura, et al., *Calreticulin: one protein, one gene, many functions*. Biochemical Journal, 1999. **344**: p. 281-292.
101. High S., Lecomte F. J., Russell S. J., and et al, *Glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum: a tale of three chaperones?* FEBS Letters, 2000. **476**: p. 38-41.
102. Jakob C. A., Chevet E., Thomas D. Y., and et al, *Lectins of the ER quality control machinery*. Results in Problems of Cell Differentiation, 2001. **33**: p. 1-17.
103. N. Platet, S. Cunat, D. Chalbos, H. Rochefort, et al., *Unliganded and Liganded Estrogen Receptors Protect against Cancer Invasion via different Mechanisms*. Molecular Endocrinology, 2000. **14**(7): p. 999-1009.
104. J. M. Holaska, B. E. Black, D. C. Love, J. A. Hanover, et al., *Calreticulin is a receptor for nuclear export*. The Journal of Cell Biology, 2001. **152**(1): p. 127-140.
105. Hathout Y., Riordan K., Gehrmann M., and Fenselau C., *Differential Protein Expression in the Cytosol Fraction of an MCF-7 Breast Cancer Cell Line Selected for Resistance toward Melphalan*. Journal of Proteome Research, 2002. **1**(5): p. 435-442.
106. Chen S-T, Pan T-L, Tsai Y-C, and Huang C-M, *Proteomics reveals protein profile changes in doxorubicin-treated MCF-7 human breast cancer cells*. Cancer Letters, 2002. **181**: p. 95-107.
107. Peterson J., Ora A., Van P. N., and Helenius A., *Calreticulin is a lectin-like molecular chaperone for glycoproteins in the*



- endoplasmic reticulum*. Molecular Biology of the Cell, 1995. **6**: p. 1173-1184.
108. Fadel M. P., Dziak E., Lo C. M., and et al, *Calreticulin affects focal contact-dependent but not close contact-dependent cell-substratum adhesion*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**: p. 15085-15094.
 109. Fadel M. P., Szewczenko-Pawlikowski M., Leclerc P., and et al, *Calreticulin affects β -catenin associated pathways*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**: p. 27083-27089.
 110. Burridge K. and Chrzanowska-Wodnicka M., *Focal adhesions, contractility, and signaling*. Annual Reviews in Cell Developmental Biology, 1996. **12**: p. 463-518.
 111. Daniel J. M. and Reynolds A. B., *Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function*. Bioessays, 1997. **19**: p. 883-891.
 112. Hanks S. K. and Polte T. R., *Signaling through focal adhesion kinase*. Bioessays, 1997. **19**: p. 137-145.
 113. Cox E. A. and Huttenlocher A., *Regulation of integrin-mediated adhesion during cell migration*. Microscopy Research Techniques, 1998. **43**: p. 412-419.
 114. B. Franzen, S. Linder, A. A. Alaiya, E. Eriksson, et al., *Analysis of polypeptide expression in benign and malignant human breast lesions: down-regulation of cytokeratins*. British Journal of Cancer, 1996. **74**: p. 1632-1638.
 115. Chaurand P. and Caprioli R. M., *Direct profiling and imaging of peptides and proteins from mammalian cells and tissue sections by mass spectrometry*. Electrophoresis, 2002. **23**: p. 3125-3135.
 116. Kim J., Kim S. H., Lee S. U., Kang D. G., et al., *Proteome analysis of human liver tumor tissue by two-dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionisation-mass spectrometry for identification of disease-related proteins*. Electrophoresis, 2002. **23**: p. 4142-4156.



117. Rosenfeld J., Capdevielle J., Guillemot J. C., and Ferrara P., *In-Gel Digestion of Proteins for Internal Sequence Analysis after One- or Two-Dimensional Gel Electrophoresis*. Analytical Biochemistry, 1992. **203**: p. 173-179.
118. Sinha P., Hutter G., Kottgen E., Dietel M., et al., *Search for novel proteins involved in the development of chemoresistance in colorectal cancer and fibrosarcoma cells in vitro using two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing*. Electrophoresis, 1999. **20**: p. 2961-2969.
119. Adriaenssens E., Lemoine J., El Yazidi-Belkoura I., and Hondermarck H., *Growth signaling in breast cancer cells: outcomes and promises of proteomics*. Biochemical Pharmacology, 2002. **64**: p. 797-803.
120. Zheng Y. F., Xu G. W., Liu D. Y., and et al, *Study of urinary nucleosides as biological marker in cancer patients analysed by micellar electrokinetic capillary chromatography*. Electrophoresis, 2002. **23**: p. 4104-4109.

