

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



025000200063



610
XAP
2002

A -

402

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΑΙ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗΣ
ΚΑΙ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΗΣ ΠΡΑΞΗΣ

Αθήνα, 1992

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΚΑΙ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

Μορφολογικός-Κλινικοεργαστηριακός Τομέας
Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομίας
Διευθυντής: Καθηγητής Ν. Ι. Αγνάντη

**ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΤΟΥ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΚΑΙ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΥ ΜΑΣΤΙΚΟΥ ΠΑΡΕΓΧΥΜΑΤΟΣ
ΚΑΙ ΜΕ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑΣ**

Αντωνία Β. Χαρχαντή
Ιατρός Παθολογοανατόμος

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2002



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: **Νίκη Ι. Αγάντη:** Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Βασιλική Μαλάμου-Μήτση: Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ευθύμιος Σιβρίδης: Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αλεξανδρούπολης



ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Νίκη Ι. Αγνάντη: Καθηγήτης Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Βασιλική Μαλάμου-Μήτση: Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Δημήτρης Γλάρος: Καθηγητής Ιατρικής Φυσικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Παναγιώτης Καναβάρος: Καθηγητής Ανατομίας-Ιστολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων..

Δημήτριος Στεφάνου: Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ευθύμιος Σιβρίδης: Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αλεξανδρούπολης

Μαίρη Μπάη: Επίκουρος Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.



*Στη Νίκη Ι. Αγκάντη, άξιο δάσκαλο και
εμπνευσμένο καθοδηγητή στο ταξίδι
κατάκτησης της γνώσης και της ζωής*



Δεν μπορώ να μην ευχαριστήσω τους ανθρώπους που ο καθένας από τη δική του θέση, με παρότρυναν, με βοήθησαν και μου συμπαραστάθηκαν σ' όλες τις φάσεις της εκπόνησης αυτής της διατριβής.

Βαθιά μου ανάγκη να ευχαριστήσω θερμότατα πρώτα από όλους την κα. Νίκη Ι. Αγνάντη, Καθηγήτρια της Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, η οποία υπήρξε, και είναι, για μένα δάσκαλος πολύτιμος και αναντικατάστατος. Η ανάθεση του θέματος και η αμέριστη συμπαράσταση της, κατέστησαν εφικτή την εκπόνηση αυτής της διατριβής. Επίσης, της εκφράζω την ευγνωμοσύνη μου για την συμβολή της στη συγκρότηση μου ως επιστήμονα, καθ' όλη την διάρκεια της ειδικότητάς μου στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Π.Π.Γ.Ν.Ιωαννίνων. Η μύηση μου στη σύγχρονη Παθολογική Ανατομική και η καλλιέργεια της επιστημονικής μου σκέψης, είναι το αποτέλεσμα της δικής της καθοδήγησης και των γνώσεων της, που τόσο γενναιόδωρα μου προσέφερε.

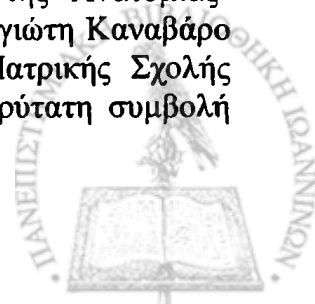
Θερμά ευχαριστώ την Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Βασιλική Μαλάμου-Μήτση για την συμπαράσταση της και τη συνεχή και πολύτιμη παροχή των γνώσεων της κατά τη διάρκεια της ειδικότητάς μου, στο επιστημονικό πεδίο της Κυτταρολογίας.

Θερμά ευχαριστώ τον Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Δημήτρη Στεφάνου και την Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κα Μαίρη Μπάη για τη συμπαράσταση και τη βοήθεια τους, όπως και για τη συμβολή τους στην εκπαίδευση και επιστημονική μου κατάρτιση.

Βαθύτατη ευγνωμοσύνη οφείλω στην Αναπληρώτρια Διευθύντρια Παθολογικής Ανατομικής, του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Π.Π.Γ.Ν.Ιωαννίνων κα Έλλη Ιωακείμ, για την ακούραστη καθημερινή βοήθεια που μου προσέφερε, το συνεχές ενδιαφέρον της την απλόχερη παροχή γνώσεων για το πολύ ειδικό αυτό θέμα καθώς και για τις πάντα εύστοχες υποδείξεις της. Επίσης, την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την επιστημονική καθοδήγηση και τις γνώσεις που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της ειδικότητάς μου στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Διευθυντή της Διαγνωστικής Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας του Παθολογοανατομικού εργαστηρίου του Christie Hospital NHS Trust Manchester U.K κ. Brian Eyden, για την μεγάλη του συμβολή στην κατανόηση και αξιολόγηση των ευρημάτων του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Χωρίς την καθοδήγηση του και την αμέριστη βοήθεια του στην ανάλυση των ευρημάτων του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου η συγγραφή του αντίστοιχου μέρους της παρούσας διατριβής θα ήταν ανέφικτη. Επίσης θερμά τον ευχαριστώ για την παρασχεθείσα δυνατότητα χρήσης της τεχνικής υποδομής του εργαστηρίου του. Ακόμη τον ευχαριστώ για τα σχήματα που σχεδίασε με επιστημονική ακρίβεια για την καλύτερη κατανόηση του συγκεκριμένου θέματος.

Ευχαριστώ τον Καθηγητή της Ιατρικής Φυσικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Δημήτρη Γλάρο, τον Καθηγητή της Ανατομίας-Ιστολογίας της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Παναγιώτη Καναβάρο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή της Παθολογικής Ανατομικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αλεξανδρούπολης κ. Ευθύμιο Σιβρίδη, για την ευρύτατη συμβολή τους στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.



Ευχαριστώ επίσης την Διευθύντρια του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Π.Γ.Ν.Ν.Ιωαννίνων Γ.Χατζηκώστα κα Στέλλα Στεφανάκη και τις συνεργάτιδες της, επιμελήτριες του εργαστηρίου της, κα Άρτεμις Στυλιανίδου και κα. Ευαγγελία Κίτσιου για την συμβολή τους στην συλλογή μέρους του υλικού που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή.

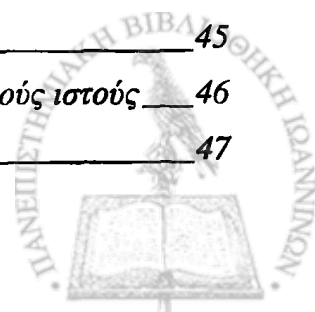
Ευχαριστώ τον επίκουρο καθηγητή του τμήματος Πληροφορικής του Πανεπιστημίου των Ιωαννίνων κ. Δημήτρη Φωτιάδη και τους συνεργάτες του για την παροχή τεχνικών διευκολύνσεων, οι οποίες βοήθησαν στην περάτωση της διατριβής μου.

Τέλος ευχαριστώ θερμά τον κ. Μιχάλη Αλεξίου και την κ Αντιγόνη Χριστοδούλου για την συμβολή τους στην διεξαγωγή του τεχνικού μέρους αυτής της μελέτης.

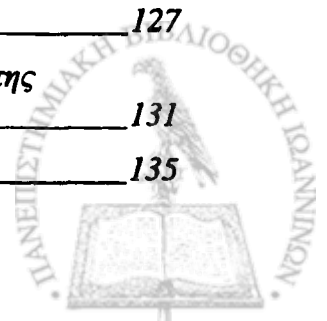


ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Γενικό Μέρος	15
1. Εισαγωγή	17
2. Διαδικασία της μετάστασης	19
2.1. Τοπική επέκταση - Δευτεροπαθής εντόπιση	19
2.2. Μετάσταση και υπερμικροσκοπικά ευρήματα	19
2.3. Αγγειογένεση και μετάσταση	20
3. Εξωκυττάρια Ουσία (ΕΟ)	22
3.1 Συστατικά της Βασικής Μembrάνης (BM)	24
3.1.1. Λαμινίνη (LM)	24
3.1.2. Κολлагόνο τύπου IV (KA)	27
3.2 Συστατικά Εξωκυττάριας Ουσίας	29
3.2.1 Τενασκίνη (TN)	29
3.2.2 Ινονεκτίνη (IN)	30
4. Πρωτεολυτικά ένζυμα	35
4.1. Ενδοκυττάρια πρωτεόλυση-Ένζυμα ασπαρτικού οξέος (Καθεψίνη D)	35
4.1.1. Γενικές πληροφορίες	35
4.1.2. Καθεψίνη D και μαστός	37
4.2. Εξωκυττάρια πρωτεόλυση - Μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας (Στρωμελυσίνες)	38
4.2.1. Δομή και λειτουργία των Μεταλλοπρωτεϊνάσών της ΕΟ (ΜΕΟ)	38
4.2.2. Ρύθμιση των ΜΕΟ	38
4.2.3. Μεταγραφική ρύθμιση των ΜΕΟ	38
4.2.4. Ενεργοποίηση των ΜΕΟ	39
4.2.5. Ιστικοί αναστολείς των ΜΕΟ	39
4.2.6. Δομή και λειτουργία των ΙΜΕΟ	39
4.2.7. ΜΕΟ και καρκίνος του μαστού	40
5. Βασική Μembrάνη και Άμορφες "Κοκκιώδεις" Ουσίες σε επίπεδο Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου	42
5.1. Άμορφες "κοκκιώδεις" ουσίες: μια νέα έννοια στην Παθολογική Ανατομική	44
5.2. Άμορφες "κοκκιώδεις" ουσίες ορισμός και κατανομή	44
5.3. Ρόλος της άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας	45
5.4. Περιαγγειακή άμορφη "κοκκιώδη" ουσία	45
5.5. Μεταβολές βασικής μεμβράνης σε φυσιολογικούς και παθολογικούς ιστούς	46
5.6. Άμορφη "κοκκιώδη" ουσία και μαστός	47



5.7. Άμορφη ουσία και μυοϊνοβλάστες στον καρκίνο του μαστού	49
6. Σκοπός	51
Ειδικό Μέρος	53
1. Υλικό και Μέθοδοι	55
1.1 Υλικό	55
1.1.1 Οπτικό μικροσκόπιο	56
1.1.2 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο	57
1.2 Περιγραφή μεθόδων	58
1.2.1 Οπτικό μικροσκόπιο	58
1.2.2 Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο	59
2. Αξιολόγηση	63
2.1 Ανοσοϊστοχημείας	63
2.1.1 Βασικών συστατικών της ΒΜ (ΑΜ, ΚΑ)	63
2.1.2 Στοιχείων της ΕΟ (ΙΝ, ΤΝ)	63
2.1.3 Πρωτεολυτικών ενζύμων (ΣΤΡ, ΚΔ)	64
2.1.4 Δεικτών πολλαπλασιασμού (Ki-67, PCNA)	64
2.1.5 Ορμονικών υποδοχέων (ΕΡ, ΡgR)	64
2.2 Υπερμικροσκόπησης	65
3. Στατιστική ανάλυση	69
4 Αποτελέσματα	71
4.1. Αποτελέσματα οπτικού μικροσκοπίου	71
4.1.1 Ανοσοϊστοχημική έκφραση Λαμίνινης (ΑΜ)	71
4.1.2. Ανοσοϊστοχημική έκφραση Κολλαγόνου τύπου IV (ΚΑ)	75
4.1.3. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της Τενασκίνης (ΤΝ)	79
4.1.4. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της Ινονεκτίνης (ΙΝ)	83
4.1.5. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της Στρωμελυσίνης (ΣΤΡ)	88
4.1.6. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της Καθεψίνης D (ΚΔ)	91
4.2 Αποτελέσματα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου	101
4.2.1. Περιαγγειακή ουσία	102
4.2.2 Η ουσία της ζώνης της βασικής μεμβράνης	112
4.2.3 Μυοϊνοβλάστες και η σχέση τους με την επιφάνεια του νεοπλάσματος, τα αγγεία και την άμορφη (κοκκιώδη) ουσία	117
4.2.4 Αριθμητική κατανομή των άμορφων "κοκκιωδών" ουσιών	127
4.2.5 Συσχέτιση των ευρημάτων του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου με αυτά της ανοσοϊστοχημείας	131
5. Συζήτηση	135



7. Περίληψη	149
8. Abstract	151
9. Βιβλιογραφία	153



Γενικό Μέρος



1. Εισαγωγή

Το καρκίνωμα του μαστού είναι η συχνότερη μορφή καρκίνου και η συχνότερη αιτία θανάτου στις γυναίκες. Είναι ο τρίτος σε συχνότητα καρκίνος και σε παγκόσμια κλίμακα το ποσοστό θανάτων από καρκίνο του μαστού είναι περίπου 60%. Είναι ο πιο συχνός κακοήθης όγκος των γυναικών και αποτελεί το 20-32% όλων των γυναικείων καρκίνων (Brainard Gc et al, 1999).

Αν και έχουν γίνει πολλές μελέτες, παρόλα αυτά η κύρια αιτία του καρκίνου του μαστού παραμένει άγνωστη. Πολλοί παράγοντες ή προδιαθεσικές καταστάσεις έχουν προταθεί, αλλά αποτελούν μόνο ένα μικρό ποσοστό της αιτιοπαθογένειας της νόσου. Από μια μεγάλη επιδημιολογική μελέτη που έγινε (Wiseman RA, 2000) όπου εξετάστηκαν όλα τα σχετικά επιδημιολογικά και βιολογικά ευρήματα, τα κύρια αποτελέσματα ήταν, ότι η κληρονομική προδιάθεση δεν αποτελεί την κύρια αιτία του καρκίνου του μαστού, και αυτό φαίνεται να εξηγείται από το γεγονός ότι τελικά η σποραδική μορφή της νόσου αποτελεί ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό. Παρατηρείται δηλαδή μια μικρή συχνότητα των ασθενών με οικογενειακό ιστορικό και γυναίκες όμοιες γενετικά εμφανίζουν διαφορετικό βαθμό κινδύνου μετά από αλλαγή του τόπου διαμονής.

Επίσης, περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η βιομηχανική μόλυνση δεν αποτελούν την κύρια αιτία εμφάνισης αυτού του καρκίνου, όπως φαίνεται από ένα μεγάλο αριθμό επιδημιολογικών στοιχείων.

Η πιθανότητα να εμπλέκεται στην αιτιοπαθογένεια κάποια λοίμωξη δεν είναι πειστική, γιατί δεν υπάρχουν άμεσα βιολογικά ευρήματα ούτε επιδημιολογικά στοιχεία που να την επιβεβαιώνουν.

Όσον αφορά τα επίπεδα των οιστρογόνων φαίνεται να συσχετίζονται στενά με τον καρκίνο του μαστού (Persson, 2000), αλλά παρατηρούνται αρκετές αντιφάσεις και παράδοξα ευρήματα.

Έχει προταθεί ότι τα οιστρογόνα, δεν αποτελούν τον άμεσο παράγοντα αλλά λειτουργούν επαγωγικά στον αιτιολογικό παράγοντα.

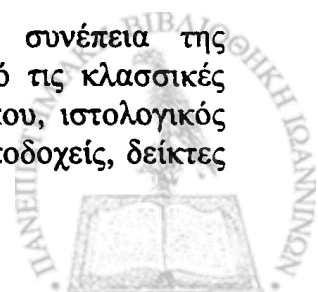
Διαιτητικοί παράγοντες και ειδικά η διαίτα η πλούσια σε λίπη, φαίνεται να συσχετίζονται με την αιτιολογία του καρκίνου του μαστού, όπως παρουσιάζεται από διάφορες μελέτες, με αντικρουόμενα όμως και αντιφατικά ευρήματα.

Η επικρατέστερη άποψη, σύμφωνα με τα διάφορα επιδημιολογικά στοιχεία φαίνεται να είναι η υπόθεση ότι η πλούσια σε λιπαρά διαίτα, δεν λειτουργεί σαν άμεσος αιτιολογικός παράγοντας, αλλά έμμεσα προκαλώντας μείωση ενός παράγοντα ο οποίος φυσιολογικά, δρα προστατευτικά έναντι στην ανάπτυξη του καρκίνου.

Ένας άλλος αιτιολογικός παράγοντας για τον καρκίνο του μαστού θεωρείται το αλκοόλ και φαίνεται να συσχετίζεται με τα αυξημένα επίπεδα των οιστρογόνων, γεγονός που επιτυγχάνεται μέσω των αυξημένων ποσοτήτων του αλκοόλ (Stoll BA, 1999). Ωστόσο, ο μηχανισμός και ο βαθμός κινδύνου, φαίνεται να είναι διαφορετικοί μεταξύ των προ και μετα-εμμηνοπαυσιακών γυναικών. Αυξημένος φαίνεται να είναι ο βαθμός κινδύνου στις μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.

Εργαστηριακά ευρήματα έδειξαν ότι η υπερινσουλιναμία που συσχετίζεται με το αλκοόλ, μπορεί να μιμείται την έκφραση του IGF1R στο μαζικό παρέγχυμα και ότι η πρωτεΐνη αυτή πιθανά παίζει σημαντικό ρόλο στην μιτογένεση και μετάλλαξη σε έναν οιστρογονικά εξάρτουμενο κακοήθη φαινότυπο.

Για τον καθορισμό της βιολογικής συμπεριφοράς και κατά συνέπεια της θεραπευτικής αντιμετώπισης του καρκίνου του μαστού, εκτός από τις κλασσικές κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους (ηλικία, μέγεθος του όγκου, ιστολογικός τύπος, βαθμός κακοηθείας, λεμφαδενικές μεταστάσεις, ορμονικοί υποδοχείς, δείκτες



πολλαπλασιασμού) ιδιαίτερη έμφαση τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί στην μελέτη διαφόρων προγνωστικών δεικτών με ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

Για μεγάλο χρονικό διάστημα, η έρευνα για τον καρκίνο είχε εστιαστεί μόνο στα νεοπλασματικά κύτταρα, ενώ το στρώμα είχε θεωρηθεί ως αντιδραστικό στοιχείο χωρίς καμιά σημαντική βιολογική και κλινική σπουδαιότητα. Ωστόσο, είναι πλέον γνωστό, ότι τα στρωματικά κύτταρα και τα προϊόντα τους παίζουν έναν σημαντικό ρόλο στον φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων. Η εξωκυττάρια ουσία παίζει ένα ενεργό και σύνθετο ρόλο στην ρύθμιση έκφρασης γονιδίων και στην συμπεριφορά των νεοπλασματικών κυττάρων τα οποία έρχονται σε επαφή με αυτήν, επηρεάζοντας έτσι την ανάπτυξη, την μετανάστευση τον πολλαπλασιασμό και τις μεταβολικές λειτουργίες αυτών. Επιπρόσθετα, το στρώμα εξασφαλίζει την αγγειακή τροφοδότηση του όγκου, την οποία χρειάζεται για την εξασφάλιση τροφής, για την ανταλλαγή οξυγόνου και για την αποβολή των άχρηστων ουσιών. Έτσι, ο όγκος αποτελεί ένα σύνθετο οικοσύστημα στο οποίο επισυμβαίνουν αλληλοεπιδράσεις μεταξύ των νεοπλασματικών κυττάρων και της εξωκυττάριας ουσίας.

Η ικανότητα διήθησης των ιστών και η δημιουργία δευτεροπαθών εστιών (μετάσταση) σε απομακρυσμένες θέσεις είναι ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό γνώρισμα των κακοήθων νεοπλασμάτων. Λόγω του ότι η κύρια αιτία θανάτου είναι αυτή η μεταστατική ιδιότητα των κακοήθων νεοπλασμάτων, επιβεβλημένη είναι η προσπάθεια κατανόησης της διαδικασίας διήθησης και μετάστασης ενός όγκου.

Η διήθηση του όγκου, αποτελεί μια σύνθετη δυναμική διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα: 1) διάσπαση της βασικής μεμβράνης κάτωθεν του όγκου 2) μετακίνηση των νεοπλασματικών κυττάρων στην εξωκυττάρια ουσία 3) διείσδυση αυτών στα αιμοφόρα ή λεμφικά αγγεία 4) εγκατάσταση και επιβίωση αυτών στην αιματική και λεμφική κυκλοφορία 5) έξοδος των νεοπλασματικών κυττάρων σε κάποιο νέο ιστό 6) επιβίωση και επέκταση αυτών στη νέα θέση, μια διαδικασία στην οποία εμπλέκεται η αγγειογένεση.



2. Διαδικασία της μετάστασης

Η τοπική ή απομακρυσμένη διασπορά των νεοπλασματικών κυττάρων είναι μια χαρακτηριστική ιδιότητα των κακοήθων όγκων. Αποτελεί κρίσιμο βήμα για την μετέπειτα πορεία της νόσου. Πολλαπλοί είναι οι κυτταρικοί και μοριακοί μηχανισμοί οι οποίοι εμπλέκονται στην διαδικασία της διασποράς και του πολλαπλασιασμού των κακοήθων κυττάρων σε δευτεροπαθείς θέσεις.

Η διάσπαση ή η πρωτεολυτική αποδόμηση των συστατικών της βασικής μεμβράνης και της εξωκυττάριας ουσίας, αποτελούν απαραίτητα βήματα στην διαδικασία της διήθησης. Η πρωτεολυτική αποδόμηση των ουσιών απαιτεί την δράση κάποιων ειδικών πρωτεολυτικών ενζύμων.

Επίσης εμπλέκονται διάφοροι αυξητικοί παράγοντες οι οποίοι δρουν είτε στην διαδικασία της μιτογένεσης είτε στην διαδικασία της απώλειας της διαφοροποίησης του όγκου.

Σημαντική είναι η συμμετοχή της αγγειογένεσης, η οποία παρατηρείται στον πρωτοπαθή όγκο και χρειάζεται για την περαιτέρω ανάπτυξη του όγκου αλλά και για την διαδικασία της διασποράς (Folkman, 1989, Hanahan and Folkman, 1996).

Τα διάφορα μόρια προσκόλλησης επίσης παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της μετάστασης (Kosmehl et al., 1996).

2.1. Τοπική επέκταση - Δευτεροπαθής εντόπιση

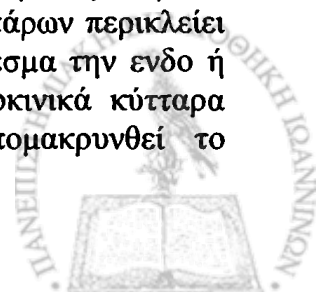
Η τοπική επέκταση του νεοπλάσματος (η κατά συνέχεια ιστού), επιτυγχάνεται μέσω της κατάργησης, των διαδοχικών φραγμών του συνδετικού ιστού. Αυτό οφείλεται στην αλληλοεπίδραση που επισυμβαίνει μεταξύ των νεοπλασματικών κυττάρων με τα πολλαπλά στοιχεία της εξωκυττάριας ουσίας.

Αν και η σπουδαιότητα της βασικής μεμβράνης η οποία λειτουργεί ως φραγμός είναι αναγνωρισμένη, παρόλα αυτά ακόμη εξετάζεται. Διαταραχή λοιπόν αυτής έχει σαν αποτέλεσμα την άμεση επαφή των καρκινικών κυττάρων με το στρώμα, γεγονός που τους επιτρέπει την διείσδυση στο τοίχωμα των αγγείων και λεμφαγγείων, με αποτέλεσμα αυτά να οδηγούνται στην αιματική κυκλοφορία (circulation). Αυτά τελικά παγιδεύονται από μικρού μεγέθους αγγεία, εισχωρούν στο τοίχωμα αυτών, έρχονται σε επαφή με την εξωκύτταρια ουσία και τελικά κάποια από αυτά σε πολύ μικρό ποσοστό (<0,01%) εξαγγειώνονται προσκολλούνται στην εξωκυττάρια ουσία και πολλαπλασιάζονται δίνοντας τελικά τη γένεση της δεύτερης εστίας (Jahroudi and Greenberger, 1995).

Σημαντικός λοιπόν ο ρόλος των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας κατά την διαδικασία της μετάστασης (Tegnanova et al., 1986, Verhoeven, Van Marck, 1993).

2.2. Μετάσταση και υπερμικροσκοπικά ευρήματα

Η ενδαγγείωση και η εξαγγείωση των νεοπλασματικών κυττάρων φαίνεται να είναι το ίδιο βιολογικό φαινόμενο, το οποίο μπορεί να συντελεστεί με διαφορετικούς τρόπους: α) μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων, μπορεί να επιτευχθεί, δια μέσου πόρων του τοιχώματος των αγγείων, οι οποίοι δημιουργούνται από την άμεση επίδραση των καρκινικών κυττάρων β) το κυτταρόπλασμα των ενδοθηλιακών κυττάρων περικλείει τα γειτονικά καρκινικά κύτταρα στο αγγειακό τοίχωμα, με αποτέλεσμα την ενδο ή εξωαγγειακή μετακίνηση των νεοπλασματικών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα παγιδεύονται στο όργανο-στόχο, αυτό επιτυγχάνεται όταν απομακρυνθεί το



εσωτερικό τοίχωμα των αγγείων και αυτά έρχονται σε στενή επαφή με τα ενδοθηλιακά κύτταρα και μάλλον με την βασική μεμβράνη αυτών.

2.3. Αγγειογένεση και μετάσταση

Θα πρέπει να τονίσουμε ότι η αγγειογένεση (δημιουργία νέων αγγείων από προϋπάρχοντα ενδοθηλιακά κύτταρα) είναι απαραίτητη κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και κατά την διαδικασία επανόρθωσης (Folkman, 1990). Σε αυτές τις φυσιολογικές διαδικασίες η αγγειογένεση ρυθμίζεται από αυξητικούς αγγειογενετικούς παράγοντες και από τους αναστολείς τους.

Πολυάριθμοι είναι και οι αγγειογενετικοί και αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες, οι οποίοι ρυθμίζουν την διαδικασία της νεοαγγειογένεσης, κατά την ανάπτυξη ενός όγκου. Αυτοί μπορεί να συνθέτονται ή να απελευθερώνονται από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα, από τα στρωματικά στοιχεία, όπως επίσης και από φλεγμονώδη κύτταρα όπως τα μακροφάγα (Lafrenie et al., 1992).

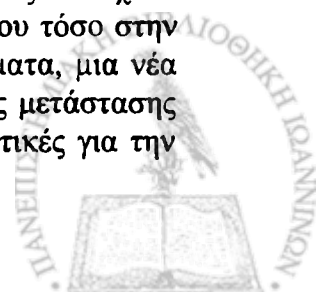
Η διαδικασία της αγγειογένεσης είναι αρκετά σύνθετη και πολυσταδιακή και σε γενικές γραμμές τα διάφορα βήματα αυτής είναι: κατακερματισμός της βασικής μεμβράνης, μετανάστευση και πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων, σωληνοειδείς σχηματισμοί των ενδοθηλιακών κυττάρων σε παθολογικές θέσεις, (τριχοειδή), σύνδεση αυτών με μεγαλύτερου μεγέθους αγγεία, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός λειτουργικού αγγείου, το οποίο περιβάλλεται από βασική μεμβράνη και περικύτταρα (Blood and Zetter, 1990).

Μια εκτροπή αυτής της διαδικασίας είναι η δημιουργία νέων αγγείων σε συμπαγείς όγκους. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα αφενός την βοήθεια στην περαιτέρω ανάπτυξη του όγκου (με την παροχή θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου) και αφετέρου την διευκόλυνση στη διαδικασία της μετάστασης.

Η αγγειογένεση ξεκινά, απαντώντας σε αυξητικούς παράγοντες που εκκρίνονται από τον όγκο, οι οποίοι διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την μετανάστευση αυτών προς τις θέσεις έκκρισης αυτών των παραγόντων. Η τελευταία εξαρτάται από κάποια μόρια προσκόλλησης που υπάρχουν μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και της εξωκυττάριας ουσίας (integrins) (Ott et al., 2000).

Ουσιώδες βήμα στην διαδικασία της διήθησης είναι η διάσπαση ή ο πρωτεολυτικός κατακερματισμός των συστατικών της βασικής μεμβράνης και της εξωκυττάριας ουσίας. Για τον πρωτεολυτικό κατακερματισμό αυτών των ουσιών, απαιτούνται ειδικά πρωτεολυτικά ένζυμα. Υπάρχουν 4 μεγάλες ομάδες πρωτεολυτικών ενζύμων, τα ένζυμα της κυστεΐνης, του ασπαρτικού οξέος, τα ένζυμα της σερίνης και τα μεταλλοεξαρτώμενα ένζυμα.

Σημαντικός επίσης είναι ο ρόλος των μορίων προσκόλλησης στη διαδικασία της μετάστασης, όπου παρατηρούνται διαφορές στην έκφραση των βασικών μορίων προσκόλλησης. Τυπική είναι η μειωμένη έκφραση αυτών (όπως οι καδερίνες) οι οποίες είναι υπεύθυνες για την σύνδεση κυττάρου-κύτταρου. Αυτές οι αλλαγές έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων, η οποία πιθανά εξαρτάται από τον κατακερματισμό (degradation) των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας, που όπως αναφέραμε αυτό οφείλεται στην δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων. Συγκεκριμένα, οι μεταλλοπρωτεϊνάσες και οι πρωτεάσες της σερίνης ανήκουν σε αυτή την ομάδα. Οι πρώτες, από διάφορες μελέτες που έχουν γίνει, φαίνεται να αποτελούν ρυθμιστικό κλειδί της ανάπτυξης του όγκου τόσο στην πρωτοπαθή όσο και στην δευτεροπαθή εστία. Με βάση αυτά τα ευρήματα, μια νέα άποψη λειτουργικού ρόλου των μεταλλοπρωτεϊνών στην διαδικασία της μετάστασης έχει βρεθεί, η οποία προτείνει ότι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες είναι σημαντικές για την



δημιουργία και τη συντήρηση ενός περιβάλλοντος, το οποίο υποστηρίζει την έναρξη και την συντήρηση της ανάπτυξης, του πρωτοπαθούς και μεταστατικού όγκου (Thorgeirsson et al., 1994, Chambers and Matrisian, 1997). Η ρύθμιση της δραστηριότητας των πρωτεολυτικών ενζύμων, οφείλεται στην αλληλοεπίδραση των νεοπλασματικών κυττάρων με τα στοιχεία της εξωκυττάριας ουσίας. Τέλος, η αλληλοεπίδραση μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και του γύρω συνδετικού ιστού, που επιτυγχάνεται με τη μεσολάβηση των κυτοκινών και των αυξητικών παραγόντων, είναι πολύ σημαντική, ειδικά για την διαδικασία της αγγειογένεσης. Μόνο εκείνα τα κύτταρα τα οποία πληρούν τις παραπάνω προϋποθέσεις μπορούν να απομακρυνθούν από τον πρωτοπαθή όγκο, να μεταναστεύσουν στα αιμο-λεμφαγγεία, να εισχωρήσουν στην κυκλοφορία και τελικά να εγκατασταθούν σε απομακρυσμένο όργανο (μετάσταση) (Kurschat and Mauch, 2000).

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι όταν αυξάνεται ο αριθμός των νεοσχηματιζόμενων αγγείων, ο οποίος προσδιορίζεται ποσοτικά με τον όρο πυκνότητα νεοσχηματιζόμενων αγγείων, αποτελεί ένα δυνατό προγνωστικό δείκτη για πολλούς όγκους (Weidner et al., 1991). Παρόλα αυτά, υπάρχουν πολλά αντικρουόμενα αποτελέσματα, γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανά μεγαλύτερη αξία έχει η ποιοτική μελέτη των αγγείων σε σχέση με την ποσοτική.



3. Εξωκυττάρια Ουσία (ΕΟ)

Τα καρκινικά κύτταρα, δεν είναι απλώς μεμονωμένες νησίδες επιθηλιακών κυττάρων σε ένα συγκεκριμένο όργανο. Αυτά περιβάλλονται από μια τροποποιημένη ΕΟ και από στρωματικά κύτταρα του ξενιστή ιστού. Και τα δύο αυτά στοιχεία, επηρεάζουν την εξέλιξη του όγκου. Το στρωματικό στοιχείο του νεοπλάσματος, διαφέρει από εκείνο του φυσιολογικού μαζικού παρεγχύματος και φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της ανάπτυξης και μετάστασης του όγκου (Noel et al., 1999). Είναι πλέον γεγονός, ότι η ΕΟ και τα προϊόντα αυτής, παίζουν έναν σημαντικό ρόλο στον φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων.

Η (ΕΟ) είναι ένα σύνθετο δίκτυο αποτελούμενο από ινώδεις πρωτεΐνες, πρωτεογλυκάνες και άλλα μακρομόρια τα οποία βρίσκονται σε ενδοεπικοινωνία μεταξύ τους μέσω, μιας δικτυωτής δομής η οποία παρέχει μηχανική υποστήριξη για το κύτταρο και για τους ιστούς γενικότερα. Όλα αυτά τα μόρια, περιβάλλουν τα κύτταρα, σχηματίζοντας έτσι ένα σημαντικό κομμάτι του κυτταρικού μικροπεριβάλλοντος (Pratt, B. M., et al., 1985, Yurchenco, P. D., and O'Rear, J. J., 1994).

Τα μέχρι σήμερα, γνωστά συστατικά της ΕΟ θεωρούνται τα παρακάτω:

- Κολλαγόνο (τύπου I, III, V, VI, VIII, XI, και XII, διάμεσου συνδετικού ιστού, τύπου IV και VII των βασικών και υπο-βασικών μεμβρανών, αντιστοίχως και τύπου II, IX, και X του χόνδρου), (Kornblihtt and Gutman, 1988 and Gordon et al., 1989)
- Συγκολλητικές γλυκοπρωτεΐνες, όπως ινονεκτίνη (Mosher, 1984, Humphries et al., 1989), λαμινίνη (Kleinman et al., 1985, Campdell and Terranova, 1988, Beck et al., 1990), εντακτίνη (Paulsson et al., 1987), παράγοντας Von Villebrand (Hoyer, 1981), θρομβοσπονδίνη (Lawler, 1986), βιτρονεκτίνη (Reilly and Nash, 1988), τενασκίνη (Chiquet-Ehrismann et al., 1986) και οστεονεκτίνη (Timpl, 1989).
- Πρωτεογλυκάνες (heparan sulphate proteoglycan (Hassel et al., 1980), ντεκορίνη (Rouslanti, 1988), πρωτεογλυκάνη θειϊκής χονδροϊτίνης και υαλουρονικό οξύ (Iozzo, 1984, Cidado, 1989).
- Ελαστίνη (Prosser and Mecham, 1988).

Μορφολογικά, η ΕΟ διακρίνεται στον διάμεσο συνδετικό ιστό και στην βασική μεμβράνη (BM). Η τελευταία, χαρακτηριστικά περιβάλλει τους εξής τύπους κυττάρων: μυϊκά και νευρικά κύτταρα, λιπώδη και φθαρτοειδή κύτταρα, και διαχωρίζει τα φυσιολογικά επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα από το υποκείμενο, διάμεσο υπόστρωμα (Hay, 1981, Gorstein, 1988, Cidado, 1989, Timpl, 1989).

Η εξειδικευμένη αυτή δομή της ΕΟ, αποτελείται, κυρίως από κολλαγόνο τύπου IV, λαμινίνη, εντακτίνη/νιδογόνο, και από πρωτεϊνογλυκάνες (Madri, et al., 1980, Schittny, and Yurchenko, 1989, Mosher, et al., 1992).

Αυτή λοιπόν η πολύπλοκη δομή, φαίνεται να παίζει έναν κεντρικό ρόλο στην ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στην συγκόλληση, στην μετανάστευση, στην γονιδιακή έκφραση και στην διαφοροποίηση του κυττάρου (Roskelley et al., 1995).

Επιπλέον, μελέτες έδειξαν ότι εξειδικευμένα λειτουργικά τμήματα των μορίων που συμπεριλαμβάνονται στην ΕΟ όπως η Ινονεκτίνη (IN), Λαμινίνη (ΛΜ), Τενασκίνη (TN) και η θρομβοσπονδίνη πιθανά παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στην αγγειογένεση και



στην αύξηση του όγκου (Grant et al., 1989, Tolsma et al., 1993, Carnemolla et al., 1996).

Η πρόοδος που επιτεύχθηκε στις βιολογικές τεχνικές, με την χρήση των μονοκλωνικών και πολυκλωνικών αντισωμάτων, βοήθησε σημαντικά στο να έχουμε την δυνατότητα απομόνωσης και μελέτης με μεγάλη λεπτομέρεια, σχεδόν των περισσότερων συστατικών την ΕΟ. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα, να έχουμε επιπρόσθετα στοιχεία ότι οι εναποθέσεις αυτών των συστατικών δεν παίζουν ρόλο μόνο στην δομή του, στην μηχανική υποστήριξη των κυττάρων, αλλά συμμετέχουν και σε άλλες πιο σύνθετες διαδικασίες, όπως στο να προάγουν την διαδικασία της κυτταρικής συγκόλλησης και επέκτασης, την κυτταρική μετανάστευση, την εμβρυϊκή ανάπτυξη, την αιμόσταση και την διαδικασία της επούλωσης (Yamada et al., 1985, Terranova et al., 1986a, Campbell and Terranova, 1988, Gorstein, 1988, Kornblihtt and Gutman, 1988, Timpl, 1989).

Πρώιμες μελέτες έχουν δείξει ότι μεταξύ των επιθηλιακών και μεσεγγυματικών κυττάρων υπάρχει ένα "φίλτρο" το οποίο αφενός τα διαχωρίζει, αφετέρου επιτρέπει την αλληλεπίδραση των κυττάρων, μέσω παραγόντων που εκκρίνονται από αυτά. (Grobstein, 1954). Πρόσφατα ποικίλοι πολυπεπτιδικοί αυξητικοί παράγοντες και αναστολείς, όπως επίσης και πρωτεολυτικοί έχουν ταυτοποιηθεί, οι οποίοι ρυθμίζουν την φυσιολογική κυτταρική ρύθμιση (Laiho and Keski-Oja, 1989).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, άρχισε να εμφανίζει ο ρόλος της ΒΜ, μετά την κατανόηση της ενεργής και άμεσης συμμετοχής αυτής στην διαδικασία της νεοπλασματικής διήθησης και μετάστασης (Alitalo and Vaheri, 1982b, McCarthy et al., 1985, Liotta, 1986, Kornblihtt and Gutman, 1988, Martinez-Hernandez, 1988, Pauli and Knudson, 1988). Αν και η ΕΟ παρέχει δομική υποστήριξη, πρόσφατες μελέτες, μας προσφέρουν επιπλέον στοιχεία ότι μια αφθονία βιοχημικών πληροφοριών συμπεριλαμβάνονται στην μοριακή της δομή (Ingber and Folkman, 1989, Timpl, 1989).

Τα νεοπλασματικά κύτταρα, επικοινωνούν με την ΕΟ μέσω 4 διαφορετικών τρόπων:

1) σύνδεση των συστατικών της ΕΟ με ειδικούς κυτταροπλασματικούς μεμβρανικούς υποδοχείς 2) τοπική αποικοδόμηση του στρώματος μέσω ενζύμων, τα οποία προέρχονται από τα νεοπλασματικά κύτταρα ή από το στρώμα του ξενιστή, 3) επαγωγική δράση δεσμοπλαστικών αυξητικών παραγόντων στα νεοπλασματικά κύτταρα, ακολουθούμενη από 4) υπερβολική de novo σύνθεση ΕΟ από τα νεοπλασματικά κύτταρα και/ή από τα συστατικά του στρώματος (Liotta, 1986).

Τα καρκινικά κύτταρα αλληλεπιδρούν με την ΕΟ κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της διήθησης, στην οποία συμπεριλαμβάνεται η συγκόλληση, η πρωτεόλυση των συστατικών της ΕΟ και η μετανάστευση λόγω ανεπάρκειας της ΕΟ.

Καμία από αυτές τις λειτουργίες δεν είναι χαρακτηριστική για την συμπεριφορά του καρκινικού κυττάρου.

Η συγκόλληση, η πρωτεόλυση και η μετανάστευση είναι βήματα τα οποία συναντούνται επίσης στην τροφοβλαστική εμφύτευση, κατά την ανάπτυξη του μαζικού παρεγχύματος, κατά την εμβρυϊκή μορφογένεση και κατά την ιστική αναδόμηση.

Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να προσκολληθούν με συστατικά της ΕΟ όπως ΙΝ, ΚΛ και ΛΜ, μέσω κυτταρικών επιφανειακών υποδοχέων (integrin or non-integrin). Αυτή η συγκόλλησή μπορεί να επαυξηθεί ή να επιτευχθεί μέσω των πρωτεογλυκάνων. Αρκετές μελέτες, έχουν δείξει ότι αυτή η ιδιότητα των καρκινικών κυττάρων να αλληλεπιδρούν με την ΕΟ, αποτελεί ένα πολύ κρίσιμο βήμα στην διαδικασία της μετάστασης.



Ο καρκίνος του μαστού, αρκετά συχνά χαρακτηρίζεται από στρωματική αντίδραση, η οποία συνίσταται σε τροποποίηση των συστατικών τόσο των κυτταρικών στοιχείων (μυοϊνοβλαστών, ενδοθηλιακών και φλεγμονωδών κυττάρων), όσο και της εξωκυττάριας ουσίας. Αυτό το αντιδραστικό στρώμα (συχνά αναφέρεται ως δεσμοπλαστική αντίδραση), στην πραγματικότητα αποτελεί μείζων κομμάτι του νεοπλάσματος (Wernert, 1997).

3.1 Συστατικά της Βασικής Μεμβράνης (BM)

Όπως ήδη αναφέραμε, τα κύρια συστατικά της BM είναι η λαμινίνη και το κολλαγόνο τύπου IV και πιθανά εμπλέκονται στην ικανότητα σύνδεσης της BM με την εξωκυττάρια ουσία, κυρίως όσον αφορά την σύνδεση των επιθηλιακών κυττάρων.

Χαρακτηριστικό είναι ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα, συχνά εμφανίζουν μια διαταραχή κατά τη σύνδεση τους με τα συστατικά της BM.

3.1.1. Λαμινίνη (ΛΜ)

Γενικές πληροφορίες

Η ΛΜ αρχικά απομονώθηκε από τον όγκο του Engelbrecht-Holm-Swarm, ένα τερατοκαρκίνωμα που αναπτύσσεται σε ποντίκια, το οποίο ήταν γνωστό ότι παράγαγε μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών συσχετιζόμενων με τη ΒΜ (Timpr et al., 1979). Αργότερα βρέθηκε ότι η ΛΜ συντίθεται από κάποιον όγκο (rat yolk sac tumor) (Wewer and Albrechtsen, 1989) και τελικώς η ΛΜ απομονώθηκε στην ανθρώπινη πλακουντιακή ΒΜ (Ohno et al., 1983, Wewer et al., 1983).

Η γλυκοπρωτεΐνη αυτή παράγεται από ποικίλα ανθρώπινα επιθηλιακά και μεσεγχυματογενή κύτταρα *in vitro* και σχηματίζει κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα μια εξωκυττάρια ουσία από λεπτά ινίδια (Foidant et al., 1980a, Alitalo et al., 1981, Gospodarowicz et al., 1981, Haymann et al., 1981., Kuhl et al., 1982, Faber et al 1986, Albrechtsen et al., 1988, Scarpa et al., 1988, McGuire and Seeds, 1989).

Στους φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς, η ΛΜ είναι ένα σταθερό στοιχείο της ΒΜ που περιβάλλει τους μυς, τα νεύρα, τον λιπώδη ιστό και τα κύτταρα του φθαρτού. Επιπλέον, διαχωρίζει τα επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα από τον γειτονικό συνδετικό ιστό (Albrechtsen et al., 1986, Liotta, 1986).

Η γλυκοπρωτεΐνη αυτή έχει ανιχνευθεί ανοσοϊστοχημικά στο κυτταρόπλασμα των επιθηλιακών κυττάρων του μαστού (Albrechtsen et al., 1981, Siegal et al., 1981 Joffe et al., 1988), στα στρωματικά κύτταρα του ενδομητρίου (Faber et al., 1986) και με τη μέθοδο του *in situ* υβριδισμού στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων πόρων και στα μεσεγχυματικά κύτταρα του ήπατος (Milani et al., 1989).

Βιολογική λειτουργία

Η ΛΜ είναι μια γλυκοπρωτεΐνη υψηλού μοριακού βάρους (850.000-1.000.000), η δομή της οποίας δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί ακόμη.

Η ΛΜ φαίνεται να είναι μέλος μιας οικογένειας πρωτεϊνών, η οποία διαφέρει σημαντικά όχι μόνο στη δομή της αλλά πιθανά και στη λειτουργία της, όχι μόνο μεταξύ των διαφορετικών ειδών αλλά και μεταξύ των διαφορετικών τύπων κυττάρου στον ίδιο οργανισμό (Beck et al., 1990).



Έχουν περιγραφεί τουλάχιστον 2 διαφορετικές κυτταρικές θέσεις σύνδεσης στο μόριο της ΛΜ (Kleinman et al., 1985, Goodman et al., 1987) και υποδοχείς της ΛΜ, περικλείοντας μέλη από την οικογένεια των ιντεγκρινών, έχουν αναγνωρισθεί σε μια ποικιλία κυττάρων, υποδηλώνοντας έναν πιθανό ρόλο της ΛΜ στην σύνδεση κυττάρου-βασικής μεμβράνης (Wewer et al., 1987, McDonald, 1989, Timpl, 1989).

Το μόριο της ΛΜ περικλείει θέσεις σύνδεσης και για άλλα συστατικά της ΒΜ, όπως κολλαγόνο τύπου IV, ηπαρίνης/πρωτεογλυκάνες θειϊκής ηπαρίνης (Laurie et al., 1986, Frenette et al., 1989).

Από διάφορες πειραματικές μελέτες που έγιναν φαίνεται ότι η ΛΜ πιθανά να επηρεάζει την αύξηση και την ανάπτυξη (Dziadek and Timpl, 1987).

Επίσης λόγω της πολυσύνθετης δομής της πιθανά να επηρεάζει ποικίλες κυτταρικές δραστηριότητες, όπως η συγκόλληση και η εξάπλωση, η διαφοροποίηση, ο προσανατολισμός, ο πολλαπλασιασμός, η μετακίνηση, η επέκταση σε γειτονικούς ιστούς και η χημειοτακτική απάντηση (Kleinman et al., 1985, Beck et al., 1990).

Επίσης πάλι από πειραματικές μελέτες, φαίνεται ότι διάφοροι ενδοκυτταριοεκκριτικοί μηχανισμοί επηρεάζονται από την ΛΜ.

Ο ρόλος της ΛΜ στην κακοήθεια

Έχει βρεθεί ότι η διαμόρφωση της ΒΜ των επιθηλιακών κυττάρων στους φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς, όπως παρατηρείται με την ανοσοϊστοχημική έκφραση της ΛΜ, μεταβάλλεται στις περιπτώσεις νεοπλασματικής διήθησης και μετάστασης (Albrechtsen et al., 1986). Επιπλέον το πρότυπο έκφρασης της ποικίλει στους διαφορετικούς τύπους καρκίνου, είτε με ελάττωση έως πλήρη απώλεια της έκφρασης της ΛΜ της ΒΜ των περισσότερων καρκινωμάτων με διαφορετική κατανομή, είτε με αύξηση της έκφρασης της σε κάποια μεσεγγυματογενή νεοπλάσματα και στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (Albrechtsen et al., 1986 και 1988, D'Ardenne et al., 1984a).

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της ΛΜ έχει μελετηθεί σε αρκετά καρκινώματα, όπου φαίνεται μια βαθμιαία ελάττωση της έκφρασης της σε σχέση με την αυξανόμενη διηθητική ανάπτυξη του όγκου, όπως στον καρκίνο του ορθού (Forster et al., 1986) και στα πλακώδη καρκινώματα της στοματικής κοιλότητας (Meyer et al., 1985, D'Ardenne et al., 1985). Φτωχή ή πλήρη απουσία της έκφρασης της παρατηρήθηκε σε χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης καρκινώματα του μαστού (Albrechtsen et al., 1981, Siegal et al., 1981), του πνεύμονα (Scarpa et al., 1988), του παγκρέατος, των χοληφόρων (Haglund et al., 1984 και 1989), του νεφρού (Burtin et al., 1982) και της ενδομητρικής κοιλότητας (Faber et al., 1986).

Διάφορες μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες, έχουν δείξει ότι καρκινικά μετασχηματισμένα κύτταρα μπορεί να παράγουν ΛΜ τόσο από επιθηλιακά όσο και από μεσεγγυματογενή κύτταρα, αν και σε μειωμένες ποσότητες σε σχέση με αυτές που παράγονται από τα φυσιολογικά ανάλογα κύτταρα (Alitalo et al., 1981, Haymann et al., 1981).

Αρκετές πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η ΛΜ η οποία προέρχεται από καρκινικά κύτταρα παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην μετάσταση (Terranova et al., 1982, Varani et al., 1983, Barsky et al., 1984b). Αυτό φαίνεται να συνδέεται με την αύξηση του αριθμού, ενός τουλάχιστον τύπου υποδοχέα της ΛΜ, της επιφανείας του καρκινικού κυττάρου (Terranova et al., 1983, Barsky et al., 1984c, Hand et al., 1985) και σύνδεση της ενδογενούς ΛΜ με αυτόν τον υποδοχέα (Hand et al., 1985, Wewer et al., 1986 και 1987).



Είναι πιθανό ότι η ενδογενής ΛΜ μπορεί να επηρεάζει τον κατακερματισμό της εξωκυττάριας ΛΜ. Η ΛΜ έχει αποδειχθεί (σε επίπεδο υποδοχέων) ότι ευοδώνει την απελευθέρωση από τα καρκινικά κύτταρα του ενζύμου τύπου κολλαγενάση το οποίο προκαλεί κατακερματισμό της ΒΜ. Το γεγονός αυτό μπορεί πιθανά να εξηγήσει την ανάστροφη σχέση ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της ΛΜ *in vivo*, μεταξύ της κυτταροπλασματικής και της εξωκυττάριας ουσίας (Turpeenniemi-Hujanen et al., 1986).

ΛΜ και μαστός

Σε πειραματικές έρευνες που έγιναν η ΛΜ βρέθηκε σταθερά στις βασικές μεμβράνες των επιθηλιακών κυττάρων, κατά την διάρκεια των ποικίλων σταδίων ανάπτυξης του μαζικού αδένου (Sonnenberg et al., 1986). Τα επιθηλιακά κύτταρα θεωρούνται υπεύθυνα για την παραγωγή της ΛΜ που βρίσκεται στην βασική μεμβράνη, καθώς *in vivo* αυτά εκφράζουν ανοσοθετικότητα και mRNA για την πρωτεΐνη, ενώ *in vitro* συνθέτουν και εναποθέτουν την γλυκοπρωτεΐνη αυτή, σε μια περικυττάρια ουσία που παράγεται από τα κύτταρα αυτά (Foidart et al., 1980a).

Ανοσοϊστοχημικές έρευνες στα καρκινώματα του μαστού, αναφέρουν αλλαγές στην κατανομή της ΛΜ της ΒΜ, με μια γενικότερη ελάττωση έως πλήρη απουσία της γλυκοπρωτεΐνης αυτής στον χώρο μεταξύ καρκινικών κυττάρων και στρώματος (Albrechtsen et al., 1981, Siegal et al., 1981). Ταυτόχρονα έχει αναφερθεί μια αύξηση των αδέσμευτων υποδοχέων για την ΛΜ (67 kDa) στα καρκινικά κύτταρα του μαστού (Terranova et al., 1983, Barsky et al., 1984c, Wewer et al., 1986 και 1987).

Σε μία μελέτη, βρέθηκε ότι τα διηθητικά καρκινώματα του μαστού μέτριας και χαμηλής διαφοροποίησης, έχουν εντονότερη ανοσοϊστοχημική έκφραση για τον 67 kDa υποδοχέα της ΛΜ απ'ότι ένα υψηλής διαφοροποίησης διηθητικό θηλώδες καρκίνωμα του μαστού (Wewer et al., 1987). Επίσης, η έντονη αυτή ενδοκυττάρια ανοσοϊστοχημική έκφραση της ΛΜ παρατηρήθηκε όχι μόνο στον πρωτοπαθή εστία, αλλά και στις λεμφαδενικές της μεταστάσεις (Albrechtsen et al., 1981, Siegal et al., 1981).

Αυτά τα ευρήματα συμφωνούν με την τρέχουσα άποψη, ότι κατάληψη των υποδοχέων ΛΜ από ενδογενώς παραγόμενη ΛΜ, διευκολύνει τα καρκινικά κύτταρα του μαστού να προσκολληθούν στις ΒΜ ιδίων κυττάρων, να καταστρέψουν αυτές και στην συνέχεια να εξαπλωθούν μεταστατικά (Wewer et al., 1987). Η προοδευτική απώλεια ΛΜ της ΒΜ με τον αυξανόμενο βαθμό αναπλασίας στα διηθητικά καρκινώματα του μαστού, μπορεί να αντανakλά ανεπάρκεια στην σύνθεση ή και στην εξωκυττάρια εναπόθεση αυτής της γλυκοπρωτεΐνης. Μπορεί ίσως να οφείλεται σε αυξημένη διάσπαση της ΛΜ από την κολλαγενάση τύπου IV (O'Grady et al., 1981, Kao et al., 1982). Η ενδογενώς παραγόμενη ΛΜ, μπορεί να συμβάλλει στην ανωτέρω διαδικασία από όσο μπορεί κανείς να συμπεράνει, από το γεγονός ότι η ΛΜ έχει την ικανότητα να αυξάνει την παραγωγή κολλαγενάσης τύπου IV, από τα καρκινικά κύτταρα (Turpeenniemi-Hujanen et al., 1986).

Υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις σχετικά με την ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια ανοσοϊστοχημική έκφραση της ΛΜ. Σύμφωνα με τους (Siegal et al., 1981, Albrechtsen et al., 1981, και Nielsen et al., 1990) σε καρκινώματα του μαστού, αναγνωρίστηκε ενδοκυττάρια έκφραση της ΛΜ, σε αντίθεση με άλλους (Gusterson et al., 1982, Ekblom et al., 1984), όπου η έκφραση της ΛΜ ήταν μόνο εξωκυττάρια. Πιθανά η διαφωνία αυτή να οφείλεται στην χρησιμοποίηση διαφορετικών αντισωμάτων.



Σε κάποιες μελέτες αναφέρεται ότι εξωκυττάρια έκφραση της ΛΜ ήταν περισσότερο συχνή σε καλά διαφοροποιημένα καρκινώματα.

Πάντως ο ρόλος της στην εξελεκτική πορεία του καρκίνου έχει ήδη τεκμηριωθεί. (Castronovo, 1993)

3.1.2. Κολλαγόνο τύπου IV (ΚΛ)

Γενικές πληροφορίες

Το κολλαγόνο, αποτελεί μια οικογένεια ινωδών πρωτεϊνών που εμφανίζεται σε όλους τους πολυκυττάριους οργανισμούς. Είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη των θηλαστικών και αποτελεί το ένα τέταρτο της συνολικής πρωτεΐνης του οργανισμού. Το κολλαγόνο είναι το βασικό ινώδες συστατικό του δέρματος, των οστών, των τενόντων, του χόνδρου, των αγγείων και των δοντιών. Υπάρχει σε όλα σχεδόν τα όργανα και χρησιμεύει για να συγκρατεί μαζί τα κύτταρα σε ευδιάκριτες λειτουργικές κυτταρικές ομάδες. Πολλές τροποποιήσεις της βασικής δομής του κολλαγόνου έχουν χαρακτηριστεί. Εκτός από τον δομικό ρόλο που έχει στους ώριμους ιστούς, το κολλαγόνο έχει και έναν "καθοδηγητικό" ρόλο για τους αναπτυσσόμενους ιστούς.

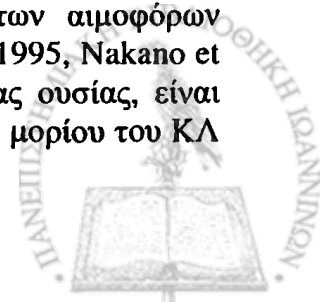
Η βασική του δομική μονάδα είναι το τροποκολλαγόνο, το οποίο έχει μοριακή μάζα 285 kd περίπου και αποτελείται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες ίδιου μεγέθους. Η σύνθεση των αλυσίδων εξαρτάται από τον τύπο του κολλαγόνου. Πρόδρομη μορφή του κολλαγόνου αποτελεί το προκολλαγόνο (Stryer, 1994).

Ο σχηματισμός των ινών κολλαγόνου γίνεται στον εξωκυττάριο χώρο κοντά στην επιφάνεια του κυττάρου και όχι μέσα στους ινοβλάστες επειδή οι πεπτιδάσες του προκολλαγόνου βρίσκονται εντός του κυττάρου.

Τα γονίδια του κολλαγόνου αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια. Έχουν προσδιοριστεί έντεκα τύποι κολλαγόνου που κωδικοποιούνται από δεκαοκτώ τουλάχιστον γονίδια. Αυτή η μεγάλη ποικιλία οφείλεται στο ότι το κολλαγόνο έχει ποικιλία δομικών ρόλων. Δημιουργεί σχηματισμούς ισχυρούς στους τένοντες και στους συνδέσμους, πυκνές επιφάνειες στο δέρμα, στις βασικές μεμβράνες στα σπειράματα των νεφρών, σκελετικά πλαίσια που ενισχύονται με ασβέστιο στα οστά και στα δόντια και πολλές δομές υποστήριξης σε ολόκληρο το σώμα. Οι διάφοροι τύποι κολλαγόνου διαφέρουν ως προς την επί μέρους σύστασή τους σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες και τις αλληλεπιδράσεις τους με άλλα μόρια. Για παράδειγμα οι τύποι II, III και V δημιουργούν ινίδια όμοια με αυτά του τύπου I. Αντίθετα το κολλαγόνο τύπου IV δημιουργεί ανοικτούς μη ινώδεις σχηματισμούς. Το κολλαγόνο τύπου IV είναι το κύριο συστατικό των βασικών μεμβρανών που περιβάλλουν τα περισσότερα επιθηλιακά κύτταρα (Stryer, 1994).

Βιολογική λειτουργία

Αξιοσημείωτο είναι ότι, έξι γενετικά διαφορετικές αλυσίδες του ΚΛ έχουν προσδιοριστεί, οι οποίες έχουν μοναδικό πρότυπο κατανομής στους ιστούς. (Hudson et al., 1993, Miner and Sanes, 1994, Peissel et al., 1995, Nakano et al., 1999,). Η περισσότερο διαδεδομένη μορφή κατανομής του ΚΛ, απαρτίζεται από ένα δίκτυο, το οποίο αποτελείται από δύο 1(IV) αλυσίδες και μια 2(IV) αλυσίδα και ανευρίσκεται στο βασικό πέταλο πολλών ιστών, συμπεριλαμβανομένων και των αιμοφόρων αγγείων. (Hudson et al., 1993, Miner and Sanes, 1994, Peissel et al., 1995, Nakano et al., 1999,). Το ΚΛ, όπως πολλά άλλα μακρομόρια της εξωκυττάριας ουσίας, είναι διοργανωμένο σε μια λειτουργική δομή (Kühn, 1994). Ένα μέρος του μορίου του ΚΛ



συμμετέχει στην δομή του εξωκυττάριου στρώματος (Tsilibary and Charonis, 1986, Siebold et al., 1987, Ries et al., 1995), ενώ ένα άλλο μέρος προάγει την αλληλεπίδραση με τις ιντεγκρίνες (Chelberg et al., 1989, Vandenberg et al., 1991). Προηγούμενες μελέτες έχουν χρησιμοποιήσει μια μεγάλη ποικιλία ειδών και πειραματικά συστήματα έχουν καθιερώσει την σπουδαιότητα της παρουσίας του τύπου IV κολλαγόνου στην βασική μεμβράνη κυρίως στην διαδικασία της μορφογένεσης. Το γεγονός ότι η διαμόρφωση της βασικής μεμβράνης είναι σημαντική για την μορφογένεση και την κυτταρική διαφοροποίηση σε κάποιους αρχέγονους και σε κάποιους ασπόνδυλους οργανισμούς όπως η *Hydra vulgaris*, τονίζουν την θεμελιώδη σπουδαιότητα των αλληλοεπιδράσεων κυττάρου-εξωκυττάριας ουσίας στα βιολογικά συστήματα (Zhang et al., 1994). Πειράματα που έγιναν στην *H. vulgaris* έχουν δείξει την μεγάλη σπουδαιότητα, του ιδιαίτερου αυτού συστατικού της εξωκυττάριας ουσίας στην ανάπτυξη, εξέλιξη και κυτταρική λειτουργία. (Zhang et al., 1994). Τα πειράματα αυτά συνεχίστηκαν και στα σπονδυλωτά είδη, όπου έχει βρεθεί ότι επίμυες με ανεπάρκεια του ΚΛ παρουσιάζουν ακουστικά προβλήματα (Cosgrove et al., 1998) και μεταβολές της δομής και λειτουργίας της βασικής μεμβράνης των σπειραμάτων (Miner and Sanes, 1996). Επίσης, απώλεια των γονιδίων 5 και 6 του κολλαγόνου τύπου IV οδηγεί σε ανωμαλίες της δομής της βασικής μεμβράνης στο σύνδρομο Alport και σε κληρονομική νόσο των λείων μυϊκών ινών της καλούμενης διάχυτης λειομυομάτωσης (Zhou et al., 1993).

Ο ρόλος του ΚΛ στην κακοήθεια

Από μελέτες που έχουν γίνει, τονίζεται η σπουδαιότητα της βασικής μεμβράνης και κυρίως του ΚΛ στην διαδικασία της μορφογένεσης. Όπως έχουμε ήδη αναφέρει αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά της βασικής μεμβράνης. Από μελέτες που έχουν γίνει φαίνεται ότι η ένταση και το πρότυπο ανάπτυξης της έκφρασης του ΚΛ εξαρτάται σημαντικά από τον βαθμό διαφοροποίησης του νεοπλάσματος. Έτσι, φτωχά διαφοροποιημένοι όγκοι παρουσιάζουν μικρές έως απουσία εναποθέσεων του ΚΛ κατά την επιφάνεια της βασικής μεμβράνης σε αντίθεση με τους καλά διαφοροποιημένους όγκους όπου παρουσιάζουν μέτρια ή εκτεταμένη έκφραση αυτού (Burtin et al., 1982, Forster et al., 1984 και 1986, Stenback et al., 1985).

ΚΛ και μαστός

Το ΚΛ, δεν έδειξε να συσχετίζεται με καμιά κλινικοπαθολογοανατομική παράμετρο, όπως ο ιστολογικός τύπος, ο βαθμός διαφοροποίησης, η ηλικία των ασθενών, το μέγεθος του όγκου, η παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και οι ορμονικοί υποδοχείς (Arihiro et al., 1993).

Μελέτες έχουν γίνει για το ΚΛ στον καρκίνο του μαστού, όπου έχουν περιγράψει τις αλληλεπιδράσεις αγγείων και στρώματος, την βασική μεμβράνη και τις πρωτεΐνες αυτής ΛΜ και ΚΛ και εξηγούν τον τρόπο με τον οποίο προάγουν την προσκόλληση και μετανάστευση.



3.2 Συστατικά Εξωκυττάριας Ουσίας

3.2.1 Τενασκίνη (TN)

Γενικές πληροφορίες

Η TN είναι μια υψηλού MW γλυκοπρωτεΐνη, το μόριο της οποίας αποτελείται από 3 ισότοπους (Chiquet-Ehrismann et al., 1986). Εμφανίζει μια δομή ομόλογη της ινονεκτίνης, του επιδερμидικού αυξητικού παράγοντα και του ινοδογόνου (Siri et al., 1991). Αρχικές μελέτες έχουν δείξει ότι εκφράζεται κατά τη διαδικασία της εμβρυογένεσης και ογκογένεσης (Aufderheide and Ekblom, 1988, Bronner-Fraser, 1998). Μεταγενέστερα, αποδείχθηκε ότι εκφράζεται και σε ποικίλους φυσιολογικούς ιστούς ενηλίκων, σε αναγεννητικές-υπερπλαστικές αλλοιώσεις, όπως και στο στρώμα μεγάλης ποικιλίας νεοπλασμάτων, επιθηλιακής, μεσεγχυματικής ή νευρογλοιακής διαφοροποίησης (Koukoulis et al., 1991). Η TN παράγεται από τους ινοβλάστες και/ή τους μυοϊνοβλάστες (Erickson and Bourdon, 1989, Vollmer, 1997,), όπως επίσης και από επιθηλιακά κύτταρα, φυσιολογικών ή νεοπλασματικών ιστών (Lightner et al., 1994, Yoshida et al., 1997).

Ο ρόλος της TN στην κακοήθεια

Μελέτες που έγιναν σε κυτταροκαλλιέργειες, έδειξαν ότι πιθανά η TN, να ευοδώνει την κυτταρική ανάπτυξη, αυξάνοντας την μιτογενετική δράση του FGF και ότι είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τον EGF που προκαλεί τον πολλαπλασιασμό (Sakakura et al., 1991, Jones et al., 1997).

Η βασικότερη λειτουργία της TN, φαίνεται να είναι η μείωση της συγκόλλησης των κυττάρων, και επομένως μπορεί να υποθέσει κανείς ότι η TN προάγει την διαδικασία της τοπικής διήθησης και της μετάστασης (Sakakura et al., 1991, Yoshida et al., 1995). Έντονη έκφραση της TN έχει αναφερθεί σε αρκετούς κακοήθεις όγκους όπως του μαστού, του πνεύμονα, του στομάχου, του εντέρου, του τραχήλου της μήτρας, των ωοθηκών και της ουροδόχου κύστεως (Shoji et al., 1992, Tiita et al., 1993, Wilson et al., 1996, Hanamura et al., 1997, Jahkola et al., 1998, Pilch et al., 1999, Zirbes et al., 1999).

Έχει προταθεί ότι η στρωματική έκφραση της TN στα καρκινώματα, αναστέλλει την επέκταση του όγκου, δημιουργώντας φραγμό στα νεοπλασματικά κύτταρα, αναστέλλοντας την μετανάστευση των κυττάρων, και ρυθμίζοντας την ανάπτυξη αυτών (Ferguson et al., 1990, Erickson, 1993, Moch et al., 1993). Αντίθετα σε άλλες μελέτες, θεωρείται ότι TN εμφανίζει αντι-συγκολλητικές ιδιότητες, δηλ. ότι η TN που παράγεται από τα νεοπλασματικά κύτταρα κατά την ανάπτυξη του καρκινώματος, έχει σαν αποτέλεσμα να διεγείρει την μετακίνηση των κυττάρων, με επακόλουθη την μετάσταση (Shoji et al., 1993).

Θεωρείται ότι έχει ενεργή δράση στην αλληλεπίδραση επιθηλίου-μεσεγχύματος και κυτταροκαλλιέργειες, έδειξαν ότι πιθανά παίζει ρόλο κατά την προαγωγή αυξήσεως του όγκου και σε αντι-συγκολλητικές λειτουργίες (Vollmer, 1997).

Η TN είναι ένα μεγάλο και σύνθετο μόριο, στο οποίο συνυπάρχουν δύο αντικρουόμενα σήματα, ένα αντισυγκολλητικό και πολλαπλασιαστικό σήμα (που εκδηλώνεται μέσω πολλών επαναλαμβανόμενων παραγόντων που μοιάζουν με τους επιδερμидικούς αυξητικούς παράγοντες) και ένα που σχετίζεται με ισχυρή κυτταρική-



δεσμευτική θέση (πιθανά myotendinous antigen epitope). Αυτό το γεγονός πιθανά εξηγεί την πολύπλευρη λειτουργία της TN (Spring et al., 1989).

Συνήθως η έκφραση της TN σε άλλοτε άλλη αναλογία, παρατηρείται σε κάποια επιθηλιακά και σε κύτταρα του λείου μυϊκού ιστού, κατά το όριο της βασικής μεμβράνης (Koukoulis et al., 1991).

TN και μαστός

Στο φυσιολογικό μαζικό παρέγχυμα το πρότυπο ανάπτυξης της έκφρασης TN είναι συνεχές και γραμμικό και περιβάλλει τους πόρους. Στο ενδοπορικό καρκίνωμα, η έκφραση αυτή είναι πιο έντονη και πιο ευρεία, ενώ στο διηθητικό καρκίνωμα του μαστού, αυτή είναι εκτεταμένη, και περιβάλλει τα νεοπλασματικά κύτταρα (Howeedy et al., 1990). Ωστόσο, η TN δεν εκφράζεται σε όλα τα καρκινώματα του μαστού (Shoji et al., 1992, Moch et al., 1993). Συνήθως η ανοσοαντίδραση είναι περισσότερο έντονη κατά το μέτωπο διήθησης του όγκου (Howeedy et al., 1990).

Ανευρίσκεται σε ποικίλες ποσότητες στην περιοχή της ΒΜ, σε κάποιους επιθηλιακούς ιστούς ενηλίκων, ενώ σε περιπτώσεις ενδοπορικού καρκινώματος του μαστού, φαίνεται να αυξάνεται αρκετά με περιτορική εντόπιση δίπλα στην ΒΜ. Στο διηθητικό καρκίνωμα του μαστού η TN εκφράζεται κυρίως βαθύτερα στο στρώμα (Ferguson et al., 1990, Howeedy et al., 1990).

Θεωρείται ένας στρωματικός δείκτης κακοηθείας για τον καρκίνο του μαστού (Mackie et al., 1987). Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι έκφραση αυτής μπορεί να παρατηρηθεί και σε υπερπλαστικές αλλοιώσεις ή καλοήγη νεοπλάσματα του μαζικού παρεγχύματος. Ωστόσο, η έκφραση αυτής είναι περισσότερο έντονη σε περιπτώσεις ενδοπορικού και διηθητικού καρκινώματος του μαστού (Fergusson et al., 1990, Howeedy et al., 1990, Moch et al., 1993).

Η γλυκοπρωτεΐνη της ΕΟ, TN στο φυσιολογικό μαζικό παρέγχυμα περιορίζεται περιτορικά, ενώ τόσο στις κακοήθειες όσο και στις ινοαδενοματώδεις υπερπλασίες αυξάνεται αρκετά. (Jahkola et al., 1998).

Σύμφωνα με μελέτες (Ishihara et al., 1995) που έγιναν φαίνεται ότι η παραγωγή της TN από τα νεοπλασματικά κύτταρα, πιθανά να διευκολύνει την διαδικασία της επέκτασης του καρκινώματος.

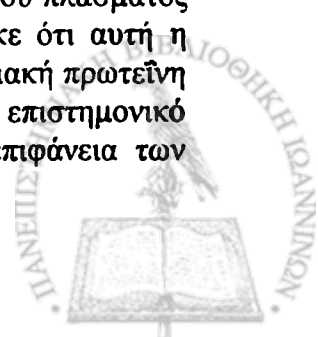
Επίσης, φαίνεται ότι η έκφραση της TN κατά το μέτωπο διήθησης, συνδυάζεται με μια πιο επιθετική πορεία της νόσου (Jahkola et al., 1996), σε αντίθεση με άλλους ερευνητές οι οποίοι υποστηρίζουν ότι η έκφραση της TN κατά το μέτωπο διήθησης παίζει προστατευτικό ρόλο, ως προς τις απομακρυσμένες μεταστάσεις (Jahkola et al., 1996).

3.2.2 Ινονεκτίνη (IN)

Γενικές πληροφορίες

Η γλυκοπρωτεΐνη ινονεκτίνη έγινε γνωστή από το 1948, ως ένας συγκολλητής του ινοδογόνου του πλάσματος. Μπορούσε να απομονωθεί με την μέθοδο του Cohn (Cohn's cold fractionation method) (Morrison et al., 1948).

Το 1970 η πρωτεΐνη αυτή αποδείχθηκε ότι αποτελεί κύριο συστατικό του πλάσματος (Mosesson and Umfleet, 1970). Λίγα χρόνια αργότερα ανακαλύφθηκε ότι αυτή η πλασματική πρωτεΐνη ήταν ανοσολογικά ταυτόσημη με μια μεγαλομοριακή πρωτεΐνη σχετιζόμενη με τους ινοβλάστες, η οποία ήδη είχε προκαλέσει το επιστημονικό ενδιαφέρον, καθόσον φαινόταν ότι απουσίαζε από την κυτταρική επιφάνεια των



κακοήθως μετασχηματισμένων ινοβλαστών σε κυτταροκαλλιέργειες (Hynes, 1973 Yamada and Weston, 1974).

Το 1977 αποδόθηκε στην πρωτεΐνη αυτή το όνομα ινονεκτίνη (λατινικό) αφού βρέθηκε ότι αυτή συνδέει τα ινίδια του κολλαγόνου στον συνδετικό ιστό (Engvall and Rouslahti, 1977).

Η ΙΝ είναι παρούσα σε δύο μορφές: μία διαλυτή μορφή που βρίσκεται μέσα στο πλάσμα (συγκέντρωση 0.3 mg/ml) και σε άλλα υγρά του σώματος και μια υψηλά αδιάλυτη μορφή που συνδέεται με τα κύτταρα και τους ιστούς και έχει μια ινιδιώδη σύσταση. (Mosher, 1984).

Η πλασματική μορφή της ΙΝ παράγεται κύρια από τα ηπατοκύτταρα (Tamkun and Hynes, 1983) ενώ η κυτταρική μορφή της από μια ποικιλία κυττάρων (καλοήθων και κακοήθων επιθηλιακών και μεσεγχυματογενών κυττάρων) και εναποτίθεται υπό μορφή ινιδίων, μέσα σε μια εξωκυττάρια ουσία που παράγεται από τα ίδια κύτταρα (Chen et al., 1978, Furcht, 1983, Mosher, 1984, Ruoslahti, 1984).

Ο πλασματικός τύπος της ΙΝ μπορεί να μετατραπεί στον κυτταρικό τύπο (Oh et al., 1981, Mann et al., 1988).

Στους φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς, η ανοσοϊστοχημική έκφραση της ΙΝ είναι υπό μορφή λεπτών ινιδίων, μέσα στον εξωκυττάριο συνδετικό ιστό και στις βασικές μεμβράνες (Stenman and Vaheri, 1978, D'Ardenne et al., 1983b, Mosher, 1984). Η πρωτεΐνη αυτή έχει επίσης ανευρεθεί μέσα στις ινοβλάστες των ιστών (Kurisu et al., 1987), στα επιθηλιακά κύτταρα των ούλων (Corvetti et al., 1984), όπως επίσης και στην επιφάνεια των φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων του ανθρώπινου μαστού (II, V, Birembaut et al., 1980).

Έχει πλέον αποδειχθεί ότι η ΙΝ είναι μία υψηλού μοριακού βάρους ετεροδιμερής γλυκοπρωτεΐνη, αποτελούμενη από δύο υπομονάδες συνδεδεμένες μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς, μοριακού βάρους 230.000 και 250.000 dalton εκάστη (Kornblihtt and Gutman, 1988).

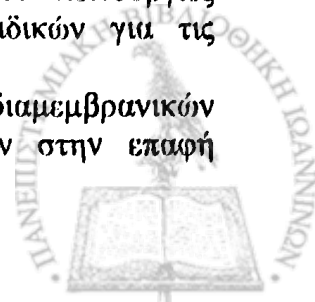
Βιολογική λειτουργία

Λόγω βασικών δομικών διαφορών ανάμεσα στις υπομονάδες του ίδιου μορίου, η ΙΝ σήμερα θεωρείται ως μία οικογένεια πολύ στενά συνδεδεμένων γλυκοπρωτεϊνών. Κάθε υπομονάδα της κυτταρικής ΙΝ περιέχει δεσμευτικές θέσεις, για κύτταρα (Piersbacher and Ruoslahti, 1984, Humphries et al., 1987), κολλαγόνου (Owens and Baraille, 1986), ινική/ινοδογόνο, ηπαρίνη (Petersen et al., 1983, Kornblihtt and Gutman, 1988) κ.α. In vitro η ΙΝ δεσμεύει επίσης πλασμινογόνο (Salonen et al., 1985), ακτίνη και άλλες κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, DNA, IgG, παράγωγα του συμπληρώματος C1q και C3 κ.α. (Mosher, 1984).

Η πλασματική ΙΝ έχει αναφερθεί ότι εμπλέκεται άμεσα σε ορισμένους μηχανισμούς άμυνας του οργανισμού, λειτουργώντας σαν μια μη άνοση οψονίνη μηχανισμός ο οποίος διευκολύνεται μέσω παραγωγής ιντερλευκίνης 1 από τα μονοκύτταρα (Beezhold and Lause, 1987).

Αυτές οι πολλαπλές δεσμευτικές ικανότητες της ΙΝ την εμπλέκουν σε μηχανισμούς προσκόλλησης κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-υποστρώματος (McDonald et al., 1987), στην μετανάστευση των κυττάρων (Mosher, 1984) και στην ρύθμιση του κυτταρικού φαινότυπου (Hedin et al., 1988). Όλες αυτές οι λειτουργίες πραγματοποιούνται μέσω υποδοχέων επιφανείας για την ΙΝ, ειδικών για τις υπομονάδες της.

Αυτοί οι υποδοχείς ανήκουν στην μεγάλη οικογένεια των διαμεμβρανικών υποδοχέων, που ονομάζονται ιντεγκρίνες, οι οποίες μεσολαβούν στην επαφή



κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-εξωκυττάριας ουσίας και είναι παρούσες σε όλα σχεδόν τα κύτταρα (Hynes, 1987, Akiyama et al., 1990).

Λειτουργώντας σαν συνδετικοί κρίκοι ανάμεσα στον κυτταρικό κυτταροσκελετό και σε εξωκυττάρια δεσμούς, οι υποδοχείς αυτοί εμπλέκουν την IN σε μηχανισμούς αναδόμησης του ιστού (Chernousov et al., 1987), εμβρυογένεσης, επούλωσης τραυμάτων και στην νεοπλασία (Chen et al., 1986, Humphries et al., 1989).

Η σύνθεση της IN, η δέσμευση της στην κυτταρική επιφάνεια, η εναπόθεση της στην εξωκυττάρια ουσία όπως και η συγκέντρωση πλασματικής IN από τις ινοβλάστες διεγείρονται από τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού β (transforming growth factor-β) μια πρωτεΐνη που μοιάζει με ορμόνη και έχει δυναμική δεσμοπλαστική ικανότητα (Igotz and Massague, 1987, Raghov et al., 1987) και παράγεται από διάφορα καλοήθη και κακοήθη κύτταρα (Derynck et al., 1987). Επίσης γλυκοκορτικοειδή (Dean et al., 1988) και άλλοι αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν την παραγωγή της IN.

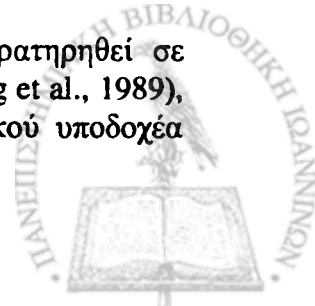
Ο ρόλος της IN στην κακοήθεια

Μειωμένη συγκολλητικότητα είναι ένα από τα σταθερά χαρακτηριστικά των κακοήθων κυττάρων (Coman, 1994), και η παρατήρηση ότι η IN είναι παρούσα στα φυσιολογικά κύτταρα κυτταροκαλλιέργειας αλλά όχι στα μετασχηματισμένα (Pearlstein et al., 1976, Yamada and Olden, 1978, Alitalo et al., 1981) προκάλεσε μια έντονη ερευνητική μελέτη γύρω από την γλυκοπρωτεΐνη αυτή και το ρόλο που παίζει στην νεοπλασία (Akiyama and Yamada, 1983, D'Ardenne and McGee, 1984b, MacCarthy et al., 1985, Humphries et al., 1989).

Η συνολική ποσότητα παραγόμενης IN φαίνεται να εξαρτάται από την μεταστατική ικανότητα των κακοήθων κυττάρων. Μεταστατικά καρκινωμάτωση κύτταρα από ανθρώπινο μαστό και από προστατικό αδένιο αρουραίου βρέθηκε ότι παράγουν σημαντικά μειωμένη ποσότητα IN συγκριτικά με τα μη μεταστατικά καρκινωμάτωση κύτταρα από το ίδιο όργανο (Smith et al., 1979, Neri et al., 1981, Schalken et al., 1988). Ωστόσο, υπάρχει σημαντική ετερογένεια στην παραγωγή IN, μεταξύ των διαφορετικών υποκλώνων των μεταστατικών ανθρώπινων καρκινωμάτων (π.χ. πνεύμονος και τραχήλου μήτρας) (Crouch et al., 1987, Auersberg et al., 1989).

Ανοσοϊστοχημικές μελέτες τόσο σε ανθρώπινα επιθηλιακά όσο και μεσεγχυματογενή νεοπλάσματα έχουν δώσει διαφορετικά αποτελέσματα όσον αφορά την κυτταροπλασματική ανάδειξη της IN, γεγονός που εξαρτάται από τον τρόπο μονιμοποίησης και τις τεχνικές ανοσοϊστοχημείας που χρησιμοποιήθηκαν. Μια πιο σταθερή ωστόσο ανοσοαντίδραση έχει βρεθεί όσο αφορά την ανίχνευση του εξωκυττάριας τμήματος της IN. Κατά κανόνα η ανίχνευση της συνδυάζεται με την διάσπαση και πλήρη απώλεια της BM (Birembaut et al., 1981, Labat-Robert et al., 1981, Stenman and Vaheri, 1981, Niemczuk et al., 1982, Sugeno et al., 1988), ενώ επίσης αυξημένη IN στο στρώμα έχει περιγραφεί στα καρκινώματα του παχέος εντέρου (Niemczuk et al., 1982), του πνεύμονα (Nagai et al., 1986), του στομάχου (Sugihara et al., 1989), των σιελογόνων αδένων (D'Ardenne et al., 1983a) και του μαστού. Αυτή η αυξημένη παρουσία της IN στο στρώμα αυτών των όγκων φαίνεται να οφείλεται στην παραγωγή της από μυοϊνοβλάστες οι οποίες είναι μεγάλα συσταλτά κύτταρα που μοιάζουν με ινοβλάστες και αφθονούν στο διάμεσο στρώμα των όγκων (Lagace et al., 1985).

Κατά πόσο η κυτταροπλασματική ανίχνευση της IN που έχει παρατηρηθεί σε ορισμένους όγκους (Nagai et al., 1986, Sugeno et al., 1988, Auersperg et al., 1989), οφείλεται σε ενδοκύτωση του δεσμευμένου από την IN επιφανειακού υποδοχέα



(Sczekan and Juliano, 1990) ή σε de novo σύνθεση της πρωτεΐνης αυτής δεν έχει ακόμα αποδειχθεί.

Οι μηχανισμοί στους οποίους οφείλεται η διαφορετική ανοσοϊστοχημική έκφραση για την IN μεταξύ καλοήθων και κακοήθων ιστών είναι αρκετά πολύπλοκοι και όχι πλήρως κατανοητοί. Πρόσφατα μεταξύ των άλλων παραγόντων που επιδρούν, ενοχοποιείται και η πρωτεόλυση (Chen and Chen, 1987, Quigley et al., 1987, Tryggvason et al., 1987).

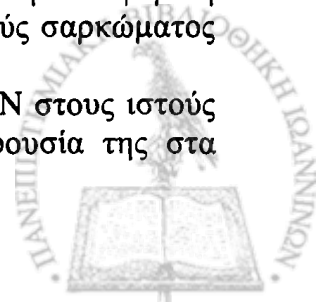
Ο ρόλος της πλασματικής IN στα κακοήθη νεοπλάσματα του ανθρώπινου οργανισμού δεν έχει διευκρινιστεί. Τα επίπεδα της είναι αυξημένα στα καρκινώματα και ιδιαίτερα στα καρκινώματα του μαστού (Choate and Mosher, 1983), αλλά αυτό ισχύει και για διάφορες άλλες πρωτεΐνες του πλάσματος και πιθανώς αντανakλά μια γενικότερη απάντηση στον καρκίνο (Boccardo et al., 1986). Επίσης η πλασματική IN επηρεάζεται και από άλλες καταστάσεις εκτός από το καρκίνωμα, όπως από την φλεγμονή, από παθήσεις του ήπατος και από χειρουργικές επεμβάσεις (Choate and Mosher, 1983). Ως εκ τούτου η πλασματική IN δεν είναι κατάλληλος νεοπλασματικός δείκτης, πράγμα το οποίο εξηγεί τις διαφορές που παρατηρούνται ανάμεσα στις τιμές IN του πλάσματος και στην έκφραση της σε ιστικό επίπεδο σε ασθενείς με καρκινώματα του μαστού (Joffe et al., 1988).

IN και μαστός

Η έκφραση της IN έχει ευρύτατα μελετηθεί στο μαστό και έχει δώσει ποικίλλοντα αποτελέσματα εξαρτώμενα πάντα από τον τρόπο μονιμοποίησης και επεξεργασίας του μαστού. Καλοήθη επιθηλιακά κύτταρα δίνουν μια ασταθή χρωστική αντίδραση αυλική, περικυτταρική (Labat-Robert et al., 1980, Friedman et al., 1984, Joffe et al., 1988) ή ενδοκυττάρια (Joffe et al., 1988), ενώ μια έντονη αντίδραση δίνουν μεμονωμένα αναπτυσσόμενα καρκινικά κύτταρα, όπως κύτταρα από χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα και μεταστατικά κύτταρα στους λεμφαδένες (Joffe et al., 1988).

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της IN στις ΒΜ των επιθηλιακών κυττάρων είναι ελλιπής στα *in situ* καρκινώματα και απύσα στα διηθητικά καρκινώματα του μαστού (Labat-Robert et al., 1980, Stenman and Vaheri, 1981, Natali et al., 1984, Lagace et al., 1985). Ωστόσο, από τις περισσότερες μελέτες έχει αναφερθεί, μια ταυτόχρονη αύξηση του ποσού των θετικών ινιδίων της IN στο συνδετικό ιστό που περιβάλλει τα κύτταρα του όγκου και ιδιαίτερα στις περιοχές της έντονης δεσμοπλασίας (Asch et al., 1981, Stenman and Vaheri, 1981, Friedman et al., 1984, Lagace et al., 1984, Alon et al., 1986, D'Ardenne et al., 1986, Loridon-Rosa et al., 1988). Με την προϋπόθεση ότι έχουμε άριστες ανοσοϊστοχημικές χρώσεις, όλα τα διηθητικά καρκινώματα του μαστού φαίνεται να συνοδεύονται από αυξημένη στρωματική έκφραση της IN, η οποία όμως έχει ένα ετερογενές πρότυπο κατανομής εξαρτώμενο από το μέγεθος και τον τύπο του όγκου (Christensen et al., 1988, Christensen, 1990) και τείνει να είναι απύσα σε εστίες γύρω από το διηθητικό άκρο των καρκινωμάτων που έχουν υψηλή μεταστατική ικανότητα (Christensen et al., 1988). Έτσι, η κατά κανόνα υψηλή στρωματική έκφραση της IN στα διηθητικά καρκινώματα του μαστού μπορεί πρακτικά να μας χρησιμεύσει στην διαφορική διάγνωση μεταξύ ενός αρχόμενου διηθητικού καρκινώματος και ενός *in situ* (Christensen, 1990) καθώς και στην διαφορική διάγνωση μεταξύ ενός μεταπλαστικού καρκινώματος και ενός αληθούς σαρκώματος του μαστού (Christensen et al., 1985).

Παρόλο που πολλοί μηχανισμοί που αφορούν την παρουσία της IN στους ιστούς πρέπει ακόμη να διερευνηθούν, δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η παρουσία της IN στα



4. Πρωτεολυτικά ένζυμα

Ο ρόλος των πρωτεολυτικών ενζύμων στη διήθηση και μετάσταση του καρκίνου του μαστού.

Η ικανότητα διήθησης των ιστών (τοπική επέκταση) και η δημιουργία δευτεροπαθών εστιών (μετάσταση) σε απομακρυσμένες θέσεις είναι ένα βασικό χαρακτηριστικό γνώρισμα των κακοήθων νεοπλασμάτων. Λόγω του ότι η κύρια αιτία θανάτου είναι αυτή η μεταστατική ιδιότητα των κακοήθων νεοπλασμάτων, επιβεβλημένη είναι η προσπάθεια κατανόησης της διαδικασίας διήθησης και μετάστασης ενός όγκου. Η διηθητική αυτή ιδιότητα είναι μία δυναμική, σύνθετη και πολυσταδιακή διαδικασία, οποία εμπεριέχει την αποκόλληση των καρκινικών κυττάρων από την αρχική τους θέση, τα οποία διαπερνούν την ΕΟ και την ΒΜ και διέρχονται στα λέμφο-αιμοφόρα αγγεία. Ουσιώδες βήμα στην διαδικασία της διήθησης είναι η διάσπαση ή ο πρωτεολυτικός κατακερματισμός των συστατικών της ΒΜ και της ΕΟ. Για τον πρωτεολυτικό κατακερματισμό ουσιών όπως το κολλαγόνο, η λαμινίνη και η ινονεκτίνη, οι οποίες αποτελούν τα κύρια συστατικά της ΕΟ, απαιτούνται ειδικά πρωτεολυτικά ένζυμα. Υπάρχουν 4 μεγάλες ομάδες πρωτεολυτικών ενζύμων, τα ένζυμα της κυστεΐνης και του ασπαρτικού οξέος (στα οποία συμπεριλαμβάνονται οι καθεψίνες), τα οποία ενεργοποιούνται σε χαμηλό pH. Αυτά, εμπλέκονται κυρίως στην ενδοκυττάρια πρωτεόλυση μέσα στα λυσοσώματα. Τα ένζυμα της σερίνης και τα μεταλλο-εξαρτώμενα ένζυμα, τα οποία ενεργοποιούνται σε ουδέτερο pH, είναι υπεύθυνα για την εξωκυττάρια πρωτεόλυση. Αν και έχει δεχθεί ότι και οι 4 ομάδες εμπλέκονται στην διαδικασία της διήθησης και μετάστασης, οι ενεργοποιητές του πλασμινογόνου (πρωτεάσες σερίνης) και ειδικά οι μεταλλοπρωτεΐνάσες της εξωκυττάριας ουσίας (ΜΕΟ) (πρωτεάσες εξαρτώμενες από τον ψευδάργυρο) έχουν γίνει αντικείμενο πλέον εκτεταμένης μελέτης (Cuttan and Murtay, 1999).

4.1. Ενδοκυττάρια πρωτεόλυση-Ένζυμα ασπαρτικού οξέος (Καθεψίνη D)

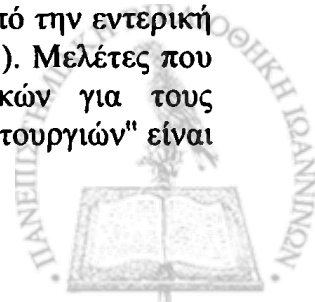
4.1.1. Γενικές πληροφορίες

Η Καθεψίνη D (KD) είναι μια λυσοσωματική ενδοπεπτιδάση, η οποία απομονώνεται σε πλήθος φυσιολογικών και νεοπλασματικών ιστών. Αρχικά, παράγεται μια πρόδρομη αδρανής ουσία με MB 52kDa, η παραγωγή της οποίας επάγεται από τα οιστρογόνα. Ακολούθως, σχηματίζεται μια ενδιάμεση πρωτεϊνική μορφή, η οποία συνδέεται με την κυτταρική μεμβράνη, από την οποία τελικά σχηματίζεται η ενεργός KD, MB 42kDa, η οποία ανευρίσκεται στα λυσοσώματα.

Με βιοχημικές και ανοσοϊστοχημικές μεθόδους κατέστη δυνατή η απομόνωση της, τόσο από τα επιθηλιακά όσο και από μη επιθηλιακά (μεσεγχυματογενή) στοιχεία του όγκου, όπως τα μακροφάγα, τα πολυμορφοπύρρηνα και τα λεμφοκύτταρα.

Η Καθεψίνη D είναι ένα λυσοσωματικό πρωτεολυτικό ένζυμο, με άγνωστο ενδογενή καταστολέα και ενεργοποιείται σε όξινο pH, ανευρίσκεται κυρίως σε ενδοκυττάρια φυσαλίδες, (vesicles), λυσοσώματα, φαγοσώματα, αυτοσώματα.

Η βιολογική λειτουργία αυτού του ενζύμου, το οποίο εκκρίνεται ως προένζυμο στο γάλα, δεν αφορά μόνο στην διάσπαση πρωτεϊνών στα λυσοσώματα, αλλά φαίνεται να βοηθά σημαντικά στην ανάπτυξη των νεογνών, προστατεύοντας τα από την εντερική νέκρωση και από την απόπτωση του θύμου αδένου (Saftig et al., 1995). Μελέτες που έγιναν σε κυτταρικές σειρές καρκινωμάτων του μαστού θετικών για τους οιστρογονικούς υποδοχείς, ανέδειξαν ότι αυτό το ένζυμο "βασικών λειτουργιών" είναι



επίσης υψηλά ρυθμιζόμενο από τα οιστρογόνα και τους αυξητικούς παράγοντες (Westley and Rochefort, 1980, Rochefort et al., 1989, Cavailles et al., 1993).

Η απρόσμενη ρύθμιση της προ-καθεψίνης D από τα οιστρογόνα σε κυτταρικές σειρές σε καρκινώματα του μαστού, έχει σαν αποτέλεσμα την μελέτη πολλών κλινικών και βασικών ερευνών με σκοπό την κατανόηση της σπουδαιότητας αυτής της οιστρογόνο-εξαρτώμενης πρωτεΐνης στον καρκίνο του μαστού και σε άλλα συμπαγή νεοπλάσματα.

Ένα πρωτεολυτικό ένζυμο, εμπλέκεται στην διαδικασία της μετάστασης με διάφορους μηχανισμούς και σε διάφορα βήματα. Η KD, αντίθετα με άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα, φαίνεται να είναι περισσότερο ένα μιτογόνο, παρά ένα πρωτεολυτικό ένζυμο, επιτρέποντας στα νεοπλασματικά κύτταρα να διαπερνούν την βασική μεμβράνη και να διηθούν τον διάμεσο συνδετικό ιστό ή να εισέρχονται στην αιματική κυκλοφορία (Vignon et al., 1986). Ωστόσο, σε άλλες μελέτες δεν ταυτοποιήθηκε αυτή η μιτογόνος δράση της KD (Stewart et al., 1994), η οποία φαίνεται να εξαρτάται από την μέθοδο καθαρισμού της πρωτεΐνης. Από πειραματικές μελέτες που έχουν γίνει, έχει επιβεβαιωθεί *in vitro*, η διέγερση που προκαλεί η KD στην κυτταρική αύξηση (Garsia et al., 1990). Επίσης, φαίνεται να έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση αποικισμού και την ανάπτυξη του όγκου σε απομακρυσμένες θέσεις παρά μια αύξηση της τοπικής επέκτασης διαμέσου της βασικής μεμβράνης.

Συνολικά, τα υπερεκφραζόμενα και εκκρινόμενα ένζυμα, λειτουργούν ως πρωτεολυτικά ένζυμα, μετά την ενεργοποίησή τους ή ως ένα συνδεδεμένο μόριο στους μεμβρανικούς υποδοχείς πριν από την ενεργοποίησή τους. Η δράση αυτών, πιθανά λαμβάνει χώρα στον εξωκυττάριο χώρο όπως αυτό διαφαίνεται λόγω της υπερέκφρασης του προενζύμου, ή ενδοκυττάρια ακολουθώντας ή όχι την ενδοκύττωση που επιτυγχάνεται μέσω των μεμβρανικών υποδοχέων.

Είναι δύσκολο να αποκλείσουμε οποιονδήποτε από αυτούς τους μηχανισμούς: η πρόδρομη μορφή της KD εκκρίνεται ανώμαλα από τα νεοπλασματικά κύτταρα, ο πρώτος μηχανισμός φαίνεται να λαμβάνει χώρα, δηλ. ότι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο διασπά την βασική μεμβράνη και έτσι με αυτόν τον τρόπο διευκολύνει την τοπική και απομακρυσμένη επέκταση του νεοπλάσματος. Το μεγάλο πρόβλημα που υπάρχει είναι ότι ένα pH σαφώς όξινο (<5.5) απαιτείται για να ενεργοποιηθεί το προένζυμο. Αυτό το pH πολύ σπάνια ανευρίσκεται στο εξωκυττάριο περιβάλλον, ακόμη και αν αυτό το pH μπορεί να ποικίλει σύμφωνα με τη φύση και το υπόστρωμα των γειτονικών στοιχείων, όπως τα μεμβρανικά λιπίδια. Ωστόσο, μια σειρά από έμμεσα ευρήματα, ευνοούν την υπόθεση ότι η KD ενεργοποιείται και λειτουργεί ως ένα ένζυμο. Ωρίμανση *in vivo* συμβαίνει στον πρωτοπαθή καρκίνο του μαστού μιας και χωριστές αναλύσεις της προ-KD και της ολικής KD, χρησιμοποιώντας διαφορετικά μονοκλωνικά αντισώματα, έδειξαν ότι ο όγκος περιέχει μόνο το 4 με 6% της προ-KD (Brouillet et al., 1993), ενώ οι κυτταρικές σειρές της μεταστατικής εστίας του καρκίνου του μαστού εκκρίνουν *in vitro* πάνω από το 50% της προ-KD (Carony et al., 1989). Εκτός αυτού, η ανάλυση της ολικής KD συμπεριλαμβάνει την ώριμη μορφή, η οποία έχει πολύ μεγαλύτερη προγνωστική σημασία απ'ότι η προ-KD (Brouillet et al., 1993). Από μελέτες που έγιναν, φαίνεται ότι η εμπλοκή της KD στην διαδικασία της μετάστασης, επηρεάζεται από την αλλαγή που επισυμβαίνει στην δομή της πρωτεΐνης και αφορά σε δύο συγκεκριμένα αμινοξέα (Rochefort et al., 2000).

Η υπερέκφραση της KD σε ορισμένα καρκινώματα (μαστός, μελάνωμα, ωοθηκών κ.λ.π.) δεν συσχετίζεται μόνο, αλλά επίσης διευκολύνει, την ανάπτυξη μεταστάσεων, όπως φαίνεται από μελέτες που έχουν γίνει (Rochefort et al., 2000).



Οι περισσότερες μελέτες δείχνουν ότι η υπερέκφραση της KD συσχετίζεται με μείωση του μεσοδιαστήματος ελεύθερου νόσου και της συνολικής επιβίωσης, προκαλώντας την ανάπτυξη μικρομεταστάσεων σε απομακρυσμένες θέσεις, παρά την τοπική επέκταση μέσου της διάσπασης της βασικής μεμβράνης. Αυτός ο μηχανισμός της μιτογονικής δραστηριότητας, πιθανά δεν συμπεριλαμβάνει μόνο την πρωτεόλυση του υποστρώματος, αλλά ίσως και την αλληλεπίδραση του προενζύμου με τους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας.

4.1.2. Καθεψίνη D και μαστός

Την τελευταία δεκαετία, η υπερέκφραση και η έκκριση της KD από τα νεοπλασματικά κύτταρα και κυρίως τα του καρκίνου του μαστού, έχουν συνδεθεί με αυξημένο βαθμό κινδύνου υποτροπής και μετάστασης (Rochefort et al., 1987, Thorpe et al., 1989, Spyrtatos et al., 1989).

Μελέτες που έχουν γίνει σε καρκίνους του μαστού με θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς, έχουν δείξει ότι αυτό το ένζυμο, ρυθμίζεται σε αρκετά μεγάλο βαθμό από τα οιστρογόνα και τους αυξητικούς παράγοντες (Ferno et al., 1994, Gion et al., 1955). Η KD αποτελεί ένα από τα πιο πολυσυζητημένα πρωτεολυτικά ένζυμα στα καρκινώματα του μαστού.

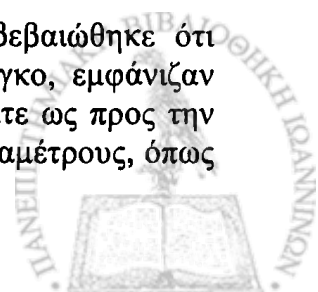
Από μελέτες που έχουν γίνει σε κυτταροκαλλιέργειες φαίνεται ότι ο ρόλος της KD είναι ενεργής και δρα είτε ως πρωτεολυτικό ένζυμο, είτε ως μιτογόνο (Westley and May, 1996).

Από το 1989 η ανεξάρτητη δυσμενής προγνωστική αξία της αυξημένης συγκέντρωσης της KD, σε ομογενοποιημένο ιστό από καρκίνο του μαστού έχει ήδη περιγραφεί σε αρκετές μελέτες (Thorpe et al., 1989, Duffy et al., 1991, 1992, Kute et al., 1991, Namer et al., 1991, Pujol et al., 1993, Ferno et al., 1994). Ωστόσο, μελέτες που έγιναν χρησιμοποιώντας την ανοσοϊστοχημική μέθοδο για την ανίχνευση της KD στα νεοπλασματικά κύτταρα, έδειξαν αμφιλεγόμενα συμπεράσματα, για το ρόλο της αν δηλαδή αποτελεί προγνωστικό δείκτη για τον καρκίνο του μαστού. Τα διαφορετικά αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται σε διαφορές στην επιλογή του υλικού, σε διαφορετικά αντισώματα ή διαφορετικά κατώτερα όρια ημιποσοτικής εκτίμησης (cut off values) (Ravdin, 1993, Cardiff, 1994, Rochefort, 1996, Westley And May, 1996).

Τρεις μελέτες περιγράφουν μια δυσμενή προγνωστική αξία της έκφρασης της KD, που παράγεται από τα στρωματικά κύτταρα και όχι από τα νεοπλασματικά επιθηλιακά κύτταρα (Tetu et al., 1993, Joensuu et al., 1995, O'Donoghue et al., 1995). Σύμφωνα με άλλη μελέτη (Jahkola et al., 1999) φαίνεται ότι τόσο η στρωματική όσο και η επιθηλιακή έκφραση της KD αποτελούν σημαντικό προγνωστικό δείκτη, ο οποίος προδικάζει έναν μεγαλύτερο βαθμό κινδύνου για τις απομακρυσμένες μεταστάσεις.

Οι πρώτες κλινικές μελέτες έδειξαν ότι αυτή η οιστρογόνο-εξαρτώμενη πρωτεΐνη σε καρκινώματα του μαστού με θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς, εμφάνιζε υπερέκφραση και σε καρκινώματα με αρνητικούς οιστρογονικούς υποδοχείς (Rochefort et al., 1989) και συσχετιζόταν με αυξημένο βαθμό κινδύνου για υποτροπή και μετάσταση χωρίς όμως να υπάρχει ορμονική εξάρτηση και συσχετισμός με την κατάσταση των οιστρογόνικών υποδοχέων (Rochefort, 1992).

Πρόσφατα σε μια μεγάλη σειρά καρκινωμάτων του μαστού, επιβεβαιώθηκε ότι ασθενείς με υψηλή ή μέτρια έκφραση της KD στον πρωτοπαθή όγκο, εμφάνιζαν φτωχή πρόγνωση, είτε ως προς το μεσοδιάστημα ελεύθερο νόσου είτε ως προς την συνολική επιβίωση, ανεξάρτητα από τις κλασσικές προγνωστικές παραμέτρους, όπως



ιστολογικός βαθμός κακοηθείας, ορμονικοί υποδοχείς και το μέγεθος του όγκου (Foekens et al., 1999).

4.2. Εξωκυττάρια πρωτεόλυση - Μεταλλοπρωτεϊνάσες της εξωκυττάριας ουσίας (Στρωμελυσίνες)

4.2.1. Δομή και λειτουργία των Μεταλλοπρωτεϊνών της ΕΟ (ΜΕΟ)

Οι ΜΕΟ είναι μια οικογένεια ενδοπεπτιδασών εξαρτώμενες από τον ψευδάργυρο, οι οποίες ομαδικά, έχουν την ικανότητα να διασπούν τα περισσότερα, αν όχι όλα, συστατικά της βασικής μεμβράνης και της εξωκυττάριας ουσίας. Ιδιαίτερα, οι ΜΕΟ περιέχουν τα μόνα ένζυμα, τα οποία είναι ικανά να διασπούν τα νημάτια του κολλαγόνου. Μέχρι τώρα, υπάρχουν το λιγότερο 19 γνωστές ανθρώπινες ΜΕΟ, οι οποίες μπορούν να χωριστούν σε περίπου 4 ομάδες: οι κολλαγενάσες, οι στρωμελυσίνες, οι ζελατινάσες και οι μεμβρανικού τύπου ΜΕΟ (MT-MEO). Οι "διαλυτές" ή μη μεμβρανικού τύπου ΜΕΟ μπορούν να ταξινομηθούν *in vitro* σύμφωνα με το δικό τους εξειδικευμένο υπόστρωμα (ουσία της οποίας η αντιδραστικότητα αυξάνεται δια ορισμένου ενζύμου). Η ονοματολογία τους είναι αρκετά περίπλοκη. Είναι αρκετά ενδιαφέρον να αναφέρουμε ότι αρκετές από τις ΜΕΟ εντοπίζονται στην ίδια χρωμοσωμιακή περιοχή, 11q23, μια θέση η οποία ενέχεται στη δημιουργία αρκετών συμπαγών όγκων (Rooney PH et al., 1999).

Η ανάλυση των ΜΕΟ αποδεικνύει ότι αυτές έχουν πολλές διακριτές περιοχές. Υπάρχει μια αμινοτελική πεπτιδική περιοχή, μια καταλυτική περιοχή και μια καρβοξυτελική περιοχή που μοιάζει με την αιμοπηξίνη. Οι MT-MEO περιέχουν επίσης μια καρβοτυξελική διαμεμβρανική περιοχή. Οι ΜΕΟ 7 (ματριλυσίνη) στερούνται της καρβοξυτελικής περιοχής που μοιάζει με αιμοπηξίνη. Οι ΜΕΟ συνθέτονται σε μια αδρανή μορφή, η οποία απαιτεί εξωκυτταρική ενεργοποίηση. Αυτό συνοδεύεται από μια διάσπαση του αμινοτελικού προπεπτιδίου, το οποίο περικλείει μια συγκεκριμένη αλληλουχία αμινοξέων (PRSGVPDV). Το ασύζευκτο υπόλειμμα κυστεΐνης πιστεύεται ότι λειτουργεί με έναν μηχανισμό "κλειδιού" φτιάχνοντας ένα συντονισμένο δεσμό με ιόντα ψευδαργύρου στην ενεργό πλευρά, καθιστώντας έτσι το ένζυμο αδρανές.

Στο γενικό πλαίσιο της βιολογίας των όγκων, αρχικά εικαζόταν ότι οι ΜΕΟ διευκόλυναν την διαδικασία της μετάστασης μέσω της διάσπασης των φυσιολογικών φραγμών που παρέχουν η ΒΜ και η ΕΟ. Ωστόσο, τελευταία φαίνεται ότι οι ΜΕΟ παρουσιάζουν πολλαπλές βιολογικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης και αυτής της ρύθμισης της αύξησης πρωτοπαθών και δευτεροπαθών όγκων (Chambers AF and Matrisian LM, 1997).

4.2.2. Ρύθμιση των ΜΕΟ

Η ρύθμιση των ΜΕΟν ασκείται σε πολλά επίπεδα και αφορά αμφότερους μεταγραφικούς, και μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς. Η ρύθμιση των ΜΕΟ στους όγκους πρόσφατα έχει ανασκοπηθεί (Jones JL, and Walker RA, 1997). Η ρύθμιση των ΜΕΟ φαίνεται να έχει μεγάλη εξειδίκευση σε κυτταρικό και ιστικό επίπεδο.

4.2.3. Μεταγραφική ρύθμιση των ΜΕΟ

Έχει δεχθεί ότι πολλοί διαφορετικοί παράγοντες επηρεάζουν την μεταγραφή των ΜΕΟ, όπως :ορμόνες, αυξητικοί παράγοντες, ογκογονίδια και κυτοκίνες. Υπάρχουν



επίσης ενδείξεις που υποδεικνύουν ότι μεμονωμένα μέλη ή ομάδες της οικογένειας των ΜΕΟ, ρυθμίζονται ανεξάρτητα. Τελευταία έχει περιγραφεί ένας μεμονωμένος πολυμορφισμός στον προαγωγέα της ΜΕΟ1, με ένα επιπρόσθετο υπόλειμμα γουανίνης, αυξάνοντας έτσι το εύρος μεταγραφής του γονιδίου της ΜΕΟ1. Υπήρχε επίσης αυξημένη συχνότητα GG πολυμορφισμού σε αρκετές κυτταρικές σειρές που προέρχονται από όγκους, υποδεικνύοντας έτσι ότι μέσω αυτού του μηχανισμού μπορεί να εξηγηθεί η αυξημένη διάσπαση της ΕΟ που παρατηρείται σε ορισμένους όγκους (Rutter JL et al., 1998).

4.2.4. Ενεργοποίηση των ΜΕΟ

Οι διαλυτές ΜΕΟ όπως οι κολλαγενάσες, ζελατινάσες και στρωμελυσίνες εκκρίνονται ως ζυμογόνα που απαιτούν ενεργοποίηση. Η απόκτηση της πρωτεολυτικής ενέργειας συνδέεται με απώλεια του αμινοτελικού άκρου. Γίνεται εμφανές ότι οι ΜΕΟ αλληλεπιδρούν μεταξύ τους όπως και με άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα π.χ. πλασμίνη με έναν πολύπλοκο τρόπο που αφορά ενεργοποίηση μηχανισμού καταρράκτη. Τα ένζυμα κλειδιά για αυτόν τον μηχανισμό φαίνεται ότι είναι οι ΜΤ1-ΜΕΟ και ΜΕΟ2 (Sato H and Seiki M, 1996).

4.2.5. Ιστικοί αναστολείς των ΜΕΟ

Οι κύριοι φυσιολογικοί αναστολείς των ΜΕΟ, είναι οι ιστικοί αναστολείς των ΜΕΟ (ΙΜΕΟ). Οι ΙΜΕΟ είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών χαμηλού μοριακού βάρους ικανών ειδικής αναστολής ενεργοποιημένων μορφών των ΜΕΟ. Η αναστολή της δράσης των ΜΕΟ από τις ΙΜΕΟ αποτελεί έναν πολύ σημαντικό ρυθμιστικό μηχανισμό.

4.2.6. Δομή και λειτουργία των ΙΜΕΟ

Οι ΙΜΕΟ είναι εκκρινόμενες πρωτεΐνες οι οποίες συμπλέκονται με μεμονωμένες ΜΕΟ και έχουν κεντρικό ρόλο τόσο στην ρύθμιση της λειτουργικής δραστηριότητας όσο και στην ενεργοποίηση μεμονωμένων ΜΕΟ. Έχουν ταυτοποιηθεί αρκετοί διαφορετικοί τύποι ΙΜΕΟ (ΙΜΕΟ 1-4) και καθένας από αυτούς φαίνεται ότι είναι ικανός να δεσμεύεται με αρκετές ΜΕΟ (Gomez DE, et al., 1997).

Η ΙΜΕΟ 1 είναι μια 28,5 ΚD γλυκοπρωτεΐνη η οποία ανευρίσκεται σε υγρά του σώματος και σε ομογενοποιημένο ιστό. Είναι ικανή να αναστέλλει όλες τις ενεργοποιημένες κολλαγενάσες. Η έκφραση της φαίνεται ότι είναι έντονα εξαρτώμενη από το ερέθισμα το οποίο δέχεται. Για παράδειγμα ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (Basic fibroblast growth factor), ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (platelet derived growth factor), φορβολικοί εστέρες και η ιντερλευκίνη 1 έχει αποδειχθεί ότι αυξάνουν την έκφραση στις ινοβλάστες (Denhardt DT, et al., 1997). Υπάρχει ένδειξη ότι η έκφραση της ρυθμίζεται τουλάχιστον μερικώς από το Ras ογκογονίδιο (Tuck et al., 1991, Leco et al., 1992).

Η ΙΜΕΟ 2 είναι μια 21 ΚD μη γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη, η οποία αρχικά απομονώθηκε από τα κύτταρα του μελανώματος. Είναι ένας αναστολέας της ΜΕΟ2 και εκκρίνεται ως σύμπλεγμα με την προ-ΜΕΟ2 από ορισμένα κύτταρα (π.χ. ινοβλάστες), ενώ άλλα κύτταρα (π.χ. κυψελιδικά μακροφάγα), εκκρίνουν την ΙΜΕΟ2 σε μια αδέσμευτη μορφή.

Η ΙΜΕΟ3 κλωνοποιήθηκε από καρκινικά κύτταρα του μαστού και είναι διαφορετική από τις ΙΜΕΟ1, ΙΜΕΟ2 δεδομένου ότι έχει μόνο 25% ομολογία αμινοξέων με κάθε μια από αυτές.



Η IMEO4 είναι το νεότερο μέλος της οικογένειας των IMEOν και έχει κλωνοποιηθεί από κύτταρα της ανθρώπινης καρδιάς. Φαίνεται ότι μπορεί να αναστέλλει τόσο την διήθηση του όγκου όσο και την διαδικασία της μετάστασης.

Όσο αφορά την διήθηση του όγκου η αρχική άποψη ήταν ότι οι IMEOς αφού ήσαν αναστολείς των MEOν μπορούσαν να έχουν αντιδιηθητική και αντιμεταστατική δράση. Ωστόσο, πρόσφατες έρευνες υποδεικνύουν ότι οι IMEO είναι πολυλειτουργικά μόρια με εμφανή παράδοξα λειτουργικά αποτελέσματα στην αύξηση των όγκων.

4.2.7. MEO και καρκίνος του μαστού

Από σημαντικές μελέτες που έχουν γίνει για τις MEO στον καρκίνο του μαστού, αρκετές εστιάστηκαν στην MMP-11, μια και το γονίδιο αυτό απομονώθηκε πρώτη φορά στον καρκίνο του μαστού. Αν και *in vitro* αυτή η MEO δείχνει ασθενή πρωτεασική αντίδραση, ακολούθως έχειδειχθεί ότι αυτή απουσιάζει από το φυσιολογικό μαζικό παρέγχυμα, ενώ είναι παρούσα στην πλειονότητα των διηθητικών καρκινωμάτων, συμπεριλαμβανομένου και του μυελοειδούς καρκινώματος. Οι περισσότερες μελέτες, έδειξαν να εντοπίζεται η MMP-11 στους ινοβλάστες που περιέβαλλαν άμεσα τα καρκινικά κύτταρα. Υπάρχουν ευρήματα τόσο σε ανοσοϊστοχημικές, όσο και σε επίπεδο *in situ* υβριδισμού μελέτες ότι τα νεοπλασματικά μαστικά κύτταρα μπορούν να προκαλέσουν παραγωγή της στρωμελυσίνης-3 (MMP-11) διεγείροντας στρωματικά κύτταρα, είτε με έναν παρακρινικό τρόπο λειτουργίας, είτε μέσω ενός κυττάρου-κυττάρου μηχανισμό επαφής. Έχειδειχθεί ότι τα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού, έχουν την ικανότητα να διεγείρουν άμεσα την περιοχή προαγωγής του γονιδίου της MMP-11. Ανοσοϊστοχημικά, έχει φανεί ότι ασθενείς με διηθητικό πορογενές καρκίνωμα μαστού, το οποίο παρουσίαζε μέτρια έως έντονη ανοσοαντίδραση για την MMP-11 είχαν στατιστικώς σημαντικά, μικρότερο διάστημα ελεύθερο νόσου, συγκριτικά με εκείνες που εμφάνιζαν ασθενή ή αρνητική ανοσοαντίδραση. Σε πολυπαραγοντική μελέτη που έγινε, διαπιστώθηκε ότι το επίπεδο της MMP-11, αποτελεί ισχυρή ανεξάρτητη προγνωστική παράμετρο για το διάστημα ελεύθερο νόσου, σε ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες.

Επίσης έχει βρεθεί ότι η ανοσοϊστοχημική έκφραση της MEO9 είναι σημαντικά υψηλότερη στα καρκινώματα μαστού με θετικούς λεμφαδένες, παρά σε αυτά με αρνητικούς λεμφαδένες. Επίσης ο αριθμός ενεργοποίησης του προ-MEO2 είναι σημαντικά μεγαλύτερος στα καρκινώματα με θετικούς λεμφαδένες από ότι στα καρκινώματα με αρνητικούς λεμφαδένες ή στα καλοήγη νεοπλάσματα (ινοαδένωμα). Σε μια πρόσφατη ανοσοϊστοχημική μελέτη που αφορούσε μεγάλη σειρά καρκινωμάτων μαστού τα περισσότερα εκ των οποίων διηθητικά πορογενή καρκινώματα, βρέθηκε ότι η θετική έκφραση για την MEO 2 συνδέονταν στατιστικώς σημαντικά με μειωμένη επιβίωση. Σε αυτή την μελέτη η οποία είχε ένα χρόνο παρακολούθησης των ασθενών γύρω στα 10 χρόνια, βρέθηκε ότι η θετικότητα για την MEO2 συνδυαζόταν με μια x 3,6 αύξηση του κινδύνου για θάνατο. Σε πολυπαραγοντική ανάλυση η MEO2, αποτελούσε έναν ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη.

Η στρωμελυσίνη-1 (MEO3), όπως και άλλες MEO πρώτα κλωνοποιήθηκε και αργότερα αποκλωνοποιήθηκε σαν ένα ειδικό για την καρκινογένεση-γονίδιο (Matrisian et al., 1985, Muller et al., 1988, Ostrowski et al., 1988). Επιπρόσθετα, η MEO3 αποκωδονόμοντας ένα μεγάλο αριθμό συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας,



μπορεί και ενεργοποιεί και άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα (ζελατινάσες Β και κολλαγενάσες) (Stenlicht and Werb, 1999).

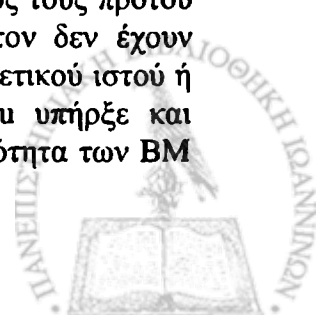
Η ΜΕΟ3 εκφράζεται από τα στρωματικά κύτταρα κατά την φυσιολογική διαδικασία της ανάπτυξης του μαζικού παρεγχύματος και υπερεκφράζονται κατά την διάρκεια της φάσης του απογαλακτισμού όταν υποστρέφει το μαζικό παρέγχυμα και τα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας αναδομούνται και οι κυψελίδες αποπίπτουν (Lund et al., 1996, Thomasset et al., 1998).



5. Βασική Μembrάνη και Άμορφες "Κοκκιώδεις" Ουσίες σε επίπεδο Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου

Στους σύνθετους οργανισμούς, όλοι οι ιστοί και τα όργανα, εμφανίζουν χαρακτηριστικά πρότυπα οργάνωσης, σαν αποτέλεσμα μάλλον συγκεκριμένης αλληλοεπίδρασης των κυτταρικών και μη στοιχείων, μέσου της οποίας επιτυγχάνεται η ανάπτυξη μιας αρχιτεκτονικής και ταυτόχρονα λειτουργικής μονάδας. Αν και τυπικά, το επιθήλιο και το γειτονικό στρώμα συνδετικού ιστού, φαίνεται να ανευρίσκονται σε στενή σύνδεση (άμεση σχέση) μεταξύ τους, στην ουσία αποτελούν δύο ξεχωριστές καλά περιγεγραμμένες περιοχές. Αυτές διαχωρίζονται από ένα διάστημα, το οποίο οριοθετείται από μια δομή, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στις βιοχημικές αλληλοεπιδράσεις μεταξύ του επιθηλίου και του στρώματος και ο όρος με τον οποίο μας είναι γνωστή είναι βασική μεμβράνη (BM). Η BM αποτελείται από ένα δίκτυο λεπτών ινών, οι οποίες ονομάζονται δικτυωτές ίνες και διαχωρίζει τα επιθηλιακά κύτταρα, από τον περιβάλλοντα αυτά συνδετικό ιστό. Ανάλογες δομές όπως έχουμε ήδη αναφέρει έχουν περιγραφεί γύρω από μη επιθηλιακούς ιστούς, όπως τα αγγεία και ιδιαίτερα τα τριχοειδή, τις λείες και γραμμωτές μυϊκές ίνες, γύρω από τα λιποκύτταρα και τις νευρικές ίνες. Η ανίχνευση των BM σε ιστολογικό επίπεδο, ενισχύθηκε με τις ιστοχημικές μεθόδους αργύρου και περιοδικού οξέος (PAS), αλλά μέχρι πρόσφατα ίσχυε η αρχική θεώρηση, ότι δηλαδή οι BM αποτελούσαν συνέχεια των ινιδίων του κολλαγόνου και όπως τα τελευταία, παράγονταν από μεσεγγυματογενή κύτταρα.

Στην κλασική ιστοπαθολογία η παρουσία ενός έντονου, όχι όμως απαραίτητα φυσιολογικού δικτύου δικτυωτών ινών, γύρω από νεοπλασματικές κυτταρικές νησίδες, θεωρείτο επιθηλιακής προέλευσης για έναν δεδομένο όγκο, ενώ η παρουσία άφθονων δικτυωτών ινών γύρω από μεμονωμένα κύτταρα του όγκου, θεωρείτο γενικά μεσεγγυματικής προέλευσης. Δεδομένου ότι μια "άθικτη" BM γύρω από τα νεοπλασματικά επιθηλιακά κύτταρα, θεωρείτο δείκτης ύπαρξης μιας ορθής αλληλεπίδρασης μεταξύ επιθηλιακών και στρωματικών στοιχείων, αυτό εκλήφθηκε ως στοιχείο ενδεικτικό υψηλής διαφοροποίησης και συνδέθηκε ως εκ τούτου με περισσότερο ή λιγότερο καλή πρόγνωση κλινικά. Αντίθετα, η απουσία ή η παρουσία μιας εμφανώς ελλειμματικής BM, με τα νεοπλασματικά κύτταρα να διαχέονται στο περιβάλλον στρώμα, θεωρήθηκε χαρακτηριστικό των κακοήθων νεοπλασμάτων. Ο μηχανισμός αυτής της υποτιθέμενα διαταραγμένης αλληλεπίδρασης όγκου-στρώματος ουδέποτε διευκρινίσθηκε πλήρως. Ο Ewing είχε υποστηρίξει ότι σε μερικά επιθετικά *in situ* comedo καρκινώματα του μαστού, η ασκούμενη μηχανική πίεση από τα συνεχώς υπερπλάσόμενα κύτταρα έχει σαν αποτέλεσμα αυτά να εγκολεαστούν διαμέσω των διατεταμένων BM προς τον συνδετικό ιστό επιπροσθέτοντας ότι ορισμένα καρκινικά κύτταρα έχουν ικανότητα αμοιβαδοειδούς κίνησης η οποία τα διευκολύνει στην διήθηση των ιστών. Η έννοια του ενδοεπιθηλιακού καρκινώματος (*in situ*) ανάγεται παλιά στον χρόνο και από το 1904 είχαν θεσπισθεί διαγνωστικά κριτήρια για τέτοιες βλάβες του δέρματος και του τραχήλου της μήτρας. Η σύγχρονη άποψη του καρκινώματος *in situ* πρωτοεισήχθηκε από τον Broders ο οποίος το 1932 είχε γράψει ότι " το καρκίνωμα *in situ* είναι μια κατάσταση όπου τα κακοήθη επιθηλιακά κύτταρα και οι απόγονοι τους βρίσκονται μέσα ή κοντά σε θέσεις που πριν καταλαμβάνονταν από του προγόνους τους προτού οι τελευταίοι υποστούν κακοήθη μετασχηματισμό. Αυτά τουλάχιστον δεν έχουν μεταναστεύσει πέραν από την επιφάνεια συμβολής επιθηλίου και συνδετικού ιστού ή της έτσι αποκαλούμενης BM. Η έννοια του καρκινώματος *in situ* υπήρξε και εξακολουθεί να είναι εξαιρετικά χρήσιμη αλλά η υποτιθέμενη ακεραιότητα των BM



έχει σε μερικές περιπτώσεις αμφισβητηθεί. Επίσης υπήρχε η αίσθηση ότι οι ΒΜ μπορεί να μην αποτελούσαν μια μόνιμα στατική δομή και ότι είχαν μια δυναμική στην λειτουργία τους. Έτσι λοιπόν υποστηρίχθηκε ότι μερικά καρκινώματα υψηλής διαφοροποίησης μπορεί να διεγείρουν τον περιβάλλοντα συνδετικό ιστό να εναποθέτει ΒΜ. Ωστόσο η άποψη ότι όλες οι ΒΜ ήταν μεσεγγυματογενή παράγωγα παρέμεινε μέχρι πρόσφατα αναμφισβήτητη και μάλιστα ενισχύθηκε από την διαπίστωση ότι ΒΜ, κολλαγόνο και ρετικουλίνη μοιράζονται κάποιες ιστοχημικές ιδιότητες.

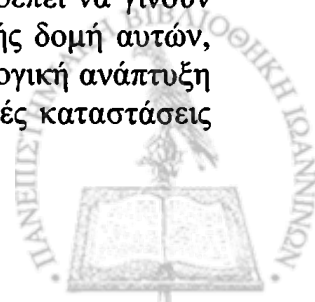
Με την βοήθεια του ΗΜ έγινε γρήγορα εμφανές ότι οι ΒΜ αποτελούντο από αρκετά διακριτά συστατικά και έτσι προέκυψε ο όρος του Βασικού Πετάλου (ΒΠ). Το ΒΠ ορίζεται ως μια συνεχής στοιβάδα (*lamina densa*) τυχαία τοποθετημένων και στενά συνδεδεμένων ινιδίων που περικλείονται μέσα σε μια πυκνή άμορφη "κοκκιώδη" ουσία και διαχωρίζονται από την υπερκείμενη κυτταρική μεμβράνη από μια στενή ανοιχτοχρωματική ζώνη (*lamina lucida*). Η *lamina lucida* διαπερνάται από λεπτότερα ινίδια μέσω των οποίων λέγεται ότι η κυτταρική μεμβράνη στηρίζεται στο ΒΠ. Παρακείμενα του ΒΠ υπάρχει ακόμα, μια άλλη ανώμαλη στοιβάδα θεμέλιας ουσίας και παχύτερων ινών, η οποία συντήκεται και εμφανίζεται, έτσι, συνεχόμενη με το περιβάλλον κολλαγόνο. Το πάχος του ΒΠ κυμαίνεται από 400-800 Angstroms και της *lamina lucida* από 150-300 Å. Αυτή η δομή του ΒΠ δεν μπορεί να ανιχνευθεί με το οπτικό μικροσκόπιο και ενώ με αυτό η έννοια της ΒΜ είναι ταυτόσημη με την δομή που εδώ ορίσαμε ως ΒΠ το τελευταίο είναι αποκλειστικά έρημα του ΗΜ. Ερευνητικές μελέτες που ακολούθησαν στο ΗΜ έδειξαν ότι ένα ευρύ φάσμα καρκινωμάτων του ανθρώπου όπως και των ζώων, διατηρεί την ικανότητα να παράγει και να εκκρίνει ΒΠ με ποικίλλουσες ωστόσο ποιοτικές και ποσοτικές διακυμάνσεις. Είναι ένας όρος του οπτικού μικροσκοπίου, αντίστοιχος με τον όρο Βασικό Πέταλο (*Basal lamina*) του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, (λιγότερο συχνά αναφέρεται ως *lamina densa*) (Eyden 1996, 146-148). Το Βασικό Πέταλο σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο αντιστοιχεί σε μια στιβάδα λεπτοκοκκιώδους υφής πρωτεϊνών.

Συνήθως ως *lamina lucida* αναφέρεται μία ανοιχτοχρωματική περιοχή, η οποία διαχωρίζει το ΒΠ από την κυτταρική μεμβράνη. Μπορεί να συνυπάρχουν και άλλα δομικά στοιχεία: π.χ. ανάμεσα στην επιδερμίδα και στο χόριο, όπως και ανάμεσα στο μαστικό επιθήλιο και στο ενδολόβιο στρώμα, το ΒΠ περιέχει επιπλέον κοντά, ραβδωτά ινίδια κολλαγόνου τύπου VII.

Το ΒΠ περιέχει έναν αριθμό γλυκοπρωτεϊνών οι οποίες στην πλειονότητα τους είναι ΛΜ και κολλαγόνο τύπου IV. Η ταυτοποίηση αυτών των πρωτεϊνών έχει επιτευχθεί με την χρήση ειδικών αντισωμάτων.

Δεδομένου ότι τα τελευταία χρόνια η ανοσοϊστοχημεία έχει αναδειχθεί ως η πλέον δημοφιλής τεχνική στην διάγνωση και στην έρευνα συγκριτικά με το ΗΜ, η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της ΛΜ και του κολλαγόνου αποτελεί δείκτη της ΒΠ (Nerlich et al., 1997).

Υπάρχουν ωστόσο παρατηρήσεις στην διεθνή βιβλιογραφία οι οποίες υποδεικνύουν, ότι μπορεί να ανιχνεύονται ανοσοϊστοχημικά αυτές οι πρωτεΐνες ακόμα και όταν δεν υπάρχει δομικά κατασκευασμένο ΒΠ. Οι παρατηρήσεις αυτές υπαινίσσονται ότι η ανοσοϊστοχημεία μπορεί μεν να παρέχει πληροφορίες για την σύνθεση των πρωτεϊνών αλλά δεν μπορεί να παρέχει ακριβείς πληροφορίες για την οργανοειδή δομή τους σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο. Στην περίπτωση του ΒΠ πρέπει να γίνουν κατανοητά αμφότερα, η σύνθεση του σε πρωτεΐνες και η οργανοειδής δομή αυτών, προκειμένου να επεξηγηθούν φυσιολογικοί μηχανισμοί στην εμβρυολογική ανάπτυξη του επιθηλιακού ιστού, καθώς και η συμπεριφορά του σε παθολογικές καταστάσεις (όπως π.χ. στην μετάσταση).



Είναι γνωστό ότι η αρχιτεκτονική δομή της βασικής μεμβράνης ποικίλει από ιστό σε ιστό και μάλιστα σε μερικές περιπτώσεις έχουμε πάχυνση και απουσία της lamina lucida. Τα τελευταία συσχετίζονται με τον επιθηλιακό ιστό (Martinez-Hernandez and Amenta, 1983).

Μια από τις περιπτώσεις όπου το ΚΛ και η ΛΜ μπορούν να ανιχνευθούν ανοσοϊστοχημικά επί απουσίας οργανωμένου ΒΠ είναι στις δικτυωτές ίνες του λεμφαδένα (Forket et al., 1977, Tykocinski et al., 1983, Kramer et al., 1988). Ένα από τα διακριτικά χαρακτηριστικά των ινών αυτών είναι η παρουσία εστιών οι οποίες αποτελούνται από θεμέλια ουσία λεπτοκοκκιώδους υφής και αναφέρονται ως συστατικά άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας των άμορφων ουσιών.

5.1. Άμορφες "κοκκιώδεις" ουσίες: μια νέα έννοια στην Παθολογική Ανατομική

Αυτοί οι όροι επισημαίνουν την διαφορά στην μορφολογία από άλλα κοινά συστατικά πρωτεϊνικής ουσίας, όπως του κολλαγόνου, ελαστίνης, αμυλοειδούς και ινικής, τα οποία έχουν μια οργανωμένη και συχνά διακριτή μορφολογία σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο.

Στις δικτυωτές ίνες, τα συστατικά της άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας περικλείουν ΛΜ και ΚΛ (Kramer et al., 1988, Berston et al., 1994). Έχει υποδειχθεί ότι αυτές οι πρωτεΐνες, παίζουν κάποιο ρόλο στην τροποποίηση της μετανάστευσης, στην επίταση της συγκόλλησης και στον πολλαπλασιασμό των μεθιστάμενων καρκινικών κυττάρων (Kramer et al., 1988, Berston et al., 1994, Brodt 1991). Σε μια πρόσφατη μελέτη, που αφορά στην περιαγγειακή άμορφη "κοκκιώδη" ουσία στο κακόηθες μελάνωμα (Lugassy et al., 1997), έχει προταθεί ότι ενέχεται στην επίταση της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων, λόγω του γεγονότος ότι αυτή δεν είναι συνδεδεμένη σε μια οργανωμένη μεμβράνη (ΒΠ) και ως εκ τούτου μπορεί να περικλείει μοριακές περιοχές οι οποίες είναι ελεύθερες, μέσω των οποίων μπορεί να επηρεάσει τις κυτταρικές βιολογικές λειτουργίες. Αυτές λοιπόν οι άμορφες "κοκκιώδεις" ουσίες μπορεί να παίζουν ενεργό ρόλο στον έλεγχο μερικών εκ των θεμελιωδών λειτουργιών της αναπτυξιακής βιολογίας και της παθολογίας.

Οι άμορφες "κοκκιώδεις" ουσίες μπορούν να προσδιοριστούν με το ΗΜ και αυτή η τεχνική απαιτείται για την ταυτοποίησή τους. Ωστόσο επειδή το ΗΜ μέχρι και σήμερα δεν αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική το κεφάλαιο των άμορφων "κοκκιωδών" ουσιών δεν έχει επαρκώς μελετηθεί και κατανοηθεί.

Αυτή η σύντομη ανασκόπηση αναδεικνύει μερικές από τις άμορφες ουσίες που ανευρίσκονται ειδικά σε παθολογικές καταστάσεις και τονίζει δυνητικούς βιολογικούς όρους και άξονες μελλοντικής έρευνας.

5.2. Άμορφες "κοκκιώδεις" ουσίες ορισμός και κατανομή

Υπάρχουν περιπτώσεις παρόλα αυτά όπου είναι δυνατόν η ΛΜ και το ΚΛ να ανιχνευθούν ανοσοϊστοχημικά χωρίς ωστόσο να είναι εμφανές ένα κλασσικά οργανωμένο ΒΠ. Τέτοιο εύρημα έχει αναφερθεί πρόσφατα στο κακόηθες μελάνωμα. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της διερεύνησης της επαφής μεταξύ κακοήθων μελανοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων, σε μερικές περιπτώσεις βρέθηκε μια άμορφη "κοκκιώδη" ουσία, εντελώς διαφορετική από ένα καλά οργανωμένο ΒΠ. Ταυτόχρονα σε αυτή την περιοχή αναδείχθηκε ανοσοϊστοχημικά έκφραση της ΛΜ και του ΚΛ, αν και για το τελευταίο ήταν ασθενέστερη. Αυτή λοιπόν είναι μια περίπτωση όπου η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση της ΛΜ και του ΚΛ δεν συμπίπτουν με την υπερμικροσκοπική παρουσία ενός ΒΠ.



Οι εστίες άμορφου υλικού το οποίο περιέχει πρωτεΐνες φυσιολογικά ανευρισκόμενες σε ένα οργανωμένο ΒΠ μπορούν να αναφέρονται ως άμορφες ουσίες και στην περίπτωση εκείνη που παρατηρήθηκε στο κακόηθες μελάνωμα ως περιενδοθηλιακές άμορφες ουσίες.

Αυτές ωστόσο δεν περιορίζονται μόνο στο μελάνωμα, αλλά έχουν ανιχνευθεί και σε καρκινώματα, λεμφώματα, μη νεοπλασματικές λεμφούπερπλαστικές αλλοιώσεις (νόσος Rosai-Dorfman) και σε έναν κακοήθη όγκο διάμεσων κυττάρων του όρχεως (Leyding cell tumor). Έχουν επίσης διαπιστωθεί στους φυσιολογικούς ώριμους και αναπτυσσόμενους ιστούς, όπως στις δικτυωτές ίνες του λεμφαδένα (Forkert et al., 1977, Kramer et al., 1988), στα φυσιολογικά τριχοειδή αγγεία του εγκεφάλου και στα τριχοειδή αγγεία κοντά στα αστροκυττώματα (Bertossi et al., 1997), στις θέσεις του πλακούντα από τροφοβλάστη (Huppertz et al., 1988) και στον αναπτυσσόμενο πνεύμονα Biczyska et al., 1988). Επιπρόσθετα στην ανάπτυξη του νευρικού ιστού έχουν αναφερθεί μικροανατομικές περιοχές όπου υπάρχει ΛΜ, ενώ δεν υπάρχει υπερμικροσκοπικά εμφανές ΒΠ. Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι υπάρχουν εξωκυττάρια περιοχές οι οποίες περιέχουν ΛΜ και ΚΛ, γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες παραδοσιακά θεωρούνται ως συστατικά ενός οργανωμένου ΒΠ. Στην ορολογία του ΗΜ αυτές οι θέσεις είναι εστίες άμορφου υλικού (θεμέλια ουσία) οι οποίες μπορούν να αναφέρονται ως άμορφες ουσίες.

5.3. Ρόλος της άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας

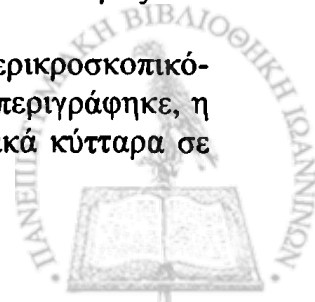
Υποστηρίζεται ότι οι άμορφες ουσίες στον λεμφαδένα ευοδώνουν την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων και πιθανά θεωρούνται υπεύθυνες για άλλες διαδικασίες όπως ο τοπικός πολλαπλασιασμός. Στις περιενδοθηλιακές άμορφες ουσίες στο κακόηθες μελάνωμα έχει προταθεί ότι οι ουσίες περιέχουν ΛΜ σε ελεύθερη μορφή (ελεύθερη ΛΜ) μη συνδεδεμένη μέσα στην μοριακή δομή του ΒΠ. Σε αυτές τις άμορφες ουσίες η ελεύθερη ΛΜ υποτίθεται ότι είναι ικανή να προάγει συγκεκριμένες βιολογικές λειτουργίες, τις οποίες δεν θα μπορούσε να επηρεάσει εάν ήταν συνδεδεμένη σε ένα οργανωμένο ΒΠ. Αυτές λοιπόν οι άμορφες ουσίες μπορεί να θεωρηθούν ότι έχουν ειδικές ιδιότητες ενεργοποίησης κάποιων κυτταρικών λειτουργιών, όπως μετανάστευση, πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση.

5.4. Περιαγγειακή άμορφη "κοκκιώδη" ουσία

Είναι ήδη γνωστό ότι η αγγειογένεση και η εξωκυττάρια ουσία, παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της μετάστασης (Folkman, 1990, Stracke et al., 1994). Ωστόσο, πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι η μικροαγγειακή πυκνότητα δεν σχετίζεται άμεσα με την πρόγνωση. Γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανά, είναι πολύ πιο σημαντική η ποιοτική αξιολόγηση της αγγείωσης ενός όγκου, σε σχέση με την ποσοτική του αξιολόγηση. Μάλλον οι ποιοτικές αλλαγές μπορεί να αποτελούν (δείκτες) στοιχεία υποβοηθητικά στην κατανόηση της διαδικασίας της μετάστασης.

Πολλές μελέτες έχουν γίνει αναφερόμενες στη σχέση που υπάρχει μεταξύ των ενδοθηλιακών και καρκινικών κυττάρων. Η είσοδος του καρκινικού κυττάρου στην αγγειακή κυκλοφορία παρεμποδίζεται από την παρουσία του περιενδοθηλιακού ΒΠ, το οποίο λειτουργεί σαν φραγμός, με αποτέλεσμα την αποφυγή της διασποράς του νεοπλάσματος.

Σε μια μελέτη που έγινε σε ανθρώπινα κακοήθη μελανώματα σε υπερμικροσκοπικό-ανοσοϊστοχημικό επίπεδο (C. Lugassy, B.P.Eyden et al, 1997), πρωτοπεριγράφηκε, η εικόνα ενός συμπλέγματος, αποτελούμενου από καρκινικά-ενδοθηλιακά κύτταρα σε



ένα υπόστρωμα αποτελούμενο από μια άμορφη "κοκκιώδη" ουσία. Στην συγκεκριμένη μελέτη η παρουσία αυτού του συμπλέγματος παρατηρήθηκε μόνο στις κακοήθειες και όχι σε καλοήθειες καταστάσεις. Αυτή η άμορφη "κοκκιώδης" ουσία -υπερμικροσκοπικός όρος- είναι φανερό ότι δεν εμφανίζει συγκεκριμένη δομή οργάνωσης, όπως σε έναν φυσιολογικό ιστό. Επιπλέον, με την ανοσοϊστοχημεία, παρατηρείται ότι η άμορφη "κοκκιώδη" ουσία όχι μόνο περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα ΛΜ αλλά και η κατανομή της είναι περισσότερο διάχυτη. Με βάση τα παραπάνω ευρήματα, θεωρήθηκε ότι αυτή η άμορφη "κοκκιώδη" ουσία, αποτελούνταν από μια "ελεύθερη" μορφή ΛΜ σε αντίθεση με την οργανωμένη μορφή της που αποτελεί συστατικό της ΒΜ και πιθανά αυτή η συγκεκριμένη διάταξη της στον χώρο, παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της μετάστασης. Αυτό πιθανά οφείλεται στο γεγονός ότι στην "ελεύθερη" μορφή της αναδεικνύονται και ενεργοποιούνται κάποιες θέσεις της, οι οποίες είναι καλυμμένες στην οργανωμένη μορφή της. Δεδομένου του ρόλου της ΛΜ στην μετανάστευση, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι η "ελεύθερη" περιαγγειική ΛΜ προάγει την μετανάστευση των νεοπλασματικών κυττάρων, μέσω της μεσεγγυματογενούς αρχής επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι η ΛΜ εμφανίζει πολλές ισομορφές (Burgeson et al., 1994, Mercurio, 1995), και ότι κάποιες από αυτές συσχετίζονται με συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις (Aumailley and Krieg, 1996), συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου (Jenq et al., 1994, Pyke et al., 1995). Το σύμπλεγμα αυτό φαίνεται να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της μετάστασης, από μελέτη που έγινε σε κακοήθη μελανώματα (Lugassy et al., 1997). Δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά στοιχεία, που να περιγράφουν την παρουσία και την πιθανή λειτουργία αυτής της ουσίας σε καρκινώματα του μαστού.

Πρόσφατα, αρκετοί συγγραφείς έχουν περιγράψει ιστούς που εμφανίζουν περιαγγειακή ανοσοαντίδραση για τις πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης, αλλά σε αυτές τις περιπτώσεις διαπιστώνεται μια αντικατάσταση των συστατικών του ΒΠ (lamina densa/lamina lucida) από ένα άμορφο "κοκκιώδες" υλικό. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται κακοήθεις όγκοι, αντιδραστικές καταστάσεις και μια περίπτωση φυσιολογικού ιστού (Lugassy et al 1997, 1999; Eyden 1999a,b; Eyden and Tzaphlidou 2000; Eyden et al 2000). Πρόσφατα, άμορφη "κοκκιώδη" ουσία περιγράφηκε και στην επιφάνεια ινοβλαστών καλοήθων νεοπλασμάτων (Eyden, Yamazaki and Banerjee 2000), γεγονός το οποίο δείχνει την δυνατότητα οργάνωσης παρόμοιας δομής σε κύτταρα που φυσιολογικά δεν εμφανίζουν βασική μεμβράνη. Στην μελέτη αυτή η περιαγγειακή άμορφος ουσία εμφανίζεται περισσότερο με την μορφολογία λεπτών στρωμάτων μεταξύ ενδοθηλίου και παρακείμενων κυττάρων.

5.5. Μεταβολές βασικής μεμβράνης σε φυσιολογικούς και παθολογικούς ιστούς

Όπως αναφέρεται, υπάρχουν παραδείγματα κάποιων φυσιολογικών και παθολογικών ιστών, οι οποίοι παρεκκλίνουν αυτού του πρότυπου δομής του ΒΠ. Τα παραδείγματα αυτά είναι τα παρακάτω:

Φυσιολογικοί Ιστοί

- Η μεμβράνη του Descemet, στους οφθαλμούς, η οποία εμφανίζει ένα άφθονο άμορφο υλικό, σαν μια πάχυνση της lamina densa επί απουσίας της lamina lucida
- Η εξωτερική lamina των περινευρίων κυττάρων (perineurial cells) η οποία μπορεί να αποτελείται από lamina densa επί απουσίας lamina lucida (Eyden 1996)



- Η lamina densa της ΒΜ των σπειραμάτων συνήθως είναι παχυσμένη με μια ανώμαλη ή λεπτυσμένη lamina lucida (Richman et al)
- Τα αγγεία της φυσιολογικής εγκεφαλικής ουσίας εμφανίζουν ένα κοκκιώδες υλικό επί απουσίας της lamina lucida/lamina densa (Eyden 1999)

Παθολογικοί ιστοί, συμπεριλαμβανομένων και των όγκων

- Η επιφάνεια των κυττάρων του χονδροειδούς συριγγώματος, μπορεί να εμφανίζει ένα κοκκιώδες υλικό επί απουσίας της lamina lucida (Eyden 1996)
- Η ζώνη της ΒΜ του μαζικού επιθηλίου των ινοαδενωμάτων που επιδεικνύει πολλαπλές στοιβάδες της lamina densa (Watson et al 1987; Ghadially)
- Τα αγγεία του κοκκιώδους ιστού τα οποία εμφανίζουν ένα πυκνό υλικό δίπλα στα ενδοθηλιακά κύτταρα χωρίς την παρουσία της lamina lucida
- Στο κακόηθες μελάνωμα τα αγγεία εμφανίζουν ένα κοκκιώδες υλικό δίπλα στα ενδοθηλιακά κύτταρα χωρίς την παρουσία της lamina lucida (Lugassy et al 1997)
- Στο ενδομητριοειδές αδενοκαρκίνωμα τα αγγεία εμφανίζουν ανώμαλες μάζες κοκκιώδους υλικού, οι οποίες θεωρείται ότι περιέχουν πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης, μέσω της ιδιότητας αυτών να αντιπαρατίθονται με την επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, χωρίς την lamina lucida (Horbelt et al)
- Τόσο στον αντιδραστικές όσο και στις νεοπλασματικές λεμφοειδείς υπερπλασίες, μπορεί να εμφανίζεται περιαγγειακά κοκκιώδες υλικό επί απουσίας του βασικού πετάλου (Eyden 1999a, b)
- Στους στρωματικούς όγκους του γαστρεντερικού σωλήνα, μπορεί να υπάρχουν νιφαδοειδείς εστίες, ενός υλικού που φαίνεται να αποτελεί ποικιλία της lamina densa (Eyden 1999)

5.6. Άμορφη "κοκκιώδη" ουσία και μαστός

Το μεσοδιάστημα μεταξύ των νεοπλασματικών νησίδων και του παρακείμενου στρώματος, στον καρκίνο του μαστού, έχει ήδη μελετηθεί σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο. Στις μελέτες αυτές φαίνεται η παρουσία ενός μονού, καλά καθορισμένου ΒΠ (Ahmed, 1974, Gould and Battifora 1976, Chomette et al., 1990, Peyrol et al., 1997), με διάφορες χωροδιαταξικές ποικιλίες όπως πολυστοιβαδωτή και δικτυωτή οργάνωση αυτού (Gould and Battifora 1976), και ως εστιακή ή διακεκομμένη οργάνωση του ΒΠ (Chomette et al., 1990). Σε άλλες περιπτώσεις, συνήθως το ΒΠ απουσιάζει (Ahmed, 1974, Gould et al., 1975, Gould and Battifora 1976, Eusebi et al., 1977, Harris and Ahmed 1977, Hassan and Olaizola 1979, An et al., 1984, Shousha et al., 1986, 1994, Wells and Ferguson 1988, Pucci-Minafra et al., 1989, Gorczyca et al., 1993).

Η παρουσία των άμορφων "κοκκιωδών" ουσιών, είτε αυτές παρατηρούνται σε περιαγγειακή εντόπιση είτε σε περιενδοθηλιακή βασικού τύπου εντόπιση, στον καρκίνο του μαστού, δεν έχουν σχεδόν καθόλου περιγραφεί. Υπάρχουν μόνο μεμονωμένες περιπτώσεις που πιθανά θα μπορούσε να θεωρηθεί ως άμορφο "κοκκιώδες" υλικό, αλλά οι περισσότερες φωτογραφίες που υπάρχουν από αυτές είναι συνήθως χαμηλής μεγέθυνσης ή συμπτωματικά δεν υπάρχει κανένα σχόλιο είτε στην λεζάντα είτε στο κείμενο.

Σε μια άλλη εργασία παρατηρήθηκε κάποια ανοιχτόχρωμη ουσία κατά την επιφάνεια των περικυττάρων σε διηθητικό καρκίνωμα του μαστού (Dvorak et al., 1981), η οποία πιθανά θα μπορούσε να αντιστοιχεί σε άμορφο "κοκκιώδες" υλικό, αλλά είναι πολύ δύσκολο να ερμηνευτεί έτσι, διότι δεν μνημονεύεται καθόλου στο κείμενο.



Επίσης, κάποια ανώμαλη πάχυνση του ΒΠ, ή οποία προσομοιάζει την εμφάνιση της άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας παρατηρήθηκε κατά την επιφάνεια μυοεπιθηλιακών κυττάρων σε διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (Ghosh 1980).

Σε ένα βλεννοεπιδερμοειδές καρκίνωμα (Hanna and Kahn 1985), παρατηρήθηκε κατά την επιφάνεια μυοεπιθηλιακών κυττάρων ουσία προσομοιάζουσα την άμορφη "κοκκιώδη" ουσία, αλλά δεν μνημονεύεται στο κείμενο.

Σε ένα μεταπλαστικό καρκίνωμα του μαστού, παρατηρήθηκε επίσης κάποια ανοιχτοχρωματική ουσία η οποία θα μπορούσε να αντιστοιχεί σε άμορφο "κοκκιώδες" υλικό κατά την επιφάνεια των νεοπλασματικών κυττάρων. Αυτό το υλικό θα μπορούσε να είναι άμορφη "κοκκιώδης" ουσία ή ίνες κολλαγόνου, αλλά δεν υπήρχε κανένα σχετικό σχόλιο (Jabson et al., 1991).

Ο Chomette et al., 1990, περιέγραψαν και ανέδειξαν εικονογραφικά μια "ομοιογενώς παχυσμένη και θολή βασική μεμβράνη" η οποία ήταν συσχετιζόμενη με την επιφάνεια μιας νεοπλασματικής νησίδας σε ένα ενδοπορικό καρκίνωμα του μαστού. Η μεγέθυνση της εικόνας είναι μικρή και έτσι είναι αρκετά δύσκολο να είναι κανείς σίγουρος για το ότι η εικόνα αυτή αντιστοιχεί σε παρουσία βασικού τύπου άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας, αν και ο όρος αυτός δεν χρησιμοποιείται, ούτε συζητείται η πιθανή βιολογική σπουδαιότητα αυτής της ουσίας.

Σε μια άλλη μελέτη έχει περιγραφεί ως "κοκκιώδες" υλικό μια πυκνοχρωματικό εμφάνιση κατά το μεσοδιάστημα μεταξύ της επιφάνειας μυοϊνοβλαστών (που βρισκόταν σε πολύ κοντινή απόσταση με τα νεοπλασματικά κύτταρα) και της επιφάνειας νεοπλασματικής νησίδας, σε διηθητικό καρκίνωμα μαστού (Tamini and Ahmed 1987), αλλά πιθανά αυτό αφορούσε σε άφθονο υλικό ινονεκτίνης το οποίο συσχετιζόταν με την συνένωση των μυοϊνοβλαστών και όχι μια βασικού τύπου άμορφη "κοκκιώδης" ουσία.

Βασικού τύπου άμορφη "κοκκιώδης" ουσία, μπορεί να δει κανείς σε μυελλοειδές καρκίνωμα μαστού (Εικόνα 3, Gould et al., 1975).

Επίσης βασικού τύπου άμορφη "κοκκιώδης" ουσία, σε μεγάλη ποικιλία πάχυνσης και οργάνωσης (δηλ. όταν υπάρχουν κάποιες θέσεις που παραμένει η τυπική δομή του ΒΠ lamina lucida/lamina densa) παρατηρείται σε αδеноμυοεπιθηλίωμα (Kjaer et al., 1984) όπου όμως αναφέρεται ως ΒΠ.

Ελάσματα του "υλικού βασικής μεμβράνης" που πιθανά αναπαριστά βασικού τύπου άμορφη "κοκκιώδης" ουσία, παρατηρήθηκε σε πορογενές καρκίνωμα μαστού (Reyrol et al., 1997).

Ακόμη σε μικροαδενική αδένωση του μαστού (Tavassoli and Norris 1983) υπάρχει κάποιο πυκνό βασικού τύπου υλικό το οποίο θα μπορούσε να εκληφθεί ως άμορφη "κοκκιώδης" ουσία, αλλά η μικρή μεγέθυνση της μικροφωτογραφίας (Εικόνα 5) δεν βοηθά καθόλου την αξιολόγηση.

Είναι επίσης ενδιαφέρον να σημειώσουμε ότι σε κυταροκαλλιέργεια φυσιολογικού μαζικού παρεγχύματος παρατηρήθηκε ότι η lamina lucida εξαφανίζεται (Halter and Glick 1983).

Ο Jao et al. (1980) απεικόνισε την παρουσία εξωκυττάριας βλέννης σε ένα κολλοειδές καρκίνωμα μαστού. Αυτή είναι άμορφη "κοκκιώδης" και is worth mentioning. Ωστόσο, αυτή αποτελείται από γλυκοζαμινογλυκάνες και είναι άσχετη με τις πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης.



5.7. Άμορφη ουσία και μυοϊνοβλάστες στον καρκίνο του μαστού

Οι μυοϊνοβλάστες, αυτά τα ενδιάμεσα κύτταρα αγνώστου προέλευσης, ανευρίσκονται αρκετά συχνά στο στρωματικό στοιχείο του καρκίνου του μαστού (Tsukada et al., 1987, Sappino et al., 1988, Ronnov-Jessen et al., 1992, Lazard et al., 1993).

Ο Barsky et al. (1984) έδειξαν μια ΜΙ η οποία βρισκόταν μόνο 0.5 nm μακριά από την επιφάνεια ενός διηθητικού καρκινώματος του μαστού σκίρου τύπου.

Ο Shousha et al., (1986) παρατήρησαν την παρουσία ΜΙ μόνο λίγων nm μακριά από τα νεοπλασματικά κύτταρα οι οποίες διαχωρίζονταν από αυτά με ίνες πυκνού κολαγόνου (όπως έχουμε δει και εμείς). Μερικές ΜΙ ανευρέθησαν σε απόσταση μόνο λίγα nm μακριά.

Οι Tamanni και Ahmed (1986) παρατήρησαν διακεκομμένο ΒΠ δίπλα σε ΜΙ (οι ΜΙ βρισκόταν μόνο λίγα nm και λίγα nm μακριά από τα νεοπλασματικά κύτταρα).

Οι Tamanni και Ahmed (1987) περιγράφουν ένα κοκκιώδες υλικό κατά την επιφάνεια των ΜΙ αλλά αυτό το υλικό είναι σχεδόν σίγουρο ότι αντιστοιχεί σε ινίδιο ινονεκτίνης.

Ο Tremblay (1987) περιγράφει κυτταρικά αποτρίμματα τα οποία έρχονται σε σχέση με την επιφάνεια των νεοπλασματικών κυττάρων, χωρίς να παρεμβάλλεται ανάμεσα τους ΒΠ, (όπως έχουμε δει και εμείς).

Ο Tremblay (1987), έχει περιγράψει την παρουσία ΜΙ οι οποίες απέχουν μεταξύ 100nm και πάνω από 2 nm από την επιφάνεια των νεοπλασματικών κυττάρων.



6. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν:

- η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση και συσχέτιση των συστατικών της Βασικής Μembrάνης (λαμίνη και κολλαγόνο τύπου IV), της εξωκυττάριας ουσίας (ινονεκτίνη και τενασκίνη) και των πρωτεολυτικών ενζύμων, στρωμελυσίνης 1 και καθεψίνης D
- η πιθανές συσχετίσεις των πρωτεολυτικών ενζύμων με τα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας
- η συγκριτική ανοσοϊστοχημική μελέτη έκφρασης της Τενασκίνης, Ινονεκτίνης, Λαμίνης και Κολλαγόνου τύπου IV με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους (μέγεθος του όγκου, ιστολογικό τύπο, βαθμό κακοηθείας, ορμονικούς υποδοχείς, λεμφαδενικές μεταστάσεις, απομακρυσμένες μεταστάσεις) και ο πιθανός προγνωστικός ρόλος αυτών
- παρατηρήσεις σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο των μεταβολών της δομής της βασικής μεμβράνης τόσο των νεοπλασματικών κυττάρων όσο και των αγγείων
- η σύγκριση αποτελεσμάτων απλού μικροσκοπίου και ευρημάτων ηλεκτρονικού μικροσκοπίου (μεταβολές προτύπου οργάνωσης των πρωτεϊνών της βασικής μεμβράνης)
- μελέτη των μεταβολών αυτών τόσο σε νεοπλασματικές νησίδες όσο και σε αγγεία κοντά και μακριά από τον όγκο



1. Υλικό και Μέθοδοι

1.1 Υλικό

Στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν 138 περιπτώσεις πρωτοπαθούς καρκίνου του μαστού με οπτικό μικροσκόπιο, ενώ σε 20 από αυτές πραγματοποιήθηκε επιπρόσθετα και υπερμικροσκοπική εξέταση.

Η συλλογή του υλικού πραγματοποιήθηκε, όσον αφορά το οπτικό μικροσκόπιο σε διάστημα 12 χρόνων (από το 1988 έως και το 2000), ενώ η συλλογή του υλικού για την υπερμικροσκοπική εξέταση πραγματοποιήθηκε σε διάστημα 3 χρόνων (από το 1997 έως και το 2000) και αφορούσε σε εγχειρητικά παρασκευάσματα διηθητικού καρκίνου του μαστού τα οποία εξαιρέθηκαν και παρακολούθηθηκαν στο Π.Π.Γ.Ν.Ιωαννίνων. Όλες οι ασθενείς είχαν υποβληθεί σε μαστεκτομή με λεμφαδενικό καθαρισμό της σύστοιχης μασχάλης. Η παρακολούθησή τους έγινε από την Ογκολογική Κλινική του Π.Π.Γ.Ν.Ιωαννίνων.

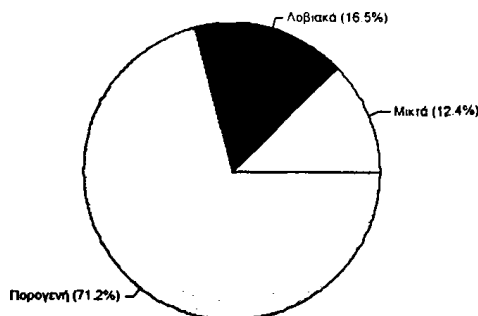
Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν από 28 έως 91 χρονών, με μέσο όρο ηλικίας των ασθενών τα 55.5 χρόνια. Το μέγεθος του όγκου (κυμαινόταν από 1 έως 17 εκ.). Τα καρκινώματα του μαστού τα οποία εξετάστηκαν με οπτικό μικροσκόπιο ήταν, στην πλειοψηφία τους πορογενούς τύπου (94/138) διαφόρων ιστολογικών υποτύπων, λοβιακά (24/138) και μικτά (20/138) (Διάγραμμα 1.1.1.).

Οι λεμφαδενικές μεταστάσεις (Διάγραμμα 1.1.2.) καταχωρήθηκαν και αναλύθηκαν ξεχωριστά. Απομακρυσμένες μεταστάσεις ανευρέθησαν σε 34 γυναίκες.

Σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο εξετάστηκαν 21 περιπτώσεις καρκίνου του μαστού, διαφορετικών ιστολογικών τύπων, τα οποία ήταν 14/21 πορογενή, 5/21 λοβιακά και 2/21 μικτά.

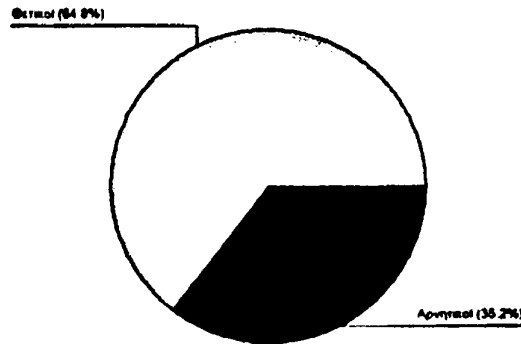
Σε 98 γυναίκες πραγματοποιήθηκε πλήρης παρακολούθηση αυτών τόσο ως προς την συνολική επιβίωση (overall survival) όσο και για το μεσοδιάστημα ελεύθερο νόσου (disease free survival). Ο μέσος όρος του χρόνου παρακολούθησης των γυναικών ήταν 5 χρόνια, με διάστημα παρακολούθησης από 3 έως 12 χρόνια.

Σε 98 γυναίκες πραγματοποιήθηκε πλήρης παρακολούθηση αυτών τόσο ως προς την συνολική επιβίωση (overall survival) όσο και για το μεσοδιάστημα ελεύθερο νόσου (disease free survival). Ο μέσος όρος του χρόνου παρακολούθησης των γυναικών ήταν 5 χρόνια, με διάστημα παρακολούθησης από 3 έως 12 χρόνια.



Διάγραμμα 1.1.1. Ιστολογικοί τύποι καρκινωμάτων





Διάγραμμα 1.1.2. Διήθηση μασχαλιαίων λεμφαδένων

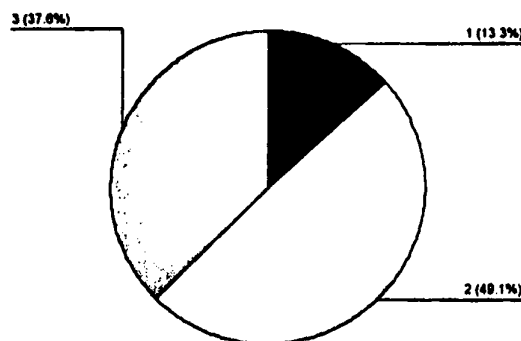
1.1.1 Οπτικό μικροσκόπιο

Χρησιμοποιήθηκε υλικό αρχείου, το οποίο είχε μονιμοποιηθεί σε διάλυμα φορμόλης 10% και είχε εγκλεισθεί σε παραφίνη. Οι ληφθείσες τομές ήταν πάχους 4 μμ. Μία τομή από κάθε περίπτωση χρώστηκε με ηωσίνη-αιματοξυλίνη και χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των ιστοπαθολογοανατομικών αλλοιώσεων.

Η ιστολογική ταξινόμηση των καρκινωμάτων έγινε σύμφωνα με την ιστοπαθολογική κατάταξη του διηθητικού καρκίνου του μαστού, κατά Νίκη Ι. Αγνάντη και Ν. Αποστολίκα (Αγνάντη, 2000).

Η εκτίμηση του ιστολογικού βαθμού διαφοροποίησης των καρκινωμάτων του μαστού, έγινε σε τομές (H-E) από έναν έμπειρο παθολογοανατόμο (Ι. Ε.), σύμφωνα με την τροποποιημένη διαβάθμιση των Scarff-Bloom and Richardson, όπου αξιολογήθηκε :η παρουσία σωληνωδών σχηματισμών, η πυρηνική μορφολογία και η μιτωτική δραστηριότητα των νεοπλασματικών κυττάρων και ταξινομήθηκαν σε: grade 1, grade 2 and grade 3 σε αντιστοιχία καλά, μέτρια και φτωχά διαφοροποιημένο διηθητικό καρκίνωμα του μαστού (Elston και Ellis 1991) (Διάγραμμα 1.1.3.)

Επίσης εξετάστηκαν περιπτώσεις με φυσιολογικό μαζικό ιστό, με ινοαδενώματα και με ινοκυστική μαστοπάθεια.



Διάγραμμα 1.1.3. Ιστολογικός βαθμός κακοηθείας



1.1.2 Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Χρησιμοποιήθηκε νωπό υλικό, το οποίο είχε μονιμοποιηθεί σε διάλυμα γλουταραλδεύδης 2.5% σε 0.1 M ρυθμιστικού διαλύματος (cacodylate buffer) και είχε εγκλεισθεί σε ρητίνη. Οι πρώτες ληφθείσες τομές ήταν πάχους περίπου 1 μm και χρώστηκαν με μπλέ τολουϊδίνης (toluidine blue). Αυτές εξετάσθηκαν σε οπτικό μικροσκόπιο όπου έγινε ο εντοπισμός των κατάλληλων προς εξέταση θέσεων. Στην συνέχεια κόπηκαν λεπτές τομές πάχους 500 \AA σε υπερμικροτόμο με διαμάντινο μαχαίρι. Η συλλογή των τομών έγινε σε χάλκινα πλέγματα των 400 mm. Οι τομές χρώστηκαν με οξεικό ουρανύλιο (uranyl acetate) και κιτρικό μόλυβδο (lead citrate). Η υπερμικροσκοπική παρατήρηση έγινε σε Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο τύπου JEOL-1200 EXII.



1.2 Περιγραφή μεθόδων

1.2.1 Οπτικό μικροσκόπιο

Ανοσοϊστοχημεία

Η ανοσοϊστοχημική μελέτη έγινε σε τομές παραφίνης πάχους 4 μμ. Η προέλευση και η αραίωση των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται στον Πίνακα 1.2.1. Η ανοσοϊστοχημική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή του συμπλέγματος της Αβιδίνης-Βιοτίνης-Υπεροξειδάσης, όπως έχει ήδη περιγραφεί μέχρι σήμερα (Hsu et al., 1981).

Επειδή η μονιμοποίηση έχει πολλές φορές δυσμενή αποτελέσματα για την διατήρηση της αντιγονικότητας των ιστών, χρησιμοποιήθηκαν κατά περίπτωση κάποιες μέθοδοι με σκοπό την αποκάλυψη των επιτόπων εκείνων, που έχουν "καλυφθεί" λόγω της μονιμοποίησης. Η διαδικασία αυτή περιγράφεται και με τον όρο "αντιγονική ανάκτηση" (antigen retrieval), και έχει ως αποτέλεσμα την αποκάλυψη, πριν από τα στάδια της ανοσοϊστοχημικής διαδικασίας αντιγονικών επιτόπων, με στόχο την ποιοτική βελτίωση των ανοσοχρώσεων. Οι μοριακοί μηχανισμοί της αποκάλυψης ή ανάκτησης δεν είναι πλήρως γνωστοί. (Νακοπούλου, 1999).

Τέτοιες μέθοδοι μεταξύ των άλλων είναι η επώαση με ποικιλία πρωτεολυτικών ενζύμων και η χρήση φούρνου μικροκυμάτων. Επώαση με πρωτεολυτικά ένζυμα και στην συγκεκριμένη περίπτωση με προνάση, εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη για την ανίχνευση των αντιγόνων της ΛΜ, ΙΝ, ΚΛ, ΤΝ, και της ΚΔ.

Αντισώματα	Προμηθευτές	Αραίωση	Χρόνος επώασης
Tenascin (M0636)#	Dako	1: 50	1 ώρα
Fibronectin (NCL.FIB)#	Novocastra	1: 100	1 ώρα
Collagen type IV (M0785)#	Dako	1: 50	1 ώρα
Laminin#	Menarin	1: 1000	1 ώρα
Cathepsin D (CD13A, A0561)#	Dako	1: 300	1 ώρα
Stromelysin (MM3)	Dako	1: 100	1 ώρα
ER (M7047)	Dako	1:50	1 ώρα
PgR (M3569)	Dako	1:75	1 ώρα
PC-10 (M0879)	Dako	1: 50	1 ώρα
Ki-67 (M0722)*	Dako	1: 10	1 ώρα

*Εφαρμογή φούρνου μικροκυμάτων

Επώαση με προνάση

Πίνακας 1.2.1.: Αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν

Συγκεκριμένα η ανοσοϊστοχημική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε περιελάμβανε τα παρακάτω στάδια:

- Αποπαραφίνωση, με εμβύθιση των τομών σε ξυλόλη για 20'. Αλλαγή της ξυλόλης έγινε στα πρώτα 10'.
- Ενυδάτωση των τομών σε κατιόντα οιοπνεύματα (100° οιν - 100° οιν - 96° οιν - 96° οιν) και απεσταγμένο νερό.
- Εμβύθιση των τομών σε μεθυλική αλκοόλη, που περιέχει 1% H₂O₂ για 30' (Σκοπός η δέσμευση της ενδογενούς υπεροξειδάσης).
- Πολύ καλή έκπλυση με απεσταγμένο νερό.
- Εφαρμογή φούρνου μικροκυμάτων 700W δύο φορές επί 15' ή επώαση με προνάση για 10'.



- Έκπλυση με απεσταγμένο νερό.
- Έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα tris-buffer-saline (TBS), pH=7.6
- Επικάλυψη των τομών με φυσιολογικό ορό κουνελιού, αραιωμένο 1/50 [normal rabbit serum-DAKO (Καλλιφρονάς)] ή με φυσιολογικό ορό χοίρου ίδιας αραιώσης [normal swine serum-DAKO (Καλλιφρονάς)], ανάλογα με το αν επρόκειτο για μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό αντίσωμα αντίστοιχα.
- Απομάκρυνση του ορού από τις τομές.
- Επικάλυψη των τομών με τον εκάστοτε πρωταρχικό αντιορό για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή ολονύκτια στους 4° C.
- Έκπλυση των τομών με διάλυμα TBS (2 φορές επί 10').
- Επικάλυψη των τομών με αντιορό κουνελιού έναντι ανοσοσφαιρίνης του ποντικού, αραιωμένο 1/500 [rabbit anti-mouse biotinylated-DAKO (Καλλιφρονάς)] ή με αντιορό χοίρου έναντι ανοσοσφαιρίνης του κουνελιού [swine anti-rabbit biotinylated-DAKO (Καλλιφρονάς)], ανάλογα με το αν επρόκειτο για μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό αντίσωμα, αντίστοιχα για 30'.
- Έκπλυση των τομών με διάλυμα TBS (2 φορές επί 5').
- Επικάλυψη των τομών με αντιδραστήριο του συμπλέγματος αβιδίνης-βιοτίνης [ABC complex-DAKO (Καλλιφρονάς)] για 60'.
- Έκπλυση των τομών με διάλυμα TBS (2 φορές επί 5').
- Επικάλυψη των τομών με φρέσκο διάλυμα χρωμογόνου, που περιέχει 0.035% διαμινοβενζιδίνη (DAB), σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος TBS (ενεργοποιημένου από υπεροξείδιο του υδρογόνου) και έλεγχος των πλακιδίων με το κοινό μικροσκόπιο, μέχρι να γίνει ορατό το φαιό χρώμα των κυττάρων.
- Έκπλυση των τομών με απεσταγμένο νερό.
- Χρώση των τομών με αιματοξυλίνη Harris 10% για 2'.
- Έκπλυση των τομών με νερό βρύσης.
- Αφυδάτωση των τομών με ανιόντα οινοπνεύματα (96° οιν - 96° οιν -100° οιν - 100° οιν).
- Καθαρισμός των τομών σε ξυλόλη (Ξ-Ξ)
- Επικάλυψη των τομών με ειδική κόλλα.

1.2.2 Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο

Η παρασκευαστική μέθοδος του ιστού για την υπερμικροσκοπική εξέταση αυτού σε γενικές γραμμές περιλαμβάνει τα εξής:

- Άμεση μονιμοποίηση του ιστού σε διάλυμα 2.5% γλουταραλδεϋδης σε 0.1M Cacodylate Buffer (pH 7.4) για 4 ώρες
- Ξέπλυμα με cacodylate-buffer (x3)
- Επώαση με διάλυμα τετροξειδίου του οσμίου 1% [buffered osmium tetroxide (OsO₄)] για 2 ώρες
- Αφυδάτωση του ιστού με ανιόντα οινοπνεύματα (30° οιν 50° οιν 70° και 90° οιν)
- Εγκλεισμός του ιστού σε ρητίνη

Αναλυτικότερα η παρασκευαστική διαδικασία περιγράφεται παρακάτω:

1^η ημέρα:

0900: Κόβουμε τον ιστό σε μικρά κομμάτια 1mm³. Αφήνουμε τα κομμάτια μέσα σε Sodium Cacodylate Buffer (SCB) σε συνεχή ανάδευση.

1459: Γρήγορο ξέπλυμα σε SCB

1500: Βάφουμε τα κομμάτια σε 1% Osmium Tetroxide



- 1600:** Ξεπλένουμε με Sodium Cacodylate
1610: Ξεπλένουμε με Sodium Cacodylate
1620: Γρήγορο ξέπλυμα με Sodium Acetate (1 λεπτό)
1621: 0,5% Uranyl Acetate όλη τη νύχτα μέσα σε ψυγείο σε συνεχή ανάδευση
 (18 ml Απεσταγμένο Νερό + 2gr 5% Uranyl Acetate αυτό είναι αρκετό για
 3 δείγματα)

2^η ημέρα:

- 0840:** Αφαιρούμε με πιπέτα το Uranyl Acetate. Ξεπλένουμε γρήγορα με
 απεσταγμένο νερό και αλλάζουμε τα πώματα των φιαλιδίων. Προσθέτουμε
 50% αλκοόλης και αναδεύουμε στον απαγωγό για 15 min.
0900: 70% αλκοόλης
1000: 70% αλκοόλης
1010: 95% αλκοόλης
1030: 95% αλκοόλης
1100: Γρήγορο ξέπλυμα σε 100% αλκοόλης το αφαιρούμε και μετά 100% αλκοόλης
 x 3 αλλαγές
1200-1300: Acetone x 3 αλλαγές (κατά την διάρκεια αυτή φτιάχνουμε την ρητίνη)
1300: 33% Ρητίνη σε ακετόνη
1600: 67% Ρητίνη σε ακετόνη όλη τη νύχτα στον απαγωγό

3^η ημέρα:

- 0840:** Παρασκευάζουμε νέα ρητίνη. Απομακρύνουμε από το φιαλίδιο την τελικού
 σταδίου ρητίνη (67% ρητίνη) και την αντικαθιστούμε με την νέα. Σφραγίζουμε
 το φιαλίδιο (με το πώμα) και το κουνάμε. Το αφήνουμε για 20 min, μετά
 αφαιρούμε το πώμα, αφαιρούμε με πιπέτα την μισή ρητίνη και τοποθετούμε τα
 φιαλίδια στον απαγωγό σε αναδευτήρα για το υπόλοιπο της ημέρας.
 Προσθέτουμε τυπωμένους αριθμούς στα καλούπια και τα τοποθετούμε σε
 στεγνό θάλαμο.
1600: Χρησιμοποιώντας νέα ρητίνη γίνεται το σκηνώμα και το τοποθετούμε σε
 φούρνο 60° C για όλη την νύχτα.

*Συνολικά οι χρησιμοποιούμενες ουσίες για την μονιμοποίηση χρώση και εγκλεισμό του
 ιστού σε μπλοκ ρητίνης:*

Sodium Cacodylate buffer 0,1 M	Τοξικό
Glutaraldehyde	Βλαβερό
Osmium Tetroxide 1%	-
Sodium Acetate	Τοξικό
Uranyl Acetate 0,5%	Εύφλεκτο
Εθανόλη	Ερεθιστικό
Agar 100 Resin	Ερεθιστικό
DDSA	Ερεθιστικό
MNA	Βλαβερό
DMP-30	Βλαβερό
Acetone	Εύφλεκτο



Παρασκευή διαλυμάτων**Παρασκευή μονιμοποιητικού διαλύματος -Γλουταραλδεΐδη (2.5% σε 0.1M Cacodylate Buffer)**

Χημικές Ουσίες που χρησιμοποιούμε:

Sodium Cacodylate Buffer	Τοξικό
Glutaraldehyde 25%	Βλαβερό

Μέθοδος:

Παρασκευή 500ml

250 ml 0.2 M Sodium Cacodylate Buffer PH 7

200 ml Απεσταγμένο νερό

50 ml 25% Glutaraldehyde

Ανάδευση του διαλύματος.

Έλεγχος του PH. Πρέπει να είναι 7.2-7.5

Αποθήκευση στο ψυγείο. Διατηρείται για 6 μήνες.

Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος - 0.2 Sodium Cacodylate Buffer

Χημικές Ουσίες που χρησιμοποιούμε:

Sodium Cacodylate	Τοξικό
Υδροχλωρικό οξύ	Διαβρωτικό

Μέθοδος:

1lt γυάλινο δοχείο

500 ml ογκομετρικό κύλινδρο

1000 ml ογκομετρικό κύλινδρο

1. Ζυγίζουμε χρησιμοποιώντας ξύλινη σπάτουλα 42.8 gr Sodium Cacodylate και το βάζουμε στο δοχείο του 1 lt.
2. Προσθέτουμε 300 ml απεσταγμένο νερό στο δοχείο του 1 lt και το αναδεύουμε έως ότου διαλυθεί .
3. Προσθέτουμε απεσταγμένο νερό έως στα 500 ml.
4. Προσθέτουμε 80 ml 0.2 M HCl (φυλάγεται στο ψυγείο)
5. Προσθέτουμε απεσταγμένο νερό έως 1000 ml. Αυτό είναι το stock διάλυμα και το διατηρούμε στο ψυγείο. Για να παρασκευάσουμε διάλυμα 0.1M διαλύουμε ίση ποσότητα stock με απεσταγμένο νερό.
6. PH 7.4 (ρύθμιση)

Παρασκευή 1% Osmium Tetroxide σε 0.1M Sodium Cacodylate Buffer

Χημικές Ουσίες που χρησιμοποιούμε:

Osmium Tetroxide	Τοξικό
------------------	--------



Cacodylate Buffer 0.1M

Τοξικό

Μέθοδος:

- Osmium Tetroxide ή σε γυάλινες αμπούλες των 50 ml 2% διάλυμα ή σε φιαλίδια των 100 ml σε 2% διάλυμα.
- Όταν πρόκειται για τις γυάλινες αμπούλες, χρησιμοποιούμε 2 από αυτές, ενώ όταν πρόκειται για φιαλίδιο χρησιμοποιούμε 1 από αυτά και αδειάζουμε το περιεχόμενο σε σκεύος των 300 ml. Ξεπλένουμε τα υπολείμματα με Cacodylate Buffer.
- Προσθέτουμε 100 ml 0.2M Sodium Cacodylate Buffer και το διατηρούμε στο ψυγείο.

Παρασκευή Ρητίνης

Χρησιμοποιούμενες Χημικές Ουσίες:

Agar 100 Resin	Ερεθιστικό
DDSA	Ερεθιστικό
MNA	Βλαβερό
DMP-30	Βλαβερό
Acetone	Εύφλεκτο

Μέθοδος:

Η ρητίνη παρασκευάζεται σε στεγνό κύπελλο με τριπλή εκβολή.

Οι παρακάτω ποσότητες προστίθενται στο κύπελλο στον απαγωγό.

Agar 100 Resin	38.4 gr	(19.2gr	μισή ποσότητα)
DDSA	20.8 gr	(10.4gr	μισή ποσότητα)
MNA	20.8 gr	(10.4gr	μισή ποσότητα)
DMP-30	35 drops	(17 drops	μισή ποσότητα)

Η πλήρης ποσότητα γεμίζει 10 καλούπια.

Η ρητίνη αναδεύεται με το χέρι χρησιμοποιώντας πλαστικό αναδευτήρα για περίπου 2 mins. Μια διακριτή αλλαγή στο χρώμα θα συμβεί από το ανοιχτό κίτρινο στο σκοτεινό χρυσαφί. Η ρητίνη μετά αναδεύεται για 10 mins χρησιμοποιώντας μαγνητάκι.



2. Αξιολόγηση

2.1 Ανοσοϊστοχημείας

Οι παράμετροι που εξετάσθηκαν ανοσοϊστοχημικά ήταν:

1. Τα βασικά συστατικά της Βασικής Μembrάνης (BM) [Λαμινίνη (ΛΜ) και Κολλαγόνο τύπου IV (ΚΛ)]
2. Στοιχεία της Εξωκυττάριας Ουσίας (ΕΟ) [Ινονεκτίνη (ΙΝ και Τεναςκίνη ΤΝ)]
3. Πρωτεολυτικά ένζυμα [Στρωμελυσίνη (ΣΤΡ) και Καθεψίνη D (ΚD)]
4. Ορμονικοί υποδοχείς (ER, PgR)
5. Δείκτες πολλαπλασιασμού (Ki-67, PCNA)

Η αξιολόγηση των ανοσοϊστοχημικών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό των ανοσοφαινοτυπικών χαρακτηριστικών των υπό εξέταση όγκων, έγινε με βάση το αν υπήρχε θετική ανοσοαντίδραση των κυττάρων του ιστού, ανεξάρτητα από την ένταση και την έκταση ή την πιθανή ετερογένεια της χρωστικής αντίδρασης. Έτσι με την παρουσία έστω και μικρής έντασης ή έκτασης της έκφρασης των αντισωμάτων, ο ιστός χαρακτηριζόταν θετικός στο εκάστοτε αντιγόνο.

Σε αρκετές περιπτώσεις σαν θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν οι παρακείμενοι του όγκου φυσιολογικοί ιστοί, οι οποίοι συμπεριλαμβανόταν στην τομή. Η μικροσκοπηση και εκτίμηση των ανοσοϊστοχημικών αποτελεσμάτων έγινε τυφλά και ανεξάρτητα από 2 παρατηρητές (Ε.Ι, Α.Χ).

Η αξιολόγηση των βιολογικών δεικτών αναλυτικότερα:

2.1.1 Βασικών συστατικών της BM (ΛΜ, ΚΛ)

Η έκφραση τόσο της ΛΜ όσο και του ΚΛ ήταν κυρίως στρωματική τόσο στον πρωτοπαθή όγκο όσο και στους διηθημένους μασχαλιαίους λεμφαδένες. Σε σπάνιες περιπτώσεις παρατηρήθηκε και κυτταροπλασματική έκφραση αυτών. Αξιολογήθηκε η έκταση αυτών, όπως και το πρότυπο ανάπτυξης, το οποίο διακρίθηκε σε συνεχές ή διάχυτο και γραμμικό ή πολυστοιβαδωτό.

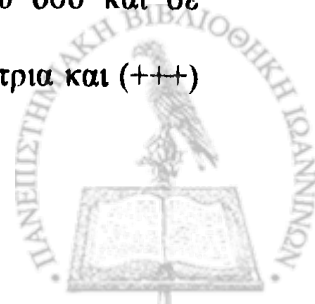
Πραγματοποιήθηκε ημιποσοτική εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των αντισωμάτων για ΛΜ, ΚΛ και οι διάφορες περιπτώσεις, ταξινομήθηκαν σε τρεις κατηγορίες, (+) ασθενής, (++) μέτρια και (+++) έντονη ανοσοαντίδραση.

2.1.2 Στοιχείων της ΕΟ (ΙΝ, ΤΝ)

Η έκφραση και των δύο αντισωμάτων ήταν κυρίως στρωματική. Σε σπάνιες περιπτώσεις παρατηρήθηκε και κυτταροπλασματική έκφραση αυτών. Αξιολογήθηκε η ένταση και η έκταση της έκφρασης αυτών τόσο σε κεντρικές όσο και σε περιφερικές θέσεις του όγκου, καθώς και το πρότυπο ανάπτυξης το οποίο διακρίθηκε σε συνεχές και διάχυτα αναπτυσσόμενο.

Πραγματοποιήθηκε ημιποσοτική εκτίμηση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των αντισωμάτων για ΙΝ και ΤΝ, τόσο σε κεντρικές θέσεις του όγκου όσο και σε περιφερικές θέσεις, και οι διάφορες περιπτώσεις, ταξινομήθηκαν:

- για τις κεντρικές θέσεις σε τρεις κατηγορίες, (+) ασθενής, (++) μέτρια και (+++) έντονη ανοσοαντίδραση



- ενώ για τις περιφερικές θέσεις, οι περιπτώσεις κατατάχθηκαν ως εξής: (-) απουσία έκφρασης, (-/+) θετικές και αρνητικές περιοχές σε περίπου ισόποσες αναλογίες και (+) θετικές σε αρκετή έκταση

2.1.3 Πρωτεολυτικών ενζύμων (ΣΤΡ, ΚD)

Η χρώση και των δύο αντισωμάτων ήταν κυτταροπλασματική υπό την μορφή λεπτών κοκκίων ή βολίων με ποικίλλουσα κατανομή.

Κάθε δείγμα, στην αρχή εξετάσθηκε πλήρως με χαμηλή μεγέθυνση και στην συνέχεια η αξιολόγηση έγινε με μεγάλη μεγέθυνση ($\times 400$). Η εκτίμηση της ανοσοαντίδρασης έγινε επί % του ποσοστού των θετικών νεοπλασματικών κυττάρων (ή και στρωματικών για την ΚD) σε σχέση με τον συνολικό αριθμό των κυττάρων, τα οποία μετρήθηκαν το λιγότερο σε 5 έως 10 αντιπροσωπευτικά οπτικά πεδία μεγάλης μεγέθυνσης. Σε κάθε περίπτωση εκτιμήθηκαν περίπου 1000 κύτταρα. Κάθε χρωσμένο κύτταρο θεωρήθηκε θετικό ανεξάρτητα της έντασης της χρώσης. Οι περιπτώσεις ανάλογα με την έκφραση των νεοπλασματικών κυττάρων κατατάχθηκαν σε τρεις κατηγορίες: ασθενής (όταν η έκφραση ήταν $<10\%$), μέτρια (όταν η έκφραση ήταν $10-50\%$) και έντονη (όταν η έκφραση ήταν $>50\%$) ανοσοαντίδραση.

2.1.4 Δεικτών πολλαπλασιασμού (Ki-67, PCNA)

Η χρώση ήταν σαφώς πυρηνική και για τους δύο δείκτες και με ετερογενή κατανομή. Εκτιμήθηκε το επί της % ποσοστό των θετικών κυττάρων επί του συνόλου των νεοπλασματικών κυττάρων. Η αξιολόγηση έγινε με τον ανωτέρω αναφερόμενο τρόπο.

2.1.5 Ορμονικών υποδοχέων (ER, PgR)

Η χρώση και για τα δύο αντισώματα ήταν πυρηνική. Εκτιμήθηκε το επί της % ποσοστό θετικών κυττάρων επί του συνόλου των νεοπλασματικών κυττάρων και για την τελική αξιολόγηση, θεωρήθηκε θετικότητα σε ορμονικούς υποδοχείς (ER, PgR), όταν η έκφραση ήταν $>10\%$ των νεοπλασματικών κυττάρων.



2.2 Υπερμικροσκοπησης

Θα πρέπει να τονιστεί εξ'αρχής ότι ιδιαίτερη σημασία για την ορθή αξιολόγηση των δειγμάτων έχει η σωστή μονιμοποίηση του ιστού, η οποία θα πρέπει να πραγματοποιηθεί στον ελάχιστο δυνατό χρόνο από την λήψη του υλικού.

Σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο, μελετήθηκαν ιδιαίτερα, οι μεταβολές της Βασικής Μembrάνης που λαμβάνουν χώρα καθ'όλην την διαδικασία της καρκινογένεσης.

Συγκεκριμένα οι παράμετροι που εξετάστηκαν ήταν οι παρακάτω:

- η φύση της ουσίας γύρω από τα αγγεία
- η φύση της ζώνης της BM που βρίσκεται σε άμεση επαφή με νησίδες καρκινικών κυττάρων και η ενδιάμεση ουσία
- η σχέση μεταξύ των μυϊνοβλαστών και νησίδων καρκινικών κυττάρων

Λόγω του ότι η υπερμικροσκοπική εικόνα των καρκινωμάτων του μαστού αρκετά συχνά εμφανιζόταν σύνθετη, (αρκετοί τύποι αντιδραστικών κυττάρων αναμεμιγμένα με τα καρκινικά κύτταρα), ήταν απαραίτητη η ταυτοποίηση των καρκινικών κυττάρων αφ'ενός και των αντιδραστικών στοιχείων αφ'ετέρου. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα διακριτικά υπερμικροσκοπικά κριτήρια:

Καρκινικά κύτταρα

Η ταυτοποίησή τους έγινε με βάση τα παρακάτω γνωρίσματα:

- δεσμοσώματα
- τονοϊνίδια αποτελούμενα από παχιές μάζες ανοιχτοχρωματικών ενδιάμεσων νηματίων κυτοκερατίνης
- παρουσία βασικού πετάλου, που περιβάλλει τα κύτταρα τα ευρισκόμενα στο άκρο των καρκινικών νησίδων (Εικόνα : 4.2.4)
- μεγάλα πυρήνια
- παρουσία αυλού μεταξύ των κυττάρων (Εικόνα : 4.2.31) ή ενδοκυττάρου (Εικόνα : 4.2.36)
- παρουσία γλυκογόνου
- βλενώδη κοκκία
- σποραδική παρουσία έντονου τραχέως ενδοπλασματικού δικτύου (rER) (Εικόνα : 4.2.4)

Η παρουσία όλων των παραπάνω κυτταρικών οργανιδίων δεν ανευρέθηκε σε όλα τα κύτταρα.

Αγγεία

Αυτά αποτελούνταν από ένα ή περισσότερα ενδοθηλιακά κύτταρα, σχηματίζοντας ένα τοίχωμα γύρω από ένα κεντρικό αυλό (Εικόνες : 4.2.1, 4.2.2). Μερικές φορές ο αυλός ήταν σχεδόν κλειστός, ενώ παρατηρήθηκαν και περιπτώσεις όπου ο αυλός περιείχε ένα ή περισσότερα ερυθροκύτταρα ή άλλα έμμορφα συστατικά του αίματος.

Ενδοθηλιακά κύτταρα

Αναγνωρίστηκαν με βάση τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- βασικό πέταλο¹ (Εικόνα : 4.2.2)



- σφιχτή συνένωση (tight junction), τύπος συνένωσης που ανευρίσκεται χαρακτηριστικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Εικόνα : 4.2.10)
- Weibel-Palade σωμάτια
- πολυφουσαλιδώδη σωμάτια
- πινοκυτωτικά κυστίδια
- ενδιάμεσα ινίδια τύπου βιμεντίνης (Εικόνα : 4.2.10)
- προσεκβολές ομοιάζουσες με νηματοειδή ψευδοπόδια, οι οποίες προβάλλουν μέσα στον αυλό

Περικύτταρα

Αυτά εμφανίστηκαν:

- σε στενή επαφή με το ενδοθήλιο και μερικές φορές παρουσίαζαν μια χαρακτηριστική ημισεληνοειδή πλάγια όψη σε γειτνίαση με το ενδοθήλιο
- σε κάποια κύτταρα, φτωχά αναπτυσσόμενα μυονημάτια
- plasmalemmal caveolae
- μικρές πλάκες σύνδεσης, στην επιφάνεια του κυττάρου
- βασικό πέταλο¹ (Εικόνα : 4.2.2)

¹ο όρος "βασικό" πέταλο συνηθίζεται να χρησιμοποιείται εδώ συνήθως για την επιθηλιακής προέλευσης βασική μεμβράνη και το ενδοθήλιο δεν είναι ακριβώς επιθηλιακής αρχής. Ωστόσο, μπορεί να θεωρηθεί σε κάποιο βαθμό ως αδενικός επιθηλιακός σχηματισμός, ο οποίος εμφανίζει εν μέρει επιθηλιακούς και εν μέρει μεσεγχυματικούς χαρακτήρες.

Μυοϊνοβλάστες

Χαρακτηρίζονται από :

- άφθονο τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο (Εικόνα : 4.2.36)
- περιφερικές μπάντες από μυοϊνίδια με εστιακές θέσεις πυκνώσης (Εικόνα : 4.2.39)
- συνδέσεις μεταξύ μυοϊνιδίων και εξωτερικών ινιδίων ινονεκτίνης (fibronexus junctions)
- συσκευή Golgi η οποία παράγει κοκκία που εκκρίνουν κολλαγόνο
- απουσία ΒΠ, τονοϊνιδίων ή δεσμοσωμάτων

Μακροφάγα

Τα οποία εμφανίζουν :

- πυρήνα με εντομή (Εικόνα : 4.2.45)
- λυσοσώματα (Εικόνα : 4.2.45)
- στην κυτταρική επιφάνεια προσεκβολές που ομοιάζουν με νηματοειδή ψευδοπόδια
- υποπλασματοκυτταρικές γραμμικές πυκνώσεις
- απουσία ΒΠ, τονοϊνιδίων ή δεσμοσωμάτων

Μαστοκύτταρα

Τα οποία χαρακτηρίζονται από :

- άφθονα πυκνωτικά κοκκία τα οποία περιέχουν κυλινδρόμορφο υλικό
- προσεκβολές στην κυτταρική επιφάνεια που ομοιάζουν με νηματοειδή ψευδοπόδια
- απουσία ΒΠ, τονοϊνιδίων ή δεσμοσωμάτων



Πλασματοκύτταρα

Τα οποία χαρακτηρίζονται από :

- άφθονο τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο
- πυρήνες με χαρακτηριστική "τροχοειδή" διάταξη της ετεροχρωματίνης
- απουσία ΒΠ, τονοϊνιδίων ή δεσμοσωμάτων

Ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηννα λευκοκύτταρα

Τα οποία χαρακτηρίζονται από :

- λοβοειδή πυρήνα με άφθονη ετεροχρωματίνη
- κυτταρόπλασμα πλούσιο σε πολυμορφικά κοκκία
- απουσία ΒΠ, τονοϊνιδίων ή δεσμοσωμάτων

Λεμφοκύτταρα

Τα οποία χαρακτηρίζονται από :

- στρογγύλους πυρήνες με άφθονη ετεροχρωματίνη (Εικόνα : 4.2.40)
- φτωχά αναπτυσσόμενο κυτταρόπλασμα, χωρίς ειδικά κυτταρικά οργανίδια
- απουσία ΒΠ, τονοϊνιδίων ή δεσμοσωμάτων



3. Στατιστική ανάλυση

Οι πιθανές συσχετίσεις της έκφρασης των πρωτεϊνών του εξωκυττάριου στρώματος ΛΜ, ΚΑ, ΤΝ, ΙΝ καθώς και των πρωτεολυτικών ενζύμων με τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους αξιολογήθηκαν με τις μη παραμετρικές μεθόδους για δύο ή διάφορα δείγματα κατά Mann-Whitney U και Kruskal-Wallis H. Επιπλέον, οι πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των πρωτεϊνών του εξωκυττάριου στρώματος και με την έκφραση των πρωτεολυτικών ενζύμων εκτιμήθηκαν με συσχετίσεις κατά Kendall's tau-b Spearman.

Επίσης, καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier σχεδιάστηκαν για τις παραμέτρους που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη. Διαφορές ανάμεσα στις καμπύλες επιβίωσης εξετάστηκαν με την δοκιμασία long-rank. Ολόκληρη η ανάλυση επιτελέστηκε με το στατιστικό πακέτο SPSS-10.0 for Windows. Η στατιστική διαφορά θεωρήθηκε σημαντική όταν η τιμή του p ήταν < 0.05 .



4 Αποτελέσματα

4.1. Αποτελέσματα οπτικού μικροσκοπίου

4.1.1 Ανοσοϊστοχημική έκφραση Λαμινίνης (ΛΜ)

Φυσιολογικός ιστός

Έκφραση της ΛΜ παρατηρήθηκε στις ΒΜς τόσο των επιθηλιακών κυττάρων όσο και των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων.

Το πρότυπο ανάπτυξης γύρω από τους πόρους και τα λόβια ήταν συνεχές και γραμμικό.

Αντίστοιχο ήταν και το πρότυπο ανάπτυξης γύρω από τα αγγεία. Αυτό το πρότυπο ανάπτυξης θεωρήθηκε ως εσωτερικός μάρτυρας.

In situ καρκίνωμα

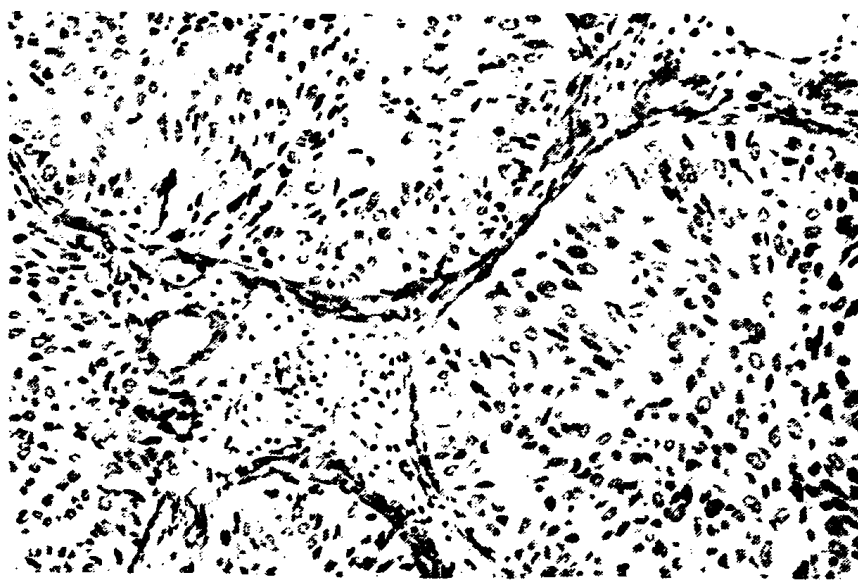
Σε κάποιες περιπτώσεις, στην ίδια τομή συμπεριλαμβανόταν και θέσεις in situ καρκινώματος. Το πρότυπο ανάπτυξης του αντισώματος της ΛΜ, ήταν παρόμοιο με αυτό του φυσιολογικού ιστού.

Πρωτοπαθής όγκος

Στα καρκινώματα παρατηρήθηκαν διαφορετικά πρότυπα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της ΛΜ (Εικόνες: 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4).

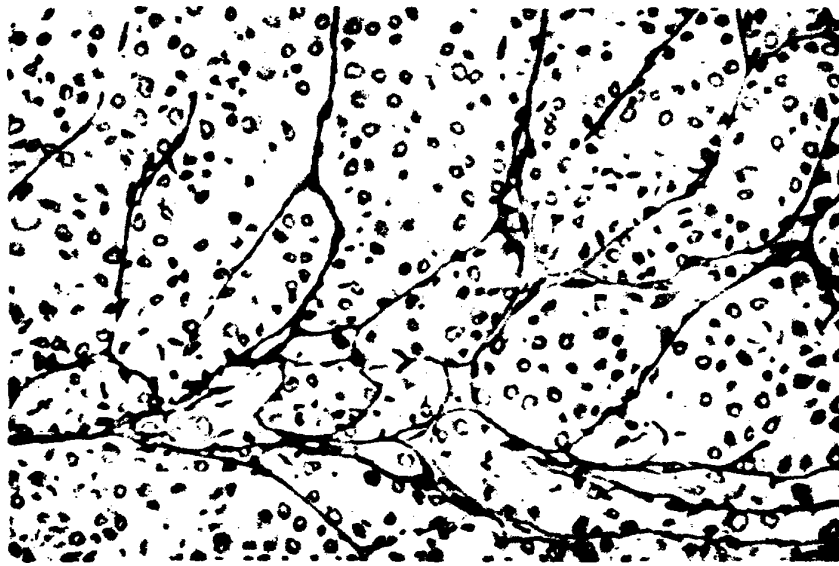
Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της ΛΜ έδειξε ένα συνεχές ή διασπασμένο γραμμικό πρότυπο ανάπτυξης, το οποίο περιέβαλλε τις νεοπλασματικές νησίδες σε ένα ποσοστό 69.5% των καρκινωμάτων.

Σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρήθηκε ένα ανώμαλα πολυστοιβαδωτό πρότυπο ανάπτυξης της ΒΜ (το οποίο εκτεινόταν πέραν του ορίου στρώματος-νεοπλασματικής νησίδας).



Εικόνα 4.1.1. Ανοσοϊστοχημική έκφραση Λαμινίνης, πολυστοιβαδωτό πρότυπο ανάπτυξης

Μικρή έκφραση της ΛΜ εμφανίστηκε σε 38/134 (20.4%) περιπτώσεις, μέτρια σε 24/134 (17.9%) περιπτώσεις, έντονη σε 17/134 (5.2%) περιπτώσεις. Απουσία έκφρασης αυτής παρατηρήθηκε σε 65/134 (48.5%) περιπτώσεις πρωτοπαθών καρκινωμάτων.



Εικόνα 4.1.2. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της Λαμινίνης. Γραμμικό πρότυπο ανάπτυξης.

	Έκφραση ΛΜ		p value
	-+	++ +	
Ηλικία			
<45	27	9	NS
45-55	18	11	
>55	48	7	
Μέγεθος όγκου			
<2	18	2	NS
2-5	47	18	
>5	19	8	
Τύπος			
Πορογενές	63	21	p=0.06
Λοβιακό	19	3	
Μικτό	11	4	
Βαθμός διαφοροποίησης			
G1	12	2	NS
G2	42	11	
G3	35	14	
Λεμφαδένες			
(-)	27	9	NS
(+)	49	14	
ER			
<10	12	11	p=0.0001
>10	58	8	
PgR			
<10	22	10	NS
>10	44	7	

Πίνακας 4.1.1.: Συσχέτιση της έκφρασης της ΛΜ με διάφορες κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της ΛΜ με το μέγεθος του όγκου, τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας και με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων (Πίνακας 4.1.1), (Ιστόγραμμα 4.1.1-4.1.4)..

Αντίθετα, η ανοσοϊστοχημική έκφραση της ΛΜ, έδειξε συσχέτιση με τον ιστολογικό τύπο των καρκινωμάτων. Τα πορογενή δηλ καρκινώματα παρουσίασαν μεγαλύτερη έκφραση αυτής σε σχέση με τα λοβιακά ($p=0.06$) (Πίνακας 4.1.1.) (Ιστόγραμμα 4.1.1.).

Επίσης παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική θετική συσχέτιση της έκφρασης αυτής με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB1 ($p=0.005$) (Πίνακας 4.1.2). Αντίθετα, αντίστροφη συσχέτιση αυτής διαπιστώθηκε με την έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων (ER) ($p=0.0001$), όχι όμως και των προγεστερονικών υποδοχέων (PgR) (Πίνακας 4.1.1).

	Έκφραση της ΛΜ		p value
	-, +	++, +++	
CD όγκου			
<10	13	1	p=0.02
>10	84	29	
CD			
στρώματος	58	14	p=0.01
+	16	8	
++	23	8	
+++			
MIB1			
<10	58	10	p=0.005
>10	28	13	
PCNA			
<50	34	8	NS
>50	47	14	

Πίνακας 4.1.2: Συσχέτιση της ΛΜ με την ΚD και τους δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού

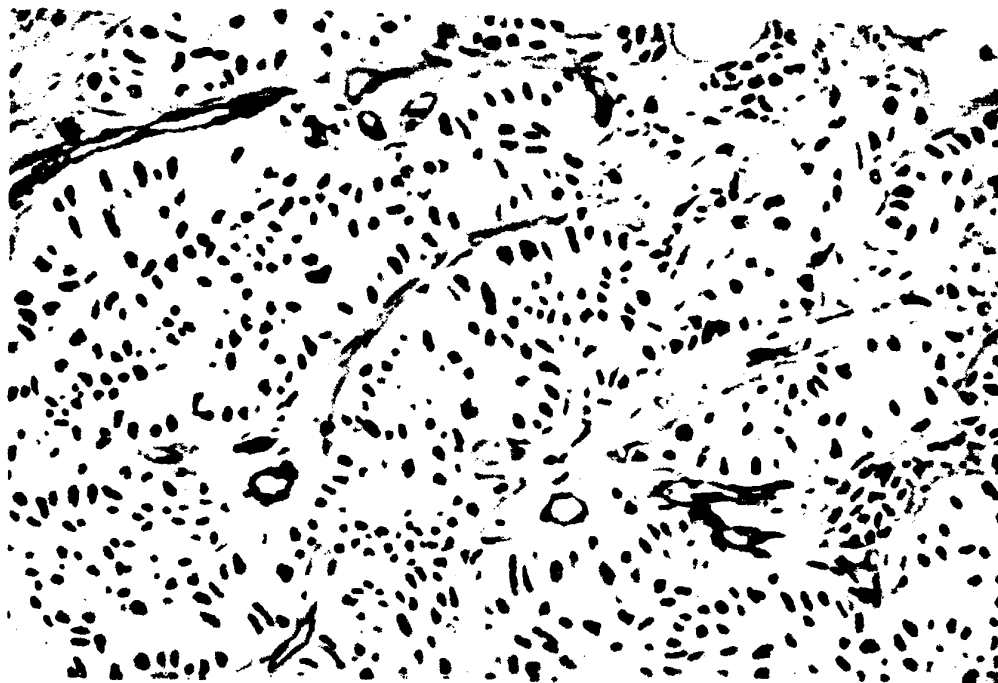
Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι, παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση της έκφρασης της ΛΜ τόσο με την έκφραση της ΚD του όγκου όσο και του στρώματος ($p=0.02$ και $p=0.01$ αντίστοιχα), αυξανόμενων δηλ. των επιπέδων έκφρασης της ΛΜ αυξάνονταν παράλληλα και οι περιπτώσεις με υπερέκφραση του πρωτεολυτικού ενζύμου ΚD (Πίνακας 4.1.2.) (Ιστόγραμμα 4.1.5., 4.1.6.).

Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της έκφρασης της ΛΜ τόσο με το μεσοδιάστημα ελεύθερο νόσου όσο και με την συνολική επιβίωση των ασθενών.

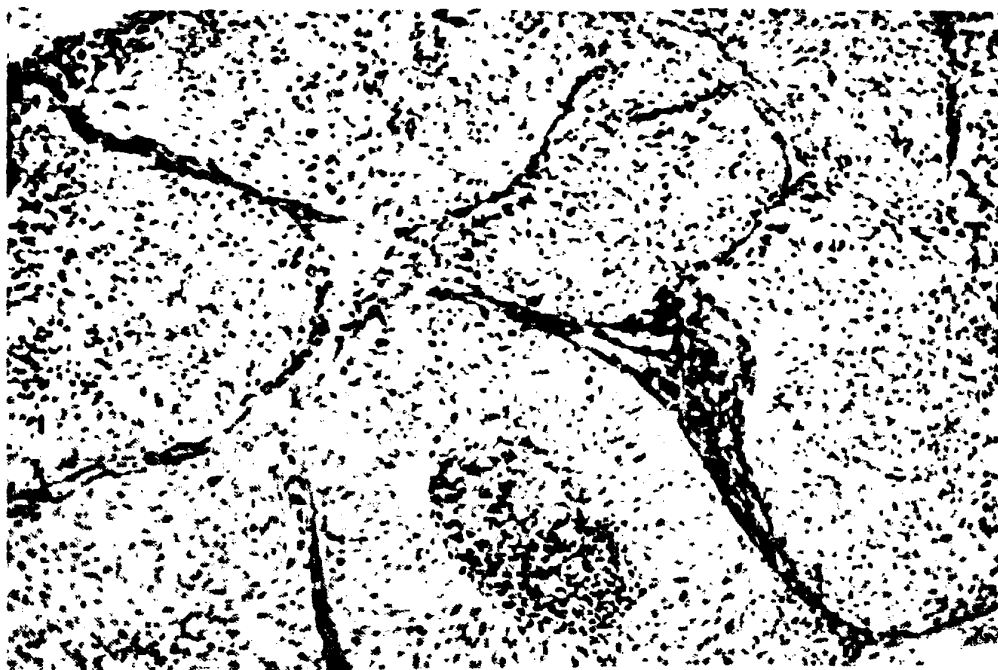
Λεμφαδένες

Στους διηθημένους μασχαλιαίους λεμφαδένες, παρατηρήθηκε στρωματική έκφραση της ΛΜ σε 20/24 (83.3%) περιπτώσεις. Σε μερικές περιπτώσεις διαπιστώθηκε και κυτταροπλασματική έκφραση αυτής, το ποσοστό της οποίας ήταν αρκετά μεγαλύτερο σε σχέση με αυτό του πρωτοπαθούς όγκου.





Εικόνα 4.1.3.: Ανοσοϊστοχημική έκφραση Λαμινίνης, στις βασικές μεμβράνες κυρίως των αγγείων. Απουσία έκφρασης κατά τις νεοπλασματικές νησίδες.



Εικόνα 4.1.4.: Ανοσοϊστοχημική έκφραση της Λαμινίνης. Πολυστοιβαδωτό πρότυπο ανάπτυξης.

4.1.2. Ανοσοϊστοχημική έκφραση Κολλαγόνου τύπου IV (ΚΛ)

Φυσιολογικός ιστός

Τα ευρήματα ήταν ανάλογα αυτών της έκφρασης της ΛΜ.

In situ καρκίνωμα

Όπως και κατά την έκφραση της ΛΜ παρατηρήθηκε πρότυπο ανάπτυξης παρόμοιο με αυτό του φυσιολογικού ιστού.

Πρωτοπαθής όγκος

Διάφορα ήταν τα πρότυπα ανάπτυξης της έκφρασης του ΚΛ στα καρκινώματα (Εικόνες 4.1.5., 4.1.6., 4.1.7., 4.1.8).

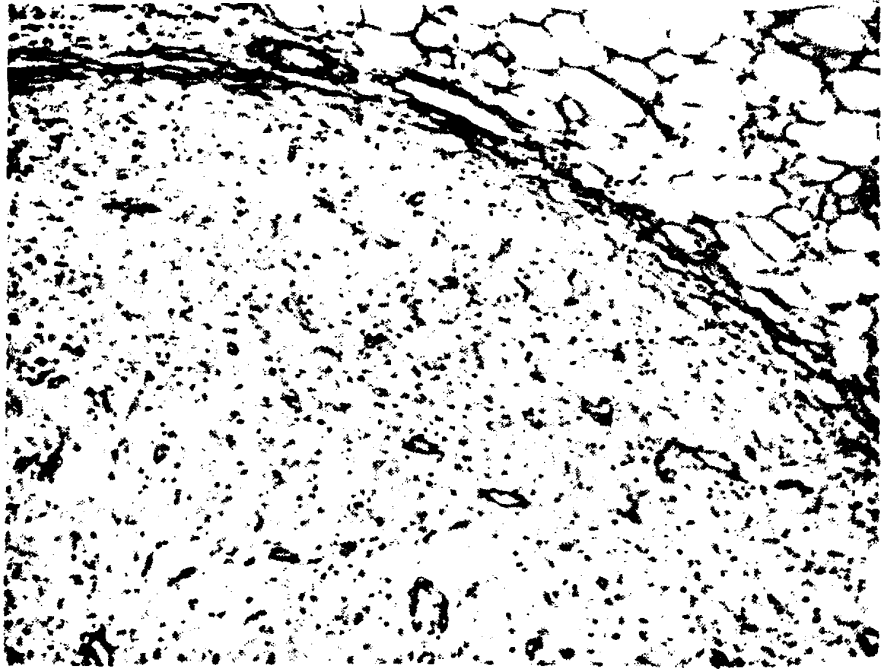


Εικόνα 4.1.5.: Ανοσοϊστοχημική έκφραση του Κολλαγόνου τύπου IV θετικότητα μόνο στις βασικές μεμβράνες των αγγείων

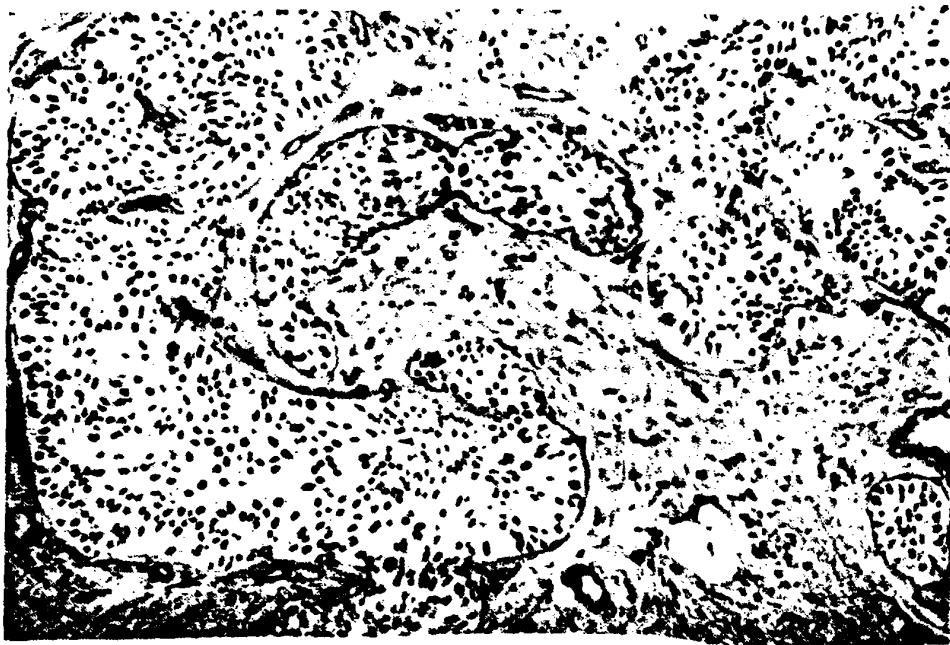
Παρατηρήθηκαν περιπτώσεις όπου το πρότυπο ανάπτυξης της έκφρασης του ΚΛ αναπτυσσόταν με τέτοιο τρόπο που περιέβαλλε τις νεοπλασματικές νησίδες είτε συνεχόμενα είτε διακεκομμένα σε ένα ποσοστό 42.9%. Σε άλλες περιπτώσεις αυτό ήταν διάχυτα αναπτυσσόμενο στο στρώμα σε ένα ποσοστό 35.1%. Παρατηρήθηκε δε και μικτό πρότυπο ανάπτυξης σε ένα ποσοστό 22.1% των πρωτοπαθών καρκινωμάτων του μαστού. Σε σπάνιες περιπτώσεις αναγνωρίστηκε κυτταροπλασματική έκφραση του ΚΛ.

Μικρή έκφραση του ΚΛ παρατηρήθηκε σε 22/138 περιπτώσεις (15.9%) καρκινωμάτων, μέτρια έκφραση σε 22/138 (15.9%) και έντονη σε 29/138 (21%). Απουσία της έκφρασης αυτής παρατηρήθηκε σε 20/138 (47.1%).





Εικόνα 4.1.6.: Ανοσοϊστοχημική έκφραση του Κολλαγόνου τύπου IV. Θετικότητα στα αγγεία και κατά την περιφέρεια του όγκου

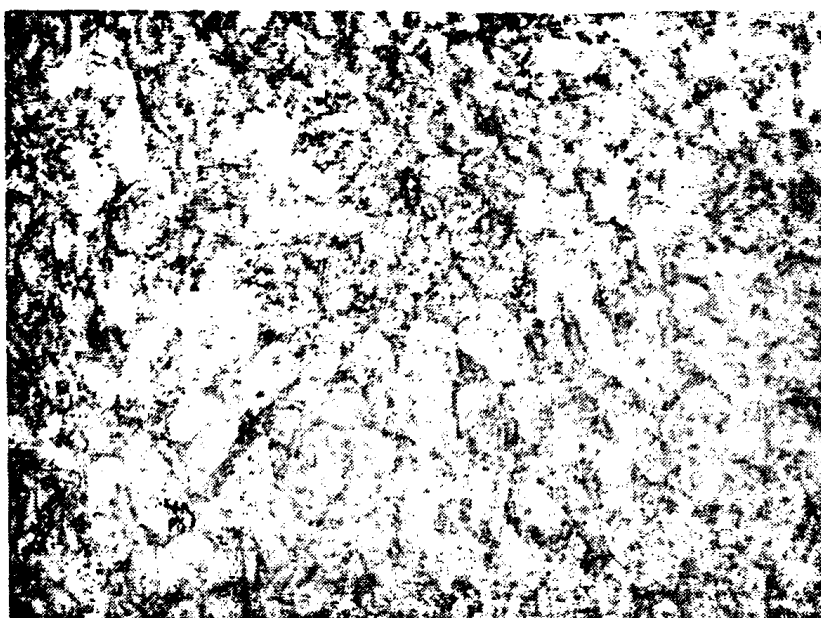


Εικόνα 4.1.7.: Ανοσοϊστοχημική έκφραση του Κολλαγόνου τύπου IV κυρίως κατά στις βασικές μεμβράνες των αγγείων.

	Έκφραση Κλ		p value
	-/+	++, +++	
Ηλικία			
<45	17	19	
45-55	11	20	NS
>55	35	27	
Μέγεθος όγκου			
<2	13	4	
2-5	35	38	p=0.004
>5	10	21	
Τύπος			
Πορογενές	36	54	
Λοβιακό	16	6	p=0.02
Μικτό	11	7	
Βαθμός διαφοροποίησης			
G1	7	8	
G2	34	24	NS
G3	22	30	
Λεμφαδένες			
(-)	6	17	NS
(+)	34	23	
ER			
<10	15	21	p=0.005
>10	39	36	
PgR			
<10	10	19	p=0.061
>10	30	20	

Πίνακας 4.1.3.: Συσχέτιση της έκφρασης του Κλ με διάφορες κλινικο-παθολογοανατομικές παραμέτρους

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του Κλ με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας και με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων (Πίνακας 4.1.3.) (Ιστόγραμμα 4.1.2., 4.1.4.).



Εικόνα 4.1.8.: Ανοσοϊστοχημική έκφραση του Κολλαγόνου τύπου IV διάχυτο πρότυπο ανάπτυξης.

Συσχέτιση της έκφρασης αυτής παρατηρήθηκε με τον ιστολογικό τύπο των καρκινωμάτων, όπου τα πορογενή καρκινώματα εμφάνισαν μεγαλύτερη έκφραση του ΚΛ σε σχέση με τα λοβιακά ($p=0.02$) (Πίνακας 4.1.3.) (Ιστόγραμμα 4.1.1).

Επίσης παρατηρήθηκε η θετική συσχέτιση της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του ΚΛ με το μέγεθος του όγκου ($p=0.0046$) (Πίνακας 4.1.3.) (Ιστόγραμμα 4.1.3).

Αντίστροφη στατιστικώς σημαντική συσχέτιση αυτού, παρατηρήθηκε τόσο με τους οιστρογονικούς ER ($p=0.005$) όσο και με τους προγεστερονικούς υποδοχείς PgR ($p=0.061$) (Πίνακας 4.1.3.).

	Έκφραση του ΚΛ		p value
	+, +	++, +++	
CD όγκου			
<10	4,	6	NS
>10	50	51	
CD			
στρώματος	34	31	NS
+	11	9	
++	9	17	
+++			
MIB1			
<10	36	30	NS
>10	16	19	
PCNA			
<50	20	17	NS
>50	26	31	

Πίνακας 4.1.4: Συσχέτιση του ΚΛ με την ΚD και τους δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Παρατηρήθηκε επίσης μια έντονα θετική, στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του ΚΛ, σε σχέση με την έκφραση της ΛΜ ($p=0.0001$) (Πίνακας 4.1.2).

Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση της έκφρασης της ΛΜ τόσο με το μεσοδιάστημα ελεύθερο νόσου, όσο και με την συνολική επιβίωση των ασθενών.

Λεμφαδένες

Η ανοσοϊστοχημική έκφραση του ΚΛ στους διηθημένους μασχαλιαίους λεμφαδένες, ήταν περισσότερη απ'ότι στον πρωτοπαθή όγκο. Οι 20/24 περιπτώσεις (83.3%), εμφάνισαν ανοσοαντίδραση.

Σε ένα μικρό ποσοστό παρατηρήθηκε και κυτταροπλασματική έκφραση αυτού.



4.1.3. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της Τενασκίνης (TN)

Φυσιολογικός ιστός

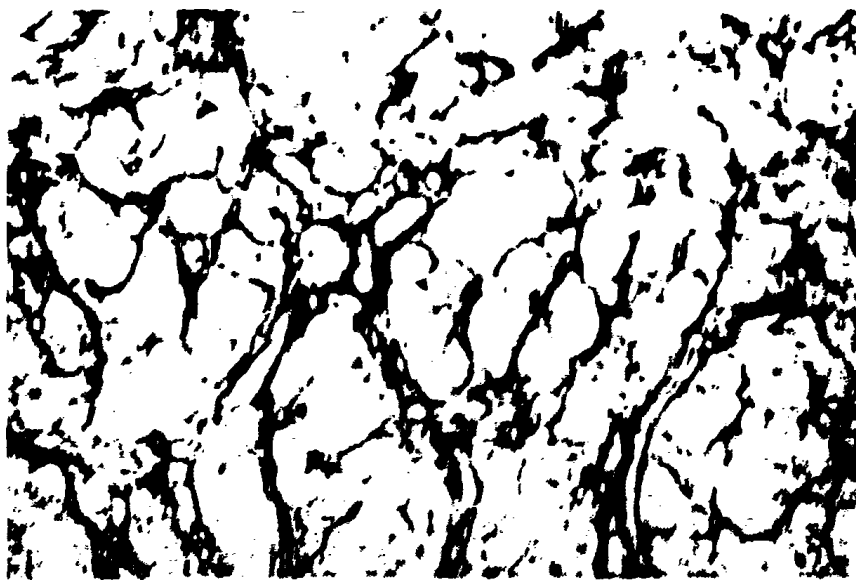
Οι πόροι και οι λοβιακές μονάδες του φυσιολογικού μαιζικού παρεγχύματος συνήθως ήταν αρνητικοί για την έκφραση της TN. Σε σπάνιες περιπτώσεις στο όριο επιθηλιακών κυττάρων-στρώματος, παρατηρήθηκε μια ελαφρά ανοσοαντίδραση της έκφρασης της TN, με ένα πρότυπο ανάπτυξης παρόμοιο με αυτό της φυσιολογικής δομής της ΒΜ. Αυτό παρατηρήθηκε σε κάποιους φυσιολογικούς πόρους, σε λίγα λόβια και γύρω από κάποια αγγεία.

Φυσιολογικοί πόροι, οι οποίοι περικλείονταν από νεοπλασματικές νησίδες, συνήθως εμφάνιζαν μια πιο έντονη έκφραση της TN η οποία ήταν προσομοιάζουσα της δομής της ΒΜ. Το στρώμα ανάμεσα (μεσολόβιος συνδετικός ιστός) και μέσα (ενδολόβιος συνδετικός ιστός) στα λόβια, τόσο στα ινοαδενώματα όσο και στην ινοκυστική μαστοπάθεια ήταν αρνητικά για την έκφραση της TN.

Πρωτοπαθής όγκος

Στα καρκινώματα, το στρωματικό στοιχείο παρουσίαζε μια αύξηση της έκφρασης της TN σε σχέση με το παρακείμενο φυσιολογικό μαιζικό παρέγχυμα (Εικόνας 4.1.9., 4.1.10.).

Τα πρότυπα ανάπτυξης που παρατηρήθηκαν ήταν: σε ένα ποσοστό 50% των περιπτώσεων η έκφραση της TN είχε ένα διάχυτο στρωματικό πρότυπο ανάπτυξης, σε ποσοστό 36.9% ήταν περισσότερο συνεχές περιβάλλοντας τις κυρκινικές νησίδες, (band-like) και σε ποσοστό 13.1% των περιπτώσεων παρατηρήθηκε συνδυασμός των δύο παραπάνω προτύπων ανάπτυξης.



Εικόνα 4.1.9: Στρωματική έκφραση της Τενασκίνης. Απόλυτο πρότυπο ανάπτυξης.

Μικρή έκφραση της TN παρατηρήθηκε σε 44/113 (38.9), μέτρια σε 13/113 (11.5%) και έντονη σε 32/113 (28.3%) περιπτώσεις πρωτοπαθούς καρκίνου. Σε 24/113 (21.2%) περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε στρωματική έκφραση αυτής.

Από τις περιπτώσεις στις οποίες μπορούσε να αξιολογηθεί η έκφραση της TN στο μέτωπο διήθησης του όγκου, οι 49/90 (54.4%) περιπτώσεις, ήταν αρνητικές, οι 26/90 (28.9%) περιπτώσεις έδειξαν θετικές και αρνητικές περιοχές σε περίπου ίσες αναλογίες και οι 15/90 (16.7%) ήταν θετικές σε αρκετή έκταση.



Εικόνα 4.1.10.: Επιθηλιακή έκφραση της Τεναςκίνης.

Κυτταροπλασματική έκφραση της TN παρατηρήθηκε σε ένα ποσοστό 9.7% των περιπτώσεων των πρωτοπαθών όγκων του μαστού (Εικόνα 4.1.8, 4.1.9). Αυτός ο τύπος ανοσοϊστοχημικής έκφρασης παρατηρήθηκε σε περιπτώσεις οι οποίες εμφάνιζαν πολύ μικρή στρωματική ανοσοαντίδραση για την TN.

	Έκφραση TN		p value
	++	++, +++	
Ηλικία			
<45	20	11	
45-55	16	11	NS
>55	27	16	
Μέγεθος όγκου			
<2	14	3	
2-5	34	18	p=0.042
>5	12	14	
Τύπος			
Πορογενές	43	26	
Λοβιακό	12	6	NS
Μικτό	9	6	
Βαθμός διαφοροποίησης			
G1	10	1	
G2	30	15	P=0.01
G3	23	18	
Λεμφαδένες			
(-)	20	8	NS
(+)	32	21	
ER			
<10	8	14	p=0.017
>10	37	19	
PgR			
<10	12	15	NS
>10	28	18	

Πίνακας 4.1.5.: Συσχέτιση της έκφρασης της TN με διάφορες κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους



Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της TN με τον ιστολογικό τύπο, με την έκφραση των προγεστερονικών υποδοχέων και με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων (Πίνακας 4.1.5.) (Ιστόγραμμα 4.1.1., 4.1.4.).

Αντίθετα, παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση της στρωματικής έκφρασης της TN με τον βαθμό διαφοροποίησης του όγκου ($p=0.013$) όπως και το μέγεθος του όγκου ($p=0.042$) (Πίνακας 4.1.5.) (Ιστόγραμμα 4.1.2., 4.1.3.).

Επιπλέον η ανοσοϊστοχημική έκφραση της TN συσχετίσθηκε αρνητικά με την έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων ($p=0.017$) (Πίνακας 4.1.5.).

	Έκφραση της TN		p value
	-, +	++, +++	
CD όγκου			
<10	11	2	p=0.037
>10	55	44	
CD			
στρώματος			
+	42	23	p=0.05
++	13	9	
+++	11	14	
MIB1			
<10	34	22	NS
>10	22	16	
PCNA			
<50	22	14	NS
>50	30	23	

Πίνακας 4.1.6.: Συσχέτιση της TN με την KD και τους δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Ενδιαφέρον εμφανίζει το γεγονός ότι η στρωματική έκφραση της TN συσχετίσθηκε θετικά με την έκφραση της KD τόσο του όγκου, όσο και του στρώματος ($p=0.037$ και $p=0.05$ αντίστοιχα) (Πίνακας 4.1.6) (Ιστόγραμμα 4.1.5., 4.1.6.).

Επίσης παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική ισχυρή συσχέτιση της έκφρασης της TN του στρώματος με την έκφραση της IN ($p=0.0041$), της ΛΜ ($p=0.007$) και του ΚΛ ($p=0.003$) (Πίνακας 4.1.8).

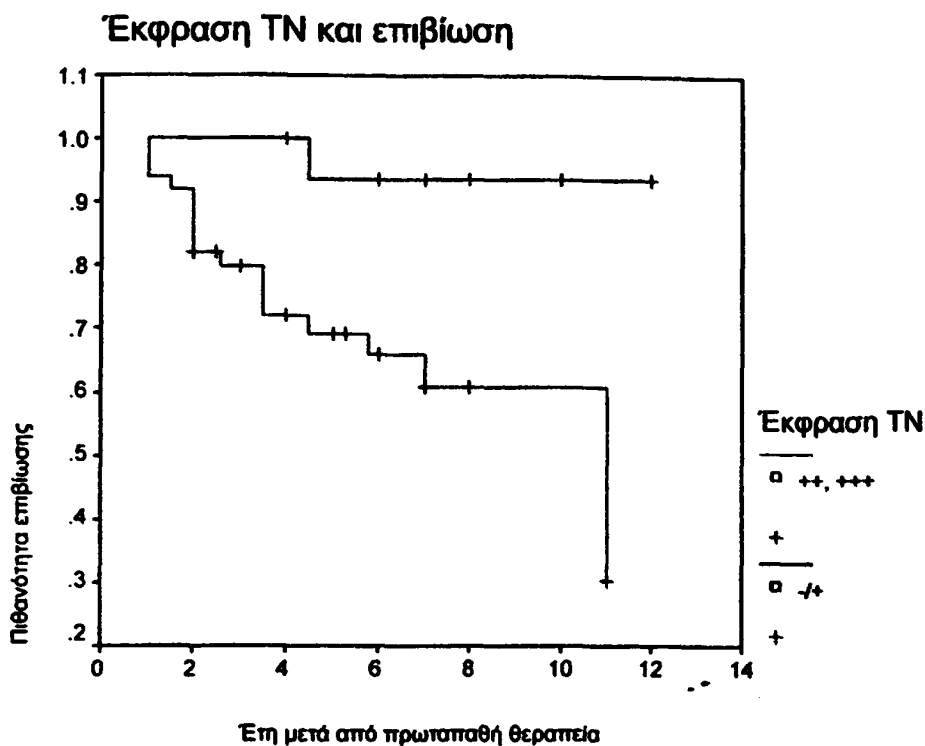
Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση ότι, μολονότι, η επιθηλιακή έκφραση της TN παρατηρήθηκε σε πολύ μικρό αριθμό των περιπτώσεων, παρ'όλα αυτά ανευρέθηκε πολύ ισχυρή αρνητική συσχέτιση με την παρουσία θετικών λεμφαδένων ($p=0.0004$).

Όσον αφορά την έκφραση της TN κατά το μέτωπο διήθησης, αυτή παρουσίασε θετική συσχέτιση, μόνο με τους διηθημένους μασχαλιαίους λεμφαδένες ($p=0.045$).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, η ομάδα των ασθενών που παρουσίαζε όγκους με περισσότερη έκφραση της TN έδειξε στατιστικώς σημαντική χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με την ομάδα ασθενών που παρουσίαζε όγκους με μικρότερη έκφραση αυτής ($p=0.017$).

Η επίδραση της στρωματικής έκφρασης της TN στην συνολική επιβίωση φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα.





Σημαντικό είναι να αναφέρουμε ότι σε πολυπαραγοντική ανάλυση που έγινε, σε σχέση με τις πρωτεΐνες τις ΕΟ, μόνο η έκφραση της TN φαίνεται να αποτελεί ανεξάρτητο δείκτη για την επιβίωση των ασθενών ($p=0.04$).

Θα πρέπει να τονίσουμε ότι δεν παρατηρήθηκε καμία συσχέτιση με τα πρότυπα ανάπτυξης της έκφρασης της TN.

Λεμφαδένες

Στρωματική ανοσοϊστοχημική έκφραση της TN παρατηρήθηκε σε 22/24 (91.7%) σε διηθημένους μασχαλιαίους λεμφαδένες. Κυτταροπλασματική έκφραση αυτής παρατηρήθηκε σε ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό (54.2%) των περιπτώσεων των διηθημένων μασχαλιαίων λεμφαδένων. Αυτός ο τύπος ανοσοϊστοχημικής έκφρασης παρατηρήθηκε σε περιπτώσεις οι οποίες εμφάνιζαν πολύ μικρή στρωματική ανοσοαντίδραση για την TN.

4.1.4. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της Ινονεκτίνης (IN)

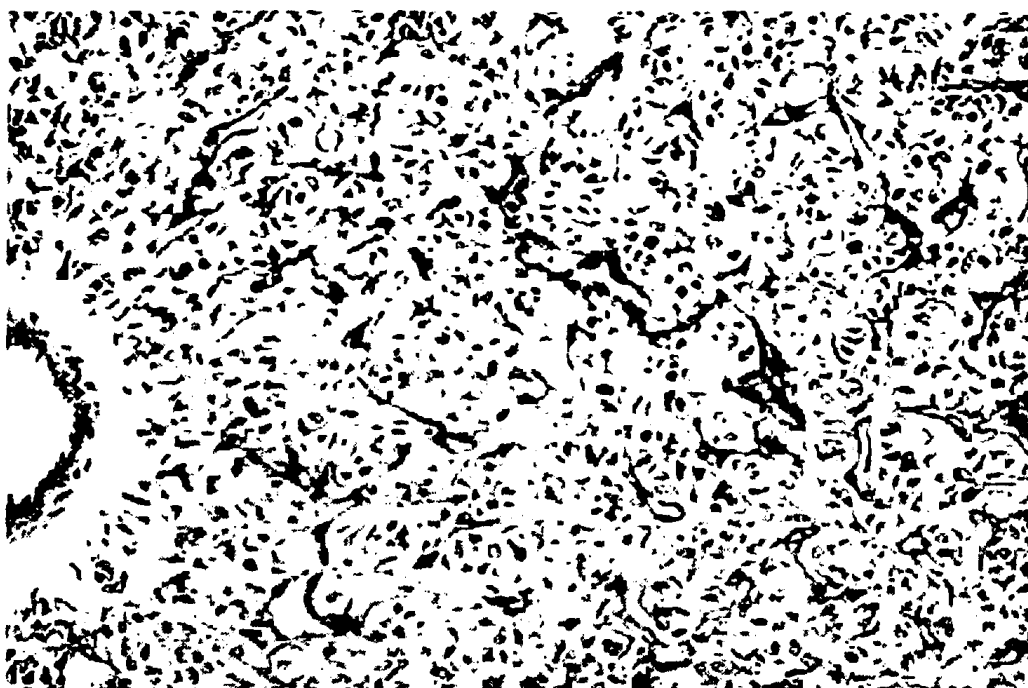
Φυσιολογικός ιστός

Το φυσιολογικό μαζικό παρέγχυμα, ο μεσολόβιος και ο ενδολόβιος συνδετικός ιστός, όπως και οι επιθηλιακές ΒΜ, συνήθως ήταν αρνητικά για την έκφραση της IN. Επίσης αρνητικές ήταν και οι περιπτώσεις με ινοαδένωμα ή ινοκυστική μαστοπάθεια. Έκφραση της IN, παρατηρήθηκε σε μερικά από τα συμπεριλαμβανόμενα αγγεία.

Πρωτοπαθής όγκος

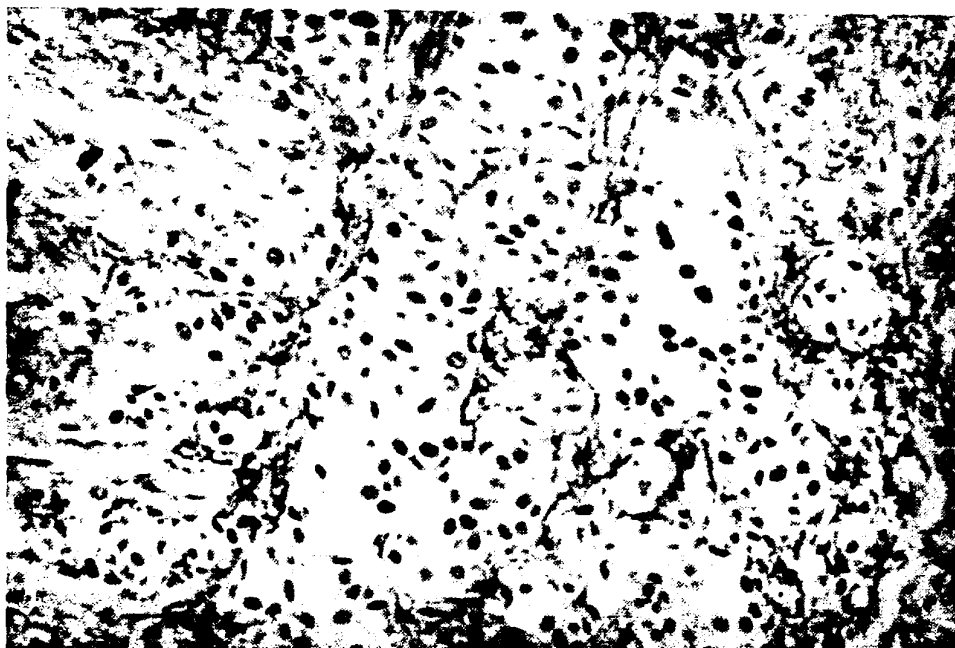
Στα καρκινώματα, η IN εκφράστηκε κυρίως στο διάμεσο στρώμα (Εικόνες 4.1.11., 4.1.12., 4.1.13.).

Τα πρότυπα ανάπτυξης της στρωματικής έκφρασης της IN, ήταν είτε συνεχές, περιβάλλοντας τις νεοπλασματικές νησίδες σε ποσοστό 39% των περιπτώσεων, είτε διάχυτα αναπτυσσόμενο στο στρώμα σε ποσοστό 60.4%. Κυτταροπλασματική έκφραση της IN παρατηρήθηκε σε ποσοστό 9.9% των πρωτοπαθών όγκων.

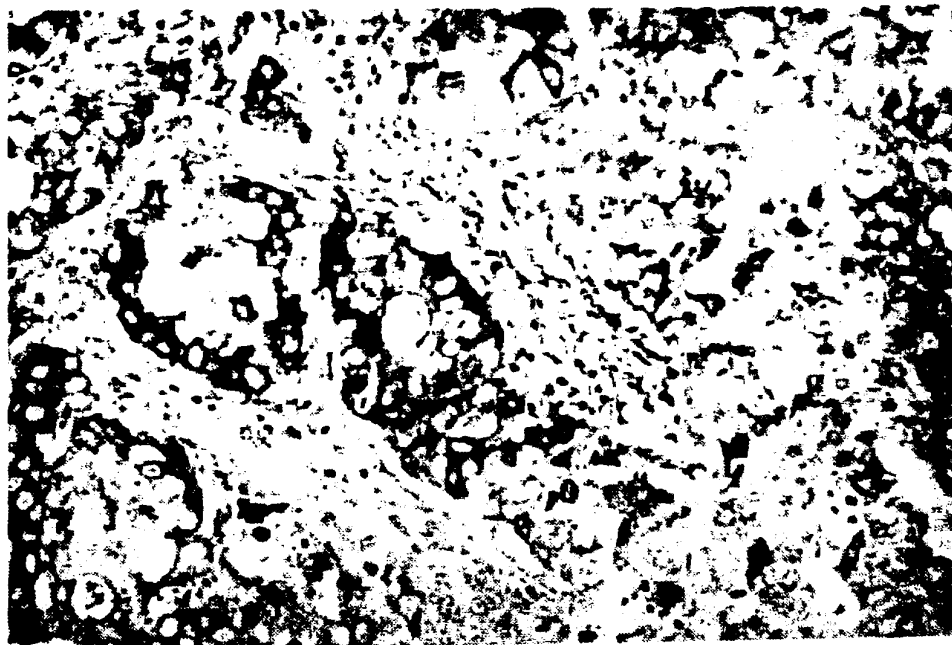


Εικόνα 4.1.11.: Ανοσοϊστοχημική έκφραση Ινονεκτίνης, διάχυτο πρότυπο ανάπτυξης

Μικρή έκφραση αυτής παρατηρήθηκε σε 39/113 (34.5%), μέτρια σε 33/113 (29.2%) και έντονη σε 2/113 (1.8 %) περιπτώσεις πρωτοπαθούς καρκίνου. Απουσία της έκφρασης της IN παρατηρήθηκε σε 39/113 (34.5%) περιπτώσεις. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της IN στο μέτωπο διήθησης, ήταν αρνητική σε 29/113 (25.7%) των περιπτώσεων, θετικές και αρνητικές περιοχές σε ισόποσες αναλογίες σε 52/113 (46%) περιπτώσεις και θετική >50% της συνολικής περιοχής σε 32/113 (28.3%) περιπτώσεις.



Εικόνα 4.1.12.: Στρωματική έκφραση της Ινονεκτίνης. Διάχυτο πρότυπο ανάπτυξης.



Εικόνα 4.1.13.: Επιθηλιακή έκφραση της Ινονεκτίνης σε καρκίνωμα μαστού.

	Έκφραση IN		p value
	-,+	++,+++	
Ηλικία			
<45	12	19	
45-55	6	18	NS
>55	15	29	
Μέγεθος όγκου			
<2	4	13	
2-5	15	34	NS
>5	9	17	
Τύπος			
Πορογενές	19	46	
Λοβιακό	9	11	NS
Μικτό	4	11	
Βαθμός διαφοροποίησης			
G1	2	7	
G2	14	29	NS
G3	13	30	
Λεμφαδένες			
(-)	10	14	p=0.04
(+)	15	41	
ER			
<10	5	16	NS
>10	17	41	
PgR			
<10	7	20	NS
>10	14	33	

Πίνακας 4.1.7.: Συσχέτιση της έκφρασης της IN με διάφορες κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της στρωματικής έκφρασης της IN με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας, με τον ιστολογικό τύπο, με το μέγεθος του όγκου, όπως και με τους ορμονικούς υποδοχείς (Πίνακας 4.1.7.) (Ιστόγραμμα 4.1.1.-4.1.3.).

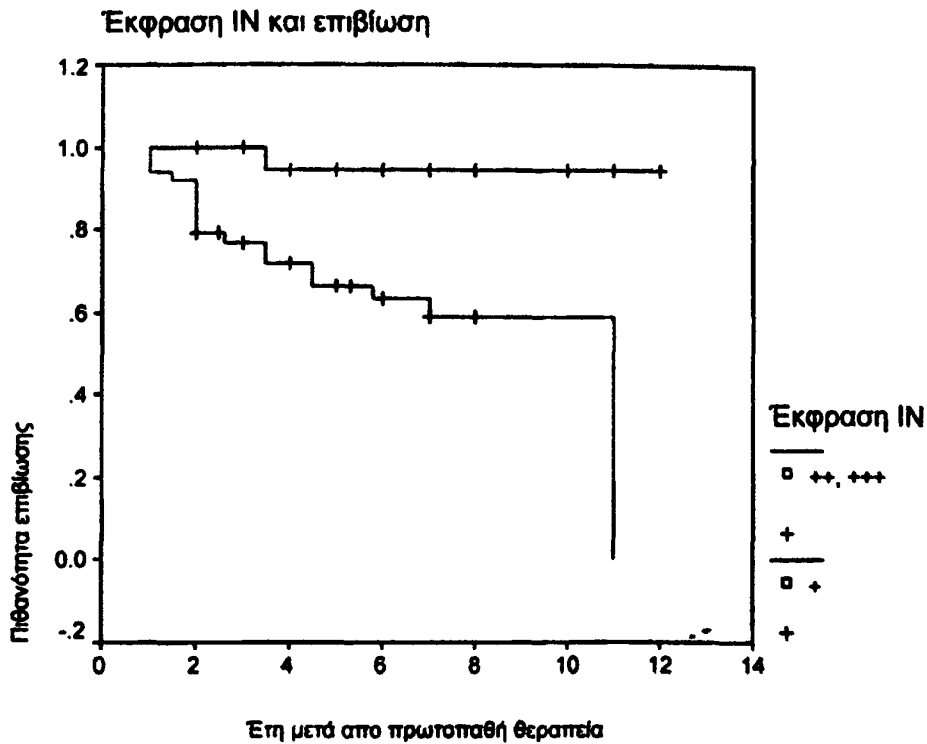
Αντίθετα, η στρωματική έκφραση της IN του πρωτοπαθούς όγκου συσχετίστηκε θετικά με τους διηθημένους μασχαλαίους λεμφαδένες ($p=0.0482$) (Πίνακας 4.1.7) (Ιστόγραμμα 4.1.4.).

Επίσης ενδιαφέρον έχει η θετική συσχέτιση αυτής με τον δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού MIB1 ($p=0.028$) (Πίνακας 4.1.12).

Σημαντική είναι η θετική συσχέτιση της στρωματικής έκφρασης της IN με την στρωματική έκφραση ενός από τα πρωτεολυτικά ένζυμα, της KD ($p=0.023$) (Πίνακας 4.1.12). Επίσης παρατηρήθηκε μια τάση για θετική συσχέτιση αυτής με την έκφραση της LM ($p=0.07$). (Ιστόγραμμα 4.1.5., 4.1.6.).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζει το γεγονός ότι, η ομάδα των ασθενών που παρουσίαζε όγκους με περισσότερη έκφραση της IN έδειξε στατιστικώς σημαντική χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με την ομάδα ασθενών που παρουσίαζε όγκους με μικρότερη έκφραση αυτής ($p=0.037$). Η επίδραση της στρωματικής έκφρασης της IN στην συνολική επιβίωση φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα.





Η έκφραση της IN στην περιφέρεια του όγκου δεν έδειξε καμία συσχέτιση με τις μελετηθείσες παραμέτρους.

Λεμφαδένες

Στρωματική έκφραση της IN στους διηθημένους μασχαλιαίους λεμφαδένες, ανευρέθηκε σε 23/24 (95.8%) περιπτώσεις. Κυτταροπλασματική έκφραση της IN παρατηρήθηκε σε ποσοστό 50% των διηθημένων μασχαλιαίων λεμφαδένων.

	Έκφραση TN		p value
	-, +	++, +++	
Ινονεκτίνη			
-, +	24	11	p=0.0041
++, +++	38	34	
Κολλαγόνο τύπου IV			
-, +	38	10	p=0.003
++, +++	19	31	
Λαμινίνη			
-, +	39	14	p=0.007
++, +++	26	31	

Πίνακας 4.1.8 : Συσχέτιση της TN με τα υπόλοιπα συστατικά της Εξωκυττάριας Ουσίας



Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε το εύρημα ότι, το ποσοστό της έκφρασης σχεδόν όλων των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας (εκτός του ΚΛ) ήταν μεγαλύτερο στους αντίστοιχους διηθημένους λεμφαδένες σε σχέση με τον πρωτοπαθή όγκο. Η έκφραση αυτή αφορούσε τόσο την στρωματική όσο και την κυτταροπλασματική εντόπιση.



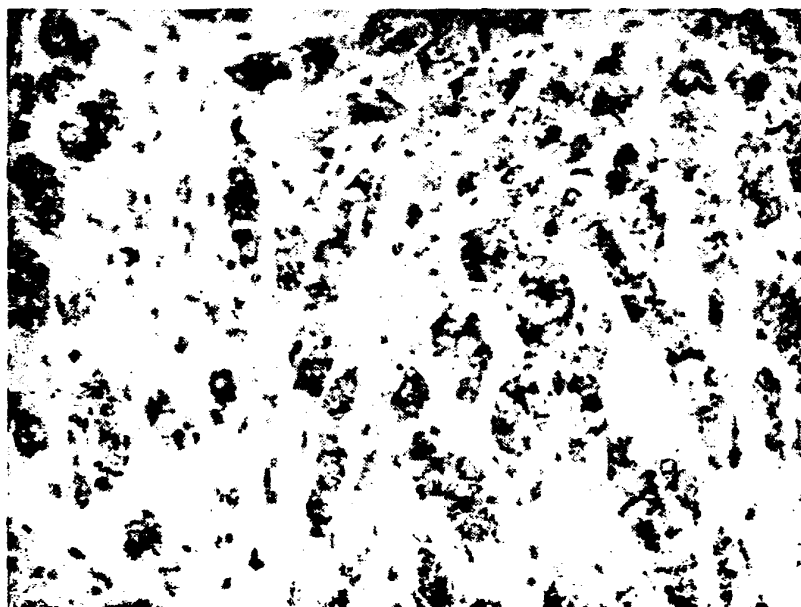
4.1.5. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της Στρωμελυσίνης (ΣΤΡ)

Φυσιολογικός ιστός

Παρατηρήθηκε ετερογένεια της έκφρασης αυτής σε φυσιολογικά λόβια και πόρους. Άλλοτε εμφάνιζαν εστιακά διάχυτη λεπτοκοκκώδη έκφραση αυτής άλλοτε καταλαμβάνοντας μεγαλύτερη έκταση και άλλοτε ήταν αρνητικά. Έντονη έκφραση αυτής παρατηρήθηκε σε θέσεις αποκρινούς μετάπλασης και σε ενδοπορικά θηλώματα.

Πρωτοπαθής όγκος

Μικρή έκφραση της ΣΤΡ (θετικότητα <10% των νεοπλασματικών κυττάρων) παρατηρήθηκε σε 39/104 (37.5%) περιπτώσεις καρκινωμάτων, μέτρια έκφραση (θετικότητα 10-50% των νεοπλασματικών κυττάρων) σε 22/104 (21.2%) και έντονη (θετικότητα >50% των νεοπλασματικών κυττάρων) σε 43/104 (41.3%) (Εικόνες 4.1.14., 4.1.15., 4.1.16.).



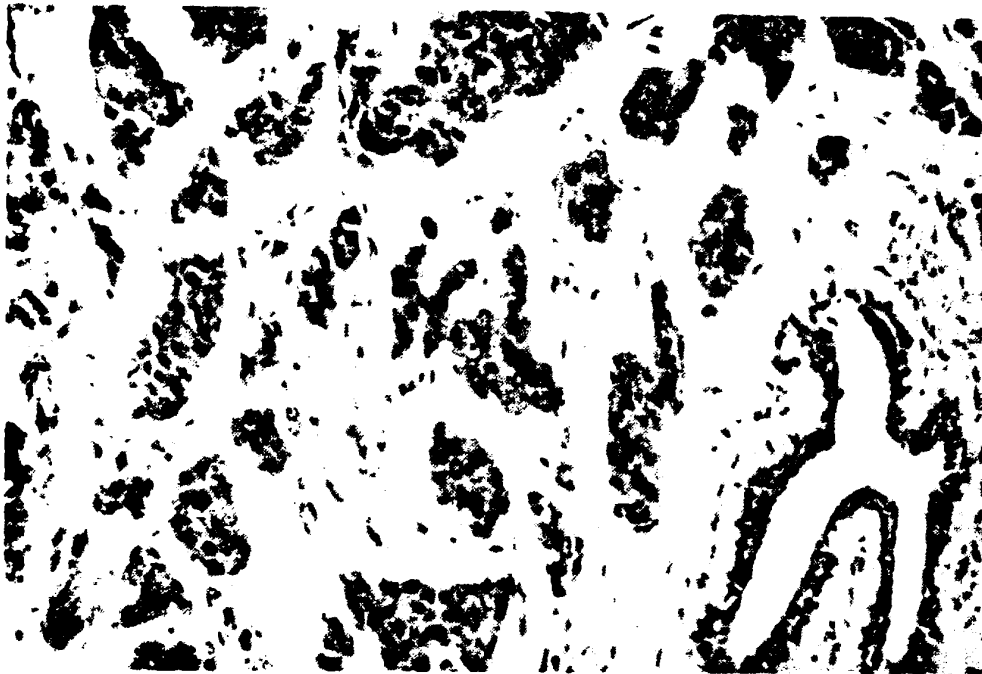
Εικόνα 4.1.14.: Ανοσοϊστοχημική έκφραση της Στρωμελυσίνης .

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της ΣΤΡ, σχεδόν με καμία από τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους, παρά μόνο με τους οιστρογονικούς υποδοχείς ($p=0.034$) (Πίνακας 4.1.9) (Ιστόγραμμα 4.1.7.).

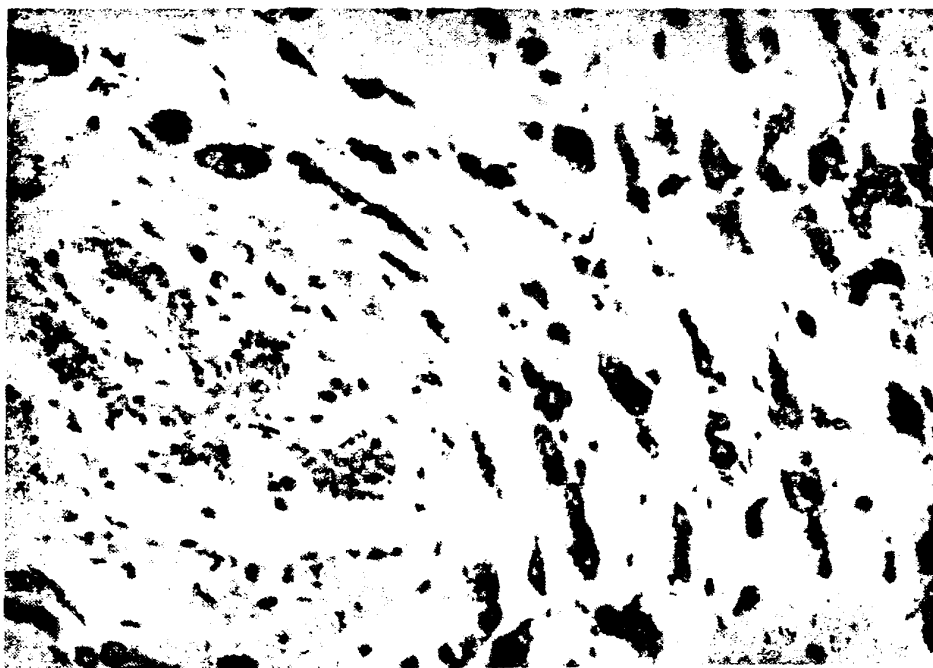
	Έκφραση της ΣΤΡ			p-value
	<10	10-50	>50	
Ηλικία				
<45	11	9	8	
45-55	9	5	11	NS
>55	14	6	22	
Μέγεθος όγκου				
<2	3	4	5	
2-5	22	8	24	NS
>5	7	6	10	
Τύπος				
Πορογενές	26	9	29	
Λοβιακό	4	7	6	NS
Μικτό	4	4	6	
Βαθμός διαφοροποίησης				
G1	5		5	
G2	16	8	20	NS
G3	13	10	15	
Λεμφαδένες				
(-)	6	4	11	NS
(+)	19	13	25	
PCNA				
<50	16	4	9	NS
>50	9	12	19	
MIB-1				
<10	20	11	19	NS
>10	7	5	8	
ER				
<10	9	5	3	p=0.034
>10	13	10	20	
PgR				
<10	5	3	9	NS
>10	16	11	12	

Πίνακας 4.1.9.: Συσχέτιση της έκφρασης της ΣΤΡ με διάφορες κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους





Εικόνα 4.1.15: Ανοσοϊστοχημική έκφραση της Στρωμελυσίνης. Παρατηρείται εστιακή έκφραση αυτής σε φυσιολογικό πόρο.



Εικόνα 4.1.16: Ανοσοϊστοχημική έκφραση της Στρωμελυσίνης, σχεδόν πλήρη απουσία κατά τον φυσιολογικό πόρο

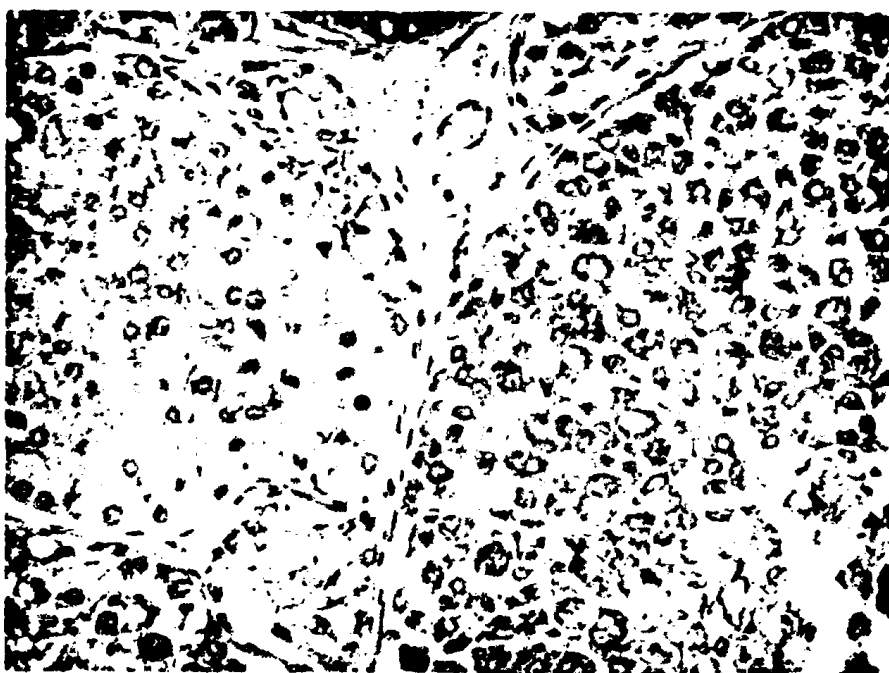
4.1.6. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της Καθεψίνης D (KD)

Φυσιολογικός ιστός

Παρατηρήθηκε ετερογένεια της έκφρασης αυτής σε φυσιολογικά λόβια και πόρους. Άλλοτε εμφάνιζαν εστιακά διάχυτη λεπτοκοκκιώδη έκφραση αυτής άλλοτε καταλαμβάνοντας μεγαλύτερη έκταση και άλλοτε ήταν αρνητικά. Έντονη έκφραση αυτής παρατηρήθηκε σε θέσεις αποκρινούς μετάπλασης και σε ενδοπορικά θηλώματα.

Πρωτοπαθής όγκος

Μικρή έκφραση της KD του όγκου (θετικότητα <10% των νεοπλασματικών κυττάρων) παρατηρήθηκε σε 13/131 (9.9%) περιπτώσεις καρκινωμάτων, μέτρια έκφραση (θετικότητα 10-50% των νεοπλασματικών κυττάρων) σε 26/131 (19.8%) και έντονη (θετικότητα >50% των νεοπλασματικών κυττάρων) σε 92/131 (70.2%) (Εικόνες 4.1.17., 4.1.18., 4.1.19.).

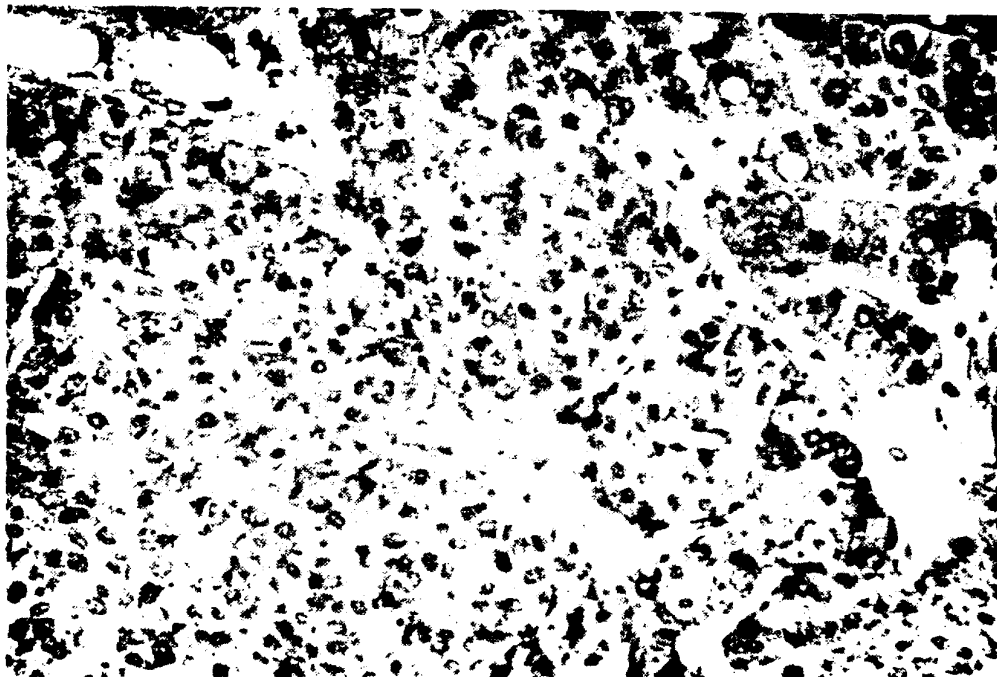


Εικόνα 4.1.17.: Ανοσοϊστοχημική έκφραση της Καθεψίνης D

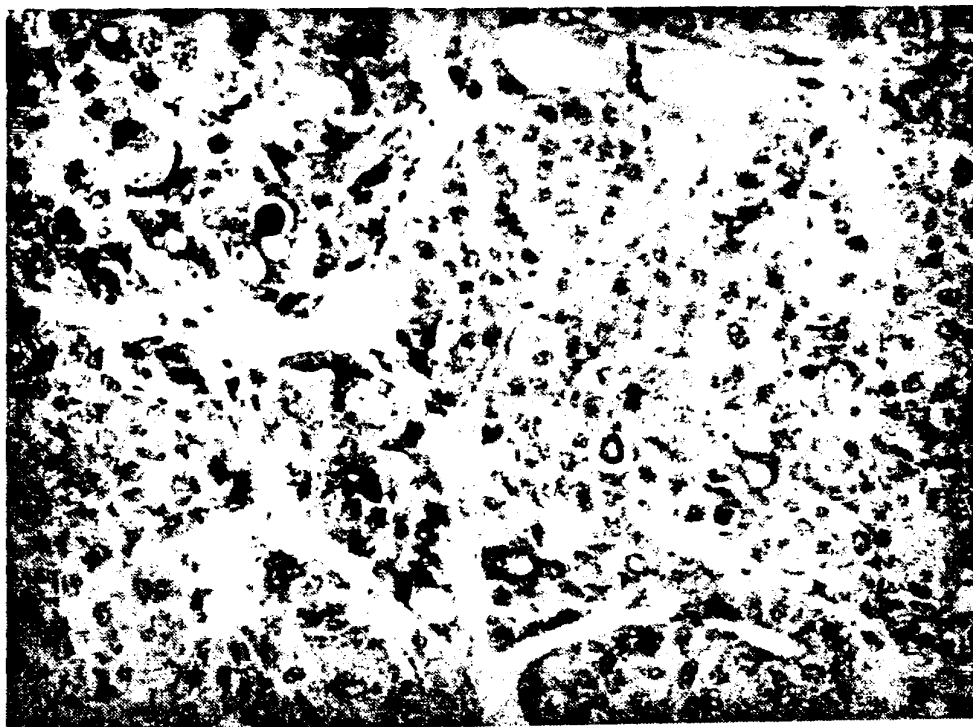
Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της KD του όγκου, σχεδόν με καμία από τις κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους. Οριακή θετική συσχέτιση αυτής διαπιστώθηκε μόνο με τους οιστρογονικούς υποδοχείς ($p=0.06$) (Πίνακας 4.1.10.).

Μικρή έκφραση της KD του στρώματος (+) παρατηρήθηκε σε 75/131 (57.3%) περιπτώσεις καρκινωμάτων, μέτρια έκφραση (++) σε 24/131 (18.3%) και έντονη (+++) σε 32/131 (24.4%).





Εικόνα 4.1.18.: Ανοσοϊστοχημική έκφραση της Καθεψίνης D, εν μέρει λεπτοκοκκιάδης



Εικόνα 4.1.19.: Ανοσοϊστοχημική έκφραση της Καθεψίνης D, αναγνωρίζονται σφαιρίδια αυτής.

Έκφρασης της KD του όγκου				p-value
	<10	10-50,	>50	
Ηλικία				
<45	5	4	25	
45-55	3	9	20	NS
>55	4	9	39	
Μέγεθος όγκου				
<2	5	1	12	
2-5	5	15	45	NS
>5	2	6	19	
Τύπος				
Πορογενές	10	15	57	
Λοβιακό	2	5	15	NS
Μικτό		3	12	
Βαθμός διαφοροποίησης				
G1	4	1	8	
G2	5	11	36	NS
G3	3	10	36	
Λεμφαδένες				
(-)	5	8	20	NS
(+)	5	11	47	
PCNA				
<50	3	9	27	NS
>50	6	11	44	
MIB-1				
<10	8	8	49	NS
>10	3	12	25	
ER				
<10	3	6	14	p=0.06
>10	4	10	51	
PgR				
<10	4	5	22	NS
>10	1	8	42	

Πίνακας 4.1.10.: Συσχέτιση της έκφρασης της KD του όγκου με διάφορες κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους



	Έκφρασης της KD του στρώματος			p value
	+	++	+++	
Ηλικία				
<45	16	9	9	
45-55	19	7	6	NS
>55	31	8	13	
Μέγεθος όγκου				
<2	9	5	4	
2-5	36	13	16	NS
>5	14	5	8	
Τύπος				
Πορογενές	39	17	26	
Λοβιακό	18	4		NS
Μικτό	9	3	3	
Βαθμός διαφοροποίησης				
G1	9	3	1	
G2	32	14	6	p=0.01
G3	22	6	21	
Λεμφαδένες				
(-)	21	6	6	p=0.04
(+)	31	14	18	
PCNA				
<5	27	5	7	p=0.008
>5	26	15	20	
MIB-1				
<10	40	13	12	p=0.01
>10	17	9	14	
ER				
<10	8	5	10	p=0.04
>10	36	15	14	
PgR				
<10	15	5	11	NS
>10	28	13	10	

Πίνακας 4.1.11: Συσχέτιση της έκφρασης της KD του στρώματος με διάφορες κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της KD του στρώματος, με τον ιστολογικό τύπο, με το μέγεθος του όγκου και με τους προγεστερονικούς υποδοχείς (Πίνακας 4.1.11.).

Παρατηρήθηκε συσχέτιση της έκφρασης αυτής με τα φτωχά διαφοροποιημένα καρκινώματα (p=0.01) (Πίνακας 4.1.11.). Αναλυτικότερα, στατιστικώς σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε τόσο μεταξύ των καρκινωμάτων ιστολογικού βαθμού κακοηθείας 1 και 3 (p=0.04), όσο και μεταξύ 2 και 3 (p=0.01).

Επίσης, σημαντικό είναι το γεγονός ότι παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση της έκφρασης της KD του στρώματος και με τους δύο δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού του MIB1 (p=0.01) και του PCNA (p=0.008) (Πίνακας 4.1.11.).

Αντίστροφη ήταν η συσχέτιση της στρωματικής έκφρασης της KD με τους οιστρογονικούς υποδοχείς (p=0.04) (Πίνακας 4.1.11.).

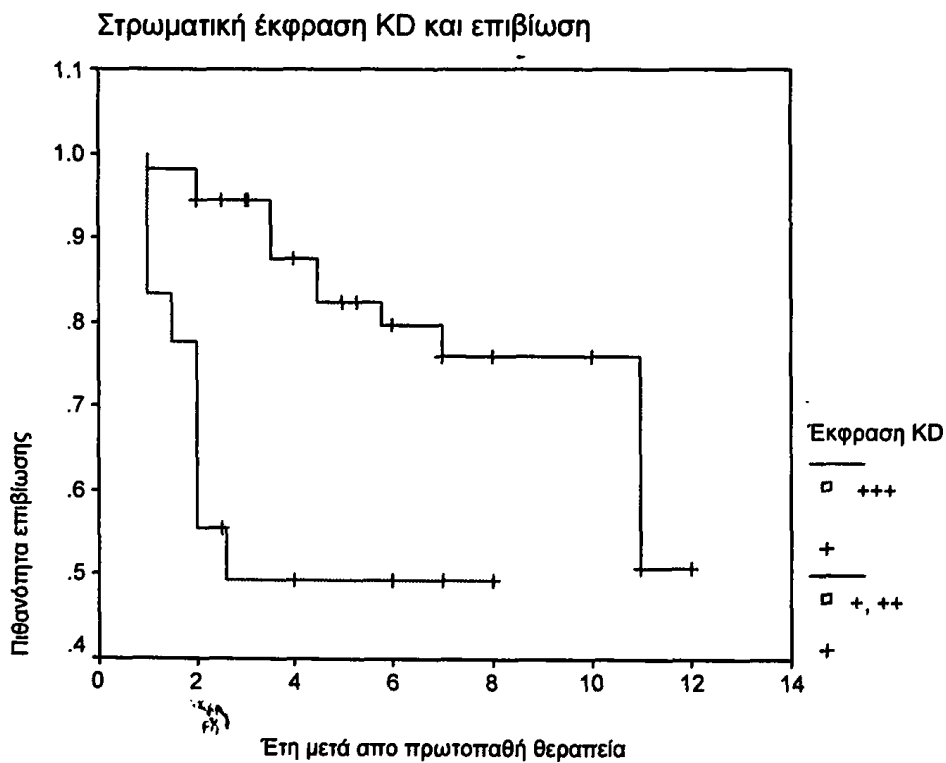
Ενδιαφέρον παρουσιάζει η αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της στρωματικής και της επιθηλιακής έκφρασης του ενζύμου (p=0.0021).

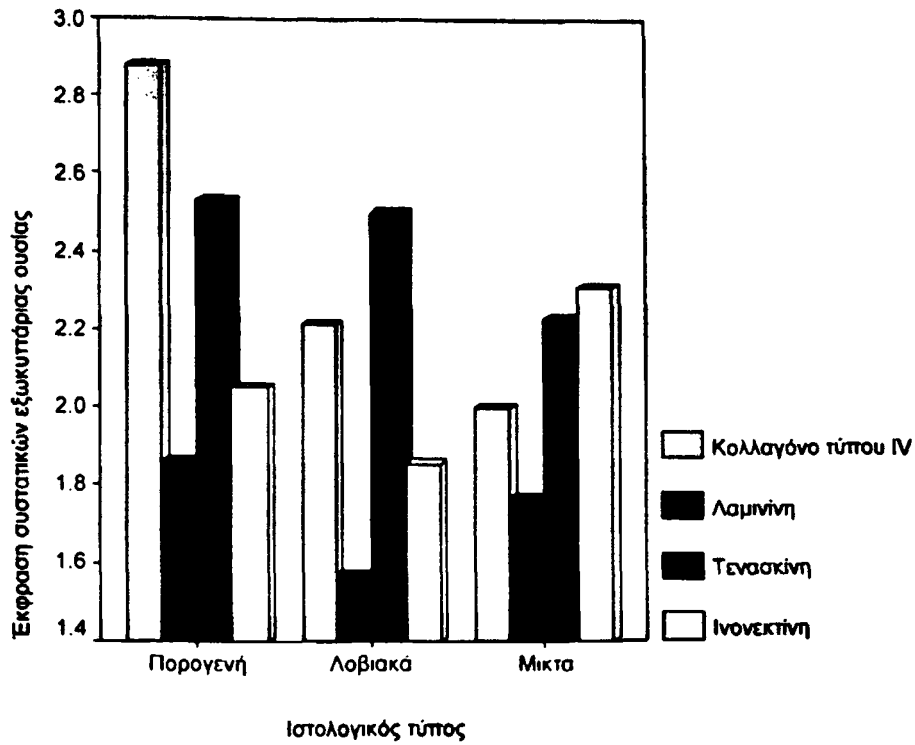


	Έκφραση της IN		p value
	-, +	++, +++	
CD όγκου			
<10	6	7	NS
>10	30	67	
CD			
στρώματος	26	38	p=0,023
+	4	17	
++	6	19	
+++			
MIB1			
<10	25	31	P=0.028
>10	6	31	
PCNA			
<50	10	24	NS
>50	17	37	

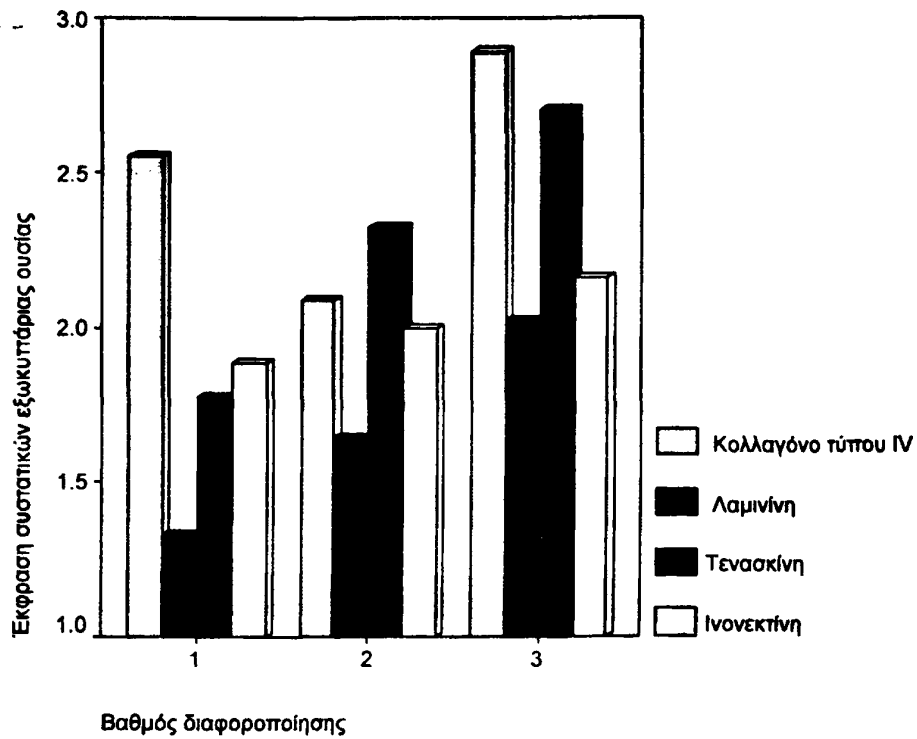
Πίνακας 4.1.12.: Συσχέτιση της IN με την KD και τους δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού

Τέλος, η πολυπαραγοντική ανάλυση της επιβίωσης έδειξε ότι η στρωματική έκφραση αυτής αποτελεί αρνητικό προγνωστικό παράγοντα για την συνολική επιβίωση ($p=0.035$). Αυτό φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα.



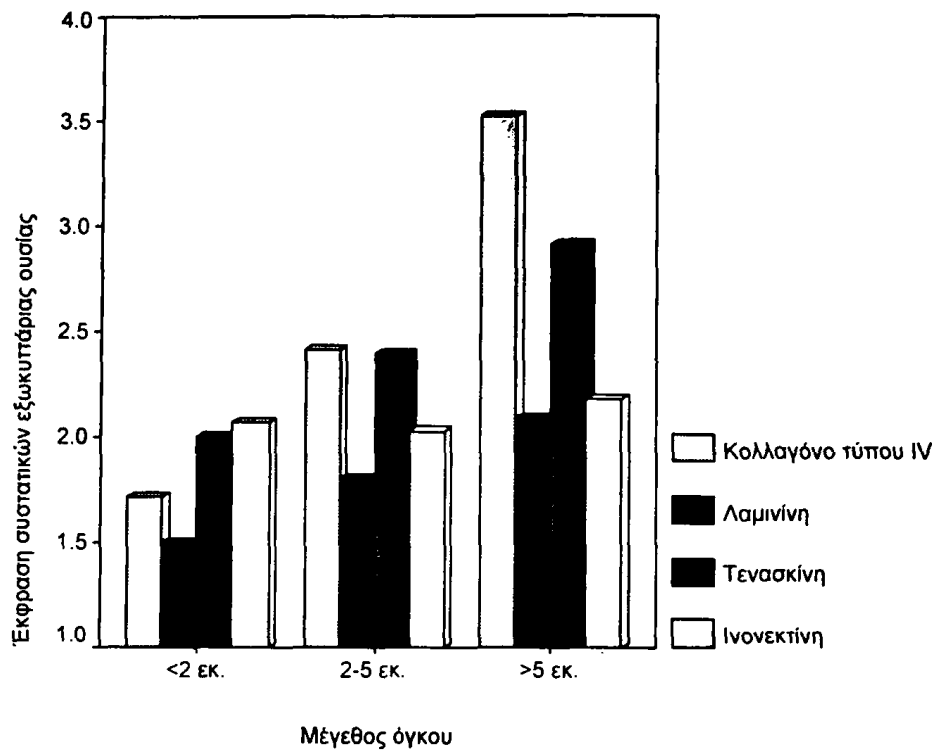


Ιστόγραμμα 4.1.1. :Συσχέτιση της έκφρασης των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας με τον ιστολογικό τύπο

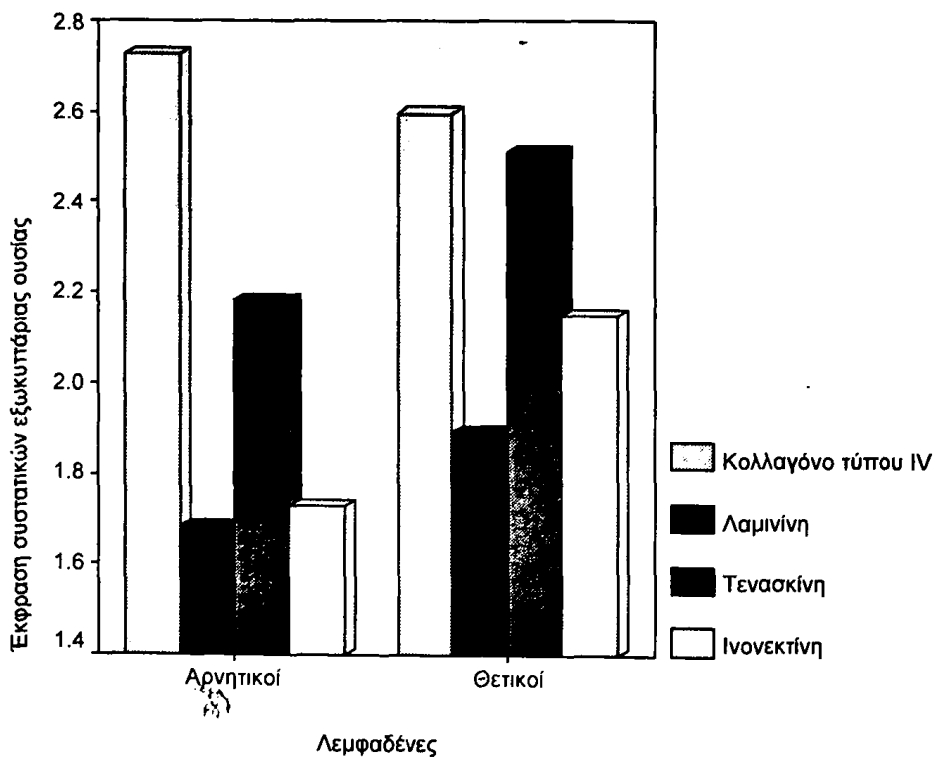


Ιστόγραμμα 4.1.2. :Συσχέτιση της έκφρασης των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας με τον βαθμό διαφοροποίησης



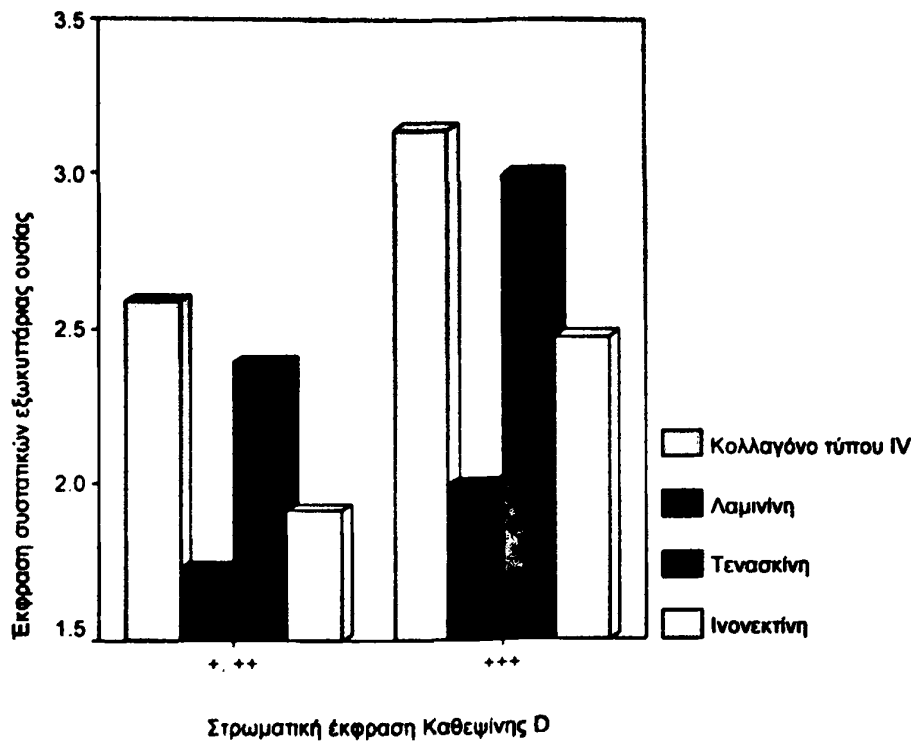


Ιστόγραμμα 4.1.3.: Συσχέτιση της έκφρασης των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας με το μέγεθος του όγκου

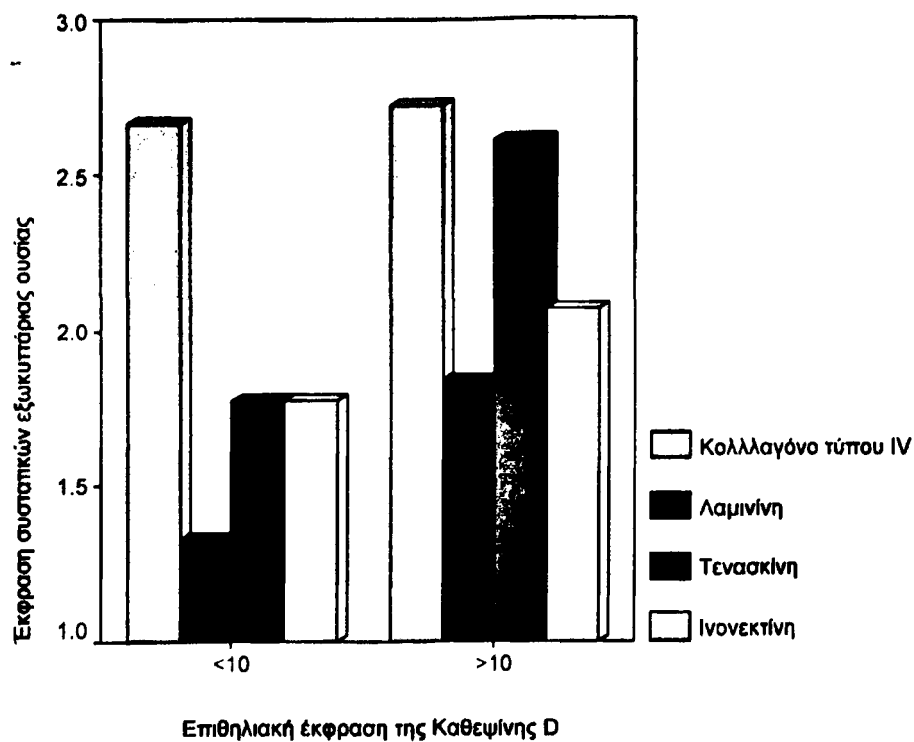


Ιστόγραμμα 4.1.4.: Συσχέτιση της έκφρασης των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας με τους λεμφαδένες

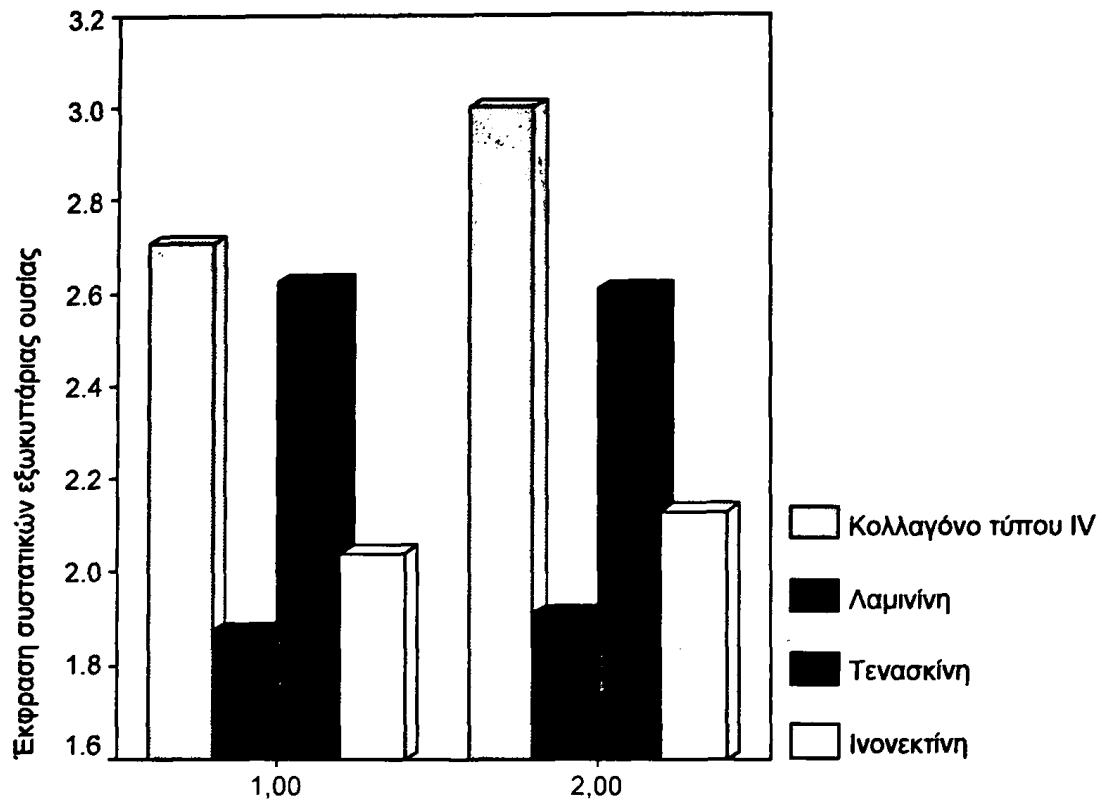




Ιστόγραμμα 4.1.5: Συσχέτιση της έκφρασης των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας με την στριωματική έκφραση της Καβεψίνης D



Ιστόγραμμα 4.1.6: Συσχέτιση της έκφρασης των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας με την επιθηλιακή έκφραση της Καβεψίνης D



Επιθηλιακή έκφραση Στρωμελυσίνης

Ιστόγραμμα 4.1.7.: Συσχέτιση της έκφρασης των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας με την επιθηλιακή έκφραση της Στρωμελυσίνης

4.2 Αποτελέσματα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου

Περιγραφή της δομής των ουσιών αυτών

Στην πραγματικότητα οι άμορφες αυτές ουσίες φαίνεται να απαρτίζονται από τις ίδιες πρωτεΐνες όπως και σε φυσιολογική δομή, με την διαφορά ότι υπάρχει αποδιοργάνωση αυτών.

Αυτές οι ουσίες εμφανίστηκαν ως ένα άμορφο υλικό και εμφάνιζαν μια λεπτοκκοκιδώδη σύσταση, ομοιόμορφη μέτριας πυκνής υποδομής, χωρίς να προσλαμβάνουν τη αναμενόμενη για αυτή τη θέση, στερεοδιάταξη του βασικού πετάλου. Εμφανίστηκαν σαν συστατικά του στρώματος, τα οποία ερχόταν σε σχέση με το ΒΠ, ή ως τρισδιάστατες συναθροίσεις, χάνοντας την γραμμική τους εμφάνιση, ή ερχόταν σε άμεση επαφή με τις κυτταροπλασματικές μεμβράνες των νεοπλασματικών κυττάρων.



4.2.1. Περιαγγειακή ουσία

(η φύση της ουσίας γύρω από τα αγγεία)

Σε αυτή την ενότητα θα περιγραφούν οι διαφορετικές δομές οργάνωσης της ουσίας που παρατηρήθηκαν σε αυτή την μελέτη.

Αναγνωρίστηκε σημαντικά μεγάλη ποικιλομορφία στην οργάνωση της περιαγγειακής ουσίας, τόσο μεταξύ των διαφορετικών περιπτώσεων, όσο και μεταξύ των αγγείων της ίδιας περίπτωσης και μάλιστα ακόμη και σε διαφορετικές θέσεις του ίδιου αγγείου.

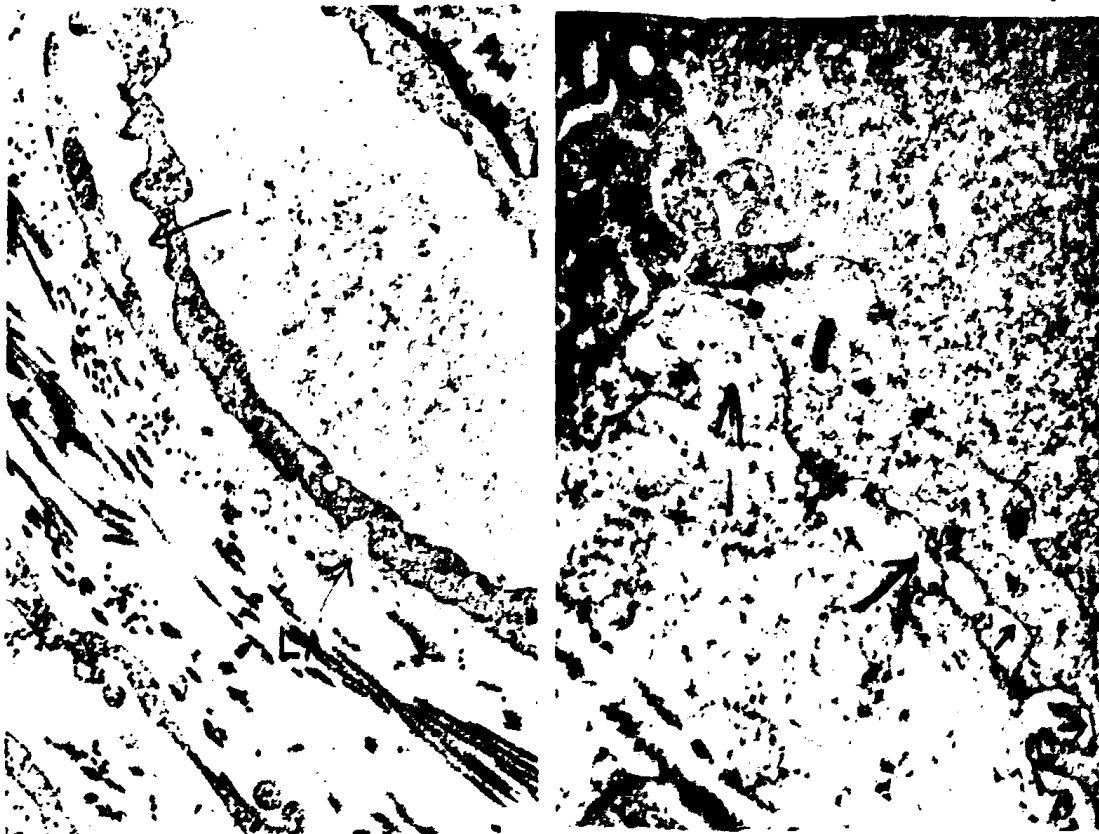
Στις περισσότερες περιπτώσεις τα αγγεία ανευρέθησαν σε θέσεις όπου απουσίαζαν τα νεοπλασματικά κύτταρα. Υπήρχε καλή οργάνωση της δομής του Βασικού τους Πετάλου (ΒΠ) δηλ. ήταν ευδιάκριτος ο διαχωρισμός των συστατικών του (lumina densa/lumina lucida) (Εικόνα 4.2.1, 4.2.2).



Εικόνα 4.2.1.: Ένα αγγείο στο στρώμα στην περίπτωση M11. Παρατηρούνται δύο ενδοθηλιακά κύτταρα (E1, E2) ο αυλός (Lu), μια προσεκβολή ενός περικυτάρου (P) ο πυρήνας (N) ενός περικυτάρου (P), και ίνες κολαγόνου (co). x 9,000.

Σε μερικές περιπτώσεις ανευρέθησαν αγγεία σε γειτνίαση με τα νεοπλασματικά κύτταρα, χωρίς όμως να εφάπτονται με αυτά. Σε ορισμένα αγγεία υπήρχε καλή οργάνωση της δομής του ΒΠ, ευδιάκριτος δηλ. διαχωρισμός των συστατικών του (lumina densa/lumina lucida). Αγγεία τα οποία δεν ήταν σε άμεση σχέση με τα νεοπλασματικά κύτταρα, παρόλο που εμφάνιζαν καλή ανάπτυξη του ΒΠ έδειξαν σε διαφορετικά σημεία της επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων, ετερογένεια της οργάνωσης αυτού. Για παράδειγμα, στην περίπτωση M11 ανευρέθησαν στο στρώμα αγγεία με καλή ανάπτυξη του ΒΠ (Εικόνα 4.2.1, 4.2.2), ενώ αντιθέτως σε θέση που υπήρχε επικάλυψη από προσεκβολή ενός περικυτάρου το ΒΠ αυτό εμφανίστηκε δικτυωτό και αποδιοργανωμένο.





Εικόνα :4.2.2.: Λεπτομέρεια της εικόνας 4.2.1., η οποία δείχνει ένα καλά αναπτυσσόμενο περι-ενδοθηλιακά ΒΠ (lamina densa/lamina lucida (LA) και ένα περισσότερο αποδιοργανωμένο υλικό μεταξύ περικυττάρου και ενδοθηλιακού κυττάρου (βέλος). x 24,000

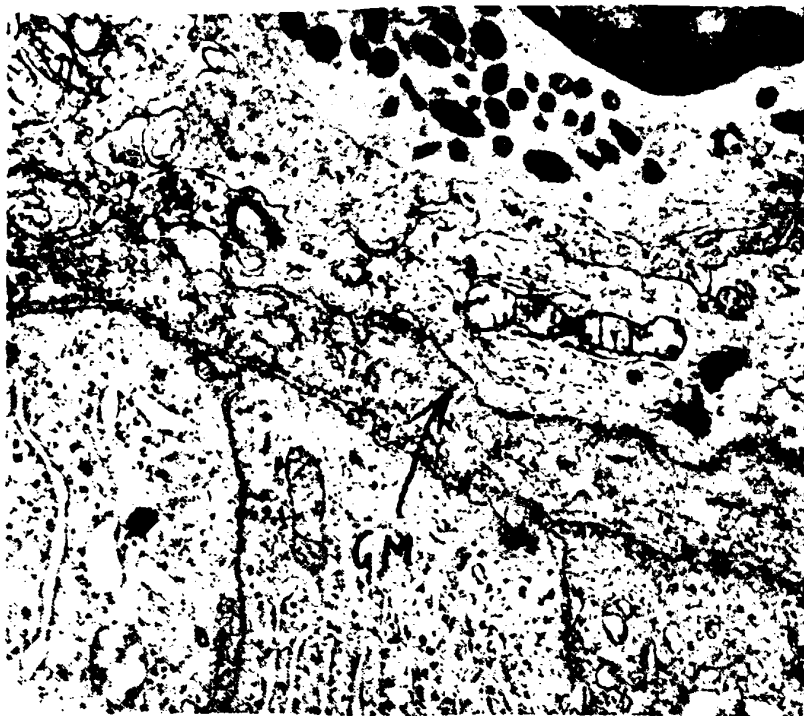
Εικόνα :4.2.3.: Διαφορετική περιοχή του ίδιου αγγείου, όπου στην ενδοθηλιακή επιφάνεια παρατηρείται ένα περισσότερο αποδιοργανωμένο υλικό (βέλη) με θέσεις όπου δεν υπάρχει καθόλου επικάλυψη (μικρά βέλη). x24,000.

Κάποια αγγεία, όπως στην περίπτωση M13 (επί απουσίας γειτονικών καρκινικών κυττάρων) εμφάνιζαν τμηματική αποδιοργάνωση της δομής του ΒΠ των ενδοθηλιακών κυττάρων, δηλαδή θέσεις ύπαρξης φυσιολογικής δομής ΒΠ που εναλλάσσονταν από θέσεις διάσπασης αυτού έως και πλήρους απουσίας του (Εικόνα: 4.2.3).

Στην περίπτωση ΚΧ3 παρατηρήθηκε ένα επιπλέον πρότυπο δομικής ετερογένειας της περιαγγειακής ουσίας γύρω από κάθε αγγείο (Εικόνες: 4.2.4, 4.2.5). Για παράδειγμα αναγνωρίστηκε αγγείο, σε πολύ κοντινή απόσταση από τα νεοπλασματικά κύτταρα το οποίο απείχε περίπου 1μm. Εδώ, ενώ τα νεοπλασματικά κύτταρα παρουσίαζαν μια καλή οργάνωση της δομής του ΒΠ (δηλ. ήταν ευδιάκριτος ο διαχωρισμός των συστατικών του, lamina densa/lamina lucida), στο ενδοθηλιακά κύτταρα παρατηρήθηκαν εστίες άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας, που καταλάμβαναν τον χώρο όπου φυσιολογικά αναμενόταν η παρουσία τυπικού καλά οργανωμένου ΒΠ (Εικόνα: 4.2.5). Ωστόσο σε θέσεις μεγαλύτερης απόστασης από τα νεοπλασματικά κύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα εμφάνιζαν διάσπαση τμήματος του ΒΠ, δηλαδή διάσπαση της lamina densa και απύθεια της λεπτής άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας (Εικόνα: 4.2.4). Αυτή η παραλλαγή της δομικής οργάνωσης της περιαγγειακής ουσίας παρατηρήθηκε επίσης και σε αγγεία που ανευρέθησαν σε αρκετή απόσταση από τα νεοπλασματικά κύτταρα.



Εικόνα 4.2.4.: Αγγείο δίπλα σε νεοπλασματική νησίδα στην περίπτωση ΚΧ3. Τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν ένα καλά σχηματισμένο ΒΠ (LA). Αντίθετα (απέναντι), το ενδοθηλιακό κύτταρο επενδύεται από ένα άμορφο "κοκκιώδες" υλικό, (GM). Ο αυλός είναι διατεταμένος και καταλαμβάνεται από ένα ουδετερόφιλο. T, νεοπλασματικό κύτταρο; N, πυρήνας; P, περικύτταρο. x 12000.



Εικόνα 4.2.5.: Λεπτομέρεια της εικόνας 4.2.4. η οποία δείχνει την άμορφη "κοκκιώδη" ουσία (βέλος). x 24,000.

Παρόμοια ετερογένεια στην οργάνωση της περιαγγειακής ουσίας παρατηρήθηκε και στην περίπτωση X5. Δηλαδή, στα ενδοθηλιακά κύτταρα ενός αγγείου που βρισκόταν σε απόσταση από τα νεοπλασματικά κύτταρα (Εικόνα: 4.2.6), αναγνωρίστηκαν, θέσεις που υπήρχε άμορφο "κοκκιώδες" υλικό κατά το ενδοθηλιακά κύτταρα (Εικόνα: 4.2.7), θέσεις με φτωχή οργάνωση της δομής του ΒΠ (Εικόνα: 4.2.8) και θέσεις με παρουσία άμορφου "κοκκιώδους" υλικού στην επιφάνεια των περικυττάρων (Εικόνα: 4.2.9).



Εικόνα 4.2.6.: Μέσου μεγέθους αγγείο, με κλειστό αυλό στην περίπτωση X5. x 9,000



Εικόνα 4.2.7.: Λεπτομέρεια της εικόνας 4.2.7, όπου αναγνωρίζεται άμορφη "κοκκιώδη" ουσία κατά την επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων (βέλος). x 24,000



Εικόνα 4.2.8.: Λεπτομέρεια της εικόνας 4.2.6. Αναγνωρίζεται ενδιάμεσης μορφολογίας ουσία ανάμεσα σε βασικό πέταλο και άμορφη "κοκκιώδη" ουσία. (βέλος). Σε κάποιες θέσεις υπάρχει υπόνοια βασικού πετάλου (βέλος). N, πυρήνας, Lu, αυλός. x 18,000.



Εικόνα 4.2.9.: Λεπτομέρεια της εικόνας 4.2.6 όπου αναγνωρίζεται άμορφη "κοκκιώδη" ουσία κατά την επιφάνεια ενός περικυττάρου [δίπλα στις ασυνήθιστα καλά αναπτυσσόμενες θέσεις σύνδεσης (attachment plaques)] (βέλος). x 24,000.



Ένα άλλο πρότυπο υπερμικροσκοπικής ετερογένειας της περιαγγειακής ουσίας, παρατηρήθηκε στην περίπτωση X4. Εδώ, αναγνωρίστηκαν μεγαλύτερου μεγέθους αγγεία, όπου τα ενδοθηλιακά τους κύτταρα εμφάνιζαν θέσεις με μερικώς αποδιοργανωμένη τη δομή του ΒΠ και θέσεις με μεγαλύτερη αποδιοργάνωση ή/και εμφάνιση άμορφου "κοκκιώδους" υλικού (Εικόνα: 4.2.10.) Ωστόσο, τα γειτονικά περικύτταρα σε ορισμένες θέσεις παρουσίαζαν μια καλά οργανωμένη δομή του ΒΠ, ενώ σε άλλες λιγότερο. (Εικόνα: 4.2.11).



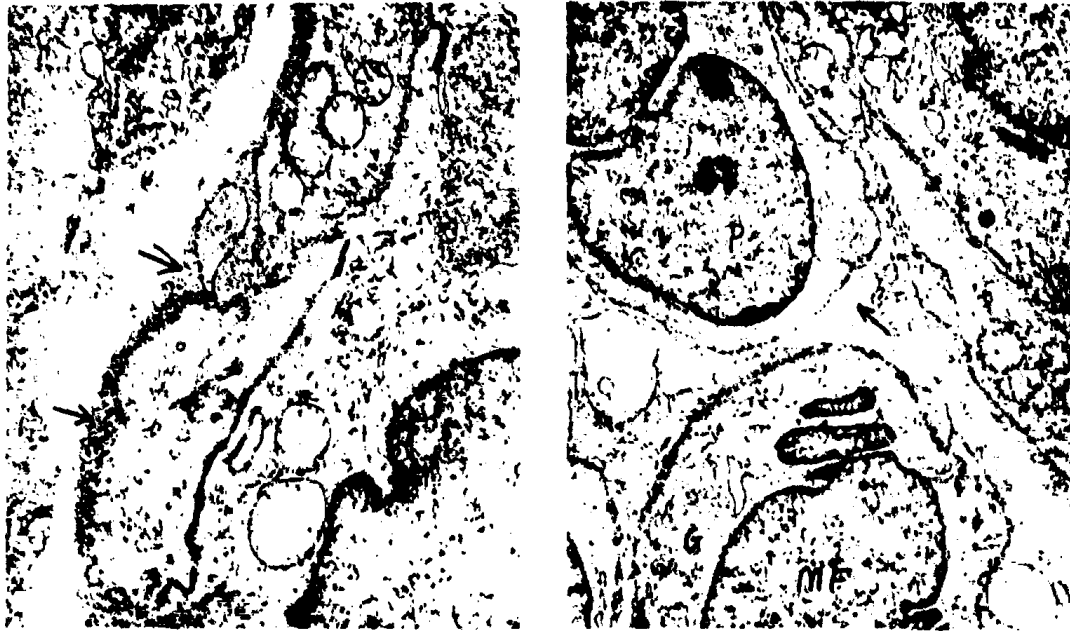
Εικόνα:4.2.10.: Ένα αγγείο από την περίπτωση X4. Η περι-ενδοθηλιακή επιφάνεια εμφανίζει μια εστία παρουσίας βασικού πετάλου (LA), αλλά κατά τα άλλα η θεμέλια ουσία είναι αποδιοργανωμένη και θυμίζει την δομή της άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας (βέλος). IF, ενδιάμεσα ινίδια TJ, σφιχτές συνενώσεις (tight junctions), MY, μυοϊνίδια στα περικύτταρα. x 24,000.



Εικόνα:4.2.114.: Το ίδιο αγγείο όπως στην εικόνα 4.2.10. Αυτό εμφανίζει αποδιοργάνωση της θεμέλιας ουσίας κατά τη επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η επιφάνεια των περικυττάρων (P) εμφανίζει θέσεις με καλά διοργανωμένο ΒΠ και θέσεις με αποδιοργάνωση αυτού (βέλος). X 24,000.

Στις περιπτώσεις 359, 247 και X4 αναγνωρίστηκε τυπική εμφάνιση άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας, με μικρή ή καμία ένδειξη παρουσίας καλά οργανωμένου ΒΠ. Στην περίπτωση X4, σε αγγεία που βρισκόταν σε απόσταση από τα νεοπλασματικά κύτταρα παρατηρήθηκε η παρουσία άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας, η οποία αφορούσε και στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα περικύτταρα. (Εικόνες: 4.2.12, 4.2.13).

Σε τρεις περιπτώσεις (247, KX3 και 347), παρατηρήθηκε ένα αγγειονεοπλασματικό σύμπλεγμα. Στην περίπτωση 247 (Εικόνα: 4.2.14), η λεπτής δομής άμορφη "κοκκιώδης" ουσία βρέθηκε να καταλαμβάνει το χώρο μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης των ενδοθηλιακών κυττάρων αφ'ενός και εκείνη των περικυττάρων (Εικόνα: 4.2.15) και των γειτονικών νεοπλασματικών κυττάρων (Εικόνα: 4.2.16), αφ'ετέρου.



Εικόνα: 4.2.12: Άμορφη "κοκκιώδη" ουσία κατά την επιφάνεια των περικυτάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων (βέλι), στην περίπτωση X4. x. 24,000.

Εικόνα: 4.2.13: Μυοϊνοβλάστη (MF) σε επαφή με ένα περικύτταρο (P) μέσω της άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας (βέλος) στην περίπτωση X4. Αν και η μυοϊνοβλάστη εμφανίζει μια ασυνήθιστη εμφάνιση, αναγνωρίζονται rER και μυοϊνίδια (and a Golgi apparatus, G). x15,000.



Εικόνα: 4.2.14: Ένα μικρή μεγέθους αγγείο σε άμεση επαφή με τα νεοπλασματικά κύτταρα (T) στην περίπτωση 247. Ο αυλός του αγγείου καταλαμβάνεται από ερυθροκύτταρα (ER). N, ενδοθηλιακοί πυρήνες. x 9,000.

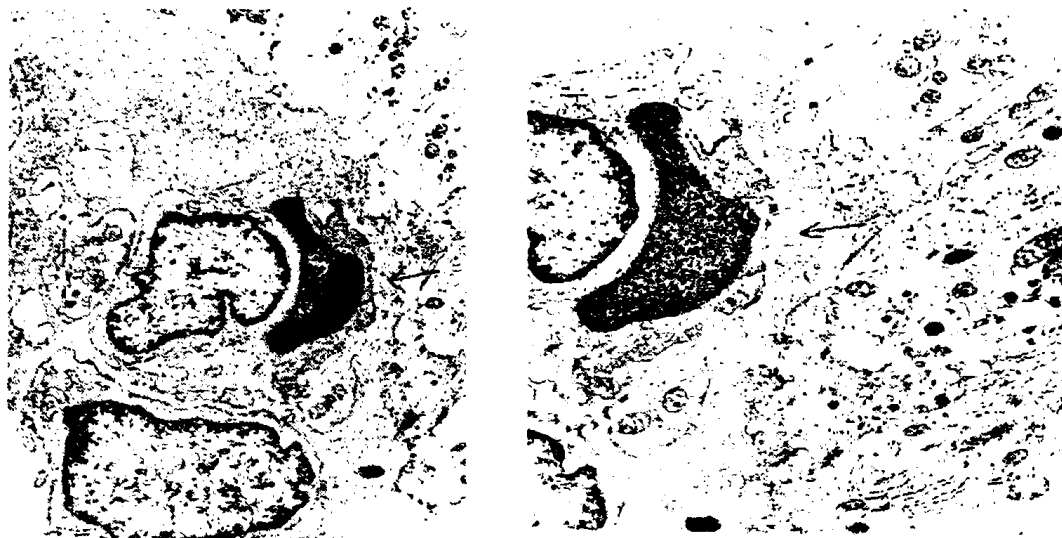


Εικόνα: 4.2.15.: Λεπτομέρεια από το ίδιο αγγείο της εικόνας 4.2.14 στην οποία αναγνωρίζεται άμορφη "κοκκιώδης" ουσία πάνω από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και των περικυττάρων (βέλος). T, νεοπλασματικά κύτταρα. x 24,000.



Εικόνα: 4.2.16.: Λεπτομέρεια του αγγείου της εικόνας 4.2.14 στην οποία αναγνωρίζεται το αγγειονεοπλασματικό σύμπλέγμα (βέλος) μεταξύ των επιφανειών των ενδοθηλιακών και νεοπλασματικών κυττάρων. x 24,000.

Στην περίπτωση ΚΧ3, η διάταξη της περιαγγειακής ουσίας έδειξε μια ασυνήθιστη, πολύπλοκη απεικόνιση διαφορετικής οργάνωσης, σε διαφορετικά τμήματα του αγγείου. Τα αγγεία αναγνωρίστηκαν με βάση τα παραπάνω αναφερόμενα κριτήρια, για τα ενδοθηλιακά κύτταρα και για τα περικύτταρα. Μερικά από τα τελευταία εμφανίστηκαν στενά συνδεδεμένα με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ κάποια άλλα πιο χαλαρά συνδεδεμένα. (Εικόνες: 4.2.17, 4.2.18).



Εικόνα: 4.2.17.: Μικρού μεγέθους αγγείο σε σχέση με την επιφάνεια νεοπλασματικής νησίδας, στην περίπτωση ΚΧ3. Παρατηρείται άμορφη "κοκκιώδης" ουσία μεταξύ ενδο-θηλιακού και νεοπλασματικού κυττάρου, σχηματίζοντας έτσι ένα αγγειονεοπλασματικό σύμπλεγμα (βέλος). Σημειώνεται ότι στο διάστημα μεταξύ μιας μικρής περικυτταρικής προσεκβολής (P) και του ενδοθηλίου εμφανίζει σε μικρή θέση την παρουσία ΒΠ. x 15.000.

Εικόνα: 4.3.18.: Λεπτομέρεια από την εικόνα 4.2.17, η οποία δείχνει την άμορφη "κοκκιώδη" ουσία, που σχηματίζει ένα αγγειονεοπλασματικό σύμπλεγμα (βέλος). x 24.000.

Εκτός από σπάνιες περιπτώσεις, δεν υπήρχε οργανωμένη δομή ΒΠ (lamina densa/lamina lucida). Οι εξαιρέσεις ήταν η παρουσία μικρών λωρίδων στις θέσεις στενής σύνδεσης μεταξύ των περικυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων (Εικόνα: 4.2.18.), όπου αναγνωρίστηκαν κάποια μικρά υπολείμματα ή κατακεραματισμένα τμήματα της lamina densa. Διαφορετικά στις πιο χαλαρές θέσεις σύνδεσης μεταξύ των περικυττάρων και των κυτταροπλασματικών μεμβρανών των ενδοθηλιακών κυττάρων, υπήρχε σύνδεση μεταξύ τους με απουσία της lamina lucida. Κάποιες περιοχές εμφάνισαν χαρακτηριστικά το αγγειονεοπλασματικό σύμπλεγμα (Εικόνα: 4.2.19.), όπου τα ενδοθηλιακά κύτταρα ήταν σε επαφή μέσω της άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας με τις κυτταροπλασματικές μεμβράνες των γειτνιαζόντων νεοπλασματικών κυττάρων. Η οργανωμένη δομή του ΒΠ (lamina densa/lamina lucida) των νεοπλασματικών κυττάρων απουσίαζε. Επιπρόσθετα, θα πρέπει να σημειωθεί ότι το ίδιο παρατηρήθηκε και στα περικύτταρα. Επιπλέον ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι στην μικρή μεγέθυνση η περιαγγειακή ουσία, φαινόταν περισσότερο κοκκιώδης και μάλλον άνυφη. Ωστόσο, στη μεγάλη μεγέθυνση μερικές περιοχές αυτής της ουσίας φάνηκε να περικλείουν μερικά λεπτά ινίδια, πιθανά λεπτά ινίδια του κολλαγόνου (Εικόνα: 4.2.20.).





Εικόνα: 4.2.19.: Το ίδιο αγγείο της εικόνας 4.2.17 όπου παρατηρείται το αγγειο-νεοπλασματικό σύμπλεγμα (βέλος). x 12,000.



Εικόνα: 4.2.20.: Το ίδιο αγγείο της εικόνας 4.2.17 όπου παρατηρούνται λεπτά ινίδια της-θεμέλιας ουσίας (βέλος). x 15,000.

Τέλος, στην περίπτωση M12 αναγνωρίσθηκαν μεγαλύτερου μεγέθους αγγεία, σε απόσταση από τα νεοπλασματικά κύτταρα, όπου σχεδόν σε όλα η περιαγγειακή ουσία ήταν κοκκιώδης (Εικόνα: 4.2.21). Μόνο γύρω από κάποια περικύτταρα υπήρχαν ευρήματα μιας λεπτής και πιθανά φτωχά οργανωμένης lamina densa (Εικόνα: 4.2.22).



Εικόνα: 4.2.21.: Αγγείο μεγάλου μεγέθους, κατά το στρώμα στην περίπτωση M12 το οποίο εμφανίζει άμορφες "κοκκιώδεις" ουσίες (βέλη). x 7,500.



Εικόνα:4.2.22.: Λεπτομέρεια της εικόνας 4.2.21 στην οποία αναγνωρίζεται άμορφη "κοκκιώδης" ουσία κατά τις επιφάνειες των ενδοθηλιακών κυττάρων και των περικυττάρων και θέσεις υπόνοιας σχηματισμού βασικού πετάλου κατά την επιφάνεια των περικυττάρων (βέλη). Ν, πυρήνες ενδοθηλιακών κυττάρων. x24,000.

Εικόνα:4.2.29.: Λεπτομέρεια του όγκου, της ίδιας περιοχής με την εικόνα 2223 στην οποία παρατηρείται μια υπόνοια σχηματισμού βασικού πετάλου στην βασικού τύπου άμορφη "κοκκιώδη" ουσία (βέλη). Και οι δύο X 24,000

4.2.2 Η ουσία της ζώνης της βασικής μεμβράνης

(η φύση της ζώνης της ΒΜ που βρίσκεται σε άμεση επαφή με νησίδες καρκινικών κυττάρων και η ενδιάμεση ουσία)

Ο όρος ζώνη της βασικής μεμβράνης χρησιμοποιείται εδώ αναφερόμενος στην περιοχή που βρίσκεται μεταξύ της επιφανείας των νεοπλασματικών κυττάρων ή των νεοπλασματικών νησίδων και της γειτονικής θεμέλιας ουσίας. Σε διάφορους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου και του μαζικού παρεγχύματος, έχει αποδειχθεί ότι η δομή αυτή περικλείει πολλά υπερμικροσκοπικά αναγνωρίσιμα συστατικά, συμπεριλαμβανομένων και των στηρικτικών ινιδίων. Αυτά ποτέ δεν ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, και ως εκ τούτου από εδώ και πέρα η χρήση αυτού του όρου θα αφορά τη δομή του ΒΠ και τις πιθανές παραλλαγές των: lamina densa/lamina lucida.

Στις περιπτώσεις 239, ΚΧ3 και Μ11Α, οι νεοπλασματικές νησίδες εμφάνιζαν ένα καλά οργανωμένο ΒΠ ή μακριές λωρίδες ΒΠ αναμεμιγμένες με περιοχές λιγότερο καλά οργανωμένου ΒΠ (Εικόνα: 4.2.23.). Στην περίπτωση Μ11Α, υπήρχαν επίσης περιοχές όπου το ΒΠ είχε μια δικτυωτή εμφάνιση (Εικόνα: 4.2.24.) και παρόμοιες περιοχές με μια περισσότερο άμορφη ή κοκκιώδη εμφάνιση (Εικόνα: 4.2.25.).



Εικόνα:4.2.23.: Επιφάνεια νεοπλασματικής νησίδας, στην περίπτωση ΚΧ3 στην οποία παρατηρείται μια περιοχή με καλή οργάνωση του βασικού πετάλου (LA) και μια μεγαλύτερη περιοχή με λιγότερο καλή οργάνωση αυτού (βέλη). Χ24,000.

Στην περίπτωση Μ12, δεν παρατηρήθηκε ένα καλά οργανωμένο ΒΠ, αλλά μια λεπτής δομής άμορφη "κοκκιώδης" ουσία η οποία ήταν σε επαφή με τις κυτταροπλασματικές μεμβράνες των νεοπλασματικών κυττάρων (Εικόνες: 4.2.26., 4.2.27., 4.2.28.). Άλλες περιοχές εμφάνισαν αμυδρή υπόνοια παρουσίας ΒΠ αναμεμιγμένο με την άμορφη "κοκκιώδη" ουσία (Εικόνες: 4.2.29., 4.2.30.).



Εικόνα:4.2.24.: Νεοπλασματικά κύτταρα (T) στην περίπτωση M11 με περιοχές παρουσίας του βασικού πετάλου (LA) και ένα περισσότερο δικτυωτό υλικό (βέλος). x 24000.

Εικόνα:4.2.25.: Ο ίδιος όγκος όπως στην εικόνα 4.2.24 όπου παρατηρείται εστιακή παρουσία του βασικού πετάλου (LA) και μια θέση που καταλαμβάνεται από υλικό που θυμίζει άμορφη "κοκκιώδη" ουσία (βέλος). x 24,000.



Εικόνα:4.2.26.: Νεοπλασματική νησίδα στην περίπτωση M12. T, νεοπλασματικά κύτταρα. Co, κολλαγόνο. X9,000.

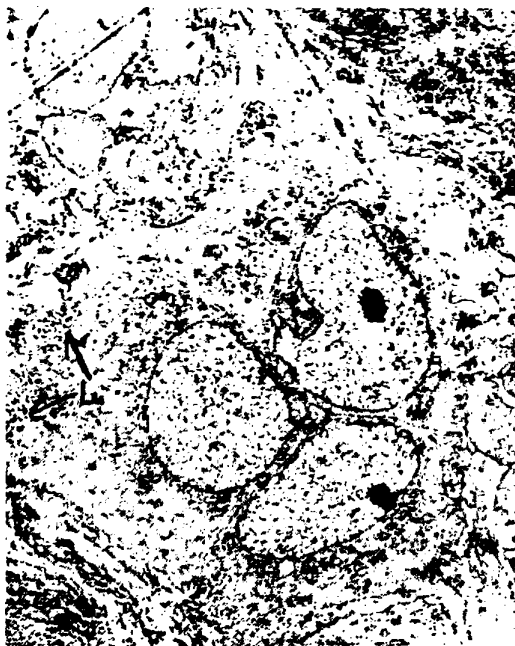
Εικόνα:4.2.28.: Λεπτομέρεια του όγκου, της ίδιας περιοχής με την εικόνα4.2.26 η οποία δείχνει την άμορφη "κοκκιώδη" βασικού τύπου ουσία (βέλος).x 24.000



Εικόνα: 4.2.28.: Λεπτομέρεια του όγκου. της ίδιας περιοχής με την εικόνα 4.2.26 η οποία δείχνει την άμορφη "κοκκιώδη" βασικού τύπου ουσία (βέλος). x 24.000

Εικόνα: 4.2.29.: Λεπτομέρεια του όγκου. της ίδιας περιοχής με την εικόνα 4.2.26 στην οποία παρατηρείται μια υπόνοια σχηματισμού βασικού πετάλου στην βασικού τύπου άμορφη "κοκκιώδη" ουσία (βέλη). Και οι δύο x 24,000

Στις περιπτώσεις 269, KX1, KX3, 247, X4 και 347, δεν ανευρέθηκε ΒΠ (Εικόνες: 4.2.31., 4.2.32.). Για παράδειγμα, στην περίπτωση 269, οι κυτταροπλασματικές μεμβράνες των νεοπλασματικών κυττάρων ήταν ακάλυπτες και ήταν σε άμεση επαφή με μια ουσία, η οποία περιείχε ελαστικές ίνες, ίνες κολλαγόνου και μόρια που έμοιαζαν με γλυκοζαμινογλυκάνες (Εικόνα: 4.2.32.).



Εικόνα: 4.2.31.: Νεοπλασματική νησίδα στην περίπτωση 269. Ενδοκυττάριος αυλός (Lu) και περιβάλλον κολλαγόνο (co) είναι παρόντα. x 7, 500

Εικόνα: 4.2.32.: Τμήμα νεοπλασματικού κυττάρου από την ίδια περιοχή του όγκου όπως φαίνεται στην εικόνα 4.2.31. Παρατηρείται μια εντελώς ακάλυπτη επιφάνεια κυτταρικής μεμβράνης (βέλη). x 24,000

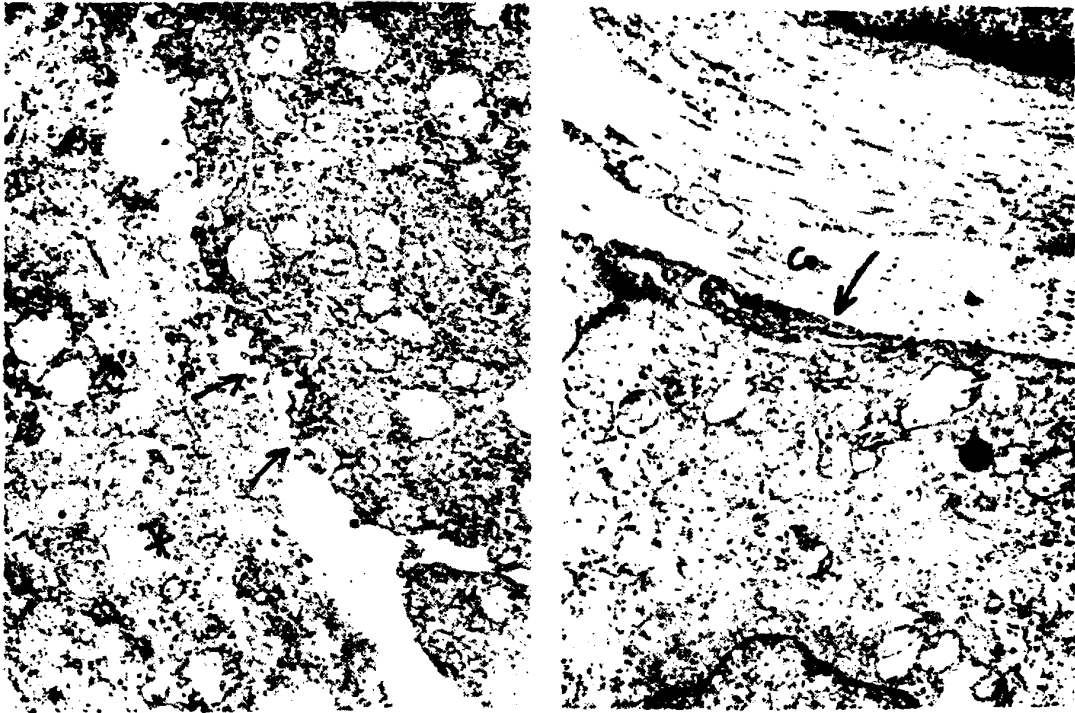


Στην περίπτωση KX1, οι πλασματοκυτταρικές μεμβράνες των νεοπλασματικών κυττάρων ήταν σε επαφή με ίνες κολλαγόνου και άλλα συστατικά της παραπάνω αναφερόμενης, ουσίας φτωχά διαφοροποιημένα. Στην περίπτωση KX3, στην επιφάνεια κάποιων νεοπλασματικών κυττάρων αναγνωρίστηκε μια λεπτής δομής άμορφη "κοκκιώδης" ουσία (Εικόνα: 4.2.17.), η οποία όπως αναφέρεται παραπάνω, ήταν σε επαφή με την επιφάνεια κάποιων ενδοθηλιακών κυττάρων δημιουργώντας έτσι ένα αγγειονεοπλασματικό σύμπλεγμα (Εικόνα: 4.2.17.). Σπάνιες θέσεις, κατά την επιφάνεια των νεοπλασματικών κυττάρων έδειξαν αμυδρή υπόνοια παρουσίας ΒΠ (Εικόνα: 4.2.33.).



Εικόνα: 4.2.33.: Άμορφη "κοκκιώδης" ουσία μεταξύ νεοπλασματικών κυττάρων (T) και ενός αγγείου, στην περίπτωση KX3. Αναγνωρίζεται ένα αγγειονεοπλασματικό σύμπλεγμα (*). Υπάρχει μια θέση όπου παρατηρείται υπόνοια σχηματισμού ΒΠ δίπλα στην νεοπλασματική νησίδα (βέλος). x 24,000

Στην περίπτωση 347, κατά την επιφάνεια των νεοπλασματικών νησίδων παρατηρήθηκε εστιακά αυξημένος αριθμός κοντών μικρολαχνών οι οποίες επικαλυπτόταν από άφθονες ποσότητες κυτταροπλασματικών αποτριμμάτων (Εικόνα: 4.2.34.). Σε άλλες νεοπλασματικές νησίδες, αναγνωρίστηκαν νεοπλασματικά κύτταρα χωρίς την παρουσία ΒΠ, που είχαν εστίες προσεκβολών μικρολαχνώδους όψης σε στενή επαφή με πυκνό κολλαγόνο (Εικόνα: 4.2.35.). Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση X5.

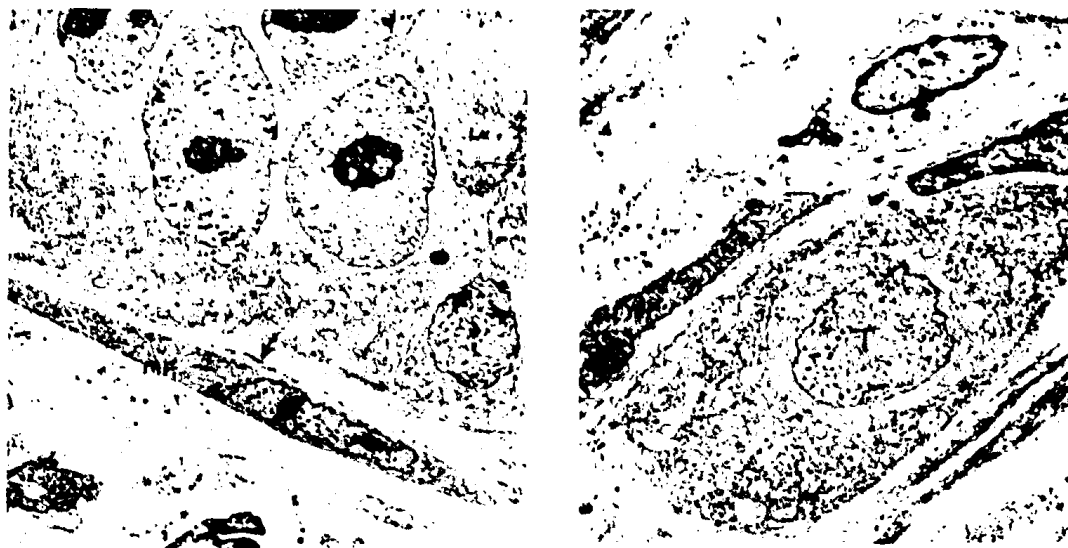


Εικόνα:4.2.34.: Κοτταροπλασματικά συντρίμματα () και μικρολαχνώδης προσεκβολές (βέλη), κατά την επιφάνεια των νεοπλασματικών κοττάρων, στην περίπτωση 347. x 18.000*

Εικόνα:4.2.35.: Εστίες από μικρολαχνώδεις προσεκβολές (βέλος) κατά την επιφάνεια μιας νεοπλασματικής νησίδας πάνω από τις οποίες παρατηρείται κολλαγόνο (co) στην περίπτωση 347.

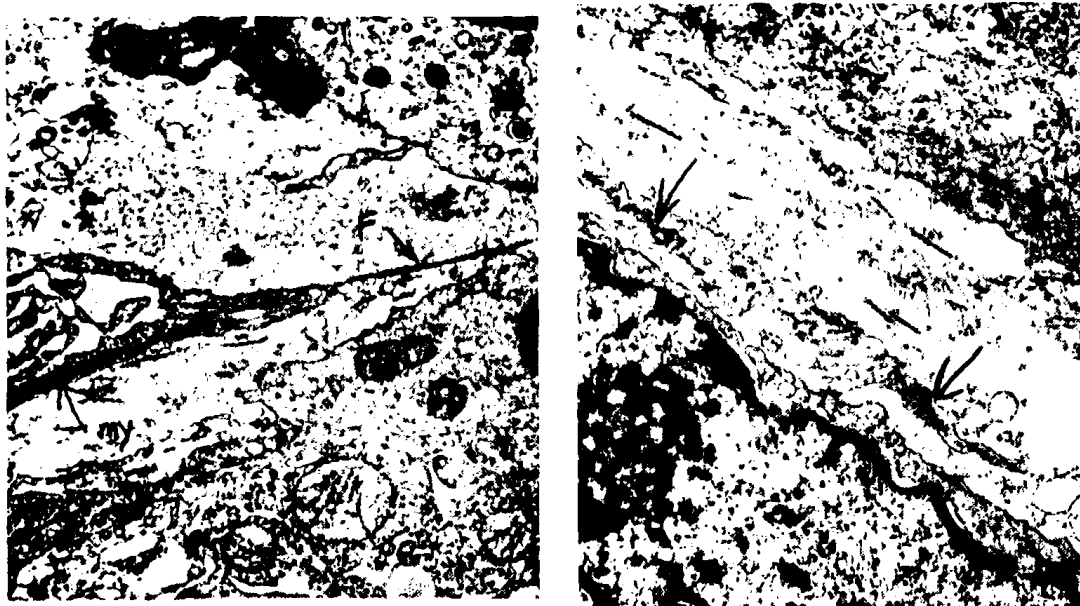
4.2.3 Μυοϊνοβλάστες και η σχέση τους με την επιφάνεια του νεοπλάσματος, τα αγγεία και την άμορφη (κοκκιώδη) ουσία

Χρησιμοποιώντας τα κριτήρια των ατρακτοειδών κυττάρων ή των λεπτών προσεκβολών που περικλείουν ένα άφθονο τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο (Εικόνα: 4.2.36), τα περιφερικά μυοϊνίδια (Εικόνες: 4.2.37., 4.2.38.) και συνενώσεις (fibropexus junctions) (Εικόνα: 4.2.37., 4.2.38.), η παρουσία των μυοϊνοβλαστών ήταν αρκετά συχνή στην επιφάνεια των μεμονομένων νεοπλασματικών κυττάρων ή των νεοπλασματικών νησίδων, όπως επίσης και σε απόσταση από τα παραπάνω μέσα στο στρώμα, είτε κάποιες φορές σε επαφή με τα αγγεία.



Εικόνα:4.2.36.: Μυοϊνοβλάστη (MF) σε στενή σχέση με μια νεοπλασματική νησίδα στην περίπτωση ΚΧ1. Lu, ενδοκυττάριος αυλός. Το βέλος υποδηλώνει μια λεπτή προσεκβολή μυοϊνοβλαστικής η οποία αναγνωρίζεται καλύτερα στην εικόνα 4.2.39 x 6.000.

Εικόνα:4.2.37.: Μια μυοϊνοβλάστη (MF) και ένα ασυνήθιστα επιμνησμένο λεμφοκύτταρο (L) στην επιφάνεια μιας μικρής νεοπλασματικής νησίδας (T) στην περίπτωση ΚΧ1 x 9.000



Εικόνα: 4.2.38.: Λεπτομέρεια της εικόνας 4.2.37 όπου αναγνωρίζονται μυοϊνίδια (my), rER και ινιδία ινονεκτικής (F) x 24,000

Εικόνα: 4.2.39.: Λεπτομέρεια της εικόνας 4.2.36 όπου αναγνωρίζονται μυοϊνίδια (βέλι), και έτσι αποδεικνύεται ότι η προσεκβολή αυτή αντιστοιχεί Μυοϊνοβλάστη. x 24,000

Σε άλλες περιπτώσεις οι μωϊνοβλάστες απλά βρισκόταν σε παράλληλη θέση σε σχέση με την επιφάνεια των νεοπλασματικών κυττάρων, άλλοτε απλά μια ή περισσότερες (περίπτωση ΚΧ1, (Εικόνα: 4.2.36.). Άλλες φορές, με μεγάλη μεγέθυνση αναγνωριζόταν μόνο κάποιο λεπτό περιφερικό τμήμα αυτής (Εικόνα: 4.2.39.), το οποίο ήταν αρκετά δύσκολο να αναγνωριστεί με την μικρή μεγέθυνση (Εικόνα: 4.2.36.). Η τυπική απόσταση της από την επιφάνεια των καρκινικών κυττάρων ήταν περίπου 1 micrometre ή και λιγότερο. Στις περιπτώσεις 247,359, 365 και 347 η απόσταση ήταν κατά πολύ μειωμένη περίπου 15-20 nm (Εικόνες: 4.2.40., 4.2.41., 4.2.42.).



Εικόνα:4.2.40.: Κοντινή απόσταση των μωϊνοβλαστών (MF) σε σχέση με τα νεοπλασματικά κύτταρα (T) Επίσης ένα λεμφοκύτταρο (L) σε πολύ κοντινή απόσταση από τα νεοπλασματικά κύτταρα. x 9,000



Εικόνες:4.2.41., 4.2.42.: Υπερβολικά κοντινή προσέγγιση (κύκλος) των μωϊνοβλαστών και των νεοπλασματικών κυττάρων (T) στις περιπτώσεις 359 και 365. x 18.000

Στην περίπτωση 347, οι μυοϊνοβλάστες ήταν σε επαφή με τις περιοχές όπου ανευρισκόταν τα κυτταροπλασματικά υπολείμματα, κοντά με την επιφάνεια των νεοπλασματικών νησίδων, όπως αναφέρεται παραπάνω (Εικόνα: 4.2.43.). Σε παρακείμενες θέσεις, ανεβρέθησαν αντιδραστικά λεμφοκύτταρα και μυοϊνοβλάστες (Εικόνα: 4.2.44.), και σε κάποιες περιπτώσεις τα παραπάνω ήταν σε στενή επαφή μαζί τους. Σε άλλες περιπτώσεις, οι μυοϊνοβλάστες ήταν σε στενή επαφή με λεμφοκύτταρα (Εικόνα: 4.2.37.) και μακροφάγα (Εικόνα: 4.2.45.).



Εικόνα:4.2.43.: Μυοϊνοβλάστη (MF) κοντά σε κυτταροπλασματικά συντρίμματα (*) σε επαφή με την επιφάνεια των νεοπλασματικών κυττάρων (T) που εμφανίζουν θέσεις με μικρολάχνες (βέλος) στην περίπτωση 347.

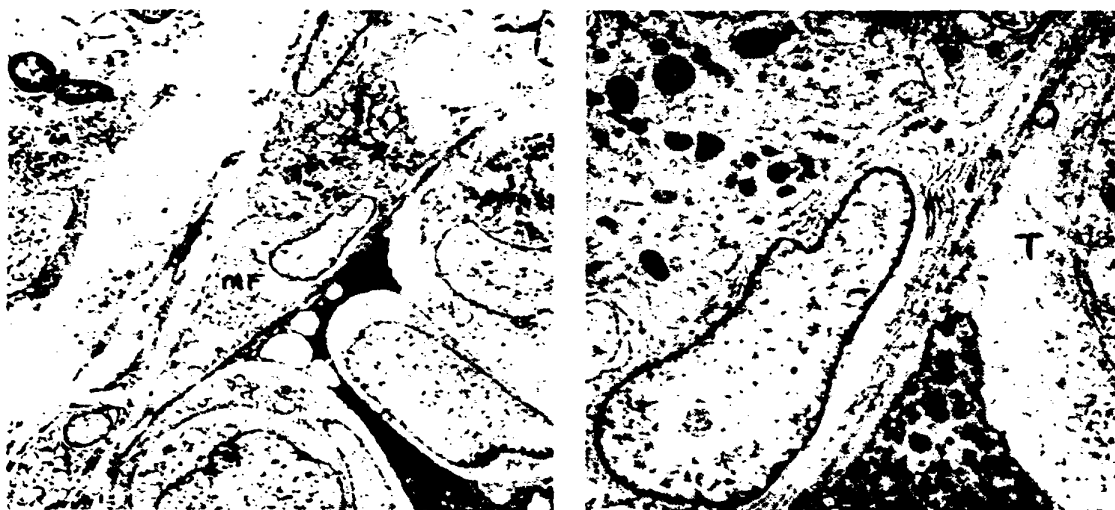


Εικόνα: 4.2.44.: Μυοϊνοβλάστη (MF) και ενεργοποιημένο λεμφοκύτταρο (L) σε στενή σχέση στην περίπτωση 347. x 18,000.



Εικόνα:4.2.45.: Μακροφάγο (M) σε σχέση με λεμφοκύτταρα (L) και μυοϊνοβλάστες (MF) στην περίπτωση KX1. x 12,000

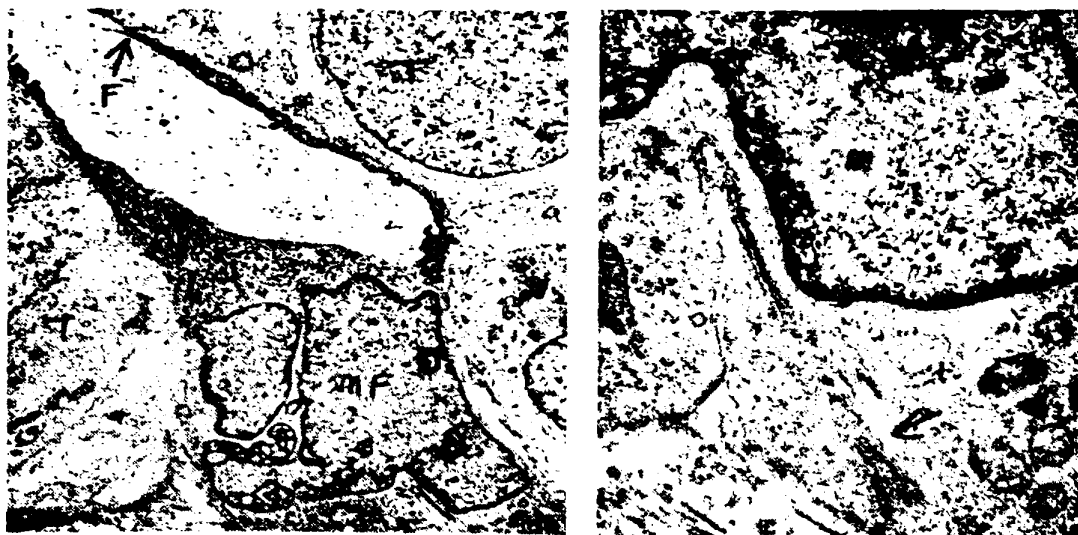
Στην περίπτωση Χ4, οι μυοϊνοβλάστες ήταν σε στενή επαφή με την επιφάνεια των νεοπλασματικών κυττάρων με έναν τέτοιο τρόπο που υποδήλωνε διθητικό πρότυπο ανάπτυξης στις νεοπλασματικές νησίδες (Εικόνα: 4.2.46.). Τα γειτνιαζόμενα κύτταρα ήταν πυκνωτικά και νεκρωμένα (Εικόνα: 4.2.47.). Σε παρακείμενες θέσεις των μυοϊνοβλαστών παρατηρήθηκαν επίσης μακροφάγα (Εικόνα: 4.2.47.).



Εικόνα:4.2.46.: Μία μυοϊνοβλάστη (MF) η οποία εμφανίζεται σαν να διηθεί μια νεοπλασματική νησίδα στην περίπτωση Χ4. Δίπλα στην μυοϊνοβλάστη υπάρχει ένα σκοτεινόχρωμο νεκρωτικό κύτταρο. x 6.000.

Εικόνα 4.2.47.: Δίνει μια πιο λεπτομερή εικόνα της πολύ κοντινής προσέγγισης της μυοϊνοβλάστης (κύκλος) με τα νεοπλασματικά κύτταρα (T). x 18.000.

Σε αυτές τις περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε η παρουσία ΒΠ. Φαινομενική διήθηση των νεοπλασματικών νησίδων ανεβρέθηκε επίσης στην περίπτωση 354: εδώ, η μυοϊνοβλάστη είχε έναν ασυνήθιστα ανώμαλο πυρήνα (Εικόνα: 4.2.48), παρόλα αυτά όμως εμφάνιζε όλα τα άλλα χαρακτηριστικά αυτού του κυττάρου, όπως πλούσιο τραχύ ενδοπλασματικό δίκτυο (rER) (Εικόνα: 4.2.48), μυοϊνίδια (Εικόνα: 4.2.49) και ινονεκτικά ινίδια (Εικόνες: 4.2.48, 4.2.49).

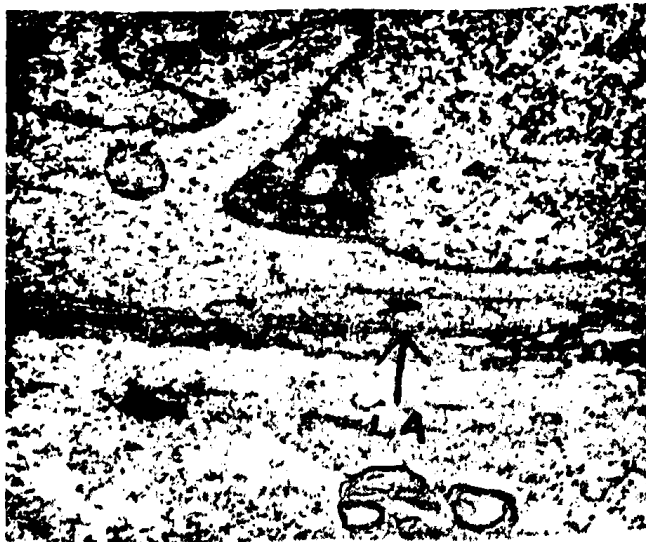


Εικόνες: 4.2.48., 4.2.49. Μυοϊνοβλάστη (MF) με έναν ασυνήθιστο πυρήνα και που φαίνεται να έχει ένα διθητικό πρότυπο ανάπτυξης στην νεοπλασματική νησίδα (T) στην περίπτωση 354. Η μυοϊνοβλάστη εμφανίζει rER, μυοϊνίδια (βέλος στην εικόνα 4.2.49) και ένα ινίδιο ινονεκτικής (F)(εικόνα 4.2.48). 4.2.48 x 9,000;4.2.49 x30,000.

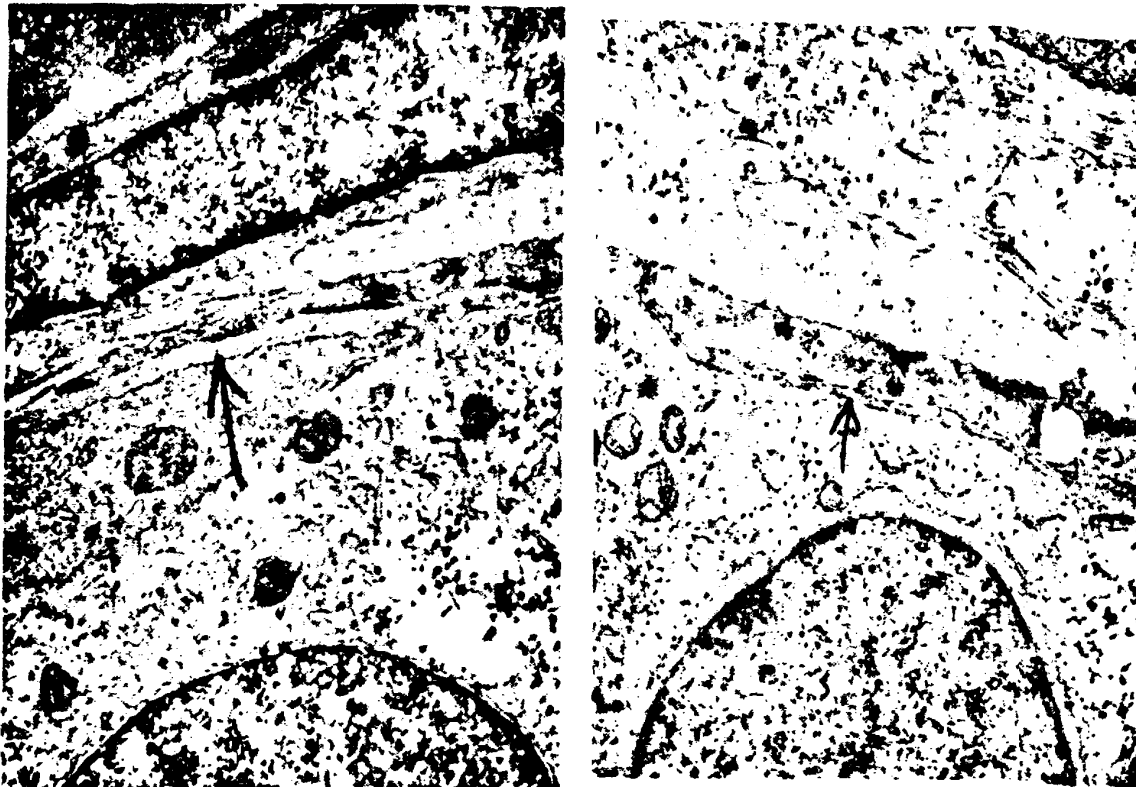
Στην περίπτωση 354, οι μυοϊνοβλάστες ήταν σε πολύ στενή επαφή με την επιφάνεια των νεοπλασματικών νησίδων (Εικόνα: 4.2.50.), οι οποίες εμφάνιζαν δομή ΒΠ σε διάφορα στάδια οργάνωσης. Σε κάποιες περιοχές αναγνωρίστηκε η παρουσία ενός καλά οργανωμένου ΒΠ (lamina densa/lamina lucida) (Εικόνα: 4.2.51.). Σε άλλες περιοχές, αυτό εμφανίστηκε να υφίσταται μια μεταβολή σε ένα πιο αποδιοργανωμένο άμορφο "κοκκιώδες" υλικό (Εικόνα: 4.2.52.). Σε άλλες θέσεις, οι μυοϊνοβλάστες ήταν πολύ κοντά στην επιφάνεια των νεοπλασματικών νησίδων, και συγκρατούνταν μεταξύ τους με μια λωρίδα ενός υλικού, με δομή κάτι ενδιάμεσο μεταξύ ΒΠ και άμορφου "κοκκιώδους" υλικού: αυτό απουσίαζε πέραν των ορίων των προσεκβολών της μυοϊνοβλάστης (Εικόνα: 4.2.53.).



Εικόνα: 4.2.50.: Μυοϊνοβλάστη σε πολύ κοντινή απόσταση από μια νεοπλασματική νησίδα (T) στην περίπτωση 354. x 9,000.



Εικόνα: 4.2.51.: Αναγνωρίζεται καλά οργανωμένο βασικό πέταλο (LA). x 12,000



Εικόνα: 4.2.52.: Παρατηρείται μια συνέχεια του ΒΠ με μια 'μορφή "κοκκιώδη" ουσία (βέλος) x. 24,000

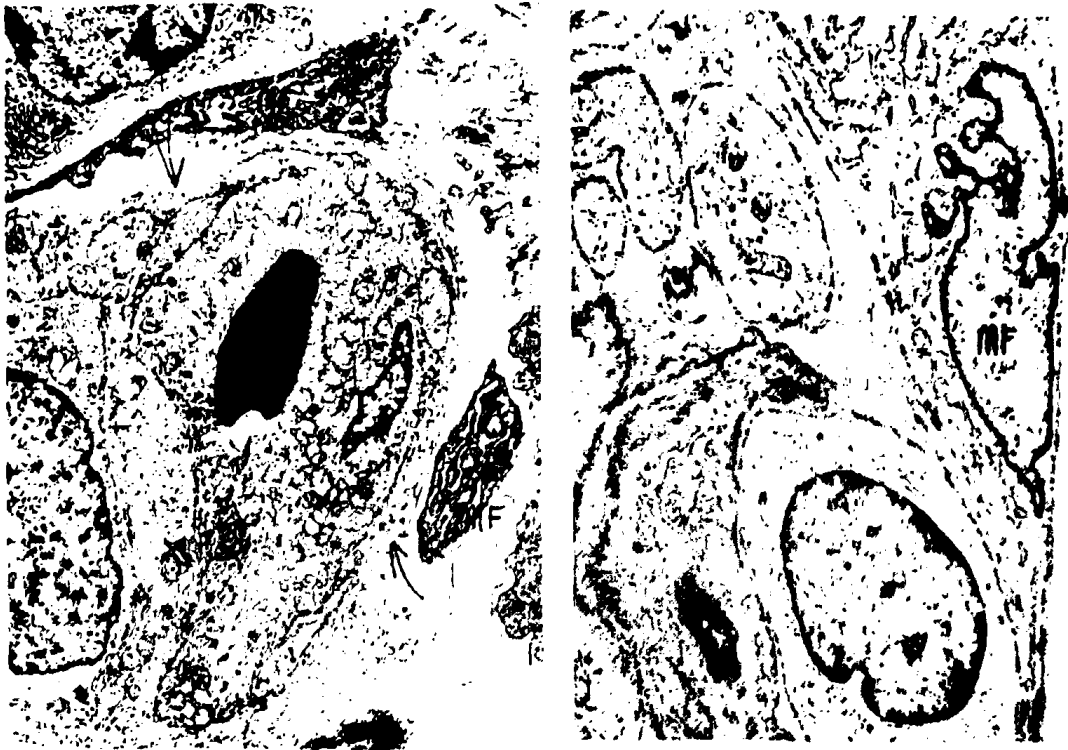
Εικόνα: 4.2.53.: Αναγνωρίζεται βασικό πέταλο/άμορφη "κοκκιώδης" ουσία μόνο κάτω από την μονοβλάστη (MY). x. 24,000

(Ποικιλία εμφάνισης του βασικού πετάλου/άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας στο ίδιο δείγμα.)

Οι μονοβλάστες ανεβρέθησαν επίσης συσχετιζόμενες και με αγγεία. Στην περίπτωση Χ4 και ΚΧ1Α, οι μονοβλάστες ανευρέθησαν σε γεινίαση με τα περικύτταρα (Εικόνα: 4.2.54.), αυτά περιβάλλονταν από ένα σχετικά άμορφο "κοκκιώδες" υλικό, χωρίς να αναγνωρίζεται ένα καλά οργανωμένο ΒΠ (lamina densa/lamina lucida) (Εικόνα: 4.2.55.), το οποίο επίσης περιέβαλλε και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Στην περίπτωση Χ4, οι μονοβλάστες ήταν σε στενή επαφή με κάποια από τα στρωματικά αγγεία (Εικόνα: 4.2.56.) με έναν τρόπο υπαινισσόμενο διηθητικό πρότυπο ανάπτυξης στην δομή του αγγείου.



Εικόνα : 4.2.54.: Μυοϊνοβλάστη (MF) σε πολύ κοντινή απόσταση από ένα περικύτταρο (P) στην περίπτωση X4. x 6,000



Εικόνα:4.2.55.: Μυοϊνοβλάστες (MF) οι οποίες συνενώνονται με ένα αγγείο, στην περίπτωση KX1. Δίπλα και στις δύο μυοϊνοβλάστες υπάρχει ένα σχετικώς άμορφο "κοκκιώδες" υλικό (βέλη). x 12.000

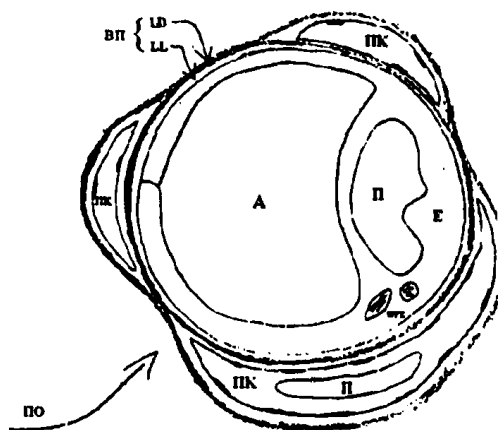
Εικόνα 4.2.56.: Μια μυοϊνοβλάστη (MF) κατά την επιφάνεια ενός αγγείου, στην περίπτωση X4.x 12000

Στην περίπτωση 347, οι μυοϊνοβλάστες εμφανίστηκαν σε στενή επαφή με τα αγγεία, κυρίως με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπου υπήρχε ένα υλικό, με ενδιάμεση μορφολογία, μεταξύ ΒΠ και άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας (Εικόνα: 4.2.57.).

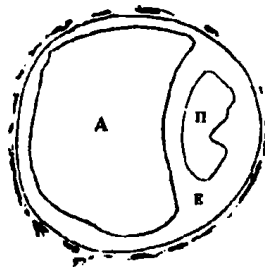


Εικόνα:4.2.57.: Μια μονοβλάστη (MF) η οποία επεκτείνει μια προσεκβολή προς ένα μικρό μεγέθους αγγείο. Η περιοχή της σύνδεσης (βέλος) εμφανίζει χαρακτηριστικά γνωρίσματα ΒΠ και άμορφου "κοκκιώδους" υλικού. x 12.000

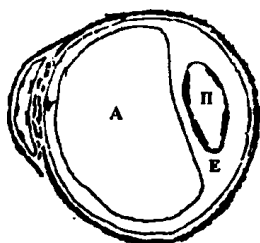
Αντιπροσωπευτικά διαγράμματα κάποιων ποιοτικών ευρημάτων δίνονται στα σχήματα (4.2.1-4.2.4).



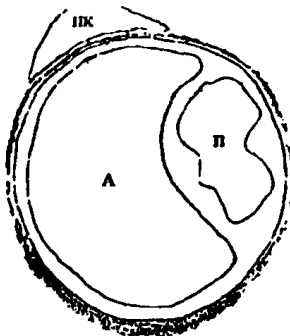
Σχήμα 4.2.1: Παράσταση ενός φυσιολογικού αγγείου σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο, όπου παρατηρούνται ο αυλός (Α), ενδοθηλιακό κύτταρο (Ε), περικύτταρα (ΠΚ) και οι πυρήνες αυτών (Π). Αναπαριστάται η ιδεώδης οργάνωση του Βασικού Πετάλου (ΒΠ), που αποτελείται από την Lamina Densa (LD) και την Lamina Lucida (LL). Όπαι (ΠΟ) η περιανθηϊκή ουσία



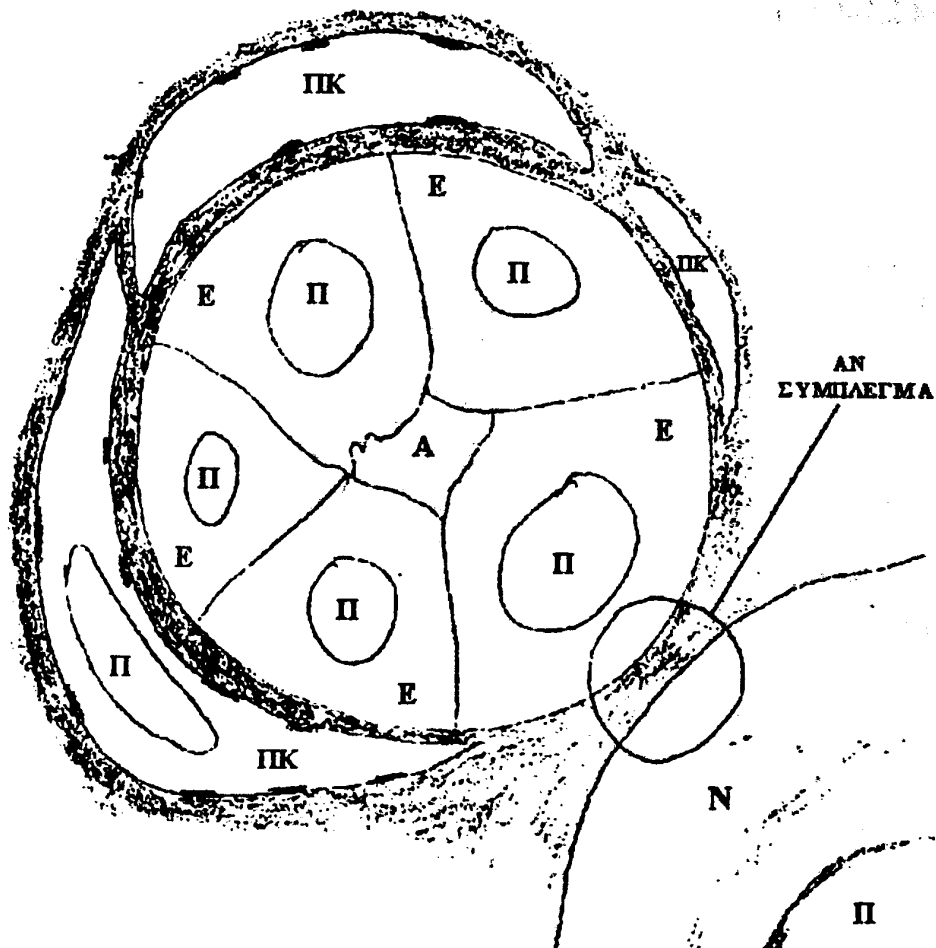
Σχήμα 4.2.3a: Μικρού μεγέθους αγγείο, που περιβάλλεται από διασπασμένο ΒΠ



Σχήμα 4.2.3β: Μικρού μεγέθους αγγείο, όπου παρατηρείται τμηματική αντικατάσταση του ΒΠ από άμορφη "κοκκιώδης" ουσία, ενώ στη θέση παρουσίας περικυττάρου καλή διατήρηση αυτού.



Σχήμα 4.2.2: Μικρού μεγέθους αγγείο, στο οποίο αναπαριστάται η διάσπαση του ΒΠ μεταξύ περικυττάρου και ενδοθηλιακού κυττάρου.



Σχήμα 4.2.4.: Μεγαλύτερου μεγέθους αγγείο, κοντά σε νεοπλασματικό κύτταρο (N) όπου παρατηρείται μεταξύ αυτών ο σχηματισμός αγγειονεοπλασματικού (AN), συμπλέγματος και πλήρη αντικατάσταση του ΒΠ και μεταξύ αυτού και των περικυττάρων.

4.2.4 Αριθμητική κατανομή των άμορφων "κοκκιωδών" ουσιών

Η κατανομή των άμορφων "κοκκιωδών" ουσιών γύρω από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα περικύτταρα και στην επιφάνεια των νεοπλασματικών κυττάρων (μεμονωμένων ή σε αθροίσεις) δίνεται περιληπτικά στον πίνακα 4.2.4.1., ενώ η σχέση μεταξύ των μυοϊνοβλαστών και της ανευρισκόμενης, στη βασική μεμβράνη των νεοπλασματικών κυττάρων ουσίας, δίνεται στον πίνακα 4.2.4.2. Η κατανομή των άμορφων "κοκκιωδών" ουσιών και η συσχέτιση τους με την ύπαρξη διηθημένων μασχαλιαίων λεμφαδένων δίνεται στον πίνακα 4.2.4.3.

Άμορφες "κοκκιώδεις" ουσίες, τόσο αγγειακού ή βασικού τύπου ανευρέθηκαν σε 15 από τις 21 περιπτώσεις (71.4%). Σε τρεις από αυτές τις περιπτώσεις είχαμε φτωχή μονιμοποίηση των νεοπλασματικών κυττάρων και η εκτίμηση βασικού τύπου, άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας ήταν πολύ δύσκολη. Προσμετρώντας το γεγονός αυτό, άμορφη "κοκκιώδης" ουσία τελικά ανευρέθηκε στις 15 από τις 18 αξιολογήσιμες περιπτώσεις (83.3%).

Οι περιενδοθηλιακή και περιπερικυτταρική άμορφος "κοκκιώδης" ουσία είχε την ίδια κατανομή και ανευρέθηκε σε 13 από τις 18 περιπτώσεις (72.2%); βασικού τύπου άμορφη "κοκκιώδης" ουσία αναγνωρίσθηκε σε 8 από τις 18 περιπτώσεις (44.4%).

Οι μυοϊνοβλάστες, ανευρέθησαν σε πολύ στενή επαφή με την επιφάνεια των νεοπλασματικών κυττάρων σε 10 από τις 18 περιπτώσεις (55.5%). Μόνο σε τρεις από αυτές τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε η παρουσία του ΒΠ. Παρόλα αυτά, και στις τρεις αυτές περιπτώσεις υπήρχαν περιοχές όπου απουσίαζε το ΒΠ ή όπου υπήρχε παρουσία άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας. Όταν οι μυοϊνοβλάστες ήταν κοντά με τις νεοπλασματικές νησίδες στις θέσεις αυτές παρατηρούσε κανείς είτε την παρουσία άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας είτε την απουσία ΒΠ. Σε δύο περιπτώσεις όπου ήταν καλά σχηματισμένο το ΒΠ, οι μυοϊνοβλάστες απουσίαζαν.



A/A	Δείγμα	Ιστολογικός Τύπος	Περι-Ενδοθηλιακά	Περι-Περικυτταρικά	Περι-Επιθηλιακά
1	KX1	Πορογενές μη ειδικού τύπου G III	+	+	-
2	KX2	Πορογενές μη ειδικού τύπου G III	+	+	-
3	KX3*	Ενδοκυστικό θηλώδες με θέσεις διηθητικού	+	+	+
4	KX4	Πορογενές μη ειδικού τύπου G III	+	+	-
5	KX5	Πορογενές μη ειδικού τύπου G III	+	+	-
6	M3	Λοβιακό G II	-	+	-
7	M5	Λοβιακό G II	+	-	-
8	M11	Λοβιακό G III	-	-	+
9	M12	Λοβιακό G III	+	+	+
10	M13	Μικτό G II	-	-	-
11	M15	Μικτό G III	-	-	-
12	239	Βλενώδες G II	+	+	-
13	243	Βλενώδες G I	-	-	-
14	247*	Πορογενές μη ειδικού τύπου G III	+	+	+
15	259	Πορογενές μη ειδικού τύπου G III	-	-	-
16	269	Πλειόμορφο Λοβιακό G III	-	-	-
17	347*	Πορογενές μη ειδικού τύπου G III	+	+	+
18	354	Πορογενές μη ειδικού τύπου G II	+	+	+
19	357	Σωληνώδες G I	-	-	+
20	359	Πορογενές μη ειδικού τύπου G II	+	+	+
21	365	Πορογενές μη ειδικού τύπου G II	-	-	-

* Αγγειοεπιασματικό σύμπλεγμα

Πίνακας 4.2.4.1: Κατανομή των άμορφων "κοκκιωδών" ουσιών



Α/Α	Δείγμα	Απόσταση MB από την επιφάνεια των Ν.Κ.	Παρουσία άμορφης (κοκκιώδους) ουσίας	Παρουσία ΒΠ
1	354	<1 μm	+	+ και -
2	357	<1 μm	+	+ και -
3	365	15-20 nm	-	-
4	359	15-20 nm	-	-
5	X5	<1 μm	-	-
6	X4	<1 μm	+	¹
7	347	15-20 nm	-	-
8	269	<1 μm	-	-
9	X1	<1 μm	-	²
10	247	15-20 nm	+ και -	+ και -

Πίνακας 4.2.4.2: Σχέση MB και βασικού τύπου άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας των νεοπλασματικών κυττάρων

¹ παρατηρήθηκαν μυοϊνοβλάστες σε πολύ κοντινή απόσταση από τα περικύτταρα, όταν υπήρχε η άμορφη "κοκκιώδης" ουσία

² παρατηρήθηκε μυοϊνοβλάστη σε κοντινή απόσταση με αγγείο, στο οποίο ανευρέθηκε υλικό ενδιάμεσης μορφολογίας μεταξύ άμορφης "κοκκιώδης" ουσίας και αποδιοργανωμένου βασικού πετάλου

³ οι περιπτώσεις 239 και ΚΧ3 παρουσίασαν θέσεις με καλή οργάνωση του ΒΠ χωρίς ταυτόχρονη παρουσία μυοϊνοβλαστών



A/A	Δείγμα	Ιστολογικός Τύπος	Περι- ενδοθηλιακή	Περι- περικυτταρική	Περι- επιθηλιακά	Λεμφαδένες (+/-)
1	KX1	Πορογενές μη ειδικού τύπου G III	+	+	-	+
2	KX2	Πορογενές μη ειδικού τύπου G III	+	+	-	+
3	KX3*	Ενδοκυστικό θηλώδες με θέσεις διηθητικού	+	+	+	+
4	KX4	Πορογενές μη ειδικού τύπου G III	+	+	-	+
5	KX5	Πορογενές μη ειδικού τύπου G III	+	+	-	+
6	M3	Λοβιακό G II	-	-	+	-
7	M5	Λοβιακό G II	+	-	-	+
8	M11	Λοβιακό G III	-	-	+	+
9	M12	Λοβιακό G III	+	+	+	+
10	239	Βλεννώδες G II	+	+	-	-
11	247*	Πορογενές μη ειδικού τύπου G III	+	+	+	+
12	259	Πορογενές μη ειδικού τύπου G III	-	-	-	+
13	269	Πλειόμορφο λοβιακό GIII	-	-	-	+
14	347*	Πορογενές μη ειδικού τύπου G III	+	+	+	+
15	354	Πορογενές μη ειδικού τύπου G II	+	+	+	+
16	357	Σωληνώδες G I	-	-	+	-
17	359	Πορογενές μη ειδικού τύπου G II	+	+	+	+
18	365	Πορογενές μη ειδικού τύπου G II	-	-	-	+

Πίνακας 4.2.4.3 : Συσχέτιση της κατανομής των άμορφων "κοκκιωδών" ουσιών με τους διηθημένους λεμφαδένες



4.2.5 Συσχέτιση των ευρημάτων του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου με αυτά της ανοσοϊστοχημείας

Σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο παρατηρήθηκε σε αρκετές θέσεις του όγκου αποδιοργάνωση της τυπικής δομής της ΒΜ (διάφορες παραλλαγές έως και πλήρης απουσία αυτής) και αντικατάσταση της από άμορφη "κοκκιώδη" ουσία τόσο μεταξύ νεοπλασματικών κυττάρων-στρώματος όσο και μεταξύ αγγείων-στρώματος.

Τυπική ΒΜ αποτελούμενη από lamina densa και lamina lucida, αναγνωρίστηκε σε αρκετές περιπτώσεις. Μερικές φορές ήταν καλά διαμορφωμένη και επεκτεινόταν σε αρκετή έκταση κατά μήκος της βασικής επιφάνειας των νεοπλασματικών κυττάρων. Αναγνωρίστηκαν ποικιλίες ως προς την δομή της ΒΜ, όπως: διασπασμένη, ή αναδιπλούμενη. Επιπλέον, άμορφη "κοκκιώδη" ουσία χωρίς την χαρακτηριστική δομή της ΒΜ, αλλά συσχετιζόμενη με την ΒΜ, αναγνωρίστηκε σε αρκετές θέσεις.

Η άμορφος αυτή ουσία σε μερικές περιπτώσεις αποτελούσε συνέχεια της τυπικής ΒΜ ενώ σε άλλες απείχε από αυτή. Μερικές άμορφες ουσίες συσχετίστηκαν με την ΒΜ ποικίλου βαθμού οργάνωσης. Σε μερικές περιπτώσεις, η ΒΜ αναγνωρίστηκε χωρίς να σχηματίζει την διπλή δομή αυτής, δίνοντας την εντύπωση ατελούς ΒΜ. Σε άλλες περιπτώσεις η άμορφη "κοκκιώδης" ουσία, φαίνεται να βρίσκεται σε επαφή με την κυτταροπλασματική μεμβράνη των νεοπλασματικών κυττάρων.

Μερικές άμορφες "κοκκιώδεις" ουσίες συσχετίστηκαν με στοιχεία της ΒΜ οι οποίες επικάλυπταν νεοπλασματικά κύτταρα, ενώ άλλες ήταν περισσότερο αποδιοργανωμένες σε κάποια απόσταση από την επιφάνεια των νεοπλασματικών κυττάρων.

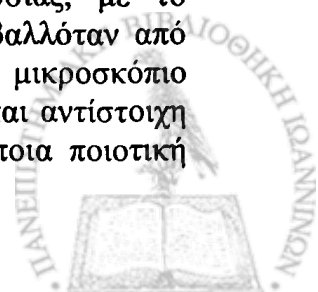
Σε τρεις περιπτώσεις αναγνωρίστηκε το αγγειονεοπλασματικό σύμπλεγμα. Αυτό χαρακτηρίζεται από την στενή επαφή των νεοπλασματικών κυττάρων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, μέσου μιας άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας. Τα νεοπλασματικά κύτταρα αναγνωρίστηκαν με βάση τα παρακάτω γνωρίσματα: λόγω του μεγάλου μεγέθους τους, των μεγάλων πυρήνων και την παρουσία των δεσμοσωμάτων, ενώ για τα ενδοθηλιακά κύτταρα τα γνωρίσματα ήταν: ο τυπικός "μη νεοπλασματικός" πυρήνας, οι συνδέσεις tight junctions και η παρουσία των σωματίων Weidel-Palade.

Με την βοήθεια της ανοσοϊστοχημείας, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση των κύριων συστατικών της ΒΜ (ΛΜ, ΚΛ) στις αντίστοιχες περιπτώσεις, έδειξε παρόμοια πρότυπα ανάπτυξης της αρχιτεκτονικής δομής της ΒΜ.

Έτσι σε περιπτώσεις όπου υπήρχε καλή οργάνωση της δομής της ΒΜ σε μεγάλη έκταση, το πρότυπο ανάπτυξης της ανοσοϊστοχημικής τους έκφρασης εμφανίστηκε γραμμικό και συνεχές, περιβάλλοντας πλήρως ή εν μέρει τις νεοπλασματικές νησίδες. Αντίθετα, σε άλλες περιπτώσεις όπου είχαμε αποδιοργάνωση της αρχιτεκτονικής δομής της ΒΜ (αναδιπλούμενη ή διασπασμένη), η ανοσοϊστοχημική έκφραση των κύριων συστατικών της εμφανίστηκε πολυστοιβαδωτή εν μέρει διακεκομμένη, ή διάχυτα κατανεμημένη στο υπόστρωμα του νεοπλάσματος, τόσο σε επαφή με τις νεοπλασματικές νησίδες όσο και σε απόσταση από αυτές.

Η μικρότερης έντασης και διάχυτα αναπτυσσόμενη ανοσοϊστοχημική έκφραση των συστατικών της ΒΜ συνοδευόταν από την παρουσία άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

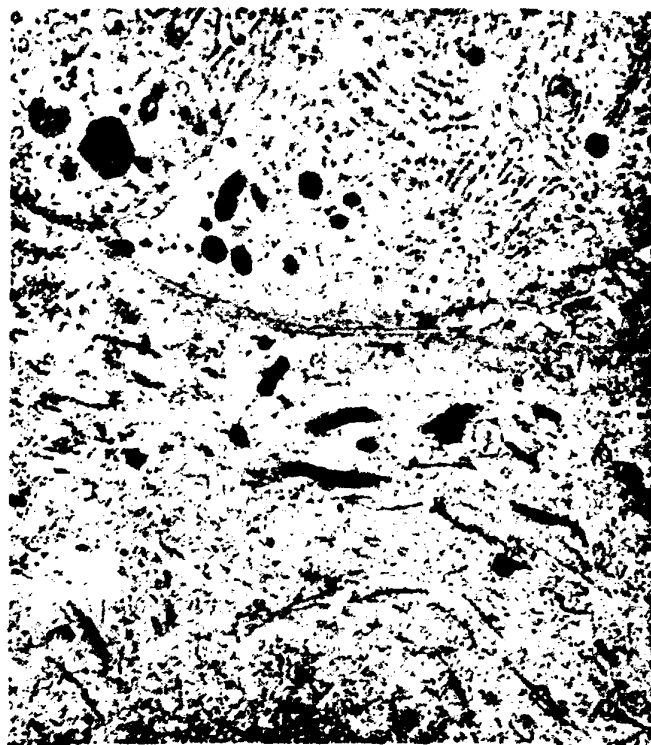
Η απουσία έκφρασης ΚΛ ή ΛΜ γύρω από τις νεοπλασματικές νησίδες, σε αρκετές θέσεις συνοδευόταν με την παρουσία άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας, με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Επίσης πολλά αγγεία του όγκου δεν περιβαλλόταν από ΚΛ ανοσοϊστοχημικά. Σε αυτές τις περιπτώσεις με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διαπιστώθηκε απουσία της κλασικής δομής της βασικής μεμβράνης και αντίστοιχη παρουσία άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας. Δηλαδή παρατηρήθηκε κάποια ποιοτική



αλλαγή του τοιχώματος των αγγείων του όγκου τόσο ανοσοϊστοχημικά όσο και σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο.



Εικόνα 4.2.5.1.: Ανοσοϊστοχημική έκφραση της Λαμινίνης. Γραμμικό πρότυπο ανάπτυξης



Εικόνα:4.2.5.2.: Υπερμικροσκοπική εικόνα φυσιολογικής δομής βασικής μεμβράνης



Εικόνα 4.2.5.3.: Ανοσοϊστοχημική έκφραση της Λαμίνινης. Πολυστιβαδωτό πρότυπο ανάπτυξης και θέσεις όπου παρατηρείται μια πιο διάχυτη έκφραση αυτής κατά το στρώμα



Εικόνα 4.2.5. 4.: Υπερμικροσκοπική εικόνα νεοπλασματικού κυττάρου, όπου παρατηρείται πλήρης αντικατάσταση του βασικού πετάλου από άμορφη "κοκκιώδη" ουσία(am).



Εικόνα 4.2.5.5.: Υπερμικροσκοπική εικόνα νεοπλασματικού κυττάρου, όπου παρατηρείται αντικατάσταση του βασικού πετάλου (la) από άμορφη 'κοκκιώδη' ουσία (am). Δεσμοσώματα (d) και ημιδεσμοσώματα (h)]

5. Συζήτηση

Για ένα αρκετά μεγάλο διάστημα, το ενδιαφέρον της έρευνας του καρκίνου είχε εστιαστεί μόνο στο νεοπλασματικό κύτταρο, εφόσον θεωρούσαν ότι το στρώμα στερούνταν οποιασδήποτε βιολογικής και κλινικής σπουδαιότητας. Ωστόσο, σήμερα έχει γίνει αρκετά ξεκάθαρο, ότι τα στρωματικά κύτταρα και τα προϊόντα τους, παίζουν έναν σημαντικό ρόλο στο φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων (Gould et al., 1990, Howedy et al., 1990, Koukoulis et al., 1993, Ishihara et al., 1995, Koochekpou et al., 1995).

Έτσι λοιπόν, οι όγκοι παρουσιάζουν ένα σύνθετο οικοσύστημα στο οποίο επισυμβαίνουν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των νεοπλασματικών κυττάρων και της εξωκυττάριας ουσίας. (Slater, 1996, Chiquet-Ehrismann et al., 1988, Gould et al., 1994, Kim et al., 1994, Lightner et al., 1994, Vollmer, 1997).

Η διαδικασία της τοπικής διήθησης και της μετάστασης απαιτεί σύνθετες αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυσιολογικού κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-εξωκυττάριας ουσίας, οι οποίες έχουν σαν αποτέλεσμα την ποικίλη αύξηση ή μείωση της ρύθμισης κάποιων σημαντικών μορίων.

Καθοριστικό ρόλο στην διαδικασία της διήθησης παίζει η διάσπαση της βασικής μεμβράνης (BM) με πρωταρχικό βήμα τις διάφορες μεταβολές αυτής. Οι μεταβολές αυτές αφορούν την αποδιοργάνωση των βασικών συστατικών της (ΚΛ, ΛΜ, ΙΝ). Αξιοσημείωτο είναι ότι η BM δεν αποτελεί μια δομική κατασκευή η οποία μπορεί να καταστραφεί και να επιτρέψει την διήθηση των νεοπλασματικών κυττάρων, αλλά μπορεί και να επαναδημιουργηθεί και να εναποτεθεί στους ιστούς. Έτσι, η παρουσία της στα νεοπλάσματα αντανακλά το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης νεοπλασματικών κυττάρων και εξωκυττάριας ουσίας.

Αρκετές μελέτες που έγιναν κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η παρουσία εναποθέσεων υλικού της BM, συμπίπτει με καλύτερη πρόγνωση για τον καρκίνο (Gorczyca et al., 1993, Siegal et al., 1981). Ο Charpin και οι συνεργάτες του (1986) δεν βρήκαν στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της ΛΜ και άλλων προγνωστικών παραμέτρων όπως τους οιστρογονικούς υποδοχείς και τον βαθμό διαφοροποίησης. Ωστόσο, απουσία παραγωγής συστατικών της BM συσχετίστηκε με δυσμενή πρόγνωση σε ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα του παχέος εντέρου (Nielsen et al., 1984, Koochekpou et al., 1995) και καρκίνωμα της ουροδόχου κύστεως (Kim et al., 1994)

Αντίθετα, στην παρούσα μελέτη η έκφραση των συστατικών της BM (ΚΛ και ΛΜ) συσχετίστηκε θετικά με τους οιστρογονικούς υποδοχείς.

Μελέτες που έχουν γίνει τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, έχουν δείξει την παρουσία της ΛΜ στους νεοπλασματικούς ιστούς, και ειδικότερα κατά την περιφέρεια του όγκου, στις θέσεις διήθησης (Koukoulis et al., 1993). Η παρουσία έκφρασης της ΛΜ, σε σπάνιες περιπτώσεις, στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να υποδηλώνει την πιθανή ικανότητα των νεοπλασματικών κυττάρων να συνθέτουν ΛΜ. (Viacana et al., 1997). Η σπουδαιότητα αυτής της σύνθεσης, ακόμη δεν έχει διευκρινισθεί.

Σύμφωνα με τους Castropovo et al., 1991 και Liotta et al., 1986 η ΛΜ φαίνεται να αθροίζεται κατά την διάρκεια της διήθησης μεταξύ των νεοπλασματικών κυττάρων και του ξενιστή, γεγονός που σημαίνει ότι πιθανά η ΛΜ συνεχίζεται να συντίθεται και να εκκρίνεται *in vivo* κατά το μέτωπο διήθησης. Σε αυτή την εντόπιση πιθανά η ΛΜ να προάγει την συγκόλληση και την μετανάστευση των νεοπλασματικών κυττάρων.



Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η ΛΜ μπορεί να προάγει την ανάπτυξη του όγκου (Koochekroui et al., 1995). Μελέτες που έγιναν έδειξαν ότι υπήρχε μια τάση στις περιπτώσεις με θετικούς λεμφαδένες, ο πρωτοπαθής όγκος να είναι αρνητικός στη ΛΜ, δεν ανιχνεύθηκε όμως στατιστικώς σημαντική διαφορά της έκφρασης τόσο της ΛΜ όσο και της IN με τις λεμφαδενικές μεταστάσεις, όπως αναφέρουν και οι (Albrechtsen et al., 1981, Iskaros et al., 1998, DeClerck, 2000) Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης σχεδόν όλων των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας (εκτός του ΚΛ) στους αντίστοιχους διηθημένους λεμφαδένες σε σχέση με τον πρωτοπαθή όγκο.

Σύμφωνα με τους Viasana et al., 1997 παρατηρήθηκε μια μεγαλύτερη συχνότητα μετάστασης στα οστά στις περιπτώσεις θετικής έκφρασης της ΛΜ στους πρωτοπαθείς όγκους. Αντίθετα αρνητικοί όγκοι μεθίσταντο συχνότερα στους πνεύμονες όπως επίσης και στον μυελό των οστών και στους λεμφαδένες.

Στην παρούσα μελέτη η έκφραση της ΛΜ συσχετίσθηκε με το πρωτεολυτικό ένζυμο ΚΙD και τον δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67, γεγονός που πιθανά υποδηλώνει έναν ενεργό ρόλο αυτής στην επέκταση και την εξέλιξη του όγκου.

Σύμφωνα με τους Aghihiro et al., 1993, το ΚΛ, δεν έδειξε να συσχετίζεται με καμία κλινικοπαθολογοανατομική παράμετρο, όπως ο ιστολογικός τύπος, ο βαθμός διαφοροποίησης, η ηλικία των ασθενών, το μέγεθος του όγκου, η παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και οι ορμονικοί υποδοχείς. Αντίθετα, εμείς παρατηρήσαμε συσχέτιση της έκφρασης αυτού με το μέγεθος και τον ιστολογικό τύπο του όγκου.

Ένα από τα μόρια της εξωκυττάριας ουσίας είναι η TN, η έκφραση της οποίας πιθανά να υποδηλώνει μια μετατροπή της αλληλεπίδρασης κυττάρου-εξωκυττάριας ουσίας, η οποία διευκολύνει την διαδικασία διήθησης των νεοπλασματικών κυττάρων κατά την διάρκεια της καρκινογένεσης και της εξέλιξης του όγκου (Chiquet-Ehrismann et al., 1988, Howedy et al., 1990, Koukoulis et al., 1993, Gould et al., 1990, Vollmer, 1997).

Τα καρκινώματα του μαστού συχνά χαρακτηρίζονται από μια στρωματική αντίδραση, η οποία συνίσταται σε προσαρμογή (αναδιοργάνωση) των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας (Howedy et al., 1990, Koukoulis et al., 1993, Gould et al., 1990). Μολονότι, η έκφραση της TN και άλλων συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας, έχουν μελετηθεί στον καρκίνο του μαστού, δεν υπάρχουν αναφορές σχετικές με την ανοσοϊστοχημική έκφραση της TN σε σχέση με τα κύρια συστατικά της ΒΜ.

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε αναλογική συσχέτιση της έκφρασης της TN με την ανοσοϊστοχημική έκφραση και των δύο συστατικών της ΒΜ.

Τα αποτελέσματα της έκφρασης της TN έδειξαν μια θετική συσχέτιση με το βαθμό διαφοροποίησης σε συμφωνία με τον Iskaros et al., 1998 και σε αντίθεση με τα ευρήματα άλλων ερευνητών (Melis et al., 1997, Tokes et al., 1999). Εμείς επίσης βρήκαμε μια θετική συσχέτιση με το μέγεθος του όγκου, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα του Melis et al., 1997. Επιπρόσθετα, η υπερέκφραση της ανοσοθετικότητας της TN, έδειξε να συσχετίζεται με τους όγκους οι οποίοι ήταν αρνητικοί για τους οιστρογονικούς υποδοχείς, γεγονός που θα μπορούσε να υποδηλώνει μια πιθανά εξαρτώμενη με τον εμμηνορυσιακό κύκλο δραστηριότητα της TN, όπως προτείνεται από τον Fergusson et al., 1990. Το εύρημα αυτό πιθανά θα μπορούσε να οφείλεται στην σύνδεση που υπάρχει μεταξύ της έκφρασης της TN και της επιθετικής νόσου (Jahkola et al., 1998, Shoji et al., 1993). Στην παρούσα μελέτη έκφραση της TN σχετίσθηκε με φτωχή πρόγνωση των ασθενών. Παρόμοια ευρήματα παρατηρήθηκαν και σε άλλες μελέτες (Ishihara et al., 1995, Shoji et al., 1993). Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της TN, στο μέτωπο διήθησης συσχετίσθηκε, με την

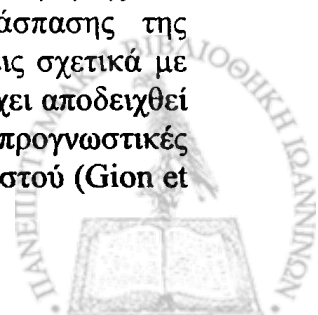
ύπαρξη διηθημένων μασχαλιαίων λεμφαδένων, γεγονός που μας προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες για την προοδευτική ανάπτυξη του όγκου. Τα δικά μας στοιχεία, υποστηρίζουν την άποψη, ότι ο ρόλος της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης της TN είναι αρκετά σημαντικός στην διαδικασία της ανάπτυξης του όγκου και μας παρέχει πληροφορίες, προγνωστικής αξίας για τις ασθενείς με καρκίνο του μαστού.

Μελέτες που έγιναν σε κυτταροκαλλιέργειες, έδειξαν ότι πιθανά η TN προάγει την κυτταρική ανάπτυξη, και αυτό το επιτυγχάνει αυξάνοντας την μιτογενετική επίδραση του ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα, ο οποίος θεωρείται προαπαιτούμενος για την υπερπλαστική δραστηριότητα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Vollmer, 1997). Από την άλλη πλευρά η TN έχει μια σύνθετη διττή λειτουργία: μια αντισυγκολλητική επίδραση και μια δυνατή κυτταρική δεσμευτική ικανότητα, του να προάγει ή να αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου (Chiquet-Ehrismann et al., 1988, Vollmer, 1997). Στη δική μας μελέτη, δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της στρωματικής έκφρασης της TN και της αυξητικής δραστηριότητας του όγκου, όπως αυτό εκτιμήθηκε με τους δείκτες πολλαπλασιασμού. Παρόμοια ευρήματα διαπίστωσαν και άλλοι ερευνητές (Tokes et al., 1999). Σε αντίθεση, άλλοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η έκφραση της TN πιθανά παίζει έναν προαγωγικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό (Jahkola et al., 1998). Αυτά τα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε *in situ* πορογενή καρκινώματα του μαστού και σε θέσεις διήθησης του αρχόμενου καρκίνου του μαστού (Jahkola et al., 1998).

Έκφραση των συστατικών της ΕΟ, ανευρέθηκε στους περισσότερους διηθημένους μασχαλιαίους λεμφαδένες σε ποικίλα ποσά. Το ιδιαίτερο εύρημα ότι το ποσοστό της κυτταροπλασματικής έκφρασης των TN, IN, και ΛΜ στους διηθημένους μασχαλιαίους λεμφαδένες είναι μεγαλύτερο σε σχέση με τον πρωτοπαθή όγκο, πιθανά να υποδηλώνει ότι αυτές οι πρωτεΐνες παράγονται από τα ίδια τα νεοπλασματικά κύτταρα και ως εκ τούτου φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της μετάστασης. Επιπρόσθετα, η παρουσία κυτταροπλασματικής έκφρασης, η οποία ήταν πιο έντονη στις περιπτώσεις όπου παρατηρήθηκε μικρή ή απουσία της έκφρασης της TN, μπορεί να υποδηλώνει ότι πιθανά τα ίδια τα νεοπλασματικά κύτταρα είναι υπεύθυνα για την σύνθεση της. Επιπλέον, στις περιπτώσεις αυτές διαπιστώθηκε ότι υπήρχε συσχέτιση της κυτταροπλασματικής έκφρασης με τους ελεύθερους μετάστασης μασχαλιαίους λεμφαδένες. Έτσι λόγω των παραπάνω θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η κυτταροπλασματική έκφραση της TN αποτελεί ένα πρώιμο γεγονός στην διαδικασία της καρκινογένεσης αναφορικά με τον καρκίνο του μαστού, σε αντίθεση με την στρωματική έκφραση αυτής, όπου φαίνεται να υπάρχει ένας περισσότερο επιθετικός φαινότυπος του όγκου.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν όλες τις παραπάνω πληροφορίες, θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι τα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας πιθανά να εμπλέκονται στον σύνθετο (περίπλοκο) μηχανισμό της ανάπτυξης και προοδευτικής εξέλιξης του καρκίνου του μαστού. Επιπρόσθετα, τα μελετηθέντα μόρια φαίνεται να εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση του στρωματικού υποστρώματος του καρκίνου. Μεταξύ αυτών η TN και η IN πιθανά μπορεί να θεωρηθούν χρήσιμοι δείκτες κακής πρόγνωσης στον καρκίνο του μαστού.

Η παραγωγή της Καθεψίνης D (KD) από τους όγκους, ένα οιστρογόνο-εξαρτώμενο λυσοσομικό ένζυμο, έχει ενοχοποιηθεί για την διαδικασία της τοπικής διήθησης του όγκου και για την μεταστατική διασπορά αυτού μέσω της διάσπασης της εξωκυττάριας ουσίας. Υπάρχουν διαφωνίες και αντικρουόμενες απόψεις σχετικά με την δραστηριότητα της KD (Ioachim et al., 1997, Ferno et al., 1994). Έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση της KD πιθανά να μας παρέχει ανεξάρτητες προγνωστικές πληροφορίες για την πορεία της νόσου των ασθενών με καρκίνο του μαστού (Gion et



al., 1995). Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η έκφραση αυτής αποτελεί αρνητικό προγνωστικό παράγοντα για την συνολική επιβίωση. Στην παρούσα μελέτη τόσο η KD των νεοπλασματικών κυττάρων όσο και η στρωματική έκφραση αυτής έδειξε να συσχετίζεται με την έκφραση της TN. Τα αποτελέσματα αυτά ήταν σε συμφωνία με αυτά μιας πολύ πρόσφατης δημοσίευσης του Jahkola και των συνεργατών του (1999) ο οποίος έδειξε ότι υπήρχε μια θετική συσχέτιση της έκφρασης της TN, κατά το μέτωπο διήθησης του πρώιμου καρκίνου του μαστού, με την στρωματική έκφραση της KD.

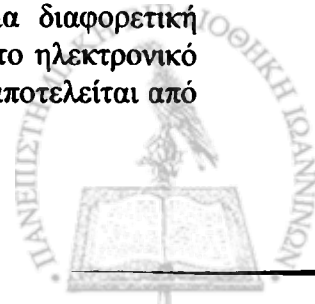
Σε μια μελέτη που έγινε με *in situ* υβριδισμό σε καρκινώματα του παχέος εντέρου έδειξε μια θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του IN-mRNA και του βάθους διήθησης όπως και της συχνότητας των μεταστατικών λεμφαδένων, γεγονός που πιθανά υποδηλώνει ότι η έκφραση της IN πιθανά είναι πολύ σημαντική στην διαδικασία αναδόμησης του νεοπλασματικού ιστού κατά την διάρκεια της καρκινογένεσης και της ανάπτυξης του όγκου (Hanamura et al., 1997). Επιπλέον, μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες έδειξαν ότι η IN πιθανά διεγείρει την μετανάστευση του νεοπλασματικού κυττάρου κάτω από βασικές προϋποθέσεις (Vollmer, 1997). Στην παρούσα μελέτη η έκφραση της IN συσχετίστηκε με την παρουσία διηθημένων μασχαλιαίων λεμφαδένων, γεγονός που υποστηρίζει τα ανωτέρω αποτελέσματα. Ωστόσο, ο Gorczyca et al., 1993, δεν παρατήρησαν συσχέτιση της έκφρασης της IN με την παρουσία θετικών μασχαλιαίων λεμφαδένων στον καρκίνο του μαστού. Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι περιπτώσεις με αυξημένα επίπεδα έκφρασης της IN συσχετιζόταν με αυξημένη θνησιμότητα των ασθενών, γεγονός που υποδηλώνει την δυσμενή προγνωστική σπουδαιότητα της έκφρασης της IN. Αυτή η άποψη ενισχύεται από το ότι διαπιστώθηκε θετική συσχέτιση της έκφρασης της IN με την παρουσία διηθημένων μασχαλιαίων λεμφαδένων και με τον δείκτη πολλαπλασιασμού Ki-67. Σύμφωνα με άλλους η ανοσοθετικότητα για IN αποτελούσε ευνοϊκό προγνωστικό δείκτη, ο οποίος συνοδευόταν με χαμηλή μεταστατική δυναμικότητα του καρκίνου του μαστού (Gorczyca et al., 1993).

Ασθενείς με θετική έκφραση της IN είχαν ένα μεγαλύτερο διάστημα ελεύθερο νόσου συγκριτικά με αυτούς που ο πρωτοπαθής όγκος ήταν αρνητικός έκφρασης IN, αν και η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικώς σημαντική. Ωστόσο, ο Christensen και οι συνεργάτες του (1988) αναφέρουν ότι όγκοι οι οποίοι εμφάνισαν θετική έκφραση της IN στο μέτωπο διήθησης, παρουσίαζαν ένα σαφές χαμηλό μεταστατικό δυναμικό, στατιστικώς σημαντική συσχέτιση, και όπως εμφανίστηκε μετά από μια πολυπαραγοντική ανάλυση αποτελεί έναν εξαιρετικό προγνωστικό δείκτη.

Η ισχυρή συσχέτιση που υπήρξε μεταξύ της έκφρασης της TN και της IN, υποστηρίζει την θεωρία ότι αυτά τα δύο αντισώματα λειτουργούν συνεργικά (Chiquet-Ehrismann et al., 1988).

Όλοι οι επιθηλιακοί ιστοί είναι οργανωμένοι σύμφωνα με ένα βασικό αρχιτεκτονικό πρότυπο, το οποίο χαρακτηρίζεται από ένα φυσικό όριο (σύνορο), που βρίσκεται μεταξύ του επιθηλιακού στοιχείου και του περιβάλλοντα συνδετικού ιστού, του στρώματος. Ένα παρόμοιο φυσικό όριο (σύνορο), υπάρχει και στα αγγεία, μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και του στρώματος. Για παράδειγμα, στην περίπτωση της επιδερμίδας του δέρματος ή στην αδενική μονάδα του μαζικού παρεγχύματος, τα επιθηλιακά κύτταρα (ή τα μυοεπιθηλιακά στην περίπτωση του μαστού) διαχωρίζονται από τον γύρω περιβάλλοντα συνδετικό ιστό (στρώμα) από μια δομή, η οποία ονομάζεται *Βασική Μembrάνη*.

Αυτός είναι ένα παλιός όρος του οπτικού μικροσκοπίου, ενώ μια διαφορετική ορολογία χρησιμοποιείται για την παρατηρούμενη ζώνη της BM με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (HM). Με τη βοήθεια του HM παρατηρήθηκε ότι αυτή αποτελείται από



πολλά συστατικά, εκ των οποίων των η πιο κοινή και με την μεγαλύτερη συνέπεια εμφανιζόμενη δομή είναι μια σαν πλάκα στοιβάδα αποτελούμενη από υλικό πρωτεϊνών η οποία ονομάζεται Βασικό Πέταλο (Basal Lamina). Αυτή διαχωρίζεται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων με ένα διαυγές διάστημα και αυτό είναι που ονομάζεται lamina lucida. Σε μια επιπρόσθετη ή εναλλακτική ορολογία, το ΒΠ ονομάζεται επίσης lamina densa, όρος που συμπεριλαμβάνει την lamina lucida (βλέπε σχήμα 4.2.1.). Η δομική αυτή οργάνωση των lamina lucida και lamina densa, συνεπώς είναι το βασικό δομικό χαρακτηριστικό των φυσιολογικών ιστών.

Η δομική αυτή οργάνωση των lamina lucida και lamina densa, επίσης παρατηρείται στην εξωτερική επιφάνεια σε αρκετά κύτταρα του συνδετικού ιστού όπως: στα κύτταρα Schwann, στα κύτταρα του μυϊκού ιστού, του περινευρίου και στα λιποκύτταρα (Eyden 1996).

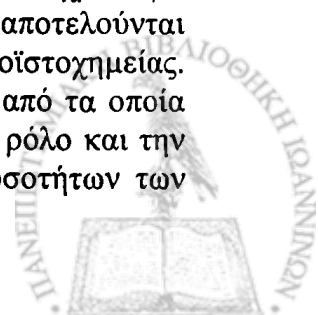
Στο ανθρώπινο μαζικό παρέγχυμα και στον καρκίνο του μαστού, υπάρχουν πολλά τεκμηριωμένα παραδείγματα, όπου η δομή που υπάρχει μεταξύ του επιθηλίου και του στρώματος παρεκκλίνει του φυσιολογικού πρότυπου ανάπτυξης (lamina lucida/lamina densa). Αυτές οι παρεκκλίσεις μπορεί να είναι: πολλαπλό και μερικές φορές δικτυωτό πρότυπο ανάπτυξης της lamina densa, το οποίο διανθίζεται με κενά διαστήματα τα οποία θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως περιοχές της lamina lucida, διακεκομμένη lamina densa, απουσία της lamina densa και εστίες από πυκνό άμορφο υλικό (Peypol et al).

Είναι ήδη γνωστό, ότι σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο η αρχιτεκτονική δομή της ΒΜ παρουσιάζει μια μεγάλη ποικιλία οργάνωσης μεταξύ των διαφορετικών ιστών. Τέτοιες παραλλαγές είναι η πάχυνση αυτής και η απουσία της lamina lucida. Αυτές είναι κυρίως συσχετιζόμενες με τον επιθηλιακό ιστό. Ωστόσο, παραλλαγή αυτής όπου παρατηρείται πλήρης αποδιοργάνωση της αρχιτεκτονικής της δομής και αντικατάσταση της με ένα άμορφο υλικό, δεν έχει αρκετά μελετηθεί σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία.

Οι παρατηρήσεις που παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη μας βοηθούν να κατανοήσουμε περισσότερο την δομή της μοριακής αρχιτεκτονικής του μεσοδιαστήματος μεταξύ των επιφανειών του στρώματος και των νεοπλασματικών νησίδων, στον καρκίνο του μαστού μέσω της παρουσίας των συστατικών της ουσίας, που ονομάσαμε ως άμορφη "κοκκιώδη" ουσία. Αυτή ερμηνεύεται ως μια μορφή δομικής οργάνωσης των πρωτεϊνών της ΒΜ.

Οι βασικής-μεμβράνης-σχετιζόμενες άμορφες "κοκκιώδεις" ουσίες έχουν ήδη περιγραφεί, σε περιαγγειακή εντόπιση, σε κακοήθειες, σε αντιδραστικές αλλοιώσεις, σε φυσιολογικό εγκεφαλικό φλοιό (Lugassy et al 1997, Eyden 1999a,b; Eyden and Tzaphlidou 2000; Eyden et al 2000) και στην επιφάνεια ινοβλαστών καλοήθων όγκων (Eyden, Yamazaki and Banerjee 2000).

Βέβαια, αυτές πιθανά να επιδρούν διαφορετικά ανάλογα με την ανατομική τους εντόπιση και αυτό να οφείλεται στην διαφορετική χωροταξική κατανομή των συστατικών της. Όταν αυτές εντοπίζονται στην βασική ζώνη των καρκινωμάτων του μαστού πιθανά να επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων, ή την μετανάστευση αυτών μέσω της περιαγγειακής εξωκυττάριας ουσίας σε μια δευτεροπαθή εντόπιση, ή να επιδρούν στην διαφοροποίηση του όγκου. Μέχρι τώρα δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες για αυτές τις ουσίες, εκτός του ότι αποτελούνται από ΛΜ και ΚΛ, όπως αυτό αποδεικνύεται με την βοήθεια της ανοσοϊστοχημείας. Για αυτό το λόγο, είναι απαραίτητο να μελετηθούν επιπλέον τα μόρια από τα οποία αποτελούνται, έτσι ώστε να έχουμε περισσότερες πληροφορίες για τον ρόλο και την λειτουργία τους. Εάν δηλαδή, αυτές είναι αποτέλεσμα ανεπαρκών ποσοτήτων των



πρωτεϊνών της ΒΜ, ή προέρχονται από τον κατακερματισμό μιας προϋπάρχουσας φυσιολογικής δομής ΒΠ. Αυτές οι πληροφορίες θα μας βοηθήσουν να κατανοήσουμε τον ρόλο αυτών των ουσιών στις διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις.

Η άμορφη "κοκκιώδης" αυτή ουσία στην παρούσα μελέτη διαχωρίστηκε ανάλογα με την τοπογραφική της εντόπιση σε δύο τύπους: α) *βασικού τύπου κοκκιώδης ουσία*, αυτή που αναγνωρίστηκε κατά το όριο επαφής των επιθηλιακών ή των μυοεπιθηλιακών κυττάρων με το στρώμα και β) *περιαγγειακή άμορφη "κοκκιώδης" ουσία*, σαν τμήμα του περιαγγειακού στρώματος.

Η βασικού τύπου άμορφη "κοκκιώδης" ουσία διέφερε από την αναμενόμενη δομή του ΒΠ (*lamina lucida/lamina densa*), στο ότι απουσίαζε η *lamina lucida*. Αντ'αυτού παρατηρήθηκε η παρουσία ενός άμορφου ομογενοποιημένου πυκνού υλικού, το οποίο βρισκόταν σε άμεση επαφή με τις μεμβράνες των βασικά τοποθετημένων καρκινικών κυττάρων.

Το πυκνό αυτό υλικό δεν θα μπορούσε να θεωρηθεί σαν μια απλά παχύτερη έκδοση της *lamina densa*, διότι τις περισσότερες φορές είναι αρκετά παχύτερο σε σχέση με αυτή και ταυτόχρονα ανώμαλα παχυσμένο. Σε θέσεις, υπήρχε απλά μια μικρή υπόνοια παρουσίας της *lamina densa*, γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανά υπάρχει ένα είδος ισορροπίας μεταξύ του άμορφου "κοκκιώδους" αυτού υλικού που θυμίζει την δομή της *lamina densa*. Δηλαδή, πιθανά υπάρχει ένας λειτουργικός μετασχηματισμός μεταξύ των δύο αυτών δομών.

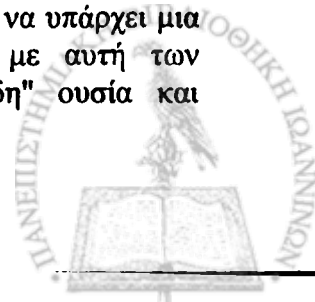
Η ίδια κατάσταση αναγνωρίστηκε και στις περιαγγειακές ουσίες. Εδώ επίσης, σε θέσεις όπου αναμενόταν η κλασική δομή του ΒΠ (*lamina densa/lamina lucida*), παρατηρήθηκε κατάληψη αυτού από ένα άμορφο "κοκκιώδες" υλικό, το οποίο ερχόταν σε επαφή με την επιφάνεια των ενδοθηλιακών και νεοπλασματικών κυττάρων. Αυτή η διαμόρφωση θύμιζε αρκετά το αγγειονεοπλασματικό σύμπλεγμα, το οποίο πρωτοπεριγράφηκε στο κακόηθες μελάνωμα (Lugassy et al 1997)

Το γεγονός ότι και στις δύο θέσεις - στο διαμέρισμα της βασικής μοίρας του όγκου και στην περιαγγειακή ουσία- υπάρχει θετική ανοσοαντίδραση για το ΚΛ και για την ΛΜ -δύο από τα ουσιώδη μόρια του Βασικού ή εξωτερικού πετάλου, υποδηλώνει ότι αυτή η άμορφη "κοκκιώδης" ουσία αποτελείται από τις πρωτεΐνες της ΒΜ. Ξεκάθαρα, ωστόσο, αυτές οι αθροίσεις των πρωτεϊνών της ΒΜ δεν οργανώνονται σύμφωνα με το αναμενόμενο πρότυπο ανάπτυξης του ΒΠ (*lamina densa/lamina lucida*). Έχει μεγάλο ενδιαφέρον να εξετασθεί η προέλευση αυτών των άμορφων "κοκκιωδών" ουσιών.

Αναγνωρίζοντας ότι οι άμορφες "κοκκιώδεις" ουσίες είναι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών της ΒΜ, δύο εκδοχές είναι πιθανές για την προέλευση τους. Ότι αυτές πιθανά σχηματίζονται είτε ως αποτέλεσμα ελαττωματικής έκκρισης και ελλιπούς συγκέντρωσης των πρωτεϊνών της ΒΜ, είτε από την διάσπαση ενός προϋπάρχοντος ΒΠ.

Προκειμένου να γίνει η ταυτοποίηση μεταξύ των δύο πιθανοτήτων, μελετήθηκε η ανοσοϊστοχημική έκφραση πρωτεολυτικών ενζύμων (ΚΔ και ΣΤΡ) τα οποία διασπούν τα συστατικά της ΕΟ, και επομένως και τα συστατικά της ΒΜ. Η σκέψη ήταν ότι εάν η ανοσοϊστοχημική έκφραση της ΛΜ και του ΚΛ συνέπιπτε με την ανοσοϊστοχημική έκφραση των ενζύμων, θα συνηγορούσε υπέρ της δεύτερης πιθανότητας, ότι δηλαδή η άμορφη "κοκκιώδης" ουσία είναι αποτέλεσμα διάσπασης μιας προϋπάρχουσας φυσιολογικής δομής ΒΠ.

Σε σχέση με τις *περιαγγειακές άμορφες "κοκκιώδεις" ουσίες*, φαίνεται να υπάρχει μια μεγαλύτερη ποικιλία αρχιτεκτονικής ετερογένειας συγκρινόμενη με αυτή των *βασικού τύπου άμορφες "κοκκιώδεις" ουσίες*. Άμορφη "κοκκιώδη" ουσία και



φυσιολογική δομή ΒΠ μπορεί να συνυπάρχουν δίπλα-δίπλα στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων ενός αγγείου. Μερικές φορές σε ένα μόνο αγγείο μπορεί να έχουμε την παρουσία φυσιολογικής δομής του ΒΠ, ενώ σε άλλα αγγεία να παρατηρείται μόνο η παρουσία της άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας. Άμορφες "κοκκιώδεις" ουσίες μπορεί να υπάρχουν στην επιφάνεια των περικυττάρων

Προσβλέποντας τις περιαγγειακές άμορφες "κοκκιώδεις" ουσίες, η ένωση των επιφανειών των ενδοθηλιακών κυττάρων, της άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας και των γειτονικών νεοπλασματικών κυττάρων, θυμίζει έντονα το αγγειονεοπλασματικό σύμπλεγμα που πρωτοπεριγράφηκε στο κακόηθες μελάνωμα (Lugassy et al 1997).

Όπως και στον μαστό, αυτό αποδείχθηκε ότι ήταν μια θέση των πρωτεϊνών της ΒΜ, της ΛΜ και του ΚΛ. Ήταν αυταπόδεικτο ότι η άμορφη "κοκκιώδης" ουσία περιείχε μόρια της ΒΜ, τα οποία ξεκάθαρα δεν ήταν οργανωμένα ως μια συγκεκριμένη υπερμικροσκοπική δομή (lamina densa/lamina lucida) αλλά ήταν σε "ελεύθερη" μορφή. Μίας και αυτά τα μόρια δεν ήταν δεσμευμένα με άλλες πρωτεΐνες της ΒΜ, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι υπάρχουν ελεύθερες θέσεις, ισότιμες των πεπτιδικών ακολουθιών, και ότι αυτές οι ελεύθερες θέσεις πιθανά δρουν ενεργά στην ανάπτυξη και την μετανάστευση των νεοπλασματικών κυττάρων του μελανώματος κατά μήκος της επιφάνειας του στρώματος και των αγγείων. Τέτοια ΛΜ ήταν η "ελεύθερη" ΛΜ: η άποψη ότι η "ελεύθερη" ΛΜ ήταν υπεύθυνη για την μετανάστευση των νεοπλασματικών κυττάρων βασίστηκε στο γεγονός ότι έχουν γίνει πολλές πειραματικές και in vitro μελέτες όπου αποδεικνύεται ότι η ΛΜ επαυξάνει την μετανάστευση.

Αυτή η επιχειρηματολογία είναι εξίσου εφαρμόσιμη και στον καρκίνο του μαστού. Επιπλέον, θα μπορούσε κανείς να υποστηρίξει, ότι η άμορφη "κοκκιώδης" ουσία η οποία συνδέεται με τα αγγεία, επί απουσίας των νεοπλασματικών κυττάρων, μπορεί να υποδηλώνει μια γενική ποιοτική αλλαγή των αντιδραστικών αγγείων, τέτοια που πιθανά θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι λειτουργεί σαν εναρκτήριο μόριο για την μετανάστευση των νεοπλασματικών κυττάρων προς αυτές τις θέσεις. Ένα επιπλέον ενδιαφέρον σημείο, που συσχετίζεται με την παρατήρηση που έγινε στο κακόηθες μελάνωμα, είναι ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα δεν εισχωρούν στην αιματική κυκλοφορία αλλά επεκτείνονται σε απομακρυσμένες θέσεις -μέσου της μετανάστευσης- χρησιμοποιώντας την στρωματική επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Στον καρκίνο του μαστού, η παρουσία αυτής της ουσίας έχει σημειωθεί πάνω στην ενδοθηλιακή επιφάνεια των περικυττάρων και αυτό ενισχύει την πιθανότητα ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα ίσως τελικά μεταναστεύουν όχι κάνοντας χρήση την επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, αλλά αντίθετα αυτό επιτυγχάνεται από την δράση άλλων επιφανειακών προαγωγών, πιθανά σε αυτή την περίπτωση την επιφάνεια των περικυττάρων.

Το γεγονός ότι η άμορφη "κοκκιώδης" ουσία έχει ήδη περιγραφεί και σε περιπτώσεις όπου δεν σχετίζονται με την μετάσταση, εγείρει την σκέψη ότι ενδεχομένως υπάρχει η πιθανότητα παρουσίας και άλλων "ελεύθερων" μορίων ("ελεύθερη" μορφή του ΚΛ όπως και της ΛΜ. Όπως έχει ήδη αναφερθεί άμορφη "κοκκιώδης" ουσία έχει παρατηρηθεί και σε φυσιολογικές ή αντιδραστικές καταστάσεις, ή σε καλοήθεις όγκους. Έτσι, μπορούμε να υποθέσουμε ότι αυτά τα "ελεύθερα" μόρια από τα οποία αποτελείται, πιθανά παρ'ουσιάζουν μια ποικιλία λειτουργιών. Από πειραματικές και in vitro μελέτες που έγιναν τόσο για το ΚΛ όσο και για την ΛΜ έχουν δείξει ότι δεν επηρεάζουν μόνο την διαδικασία της μετανάστευσης αλλά ότι ελέγχουν και επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση. Τις ίδιες πιθανά λειτουργίες μπορεί κανείς να περιμένει ότι εφαρμόζονται στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού.



Ένα άλλο ερώτημα που προκύπτει από αυτή την μελέτη είναι ο ρόλος των μυοϊνοβλαστών στον σχηματισμό της άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας. Γιατί οι μυοϊνοβλάστες βρίσκονται σε επαφή με νεοπλασματικές νησίδες ή κύτταρα ή με αγγεία και παρεμβάλλεται αυτή η άμορφη "κοκκιώδης" ουσία ;

Η παρουσία των μυοϊνοβλαστών σε σχέση με την ύπαρξη άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας δείχνει την πιθανή συμμετοχή τους στην αποδιοργάνωση της δομής του ΒΠ. Πιθανά αυτό επιτυγχάνεται μέσω έκκρισης πρωτεολυτικών ενζύμων από τις μυοϊνοβλάστες. Έτσι, η παρουσία τους σε τόσο κοντινή απόσταση από τα νεοπλασματικά κύτταρα μπορεί να εξηγήει την πιθανή εμπλοκή τους στην διαδικασία της μετάστασης.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν την εικασία ότι οι άμορφες "κοκκιώδεις" ουσίες πιθανά επηρεάζουν κάποιες συγκεκριμένες από το μεγάλο εύρος των λειτουργιών αυτών, όπως τον έλεγχο της διαφοροποίησης και την προαγωγή της μετανάστευσης, ένα γενικό μοντέλο της λειτουργίας των άμορφων "κοκκιωδών" ουσιών μπορεί να υποτεθεί το οποίο μπορεί να εξηγήει πως επιτυγχάνεται η μετάσταση στον καρκίνο του μαστού. Στην περίπτωση του πρωτοπαθούς όγκου, οι μυοϊνοβλάστες εκκρίνουν πρωτεολυτικά ένζυμα τα οποία αποδομούν το προϋπάρχον συστατικό του ΒΠ (lamina densa) και πιθανά έτσι δημιουργούνται αυτές οι βασικού τύπου άμορφες "κοκκιώδεις" ουσίες. Αυτές πιθανά αποτελούνται από "ελεύθερα" μόρια, των οποίων η λειτουργία είναι του να προάγουν τον πολλαπλασιασμό των νεοπλασματικών κυττάρων και στην συνέχεια της μετανάστευσης τους προς την κατεύθυνση των αγγείων.

Κατά αντιστοιχία μια ίδια διαδικασία, έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό του περιαγγειακού τύπου άμορφων ουσιών. Τα νεοπλασματικά κύτταρα έρχονται σε επαφή με μια διαφορετική ομάδα μορίων της περιαγγειακής άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα του να προάγει την μετανάστευση που επιτυγχάνεται μέσω των στρωματικών επιφανειών των ενδοθηλιακών κυττάρων και πιθανά αργότερα μέσω των περικυττάρων μέχρι αυτά να εγκατασταθούν στους πλησιέστερους επιχώριους λεμφαδένες. Εκεί, αυτά έρχονται σε επαφή με τις δικτυωτές ίνες οι οποίες απαρτίζονται από μια άμορφη "κοκκιώδης" ουσία αποτελούμενη τόσο από "ελεύθερη" ΛΜ όσο και από άλλα μόρια "ελεύθερης" μορφής. Εδώ, μια νέα ομάδα "ελεύθερων" μορίων της άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας διακόπτει την μετανάστευση και προάγει τον τοπικό πολλαπλασιασμό και τελικά αυτό οδηγεί στον σχηματισμό μιας δεύτερης εστίας του καρκινώματος στους μασχαλιαίους λεμφαδένες.

Τα ευρήματα της ανοσοϊστοχημείας σε συνδυασμό με αυτά του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου δείχνουν έμμεσα τον ρόλο των ουσιών αυτών στην διαδικασία της καρκινογένεσης και της πιθανής εμπλοκής τους στην διαδικασία της μετάστασης.

Ένα επιπλέον ενδιαφέρον σημείο, συσχετίζεται με την άποψη ότι τα νεοπλασματικά κύτταρα του κακοήθους μελανώματος, δεν ενδαγγειώνονται αλλά εξαπλώνονται σε μακρινές θέσεις, μέσω της μετανάστευσης η οποία επιτυγχάνεται διαμέσου της στρωματικής επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων. Στον καρκίνο του μαστού, έχει σημειωθεί η παρουσία της κοκκιώδους ουσίας πάνω στην εξω-ενδοθηλιακή επιφάνεια των περικυττάρων και αυτό εγείρει την πιθανότητα ότι τέτοια μεταναστευτικά κύτταρα, πιθανά τελικά σταματούν να χρησιμοποιούν την επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων και αντ'αυτού κάνουν χρήση άλλων προαγωγικών επιφανειών, σε αυτή την περίπτωση την επιφάνεια των περικυττάρων.

Επίσης μια άλλη παρατήρηση, είναι ότι δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ιστολογικών τύπων και πιθανά αυτό να σημαίνει ότι αυτή η άμορφη "κοκκιώδης" ουσία εμπλέκεται μάλλον στο πρώιμο στάδιο της μετάστασης, δηλ. στην τοπική επέκταση.



Σε 12 περιπτώσεις παρατηρήθηκε η παρουσία τόσο του περιαγγειακού όσο και του βασικού τύπου άμορφη "κοκκιώδης" ουσίας, και σε όλες αυτές τις περιπτώσεις ήταν τουλάχιστον έναν μασχαλιαίο λεμφαδένα διηθημένος. Σε τρεις περιπτώσεις είχαμε την παρουσία μόνου του βασικού τύπου άμορφη "κοκκιώδης" ουσίας, χωρίς ταυτόχρονη διήθηση των μασχαλιαίων λεμφαδένων. Αυτά τα ευρήματα, πιθανά εξηγούν τον κρίσιμο ρόλο της άμορφη "κοκκιώδης" ουσίας, όταν αυτή σχηματίζει το χαρακτηριστικό αγγειονεοπλασματικό σύμπλεγμα, στην τόσο πολυσύνθετη διαδικασία της μετάστασης. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ιστολογικών βαθμών κακοηθείας, γεγονός που πιθανά να σημαίνει ότι ουσία αυτή εμπλέκεται σε πολύ αρχικά στάδια της μετάστασης -τοπική επέκταση-.

Τα υπερμικροσκοπικά ευρήματα σε συνδυασμό με τα ανοσοϊστοχημικά μας βοηθούν να κατανοήσουμε περισσότερο τη φύση της ζώνης της βασικής μεμβράνης η οποία συσχετίζεται με τα νεοπλασματικά κύτταρα και τα αγγεία. Διαφορετικά πρότυπα ανάπτυξης της δομής της οργάνωσης των πρωτεϊνών της βασικής μεμβράνης και ειδικά της αναφερόμενης ως άμορφη "κοκκιώδης" ουσίας, πιθανά παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της μετάστασης και κατά συνέπεια στην βιολογική συμπεριφορά του καρκινώματος του μαστού.

Το πρότυπο ανάπτυξης της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης τόσο της ΛΜ όσο και του ΚΛ ήταν ετερογενές ακόμη σε διαφορετικές θέσεις του ίδιου νεοπλάσματος. Υπήρχαν θέσεις με γραμμικό πρότυπο ανάπτυξης που εναλλασσόταν με θέσεις όπου αυτό γινόταν είτε πολυστοιβαδωτό είτε διασπασμένο, είτε πιο διάχυτο. Σε κάποιες περιπτώσεις το πρότυπο έκφρασης ήταν διακεκομμένο γύρω από τα νεοπλασματικά κύτταρα εμφανίζοντας κατά θέσεις μια ανώμαλη πάχυνση ή μια επέκταση στο υποκείμενο στρώμα. Επίσης παρατηρήθηκαν θέσεις όπου στερούνταν περιπιθηλιακής έκφρασης, και εμφάνιζαν μόνο στις βασικές μεμβράνες των αγγείων -πολυστοιβαδωτό ή περισσότερο διάχυτο πρότυπο ανάπτυξης-.

Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας με το απλό μικροσκόπιο έδειξαν ότι οι βασικές μεμβράνες τόσο των αγγείων όσο και των νεοπλασματικών νησίδων εμφάνισαν θετικότητα στο ΚΛ και στην ΛΜ, όπως ήταν αναμενόμενο. Απώλεια της βασικής μεμβράνης ή μεταβολή αυτής συνοδευόταν με αντίστοιχες μεταβολές της κατανομής των δύο αυτών πρωτεϊνών. Έτσι, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι οι πρωτεΐνες -ΚΛ και ΛΜ- αποτελούν τα συστατικά της άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας και από την λεπτομερή δομή που μας παρέχει το Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, να υποθέσουμε την πιθανή εμπλοκή αυτών των ουσιών στην διαδικασία της μετάστασης. Αυτός ο συνδυασμός των παρατηρήσεων του απλού μικροσκοπίου με τα μοντέλα έκφρασης και του προτύπου ανάπτυξης των πρωτεϊνών αυτών σε συνδυασμό με τις υπερμικροσκοπικές παρατηρήσεις της αποδιοργάνωσης της βασικής μεμβράνης μας παρέχει επιπρόσθετες πληροφορίες της βιολογικής συμπεριφοράς του καρκινώματος του μαστού.

Επιπλέον, οι μεταβολές της έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών γύρω από αγγεία σε θέσεις του όγκου, σε συνδυασμό με την απουσία ή αποδιοργάνωση της κλασσικής δομής της βασικής μεμβράνης των αγγείων που παρατηρήθηκαν σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο, δείχνει την ποιοτική τους μεταβολή στον καρκίνο του μαστού. Έτσι, δεν θα πρέπει να μελετώνται μόνο οι πιθανές αυξομειώσεις της μικροαγγειακής πυκνότητας και η προγνωστική τους αξία, αλλά να συνεκτιμούνται και οι ποιοτικές μεταβολές των αγγείων ενός όγκου.



Μελλοντικές προοπτικές

1. Η ανάγκη ταυτοποίησης των συστατικών της άμορφη "κοκκιώδης" ουσίας χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχεία σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο
2. Η περαιτέρω μελέτη με την μέθοδο του *in situ* υβριδισμού
3. Η πιθανότητα ταυτοποίησης αυτών των "ελεύθερων" μορίων της άμορφης "κοκκιώδους" ουσίας και οι συσχετιζόμενες με αυτά λειτουργίες σε πειραματικό επίπεδο. Με μεθόδους ανοσοϊστοχημείας μπορεί να αποδειχθεί ότι αυτές οι άμορφες "κοκκιώδεις" ουσίες περιέχουν ελεύθερα μόρια τα οποία μπορεί να μην είναι παρόντα σε μια συμβατική ΒΜ
4. Να ελεγχθεί το εάν υπάρχει συγκεκριμένη γενετική μετάλλαξη που να συσχετίζεται με την παραγωγή αυτών των ουσιών ή των συστατικών τους



6. Συμπεράσματα

- Παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση των περισσότερων συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας, τόσο μεταξύ τους (αναλογική συσχέτιση της έκφρασης της ΛΜ, τόσο με την έκφραση της TN όσο και της IN), όσο και με το πρωτεολυτικό ένζυμο KD.
- Παρατηρήθηκε συσχέτιση της έκφρασης της TN και της IN με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων.
- Η ανοσοϊστοχημική έκφραση τόσο των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας (TN, IN) όσο και του πρωτεολυτικού ενζύμου KD, δεδομένου ότι συσχετίσθηκε με την επιβίωση φαίνεται να αποτελεί προγνωστικό δείκτη για τον καρκίνο του μαστού.
- Σε υπερμικροσκοπικό επίπεδο παρατηρήθηκαν μεταβολές της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής δομής της ΒΜ τόσο των αγγείων όσο και των νεοπλασματικών κυττάρων. Οι μεταβολές αφορούσαν σε διάφορα πρότυπα ανάπτυξης, έως και πλήρης απουσίας αυτής.
- Η διαδικασία της μετάστασης φαίνεται να επηρεάζεται από τον τρόπο της αρχιτεκτονικής διαμόρφωσης των πρωτεϊνών της ΒΜ και της ΕΟ.
- Πιστεύουμε ότι η έναρξη της διαδικασίας της διήθησης λαμβάνει χώρα στις θέσεις αποδιοργάνωσης της ΒΜ ή πλήρης απουσίας αυτής.
- Τα συστατικά της ΕΟ φαίνεται ότι δεν αποτελούν απλά δομικά στοιχεία, αλλά συμμετέχουν ενεργά σε όλη την διαδικασία της ανάπτυξης του καρκινώματος του μαστού.



7. Περίληψη

Σήμερα έχει γίνει αρκετά ξεκάθαρο, ότι τα στρωματικά κύτταρα και τα προϊόντα τους, παίζουν έναν σημαντικό ρόλο στο φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων. Έτσι λοιπόν, οι όγκοι παρουσιάζουν ένα σύνθετο οικοσύστημα στο οποίο επισυμβαίνουν αλληλοεπιδράσεις μεταξύ των νεοπλασματικών κυττάρων και της εξωκυττάριας ουσίας (ΕΟ). Η βασική μεμβράνη (ΒΜ) αποτελεί μια εξειδικευμένη δομή της ΕΟ. Οι μεταβολές τόσο αυτής όσο και των υπολοίπων συστατικών της ΕΟ, φαίνεται να εμπλέκονται στην πολυσταδιακή διαδικασία της μετάστασης.

Μελετήθηκε ή ανοσοϊστοχημική έκφραση των συστατικών της ΕΟ (Λαμινίνη, Κολλαγόνο τύπου IV, Τενασκίνης και Ινονεκτίνης), των πρωτεολυτικών ενζύμων (Καθεψίνη D και Στρωμελυσίνη) και η συσχέτιση αυτών τόσο μεταξύ τους όσο και με διάφορες κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους, σε 138 καρκινώματα μαστού. Παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση των περισσότερων συστατικών της ΕΟ, (αναλογική συσχέτιση της έκφρασης της ΛΜ, τόσο με την έκφραση της TN όσο και της IN) και συσχέτιση αυτών με το πρωτεολυτικό ένζυμο Καθεψίνη D. Επιπλέον, η έκφραση της Τενασκίνης στην περιφέρεια του όγκου και η στρωματική έκφραση της Ινονεκτίνης συσχετίστηκαν με την ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση τόσο των συστατικών της ΕΟ (Τενασκίνη, Ινονεκτίνη) όσο και του πρωτεολυτικού ενζύμου Καθεψίνη D, συσχετίστηκε με την επιβίωση και θα μπορούσε να αποτελεί προγνωστικό δείκτη για τον καρκίνο του μαστού.

Σε 21 περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε και υπερμικροσκοπική μελέτη αυτών, όπου παρατηρήθηκε αποδιοργάνωση της δομής της ΒΜ και η παρουσία άμορφων "κοκκιωδών" ουσιών που συσχετίζονταν με την ΒΜ τόσο των επιθηλιακών κυττάρων όσο και των αγγείων. Αυτές φαίνεται να αποτελούν στοιχεία των πρωτεϊνών που φυσιολογικά ανευρίσκονται στο βασικό πέταλο με μια οργανωμένη δομή. Μεταβολές της οποίας φαίνεται να εμπλέκονται στην διαδικασία της διήθησης και μετάστασης.

Τα ευρήματα του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, σε συσχέτιση με τα ανοσοϊστοχημικά δεδομένα μας παρέχουν επιπρόσθετες πληροφορίες της βιολογικής συμπεριφοράς του καρκινώματος μαστού, που φαίνεται να επηρεάζεται από τον τρόπο οργάνωσης των πρωτεϊνών της Β.Μ. και από την αλληλεπίδραση τους με τα άλλα συστατικά της ΕΟ. Στοιχεία που υποδηλώνουν την εμπλοκή αυτών στη διαδικασία της μετάστασης.



8. Abstract

For a long time, only the neoplastic cells were the focus of interest in cancer research and the stroma was considered a reactive component without major biological and clinical significance. However, now a days it has become clear that the stromal cells and their products play an active and complex role in the behavior of tumor that contact it. Thus tumor present a complex ecosystem in which interactions between tumor cells and extracellular matrix (ECM) may lead to reciprocal influences resulting in tumor promotion, invasion and metastasis. Basement membrane (BM) is a specified structure of the ECM. Alterations in both BM and other ECM components seems to be related in the complex process of metastases. On the other hand, breakdown or proteolytic degradation of components of the BM and ECM are essential steps in tissue invasion and require specific proteases.

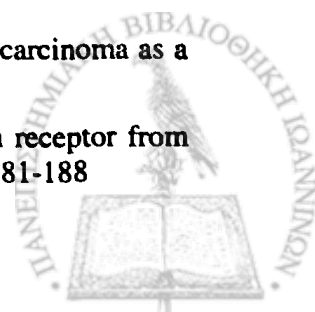
The immunohistochemical expression of the major BM components (collagen type IV and laminin), the extracellular matrix components (tenascin and fibronectin) and the relationship between them and the other clinicopathological parameters was studied in 138 breast carcinomas. An interrelationship of BM components expression was observed (positive correlation of LN with TN and FN). The expression of TN at the periphery of the tumor as well as the stromal FN expression was correlated with the lymph node involved. In addition, the immunohistochemical expression of the extracellular matrix components (TN and FN) as well as the expression of the proteolytic enzyme CD was correlated with the overall survival and could be considered as prognostic markers for the breast cancer.

In 21 cases ultrastructural study was performed where a disorganization of the normal structure of the BM was observed. Variants of basal lamina were found such as poorly developed, fragmented, multi-layered and replicated. Amorphous matrix related with basement membrane has been also observed in peri-vascular and peri-tumoral region. The ultrastructural findings in correlation with those of immunohistochemistry supply more information about the biological behavior of breast cancer that seems to be influenced by the organization of BM proteins. These models of organization may be involved in the metastatic process.

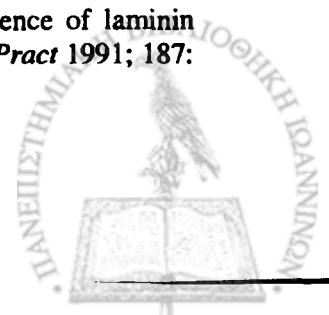


9. Βιβλιογραφία

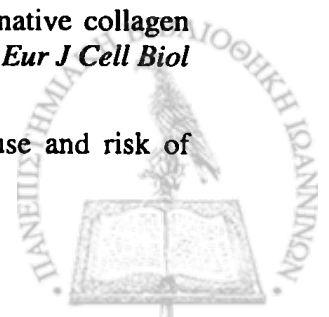
1. Αγνάντη Ι. Νίκη. Ειδική Παθολογική Ανατομική. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Ιωαννίνων 2000; 4
2. Νακοπούλου Λυδία. Ανοσοϊστοχημεία. Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης 1999.
3. Ahmed A. The myoepithelium in human breast carcinoma. *J Pathol* 1974; 113: 129-135
4. Ahmed A. The myoepithelium in human breast fibroadenoma *J Pathol* 1974 Nov;114(3):135-8
5. Akiyama SK, Nagata K, Yamada KM. Cell surface receptors for extracellular matrix components. *Biophys Acta* 1990; 1031:91-110.
6. Albrechtsen R, Nielsen M, Wewer U, Engvall E, Ruoslahti E. Basement membrane changes in breast cancer detected by immunohistochemical staining for laminin. *Cancer Res* 1981, 41, 5076-5081.
7. Albrechtsen R, Wewer UM, Liotta LA. Basement membranes in human cancer. *Pathol Ann (Part 2)* 1986, 11, 251-76.
8. Albrechtsen R, Wewer UM, Thorgeirsson SS. De novo deposition of laminin-positive basement membrane in vitro by normal hepatocytes and during hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 1988, 8, 538-46.
9. Alitalo K, Keski-Oja J, Vaheri A. Extracellular matrix proteins characterize human tumor cells. *Int J Cancer* 1981; 27: 755-61.
10. Alitalo K, Vaheri A. Pericellular matrix in malignant transformation. *Adv Cancer Res* 1982b, 37, 111-158.
11. Alon Y, Horowitz AT, Biran S, Weiss DW, Doljanski F. Immunofluorescent characterization of fibronectin, laminin and keratin in normal and neoplastic human mammary epithelial cells in culture and in breast tissue sections. *Int J Tiss Reac* 1986; 7: 401-410.
12. Arihiro K, Inai K, Kurihara K, Takeda S, Kaneko M. Distribution of laminin, type IV collagen and fibronectin in the invasive component of breast carcinoma. *Acta Pathol Jpn* 1993 Dec;43(12):758-64
13. Asch BB, Kamat BR, Burstein NA. Interactions of normal, dysplastic, and malignant mammary epithelial cells with fibronectin in vivo and in vitro. *Cancer Res* 1981; 41: 2115-25.
14. Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. Recommendations for life reporting of breast carcinoma. *Hum Pathol* 1996; 27:220-224,
15. Auersberg N, Kruk PA, MacLaren IA, Watt FM, Myrdal SE. Heterogenous expression of keratin, involucrin, and extracellular matrix among subpopulations of a poorly differentiated human cervical carcinoma: possible relationships to patterns of invasion. *Cancer Res* 1989; 49: 3007-14.
16. Aufderheide E, Ekblom P. Tenascin during gut development: appearance in the mesenchyme, shift in molecular forms and dependence on epithelial-mesenchymal interactions. *J Cell Biol* 1988; 107:2341-2349
17. Barsky SH, Green WR, Grotendorst GR, Liotta LA. Desmoplastic breast carcinoma as a source of human myofibroblasts. *Am J Pathol* 1984 Jun;115(3):329-33
18. Barsky SH, Rao CN, Hyams D, Liotta JA. Characterization of a laminin receptor from human breast carcinoma tissue. *Breast Cancer Res and Treatm* 1984c; 4: 181-188



19. Barsky SH, Rao CN, Williams JE, Liotta JA. Laminin molecular domains which alter metastasis in a murine model. *J Clin Invest* 1984b; 74: 843-48
20. Beck K, Hunter I, Engel J. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J*, 1990, 4, 148-60.
21. Beezhold DH, Lause BD. Stimulation of rat macrophage interleukin 1 secretion by plasma fibronectin. *Immunol Invest* 1987; 16: 437-49.
22. Berston ED, Ramos DM, Kramer RH. Metastatic melanoma cells interact with the reticular fibres of the lymph node. *Melanoma Res* 1994 Apr;4(2):115-25
23. Bertossi M, Virgintino D, Maiorano E, Occhiogrosso M, Roncali L. Ultrastructural and morphometric investigation of human brain capillaries in normal and peritumoral tissues 1997 *Ultrastruct. Pathol* 21:41-49
24. Birembaut P, Gaillard D, Armandies J, Adnet JJ, Dousset H, Kalis B, Poynard JP, Leutenegger M, Labat-Robert J, Robert L. La fibronectine, etude immuno/morphologique de sa distribution en pathologie. *Ann Pathol* . 1981; 1:140-6.
25. Birembaut P, Gaillard D, Armandies J, Adnet JJ, Labat-Robert J, Robert L. Distribution de la fibronectine, dans les tissus humaines normaux. *Bull Assoc Anat* 1980; 64:349-65.
26. Blood CH, Zetter BR. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1032: 89-118
27. Boccardo F, Guarneri D, Zanardi S, Castellani P, Borsi L, Zardi L. Fibronectin concentration in the plasma of patients with malignant and benign breast disease. *Cancer Lett* 1986; 33: 317-323.
28. Bonner-Fraser M. Distribution and function of tenascin during neural crest development in the chick. *J Neurosci Res* 1998; 21: 135-147
29. Brouillet JP, Spyrtos F, Hacene K, Fauque J, Fupont F, Maudelonde T, Rochefort H. Immunoradiometric assay of pro-cathepsin D in breast cancer cytosol: relative prognostic value versus total cathepsin D. *Eur J Cancer* 1993; 29A: 1248-51
30. Burtin P, Chavanel G, Foidart JM et al., Antigen of the basement membrane and the peritumoral stroma in human colonic adenocarcinomas: An immunofluorescence study. *Int J Cancer* 1982; 30: 13-16.
31. Burtin P, Chavanel G, Foidart JM, Martin G. Antigens of the basement membrane and the peritumoral stroma in human colonic adenocarcinomas: an immunofluorescence study. *Int J Cancer* 1982; 30: 13-20
32. Campbell JH, Terranova VP. Laminin: molecular organization and biological function. *J Oral Pathol*. 1988, 17, 309-323.
33. Capony F, Rougeot C, Montcourrier P, Cavailles V, Salazar G, Rochefort H. Increased secretion, altered processing, and glycosylation of pro-cathepsin D in human mammary cancer cells. *Cancer Res* 1989; 49: 3904-9
34. Cardiff RD. Cathepsin D and breast cancer: useful? (editorial). *Hum Pathol* 1994; 25: 847-848
35. Carnemolla, B., Neri, D., Castellani, P., Leprini, A., Neri, G., Pini, A., Winter, G., and Zardi, L. Phage antibodies with pan-species recognition of the oncofoetal angiogenesis marker fibronectin ED-B domain (1996) *Int. J. Cancer*. 68, 397-405
36. Castronovo V, Bracke ME, Mareel MM, Reznik M, Foidart JM. Absence of laminin deposition in breast cancer and metastases except to the brain. *Path Res Pract* 1991; 187: 201-208



37. Cavailles V, Augereau P, Rochefort H. Cathepsin D gene is controlled by a mixed promoter and estrogens stimulate only TATA dependent transcription in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 203-7
38. Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 1997 Sep 3;89(17):1260-70
39. Charpin C, Lissitzky JC, Jacquemier J, Lavaut N, Kopp F, Pourreeau-Schneider N, Martin PM, and Toga M. Immunohistochemical Detection of Laminin in 98 Human Breast Carcinomas: A Light and Electron Microscopy Study. *Human Pathology.* 1986 Apr 17 (4):355-365
40. Chelberg, M. K., Tsilibary, E. C., Hauser, A. R., and McCarthy, J. B. Type IV collagen-mediated melanoma cell adhesion and migration: involvement of multiple, distinct domains of the collagen molecule (1989) *Cancer Res.* 49, 4796-4802
41. Chen JM, Chen WT. FN-degrading proteases from the membranes of transformed cells. *Cell* 1987; 48: 193-203.
42. Chen LB, Murraray A, Segal RA, Bushnell A, Walsh ML. Studies on intercellular LETS glycoprotein matrices. *Cell* 1978; 14: 377-91
43. Chen W.T, Wang J, Hasegawa T, Yamada SS, Yamada KM. Regulation of fibronectin receptor distribution by transformation, exogenous fibronectin and synthetic peptides. *J Cell Biol* 1986; 103:1649-61
44. Chernousov MA, Faerman AI, Frid MG, Printseva OY, Koteliansky VE. Monoclonal antibody to fibronectin which inhibits extracellular matrix assembly. *FEBS Lett.*1987; 217: 124-28
45. Chiquet-Ehrismann R, Kalla P, Pearson CA, Beck K, Chiquet M. Tenascin interferes with fibronectin action. *Cell* 1988, 53, 383-390.
46. Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA, Sakakura T. Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and ontogenesis. *Cell.* 1986, 47, 131-139
47. Choate JJ, Mosher DF. Fibronectin concentration in plasma of patients with breast cancer, colon cancer and acute leukemia. *Cancer* 1983; 51: 1142-1147.
48. Chomette G, Auriol M, Tranbaloc P, Blondon J. Stromal changes in early invasive breast carcinoma. An immunohistochemical, histoenzymological and ultrastructural study. *Pathol Res Pract* 1990 Feb;186(1):70-9
49. Christensen L, Nielsen M, Andersen J, Clemmensen I. Stromal fibronectin staining pattern and metastasizing ability of human breast carcinoma. *Cancer Research* 1988; 48: 6227-6233.
50. Christensen L, Nielsen M, Holund B, Clemmensen I. Differentiation between metaplastic carcinoma and sarcoma of the human female breast by fibronectin. *Virchows Archiv* 1985; 407: 465- 476.
51. Christensen L. Fibronectin, a discrimination marker between small invasive carcinomas and benign proliferative lesions of the breast. *APMIS* 1990; 98: 615-623
52. Christensen L. The distribution of fibronectin, laminin and tetranectin in human breast cancer with special attention to the extracellular matrix. *APMIS* 1992; 26: 100: 1-38
53. Cidado AJ. Interactions between fibronectin, glycosaminoglycans and native collagen fibrills: an EM study in artificial three-dimensional extracellular matrices. *Eur J Cell Biol* 1989; 48: 303-312.
54. Clavel-Chapelon F., Hill C. Hormone replacement therapy in menopause and risk of breast cancer. *Presse Med.* 2000 Oct 21; 29 (31): 1688-93



55. Coman DR. Decreased mutual adhesiveness, a property of cells from squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 1994; 4: 625-629.
56. Corvetti G, Cameron-Curry P, Sisto Daneo L, Martin R, Modica F. Immunohistochemical localization of fibronectin in structures of the human oral cavity, dental pulp and gingiva. *Arch D'Anat Microscop Morphol Exp* 1984; 4: 205-15.
57. Cosgrove, D., Samuelson, G., Meehan, D. T., Miller, C., McGee, J, Walsh, E., and Siegel, M. Ultrastructural, physiological, and molecular defects in the inner ear of a gene-knockout mouse model for autosomal Alport syndrome (1998) *Hearing Res.* 121, 84-98
58. Crouch EC, Stone KR, Bloch M, McDivitt RW. Heterogeneity in the production of collagen and fibronectin by morphologically distinct clones of a human tumor cell line. Evidence for intratumoral diversity in matrix protein biosynthesis. *Cancer Res* 1987; 47: 6086-6092.
59. Curran S, and Murray G.I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *J. Pathol.* 1999, 189: 300-308
60. D'Ardenne AJ, Burns J, Sykes BC, Bennett MK. Fibronectin and type III collagen in epithelial neoplasms of gastrointestinal tract and salivary gland. *J Clin Pathol* 1983a; 36: 756-63.
61. D'Ardenne AJ, Kirkpatrick P, Sykes BC. Distribution of laminin, fibronectin, and interstitial collagen type III in soft tissue tumors. *J Clin Pathol* 1984a; 37 : 895-904.
62. D'Ardenne AJ, Kirkpatrick P, Wells CA, Davies JD. Laminin and fibronectin in adenoid cystic carcinoma. *J Clin Pathol* 1986; 39: 138-44.
63. D'Ardenne AJ, McGee JOD. Fibronectin in disease. *J Pathol* 1984b; 142: 235-51.
64. Dean DC, Newby RF, Bourgeois S. Regulation of fibronectin biosynthesis by dexamethazone, transforming growth factor- β and cAMP in human cell lines. *J Cell Biol* 1988; 106: 2159-70.
65. DeClerck YA. Interactions between tumour cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *Eur J Cancer* 2000, 36, 1258-1268.
66. Denhartdt DT, Feng B, Edwards DR, Cocuzzi ET, Malyankar UM. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP, aka EPA): structure, control of expression and biological functions. *Pharmacol Ther* 1993; 59:329-341
67. Derynck R, Goeddel DV, Ullrich A, Gutterman JU, Williams RD, Bringman TS, Berger WH. Synthesis of messenger RNAs for Transforming growth factors alfa and beta and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer Res* 1987; 47: 707-12.
68. Duenne AA, Werner JA. Functional anatomy of lymphatic vessels under the aspect of tumor invasion. *Recent Results Cancer Res.* 2000;157:82-9
69. Duffy MJ, Brouillet J-P, Reilly D, McDermott E, O'Higgins N, Fennelly JJ, Maudelonde T and Rochefort H. Cathepsin D concentration in breast cancer cytosols: correlation with biochemical, histological, and clinical findings. *Clin Chem* 1991; 37: 101-104
70. Duffy MJ, Reilly D, Brouillet J-P, McDermott EWM, Faul C, O'Higgins N, Fennelly JJ, Maudelonde T and Rochefort H. Cathepsin D concentration in breast cancer cytosols: correlation with disease-free interval and overall survival. *Clin Chem* 1992; 38: 2114-2116
71. Dvorak HF, Dickersin GR, Dvorak AM, Manseau EJ, Pyne K. Human breast carcinoma: fibrin deposits and desmoplasia. Inflammatory cell type and distribution. Microvasculature and infarction. *J Natl Cancer Inst* 1981 Aug;67(2):335-45



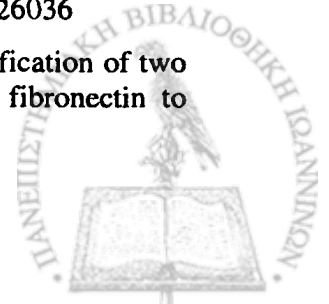
72. Elston CW, Ellis IO: Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long term follow up. *Histopathol* 1991, 19, 403-410.
73. Engels K, Fox SB, Harris AL. Angiogenesis as a biologic and prognostic indicator in human breast carcinoma. *EXS*. 1997;79:113-56
74. Erickson HP, Bourdon MA. Tenascin: an extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors. *Ann Rev Cell Biol* 1989; 5: 71-92
75. Erickson HP. Tenascin-C. Tenascin-R and tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 869-876
76. Eusebi V, Pich A, Macchiorlatti E, Bussolati G. Morpho-functional differentiation in lobular carcinoma of the breast. *Histopathology* 1977 Jul;1(4):301-14
77. Eyden B, Banerjee SS, Nesland JM. Amphicrine carcinoma of breast with giant granules: an immunohistochemical, histochemical and ultrastructural study. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2002 Jan;34(1):27-36
78. Eyden B, Tzaphlidou M. Structural variations of collagen in normal and pathological tissues: role of electron microscopy. *Micron* 2001 Apr;32(3):287-300
79. Eyden B, Yamazaki K, Menasce LP, Charchanti A, and Agnantis NJ. Basement-membrane-related peri-vascular matrices not organised as a basal lamina: distribution in malignant tumors and benign lesions. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol* 2000; 32: (4) 515-523.
80. Eyden B. 1996. 'Organelles in Tumor Diagnosis. An Ultrastructural Atlas'. Isaku-Shoin, New York, a [lamina] pp. 146-149; b [collagen and elastic fibres] pp. 160-167
81. Eyden B. Amorphous matrices in pathology: their definition and place in the spectrum of morphological variations in the vessel-stroma interface. (Re: Lugassy et al., 1998. Angio-tumoral laminin in murine tumors derived from human melanoma cell lines. Immunohistochemical and ultrastructural observations. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 30, 231-237) *J Submicrosc Cytol Pathol* 1999 Oct;31(4):585-7
82. Eyden B. Perivascular amorphous matrices containing laminin and type IV collagen not organised as a conventional basal lamina: identification by electron microscopy and implications for the control of the cell biological processes. *Ultrastruct. Pathol.* 1999a 23;355-357
83. Eyden B.. Amorphous matrices in pathology: their definition and place in the spectrum of morphological variations in the vessel-stroma interface. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 1999b; 31:, 585-587.
84. Eyden B. Electron microscopy in tumour diagnosis: continuing to complement other diagnostic techniques. *Histopathology* 1999 Aug;35(2):102-8
85. Eyden B. Perivascular amorphous matrices containing laminin and type IV collagen not organized as a conventional basal lamina: identification by electron microscopy and implications for the control of cell biological processes. *Ultrastruct Pathol* 1999 Sep-Oct;23(5):355-7
86. Eyden B. The myofibroblast: an assessment of controversial issues and a definition useful in diagnosis and research. *Ultrastruct Pathol* 2001 Jan-Feb;25(1):39-50
87. Faber M, Wewer UM, Berthelsen JG, Liotta LA, Albrechtsen R. Laminin production by human endometrial stromal cells relates to the cyclic and pathologic state of the endometrium. *Am J Pathol* 1986; 124: 384-398



88. Fergusson JE, Schoor AM, Howell A, Fergusson MW. Tensascin-C distribution in the normal breast is altered during the menstrual cycle and in carcinoma. *Differentiation* 1990, 42, 199-207.
89. Ferno M, Baldetorp B, Borg A et al. Cathepsin D, both a prognostic factor and a predictive factor for the effect of adjuvant tamoxifen in breast cancer. South Sweden Breast Cancer group. *Eur J Cancer* 1994; 30A: 2042-2048.
90. Foekens JA, Look MP, Bolt-de Vries J, Meijer-van Gelder M, van Putten WLJ, Klijn JGM. Cathepsin D in primary breast cancer: prognostic evaluation involving 2810 patients. *Br J Cancer* 1999; 79: 300-7
91. Foidart JM, Bere EW, Yaar M, Rennard SI, Gullino M, Martin GR, Katz SI. Distribution and immunoelectron microscopic localization of laminin, a noncollagenous basement membrane glycoprotein. *Lab Invest* 1980a; 42: 336-342
92. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* 1989, 82: 4-6
93. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:4-6
94. Forster SJ, Talbot IC, Clayton DG, Critchley DR. Tumour basement membrane laminin in adenocarcinoma of rectum: an immunohistochemical study of biological and clinical significance. *Int J Cancer* 1986; 37: 813-17
95. Forster SJ, Talbot IC, Critchley DR. Laminin and fibronectin in rectal adenocarcinoma: Relationship to tumour grade, stage and metastasis. *Br J Cancer* 1984; 50: 51-60.
96. Friedman R, Gelfand T, Weiss DW, Doljanski F. Patterns of fibronectin deposition in normal and neoplastic fibroblasts and mammary tissue. *Int J Tiss Reac* 1984; 6: 291-301.
97. Furcht LT. Structure and function of the adhesive glycoprotein fibronectin. *Cell* 1983; 54-117
98. Garsia D, Derocq D, Pujol P, Rochefort H. Overexpression of transfected cathepsin D in transformed cells increases their malignant phenotype and metastatic potency. *Oncogene* 1990; 5:1809-14
99. Gasparini G. Prognostic value of the vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist.* 2000;5 Suppl 1:37-44
100. Ghosh L. Ultrastructural study of myoepithelial cells in breast carcinoma. *J Surg Oncol* 1980;15(1):19-28
101. Gion M, Mione R, Dittadi R et al. Relationship between cathepsin D and other pathological and biological parameters in 1752 patients with primary breast cancer. *Eur J Cancer* 1995, 31A, 671-677.
102. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997; 74: 111-122.
103. Gorczyca W, Holm R, Nesland JM. Laminin production and fibronectin immunoreactivity in breast carcinomas. *Anticancer Res* 1993 Jul-Aug;13(4):851-8
104. Gould V, Kouloulis G and Virtanen I. Extracellular matrix proteins and their receptors in the normal, hyperplastic and neoplastic breast. *Cell Diff Dev* 1990, 32, 409-416.
105. Gould VE, Battifora H. Origin and significance of the basal lamina and some interstitial fibrillar components in epithelial neoplasms. *Pathol Annu* 1976;11:353-86



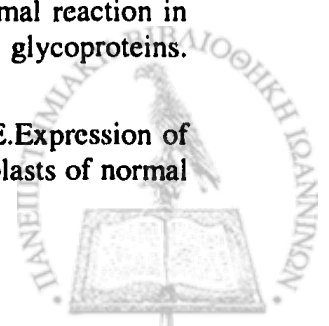
106. Gould VE, Miller J, Jao W. Ultrastructure of medullary, intraductal, tubular and adenocystic breast carcinomas: comparative patterns of myoepithelial differentiation and basal lamina deposition. *Am J Pathol* 1975 Mar;78(3):401-7
107. Grant, D. S., Tashiro, K., Segui-Real, B., Yamada, Y., Martin, G. R., and Kleinman, H. K. Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro (1989) *Cell*. 58, 933-943),
108. Haglund C, Roberts PJ, Nordling S, Ekblom P. Expression of laminin in pancreatic neoplasms and in chronic pancreatitis. *Am J Surg Pathol* 1984; 8: 669-76
109. Halter SA, Glick AD. Basement membrane changes in human breast tissue in explant culture: a morphometric and ultrastructural study. *Ultrastruct Pathol* 1983 Jan;4(1):23-34
110. Hanahan D and Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996, 86: 353-364
111. Hanamura N, Yoshida T, Matsumoto E, Kawarada Y, Sakakura T. Expression of fibronectin and tenascin-C mRNA by myofibroblasts, vascular cells and epithelial cells in human colon adenomas and carcinomas. *Int J Cancer* 1997; 73: 10-15.
112. Hand PH, Thor A, Schlom J, Rao CN, Liotta LA. Expression of laminin receptor in normal and carcinomatous human tissues as defined by a monoclonal antibody. *Cancer Res* 1985; 45: 2713-19
113. Hanna W, Kahn HJ. Ultrastructural and immunohistochemical characteristics of mucoepidermoid carcinoma of the breast. *Hum Pathol* 1985 Sep;16(9):941-6
114. Harris M, Ahmed A. The ultrastructure of tubular carcinoma of the breast *J Pathol* 1977 Oct;123(2):79-83.
115. Hassan MO, Olaizola MY. Ultrastructural observations on gynecomastia. *Arch Pathol Lab Med* 1979 Nov;103(12):624-30
116. Hayman EG, Engvall E, Rouslanti E. Concomitant loss of cell surface fibronectin and laminin from transformed rat kidney cells. *J Cell Biol* 1981; 88: 352-357
117. Hedin U, Bottger BA, Forsberg E, Johansson S, Thyberg J. Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1988; 107: 307-19.
118. Heimann R, Hellman S. Individual characterization of the metastatic capacity of human breast carcinoma. *Eur J Cancer*. 2000 Aug;36(13):1631-9
119. Hewitt RE, Powe DG, Morrell K, Balley E, Leach IH, Ellis IO, Turner DR. Laminin and collagen IV subunit distribution in normal and neoplastic tissues of colorectum and breast. *Br J Cancer* 1997;75(2):221-9
120. Howedy AA, Virtanen I, Laitinen L, Gould MS, Koukoulis GK, Gould VE. Differential distribution of tenascin in the normal, hyperplastic and neoplastic breast. *Lab Invest* 1990, 63, 798-806.
121. Hsu SM, Reine I, Fanger H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem* 1981;29:577-580.
122. Hudson, B. G., Reeders, S. T., and Tryggvason, K. Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 26033-26036
123. Humphries MJ, Komoriya A, Akiyama SK, Olden K, Yamada KM. Identification of two distinct regions of the type III connecting segment of human plasma fibronectin to promote cell type-specific adhesion. *J Biol Chem* 1987; 262: 6886-6892.



124. Humphries MJ, Obara M, Olden K, Yamada KM. Role of fibronectin in adhesion, migration, and metastasis. *Cancer Invest* 1989; 7: 373-93.
125. Hynes RO. Integrins, a family of cell surface receptors. *Cell* 1987; 48: 549-54.
126. Ignatz RA, Massague J. Cell adhesion protein receptors as targets for transforming growth factor- β action. *Cell* 1987; 51: 189-97.
127. Ingber, D. E., and Folkman, J. How does extracellular matrix control capillary morphogenesis? (1989) *Cell*. 58, 803-805
128. Ioachim E, Kamina S, Athanassiadou S, Agnantis NJ. Glycoprotein CD44 expression in human breast Cancer: An immunohistochemical study including correlation with Cathepsin D, Type IV Collagen, Laminin, Fibronectin, EGFR, c-erbB-2 Oncoprotein, p53, Steroid Receptor Status and proliferative indices. *The Breast J* 1997, 3, 112-119.
129. Ioachim E, Kamina S, Kontostolis M, Agnantis N.J. Immunohistochemical expression of cathepsin D in correlation with extracellular matrix component, steroid receptor status and proliferative indices in breast cancer. *Virchows Arch* 1997, 431, 311-316.
130. Ishihara A, Yoshida T, Tamaki H, Sakakura T. Tenascin-C expression in cancer cells and stroma of human breast cancer and its prognostic significance. *Clin Cancer Res* 1995, 1, 1035-1041.
131. Iskaros BF, Hu X, Sparano JA, Fineberg SA. Tenascin pattern of expression and established prognostic factors in invasive breast carcinoma. *J Surg Oncol* 1998, 68, 107-112.
132. Jahkola T, Toivonen T, Nordling S, von Smitten K, Virtanen I. Expression of tenascin-C in intraductal carcinoma of human breast: relationship to invasion. *Eur J Cancer* 1998, 34, 1687-1692.
133. Jahkola T, Toivonen T, Vitranen I, Von Smitten K, Nordling S, Von Boguslawskin K, Haglund C, Nevanlinna H, and C. Blomqvist. Tenascin-C expression in invasion border of early breast cancer: a predictor of local and distant recurrence. *British Journal of Cancer* 1998; 78 (11), 1507-1513
134. Jahkola T, Toivonen T, Von Smitten K, Blomqvist C, Vitranen I. Expression of tenascin in invasion border of early breast cancer correlates with higher risk of distant metastasis. *Int J Cancer (Pred Onol)* 1996; 69: 445-447
135. Jahkola T, Toivonen T, von Smitten K, Virtanen I, Wasenius VM, Blomqvist C. Cathepsin-D, urokinase plasminogen activator and type-1 plasminogen activator inhibitor in early breast cancer: an immunohistochemical study of prognostic value and relations to tenascin-C and other factors. *Br J Cancer* 1999, 80, 167-174.
136. Jahroudi N, Greenberger JS. The role of endothelial cells in tumor invasion and metastasis. *J Neurooncol.* 1995;23(2):99-108
137. Jao W, Lao IO, Chowdhury LN, Gould VE. Ultrastructural aspects of mucinous (colloid) breast carcinoma. *Diagn Gynecol Obstet* 1980 Summer;2(2):83-92
138. Joensuu H, Toikkanen S and Isola J. Stromal cell cathepsin D expression and long-term survival in breast cancer. *Br J Cancer* 1995; 71: 155-159
139. Joffe EBDK, Puricelli L, Mariotto R, Eijian AM, de Lusting ES. Fibronectin and laminin expression in breast cancer and lymph node metastases. Lack of correlation with fibronectin plasmatic levels. *Medicina* 1988; 48: 499-505.
140. Jones JL, Walker RA. Control of matrix metalloproteinase activity in cancer. *J Pathol* 1997; 183:377-379.



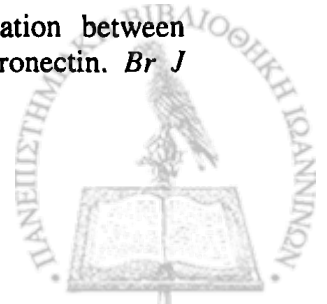
141. Jones PL, Cowan KN, and Rabinovitch M. Tenascin-C, proliferation and subendothelial fibronectin in progressive pulmonary vascular disease. *Am J Pathol* 1997; 150: 1349-1360.
142. Kao R, Wong M, Stern R. A hormone responsive collagenase of human breast carcinoma cells. *J Cell Biochem Suppl* 1982; 6: 163
143. Kiaer H, Nielsen B, Paulsen S, Sorensen IM, Dyreborg U, Blichert-Toft M. Adenomyoepithelial adenosis and low-grade malignant adenomyoepithelioma of the breast. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1984;405(1):55-67
144. Kim JP, Chen JD, Wilke MS, Shall TJ, Woodley DT. Human keratinocyte migration on type IV collagen. *Lab Invest* 1994, 71, 401-408.
145. Koochekpour S, Merzak A, Pilkington GJ. Extracellular matrix proteins inhibit proliferation, upregulate migration and induce morphological changes in human glioma cell lines. *Eur J Cancer* 1995, 31A, 375-380.
146. Kornblihtt AR, Gutman A. Molecular biology of the extracellular matrix proteins. *Biol Rev* 1988; 63: 465-507.
147. Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D. Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects. *Virchows Arch*. 1996 Dec;429(6):311-22
148. Koukoulis GK, Gould VE, Bhattacharyya A, Gould JE, Howedy AA, Virtanen I. Tenascin in normal, reactive, hyperplastic and neoplastic tissues: biologic and pathologic implications. *Hum Pathol* 1991, 22: 636-643.
149. Koukoulis GK, Howedy AA, Korhonen M, Virtanen I, Gould VE. Distribution of tenascin, cellular fibronectins and integrins in the normal hyperplastic and neoplastic breast. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1993, 25, 285-295.
150. Kramer RH, Rosen SD, McDonald KA. Basement-membrane components associated with the extracellular matrix of the lymph node. *Cell Tissue Res* 1988 May;252(2):367-75
151. Kühn, K. (1994) *Matrix Biol.* 14, 439-445
152. Kurisu K, Ohsaki Y, Nagata K, Kukita T, Yoshikawa H, Inai T. Immunoelectron microscopic localization of fibronectin in the smooth muscle layer of mouse small intestine. *J Histochem Cytochem* 1987; 35: 411-417.
153. Kurschat P, Mauch C. Mechanisms of metastasis. *Clin Exp Dermatol.* 2000 Sep;25(6): 482-9
154. Kute TE, Shao ZM, Sugg NK, Long RT, Russell GB, and Case LD. Cathepsin D as a prognostic indicator for node-negative breast cancer patients using both immunoassays and enzymatic assays. *Cancer Res* 1991; 52: 5198-5203
155. Labat-Robert J, Birembaut P, Adnet JJ, Mercantini F, Robert L. Loss of fibronectin in human breast cancer. *Cell Biol Int Rep* 1980; 4: 609-616.
156. Labat-Robert J, Birembaut P, Robert L Adnet JJ. Modification of fibronectin distribution pattern in solid human tumours. *Diagn Histopath* 1981; 4: 299-306.
157. Lafrenie R, Shaughnessy SG, Orr FW. Cancer cell interactions with injured or activated endothelium. *Cancer Metastasis Rev.* 1992 Nov;11(3-4):377-88
158. Lagace R, Grimaud JA, Schurch W, Seemayer TA. Myofibroblastic stromal reaction in carcinoma of the breast: variations of collagenous matrix and structural glycoproteins. *Virchows Arch (Pathol Anat)* 1984; 408: 49-59.
159. Lazard D, Sastre X, Frid MG, Glukhova MA, Thiery JP, Kotliansky VE. Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal



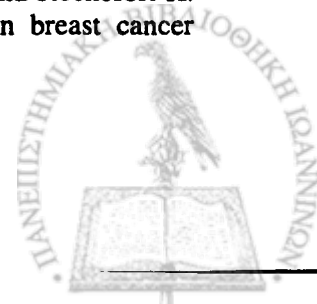
- and malignant human breast tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Feb 1;90(3):999-1003
160. Leco KJ, Hayden LJ, Sharma RR, et al. Differential regulation of TIMP-1 and TIMP-2 mRNA expression in normal and Ha-ras-transformed murine fibroblasts. *Gene* 1992; 117: 209-217.
161. Lesley J, Hyman R, Kincade PW. CD44 and its interaction with the cellular matrix. *Adv Immun* 1993, 54, 271-335.
162. Liaudet E, Derocq D, Rochefort H, Garsia M. Transfected cathepsin D stimulates high density cancer cell growth by inactivating growth inhibitors. *Cell Growth Diff* 1995; 6: 1045-52
163. Lightner VA, Marks JR, McCahren SS. Epithelial cells are an important source of tenascin in normal and malignant human breast tissue. *Exp Cell Res* 1994, 210, 177-184.
164. Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest* 1983; 49: 636-649
165. Liotta LA. Tumor invasion and metastasis - Role of the extracellular matrix. *Cancer Res* 1986; 46: 1-7
166. Loridon-Rosa B, Vielh P, Cuadrado C, Burtin P. Comparative distribution of fibronectin and vitronectin in human breast and colon carcinomas. An immunofluorescence study. *Am J Clin Pathol* 1988; 90: 7-16.
167. Lugassy C, Eyden BP, Christensen L, Escande JP. Angio-tumoral complex in human malignant melanoma characterised by free laminin: ultrastructural and immunohistochemical observations. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1997 Jan;29(1):19-28
168. Lund LR, Romer J, Thomasset N, Solberg H, Pyke C, Bissell MJ, Dano K and Werb Z. Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways *Development* 1996; 122: 181-193
169. MacCarthy JB, Basara ML, Palm SL, Sas DS, Furcht LT. The role of cell adhesion proteins - laminin and fibronectin - in the movement of malignant and metastatic cells. *Cancer Metast Rev* 1985; 4: 125-52.
170. Mackie EJ, Chiquet ER, Pearson CA, Inaguma Y, Taya K, Kawarada Y, and Takakura T. Tenascin is a stromal marker for epithelial malignancy in the mammary gland. *Proc. Nat. Acad Sci* 1987; 84: 4621-4625
171. Madri, J. A., Dreyer, B., Pitlick, F. A., and Furthmayr, H. The collagenous components of the subendothelium. Correlation of structure and function. (1980) *Lab. Invest.* 43, 303-315),
172. Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The basement membrane in pathology. *Lab Invest* 1983 Jun;48(6):656-77
173. Matrisian LM, Glaichenhaus N, Gesnel MC and Breathnach R. Epidermal growth factor and oncogenes induce transcription of the same cellular mRNA in rat fibroblasts. *EMBO J* 1985; 4: 1435-1440
174. McDonald JA, Quade BJ, Broekelmann TJ, LaChance R, Forsman K, Hasegawa E, Akiyama S. Fibronectin's cell adhesive domain and an amino-terminal matrix assembly domain participate in its assembly into fibroblast percellular matrix. *J Biol Chem* 1987; 262: 2957-67.
175. Melis M, Baiocchini A, Soda G, Bosco D. Tenascin expression in elastotic cuffs of invasive ductal carcinoma of the breast. *Pathol Res Pract* 1997, 193, 479-484.



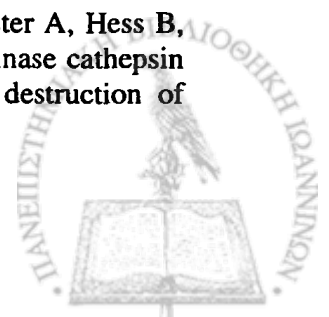
176. Meyer JR, Silverman Jr S, Daniels TE, Kramer RH, Greenspan JS. Distribution of fibronectin and laminin in oral leukoplakia and carcinoma. *J Oral Pathol* 1985; 14: 247-55.
177. Miner, J. H., and Sanes, J. Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen alpha 3(IV): implications for Alport syndrome. (1996) *J. Cell Biol.* 135, 1403-1413
178. Miner, J. H., and Sanes, J. R. Collagen IV alpha 3, alpha 4, and alpha 5 chains in rodent basal laminae: sequence, distribution, association with laminins, and developmental switches. (1994) *J. Cell Biol.* 127, 879-891
179. Moch H, Torhorst J, Durmuller U, Feichter GE, Sauter G, and Gudat F. Comparative analysis of the expression of tenascin and established prognostic factors in human breast cancer. *Pathol Res Pract* 1993; 189: 510-51
180. Morrison PR, Edsall JT, Miller SG. Preparation and properties of serum and plasma proteins XVIII. The separation of purified fibrinogen from fraction I of human plasma. *J Am Chem Soc* 1948; 70: 3103-08
181. Mosher, D. F. Physiology of fibronectin. *Ann Rev Med* 1984; 35: 561-75
182. Mosher, D. F., Sottile, J., Wu, C., and McDonald, J. A. Assembly of extracellular matrix. (1992) *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 810-818),
183. Muller D, Quantin B, Gesnel MC, Millon-Collard R, Abecassis J and Breathnach R. *Biochem J* The collagenase gene family in humans consists of at least four members. 1988; 253: 187-192
184. Nagai H, Isemura M, Arai H, Abe T, Shimoda S, Motomiya M, Sato H, Hasshimoto K, Takusagawa K, Konno K. Pattern of fibronectin distribution in human lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1986; 112: 1-5.
185. Nakano, S., Iyama, K., Ogawa, M., Yoshioka, H., Sado, Y., Oohashi, T., and Ninomiya, Y. Differential tissular expression and localization of type IV collagen alpha1(IV), alpha2(IV), alpha5(IV), and alpha6(IV) chains and their mRNA in normal breast and in benign and malignant breast tumors (1999) *Lab. Invest.* 79, 281-292
186. Namer M, Ramaioli A, Fontana X, Etienne M-C, Hery M, Jurlait A, Milano G, Frenay M, Francois E and Lapalus F. Prognostic value of total cathepsin D in breast tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1991; 19:85-93
187. Natali PG, Giacomini P, Bigotti G, Nicotra MR, Bellocchi M, Martino CD. Heterogenous distribution of actin, myosin, fibronectin and basement membrane antigens in primary and metastatic human breast cancer. *Virchows Arch* 1984; 405: 69-83.
188. Neri A, Ruoslahti E, Nicolson GL. Distribution of fibronectin on clonal cell lines of a rat mammary adenocarcinoma growing in vitro and in vivo at primary and metastatic sites. *Cancer Res* 1981; 41: 5082-95.
189. Nerlich AG, Wiest I, Wagner E, Sauer U, Schleicher ED. Gene expression and protein deposition of major basement membrane components and TGF-beta 1 in human breast cancer *Anticancer Res* 1997 Nov-Dec; 17(6D):4443-9.
190. Nielsen M, Christensen L, Albrechtsen R. The basement membrane component laminin in breast carcinomas and axillary lymph node metastases. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]* 1984, 91, 257.
191. Niemczuk P, Perkins RM, Talbot IC, Critchley DR. Lack of correlation between metastasis of human rectal carcinoma and the absence of stromal fibronectin. *Br J Cancer* 1982; 45: 500-505.



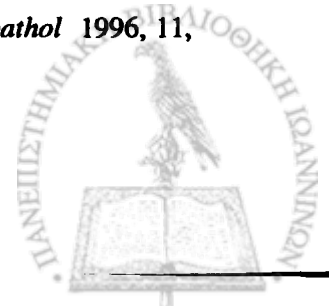
192. O'Donoghue AEMA, Poller DN, Bell JA, Galea MH, Elston CW, Blamey RW, and Ellis IO. Cathepsin D in primary breast carcinoma: adverse prognosis is associated with expression of cathepsin D in stromal cells. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 33: 137-145
193. O'Grady RL, Upfold LI, Stephens RW. Rat mammary carcinoma cells secrete active collagenase and active latent enzyme in the stroma via plasminogen activator. *Int J Cancer* 1981; 28: 509-15
194. Orr FW, Wang HH, Lafrenie RM, Scherbarth S, Nance DM. Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis. *J Pathol.* 2000 Feb;190(3):310-29
195. Ostrowski LE, Finch J, Krieg P, Matrisian L, Patskan G, O'Connell JF, Phillips J, Slaga TJ, Breathnach R and Bowden Gt. *Mol Carcinog* 1988; 1: 13-19
196. Owens RJ, Baralle FE. Exon structure of the collagen-binding domain of human fibronectin. *FEBS lett* 1986; 204: 318-22.
197. Paolo Viacana, Antonio G. Naccarato, Paola Collecchi, Sylvie Menard, Vincent Castranovo and Generoso Bevilacqua: The spectrum of 67-kD laminin receptor expression in breast carcinoma progression. *Journal of Pathology*, 1997; 182: 36-44
198. Pearlstein E, Hynes RO, Franks LM, Hemmings VJ. Surface proteins and fibrinolytic activity of cultured mammalian cells. *Cancer Res* 1976; 36: 1475-80.
199. Peissel, B., Geng, L., Kalluri, R., Kashtan, C., Rennke, H. G., Gallo, G. R., Yoshioka, K., Sun, M. J., Hudson, B. G., and Neilson, E. G. Comparative distribution of the alpha 1(IV), alpha 5(IV), and alpha 6(IV) collagen chains in normal human adult and fetal tissues and in kidneys from X-linked Alport syndrome patients. (1995) *J. Clin. Invest.* 96, 1948-1957
200. Persson I. Estrogens in the causation of breast, endometrial and ovarian cancers - evidence and hypotheses from epidemiological findings. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000 Nov 30; 74 (5): 357-64
201. Petersen TE, Thogersen HC, Skorstengaard K, Vibe-Pedersen K, Sahl P, Sottrup-Jensen L, Magnusson S. Partial primary structure of bovine plasma fibronectin. Three different types of intestinal homology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 137-41
202. Peyrol S, Raccurt M, Gerard F, Gleyzal C, Grimaud JA, Sommer P. Lysyl oxidase gene expression in the stromal reaction to in situ and invasive ductal breast carcinoma. *Am J Pathol* 1997 Feb;150(2):497-507
203. Piersbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 1984; 309: 30-33.
204. Pilch H, Schaffer U, Schlenger K, Lautz A, Tanner B, Hockel M, Knapstein PG. Expression of tenascin in human cervical cancer-association of tenascin expression with clinicopathological parameters. *Gynecol Oncol* 1999; 73: 415-421
205. Pratt, B. M., Form, D., and Madri, J. A. (1985) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 460, 274-288).
206. Pucci-Minafra I, Minafra S, Alessandro R, Faccini AM. An ultrastructural evaluation of cell heterogeneity in invasive ductal carcinomas of the human breast. II. An in vitro study. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1989 Jul;21(3):489-99
207. Pucci-Minafra I, Minafra S, Faccini AM, Alessandro R. An ultrastructural evaluation of cell heterogeneity in invasive ductal carcinomas of the human breast. I. An in vivo study. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1989 Jul;21(3):475-88
208. Pujol P, Maudelonde T, Dures J-P, Rouanet P, Brouillet J-P, Pujol H and Rochefort H. A prospective study of the prognostic value of cathepsin D levels in breast cancer cytosol. *Cancer* 1993; 71: 2006-2012



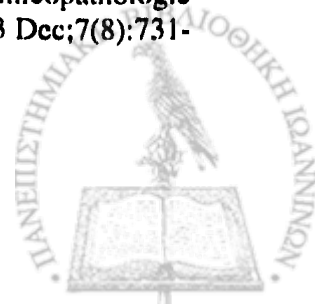
209. Quigley JP, Gold LI, Schwimmer R, Sullivan LM. Limited cleavage of cellular fibronectin by plasminogen activators purified from transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2776-80.
210. Raghov R, Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH. Transforming growth factor- β increases steady state levels of type I procollagen and fibronectin mRNAs posttranscriptionally in cultured human dermal fibroblasts. *J Clin Invest* 1987; 79: 1285-88.
211. Ravdin PM. Evaluation of cathepsin D as a prognostic factor in breast cancer. (review). *Breast Cancer Res Treat* 1993; 24: 219-226
212. Ries, A., Engel, J., Lustig, A., and Kühn, K. The function of the NC1 domains in type IV collagen (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 23790-23794
213. Rochefort H, Capony F, Garsia M, Cavailles V, Freiss G, Chambon M, Morisset M, Vignon F. Estrogen-induced lysosomal proteases secreted by breast cancer cells: A role in carcinogenesis? *J Cell Biochem* 1987; 35: 17-29
214. Rochefort H, Cavailles V, Augereau P, Capony F, Maudelonde T, Touitou I, Garsia M. Overexpression and hormonal regulation of pro-cathepsin D in mammary and endometrial cancer. *J Steroid Biochem* 1989; 34: 77-182
215. Rochefort H, Garsia M, Glondou M, Laurent V, Liaudet E, Rey J-M, Roger P. Cathepsin D in breast cancer: mechanisms and clinical applications, a 1999 overview. *Clinica Chimica Acta* 2000; 291:157-170
216. Rochefort H. Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer. *Acta Oncol* 1992, 31, 125-130.
217. Rochefort H. Cathepsin D in breast cancer: a tissue marker associated with metastasis. *Eur J Cancer* 1992; 28A:1780-3
218. Rochefort H. The prognostic value of cathepsin D in breast cancer. A long road to the clinic. (editorial). *Eur J Cancer* 1996; 32A:7-8
219. Ronnov-Jessen L, Van Deurs B, Nielsen M, Petersen OW. Identification, paracrine generation, and possible function of human breast carcinoma myofibroblasts in culture. *In Vitro Cell Dev Biol* 1992 Apr;28A(4):273-83
220. Rooney PH, Murray GI, Stevenson DAJ, Haites NE, Cassidy J, McLeod HL. Comparative genomic hybridisation and chromosomal instability in solid tumors. *Br J Cancer.* 1999; 80: 862-873.
221. Roskelley, C. D., Srebow, A., and Bissel, M. J. A hierarchy of ECM-mediated signalling regulates tissue-specific gene expression. (1995) *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 736-747
222. Ruoslahti E. Fibronectin in cell adhesion and invasion. *Cancer Metast Rev*, 1984; 3: 43-51
223. Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res* 1998;58: 5321-5325.
224. Ryska A. Angiogenesis in tumors. Part I. Its role in the determination of biological characteristics of tumors; factors controlling the onset and development of angiogenesis. *Cesk Pathol.* 2000 Jan;36(1):26-31
225. Saftig P, Hetman M, Schmahl W, Weber K, Heine L, Mossmann H, Koster A, Hess B, Evers M, Von Figura K, Peters C. Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. *EMBO J* 1995; 14: 3599-608.



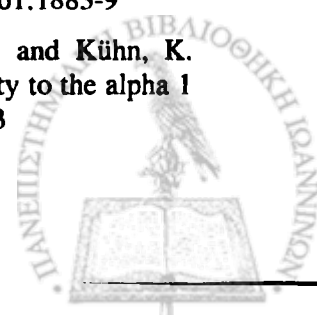
226. Sakakura T, Ishihara A and Yatani R. Tn-C in mammary gland development: from embryogenesis to carcinogenesis. *In Regulatory Mechanisms in Breast Cancer*, 1991;383-400
227. Sakakura T, Nishizuka Y, Dawe CJ. Mesenchyme-dependent morphogenesis and epithelium-specific cytodifferentiation in mouse mammary gland. *Science* 1976; 194: 1439-41.
228. Salonen EM, Saksela O, Vartio T, Vaheri A, Nielsen LS, Zeuthen J. Plasminogen and tissue type plasminogen activator bind to immobilized fibronectin. *J Biol Chem* 1985; 260: 1232-7.
229. Sappino AP, Skalli O, Jackson B, Schurch W, Gabbiani G. Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues. *Int J Cancer* 1988 May 15;41(5):707-12
230. Sato H, Seiki M. Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs) in tumor metastasis. *J Biochem* 1996; 119: 209-215.
231. Scarpa S, Morstyn G, Carney DN, Modesti A, Triche TJ. Small cell lung cancer cell lines: pure and variant types can be distinguished by their extracellular matrix synthesis. *Eur Respir J* 1988; 1: 639-644
232. Schalken JA, Ebeling SB, Isaacs JT, Treiger B, Bussemakers MJG, de Jong MEM, Van de Ven WJM. Down modulation of fibronectin messenger RNA in metastasizing rat prostatic cancer cells revealed by differential hybridization analysis. *Cancer Res* 1988; 48: 2042-46.
233. Schittny, J. C., and Yurchenko, P. D. Basement membranes: molecular organization and function in development and disease. (1989) *Curr. Opin. Cell Biol.* 1, 983-988).
234. Sczekan MM, Juliano RL. Protease resistance of the beta subunit of the hamster fibronectin receptor - Evidence for differential cleavage of membrane-bound and soluble receptor. *Eur J Biochem* 1990; 189: 83-89.
235. Shoji T, Kamiya T, Tsubura A et al. Tenascin staining positivity and the survival of patients with invasive breast carcinoma. *J Surg Res* 1993, 55, 295-297.
236. Shoji T, Kamiya T, Tsubura A, Hatano T, Sakakura T, Yamamoto M, Morii S. Immunohistochemical staining patterns of tenascin in invasive breast carcinomas. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1992; 421: 53-56
237. Shousha S, Bull TB, Burn I. Alveolar variant of invasive lobular carcinoma of the breast: an electron microscopic study. *Ultrastruct Pathol* 1986;10(4):311-9
238. Shousha S, Schoenfeld A, Moss J, Shore I, Sinnett HD. Light and electron microscopic study of an invasive cribriform carcinoma with extensive microcalcification developing in a breast with silicone augmentation. *Ultrastruct Pathol* 1994 Sep-Oct;18(5):519-23
239. Siebold, B., Qian, R. A., Glanville, R. W., Hofmann, H., Deutzmann, R., and Kühn, K. (1987) *Eur. J. Biochem.* 168, 569-575
240. Siegal GP, Barsky SH, Terranova VP, Liotta LA. Stages of neoplastic transformation of human breast tissue as monitored by dissolution of basement membrane components. *Invasion Metastasis* 1981, 1, 54-65.
241. Siri A, Carnemolla B, Saginati M, Leprini A, Casari G, Baralle F, Zardi L. Human tenascin: primary structure, premRNA splicing patterns and localization of the epitopes recognized by to monoclonal antibodies. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 525-531
242. Slater M. Dynamic interactions of the extracellular matrix. *Histol Histopathol* 1996, 11, 175-180.



243. Smith HS, Riggs JL, Mosesson MW. Production of fibronectin by human epithelial cells in culture. *Cancer Res* 1979; 38: 4138-44.
244. Sonnenberg A, Daams H, Van der Valk MA, Kilkens J, Hilgers J. Development of mouse mammary gland: Identification of stages in differentiation of luminal and myoepithelial cells using monoclonal antibodies and polyvalent antiserum against keratin. *J Histochem Cytochem* 1986; 34: 1037-46
245. Spring J, Beck K, and Chiquet-Ehrismann R. Two contrary functions of tenascin: Dissection of the active sites by recombinant tenascin fragments. *Cell* 1989; 59:325
246. Spyrtos F, Brouillet JP, Defrenne A, Hacene K, Rouesse J, Maudelonde T, Brunet M, Andrieu C, Desplaces A, Rochefort H. Cathepsin -D: an independent prognostic factor for metastasis of breast cancer. *Lancet* 1998; 8672: 1115-8
247. Stenback F, Risteli J, Risteli L et al., Basement membrane laminin and type IV collagen in endometrial adenocarcinoma: Relation to the differentiation and treatment. *Oncology* 1985; 42: 370-376.
248. Stenman S, Vaheri A. Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissues. *J Exp Med* 1981; 147: 1054-64.
249. Stenman SA, Vaheri A. Distribution of a major connective tissue protein, fibronectin, in normal human tissues. *J Exp Med* 1978; 147: 1054-64.
250. Stenman SA, Vaheri A. Fibronectin in human solid tumors. *Int J Cancer* 1981; 27: 427-35.
251. Sternlicht MD and Werb Z. Guidebook to the Extracellular Matrix and Adhesion Proteins. Kreis T and Vale R. *Oxford University Press: Oxford*, 1999; pp. 503-562
252. Stewart AJ, Piggot NH, May FEB, Westley BR. Mitogenic activity of procathepsin D purified for conditioned medium of breast cancer cells by affinity chromatography on pepstatinyl agarose. *Int J Cancer* 1994; 57: 715-8
253. Stoll BA. Alcohol intake and late-stage promotion of breast cancer. *Eur J Cancer*. 1999 Nov; 35(12): 1653-8
254. Stracke ML, Murata J, Aznavoorian S, Liotta LA. The role of the extracellular matrix in tumor cell metastasis. *in vivo* 8:49-58 (1994)
255. Stryer L. Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης 1994, Τόμος πρώτος
256. Sugeno A, Usada N, Adachi W, Oohashi M, Nagata T, Iida F. Immunohistochemical studies on the localization of fibronectin in human thyroid neoplastic tissues. *Endocrinol Japan* 1988; 35: 111-120.
257. Sugihara H, Hattori T, Fujita S, Fukuda M. Distribution of fibronectin and laminin in early and advanced signet-ring-cell carcinomas of the stomach. *Int J Cancer* 1989 Feb 15;43(2):263-9
258. Swindle CS, Tran KT, Johnson TD, Banerjee P, Mayes AM, Griffith L, Wells A. Epidermal growth factor (EGF)-like repeats of human tenascin-C as ligands for EGF receptor. *J Cell Biol* 2001, 23:154 (2), 459-468.
259. Tamimi SO, Ahmed A. Stromal changes in early invasive and non-invasive breast carcinoma: an ultrastructural study. *J Pathol* 1986 Sep;150(1):43-9
260. Tavassoli FA, Norris HJ. Microglandular adenosis of the breast. A clinicopathologic study of 11 cases with ultrastructural observations. *Am J Surg Pathol* 1983 Dec;7(8):731-7



261. Tempfer C, Losch A, Heinzl H et al. Prognostic value of immunohistochemically detected CD44 isoforms CD44v5, CD44v6 and CD44v7-8 in human breast cancer. *Eur J Cancer* 1996, 32A, 2023-2025.
262. Terranova VP, Hic S, Diflorio RM, Lyall RM. Tumor cell Metastasis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1986;5(2):87-114
263. Terranova VP, Liotta LA, Russo RG, Martin GR. Role of laminin in the attachment and metastasis of murine tumor cells. *Cancer Res* 1982;42: 2265-2269
264. Terranova VP, Rao CN, Kalebic T, Margulies IM, Liotta LA. Laminin receptor on human breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 444-48
265. Tetu B, Brisson J, Cote C, Brisson S, Potvin D and Roderge N. Prognostic significance of cathepsin D expression in node-positive breast carcinoma: an immunohistochemical study. *Int J Cancer* 1993; 55: 429-435
266. Thiery JP, Sastre-Garau X. Metastatic process. *Rev Prat.* 1995 Oct 1;45(15):1909-19
267. Thomas L, Byers HR, Vink J, Stamenkovic I. CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate. *J Cell Biol* 1992, 118, 971-977.
268. Thomasset N, Lochter A, Sympson CJ, Lund LR, Williams DR, Bechrendtsen O, Werb Z and Bissel MJ. *Am J Pathol* 1998; 153: 457-467
269. Thorgeirsson UP, Lindsay CK, Cottam DW, Gomez DE. Tumor invasion, proteolysis, and angiogenesis. *J Neurooncol.* 1994;18(2):89-103
270. Thorpe SM, Rochefort H, Garsia M, Freiss G, Christensen IJ, Khalaf S, Paolucci F, Pau B, Rasmussen BB and Rose C. Association between high concentrations of Mr 52,000 cathepsin D and poor prognosis in primary human breast cancer. *Cancer Res* 1989; 49: 6008-6014
271. Tiita O, Wahlstron T, Virtanen I, Gould VE. Tenascin in inflammatory conditions and neoplasm of the urinary bladder. *Virchows Archiv B Cell Pathol* 1993; 63: 283-287
272. Timpl, R. Structure and biological activity of basement membrane proteins (1989) *Eur. J. Biochem.* 180, 487-502)
273. Tokes AM, Hortovanyi E, Csordas G et al. Immunohistochemical localisation of tenascin in invasive ductal carcinoma of the breast. *Anticancer Res* 1999, 19(1A), 175-179.
274. Tolsma, S. S., Volpert, O. V., Good, D. J., Frazier, W. A., Polverini, P. J., and Bouck, N. J. Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. (1993) *Cell Biol.* 122, 497-511
275. Tremblay J, Frenette G, Tremblay RR, Dupont A, Thabet M, Dube JY. Excretion of three major prostatic secretory proteins in the urine of normal men and patients with benign prostatic hypertrophy or prostate cancer. *Prostate* 1987;10(3):235-43
276. Truck AB, Wilson SM, Khokha R, Chambers AF. Different patterns of gene expression in ras-resistant and ras-sensitive cells. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 485-491.
277. Tryggvason K, Hoyhtya M, Salo T. Proteolytic degradation of extracellular matrix in tumor invasion. *Biochim Biophys Acta* 1987; 907: 191-217.
278. Tsilibary, E. C., and Charonis, A. S. The role of the main noncollagenous domain (NC1) in type IV collagen self-assembly. (1986) *J. Cell Biol.* 103, 2467-2473
279. Turpeenniemi-Hujanen T, Thorgeirsson UP, Rao CN, Liotta LA. Laminin increases the release of type IV collagenase from malignant cells. *J Biol Chem* 1986; 261:1883-9
280. Vandenberg, P., Kern, A., Ries, A., Luckenbill-Edds, L., Mann, K., and Kühn, K. Characterization of a type IV collagen major cell binding site with affinity to the alpha 1 beta 1 and the alpha 2 beta 1 integrins (1991) *J. Cell Biol.* 113, 1475-1483



281. Varani J, Lovett EJ, McCoy JP, Shibata S, Maddox DE, Goldstein IJ, Wicha M. Differential expression of a lamininlike substance by high- and low-metastatic tumor cells. *Am J Pathol* 1983; 111: 27-34
282. Verhoeven D, Van Marck E. Proliferation, basement membrane changes, metastasis and vascularization patterns in human breast cancer. *Pathol Res Pract.* 1993 Sep;189(8):851-61
283. Verhoeven D, Van Marck E. Proliferation, basement membrane changes, metastasis and vascularization patterns in human breast cancer. *Pathol Res Pract.* 1999; Sep 189(8): 851-61
284. Viacana P, Naccarato AG, Collecchi P, Menard S, Castranovo V, and Bevilacqua G: The spectrum of 67-kD laminin receptor expression in breast carcinoma progression. *Journal of Pathology.* 1997;182: 36-44
285. Vignon F, Capony F, Chambon M, Freiss G, Garsia M, Rochefort H. Autocrine growth stimulation of the MCF7 breast cancer cells by the estrogen-regulated 52k protein. *Endocrinology* 1986; 118: 1537-45
286. Vollmer G. Biologic and oncologic implications of tenascin-C/hexabracion proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 1997, 25, 187-210.
287. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis- correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8
288. Wells CA, Ferguson DJ. Ultrastructural and immunocytochemical study of a case of invasive cribriform breast carcinoma. *J Clin Pathol* 1988 Jan;41(1):17-20
289. Wernert N. The multiple roles of tumor stroma. *Virchows Arch.* 1997; 430:433-443
290. Westley BR, and May FEB. Cathepsin D and breast cancer. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 15-24
291. Westley BR, Rochefort H. A secreted glycoprotein induced by estrogen in human breast cancer cell lines. *Cell* 1980; 20: 353-62
292. Wewer UM, Liotta LA, Jaye M, Eicca GA, Drohan WN, Claysmith AP, Rao CN, Wirth P, Coligan JE, Albrechtsen R, Mudry M, Sobel ME. Altered levels of laminin receptor mRNA in various human carcinoma cells that have different abilities to bind laminin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 7137-41
293. Wewer UM, Taraboletti G, Sobel ME, Albrechtsen R, Liotta LA. Role of laminin receptor in tumor cell migration. *Cancer Res* 1987; 47: 5691-98
294. Wilson KE, Langdon SP, Lessells AM, Miller WR. Expression of the extracellular matrix protein tenascin in malignant and benign ovarian tumors. *Br J Cancer* 1996; 74: 999-1004
295. Wiseman RA. Breast cancer hypothesis: a single cause for the majority of cases. *J Epidemiol Community Health.* 2000 Nov; 54(11): 851-8
296. Wojciech Gorczyca, Ruth Holm and Janh M. Nesland: Laminin production and fibronectin immunoreactivity in breast carcinomas. *Anticancer Res* 1993; 13: 851-858.
297. Yamada KM, Olden K. Fibronectins - adhesive glycoproteins on the cell surface and blood. *Nature* 1978; 275: 161-79.
298. Yoshida T, Ishihara A, Hirokawa Y, Kusakabe M and Sakakura T. Tenascin in breast cancer development - is epithelial tenascin a marker for poor prognosis. *Cancer Lett* 1995; 90: 65-73



299. Yoshida T, Matsumoto E-I, Hanamura N, Kalembeiyi I, Katsuta K, Ishihara A, Sakakura T. Co-expression of tenascin and fibronectin in epithelial and stromal cells of benign lesions and ductal carcinomas in the human breast. *J Pathol* 1997; 182: 421-428
300. Yurchenco, P. D., and O'Rear, J. J. Basal lamina assembly. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 674-681)
301. Zhou, J., Mochizuki, T., Smeets, H., Antignac, C., Laurila, P., de Paepe, A., Tryggvason, K., and Reeders, S. T. Deletion of the paired alpha 5(IV) and alpha 6(IV) collagen genes in inherited smooth muscle tumors (1993) *Science* 261, 1167-1169
302. Zirbes TK, Baldus SE, Moenig SP, Schmitz K, Thiele J, Holscher AH, Dienes HP. Tenascin expression in gastric cancer with special emphasis on the WHO-lauren-, and goseki-classifications. *Int J Mol Med* 1999; 4: 39-42

