

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200180



ΑΔ  
610  
ΠΑΠ : Α  
9003

4

385

ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΕΛΑΥ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΩΣΕΙΣ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΩΝ

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΩΝ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΩΝ  
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΕΩΝ





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ- ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**  
**ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ**  
Διευθυντής : Καθηγητής Ν.Ι. Αγνάντη

ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΟ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟ - ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
«Ο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ»  
ΚΕΝΤΡΟ ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ «Γ. ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ»

**« ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΑΚΑΤΑΤΑΞΕΩΝ ΚΑΙ  
ΚΛΙΝΙΚΟ-ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΩΝ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ  
ΣΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΟΥΣ »**

**Διδακτορική Διατριβή**

ΑΝΝΑ Δ. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ  
Βιοχημικός - MSc. Κλινική Φαρμακολογία

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2003



***‘Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμών του συγγραφέα.’***

N.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2.





**Ημερομηνία αίτησης :** 19.05.1999

**Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:** 14.10.1999

**Σύνθεση της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής**

Αγνάντη Νίκη Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων,  
Πρόεδρος Ιατρικού Τμήματος  
Επιβλέπουσα

Πανδής Νικόλαος Αναπληρωτής Καθηγητής  
Πανεπιστημίου Lund Σουηδίας  
Μέλος

Τζαβάρας Θεόδωρος Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας,  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων,  
Μέλος

**Ημερομηνία ορισμού του θέματος:** 21.10.1999

**Ημερομηνία κατάθεσης της διδακτορικής διατριβής:** 11.06.2003



Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής:

Καθ. κα Νίκη Άγναντη

Σύνθεση της Επταμελούς Επιτροπής

Άγναντη Νίκη

Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων,  
Πρόεδρος Ιατρικού Τμήματος  
Επιβλέπουσα

Παναγιώτης Καναβάρος

Καθηγητής Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων  
Μέλος

Τζαβάρας Θεόδωρος

Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας,  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων,  
Μέλος

Βασιλική Μαλάμου- Μήτση

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων,  
Μέλος

Δημήτριος Στεφάνου

Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής Ανατομικής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων,  
Μέλος

Μαρία Μπάη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων,  
Μέλος

Άννα Μπατισιάτου

Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων,  
Μέλος

Βαθμός με τον οποίο έγινε αποδεκτή η διατριβή:

ΑΡΙΣΤΑ



Small, gradual changes in causes give rise to small gradual  
changes in effects  
*John Casti 'Complexification'*



Στον Δημήτρη,

την Ελένη

και τον Γιώργο



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

---

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου σε γυναίκες 40 με 50 ετών. Στην Αμερική σήμερα είναι η δεύτερη αιτία θανάτου, ενώ στη χώρα μας η συχνότητα εμφάνισής του αυξάνει με γρήγορους ρυθμούς.

Η εμφάνιση του καρκίνου του μαστού και η εξέλιξη του συνδυάζεται στις περισσότερες περιπτώσεις με συσσωρευμένες γενετικές και επιγενετικές ανωμαλίες που έχουν κατά καιρούς προταθεί και πιθανώς να διαμορφώνουν το φαινότυπο του όγκου. Η εύρεση προγνωστικών δεικτών και θεραπευτικών στόχων έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητικών ομάδων, όμως η ταυτοποίηση των γονιδίων που συμμετέχουν στη διαδικασία της καρκινογένεσης και η διαλεύκανση των αντίστοιχων βιοχημικών οδών που εμπλέκονται δεν έχει ακόμα ολοκληρωθεί.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή φιλοδοξεί να ενισχύσει τα δεδομένα που σκιαγραφούν το γενετικό και βιολογικό προφίλ των όγκων του μαστού και να τα συνδέσει με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά τους.

Η εκπόνηση της διατριβής έγινε με τη συνεργασία των παρακάτω τμημάτων:

- Μορφολογικός – Κλινικοεργαστηριακός Τομέας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
- Τμήμα Γενετικής, Περιφερειακό Αντικαρκινικό Ογκολογικό Νοσοκομείο Αθηνών «ο Άγιος Σάββας»

Ολοκληρώνοντας αυτή την εργασία αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου σε όλους εκείνους που μου συμπαραστάθηκαν και με βοήθησαν να πραγματοποιήσω αυτήν την εργασία.

Θα ήθελα κατ'αρχήν να ευχαριστήσω την Πρόεδρο της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής κα Νίκη Αγνάντη, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής και Πρόεδρο της Ιατρικής Σχολής του Παν/μίου Ιωαννίνων, για την ανάθεση του θέματος και τις εποικοδομητικές συμβουλές της σε όλη τη διάρκεια της διατριβής. Από τους



πρωτοπόρους της μελέτης του καρκίνου του μαστού στη χώρα μας, με την ευρυμάθεια και την πλατύτητα αντίληψης που την διακρίνει, σε συνδυασμό με την κατανόηση και την ευγένειά της υπήρξε ενθαρρυντικός και ουσιαστικός παράγοντας για την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής. Οι διεθνούς επιπέδου δημοσιεύσεις της, τόσο στην παθολογοανατομική θεώρηση του καρκίνου του μαστού όσο και στη βιολογική θεώρηση αυτού, και οι προφορικές της υποδείξεις ήταν πολύτιμες σε όλη την πορεία της ερευνητικής αυτής εργασίας.

Τον επίκουρο Καθηγητή Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής Ιωαννίνων κο Θ. Τζαβάρα που με προθυμία και ευγένεια αποδέχθηκε να είναι το τρίτο μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής. Τον ευχαριστώ πολύ για τη συμπαράσταση, την εμπιστοσύνη του και τις γόνιμες υποδείξεις σχετικά με τη διατριβή.

Τον κο Ν. Πανδή, αναπληρωτή καθηγητή του Παν/ου της Lund, διευθυντή του Τμήματος Γενετικής του Ογκολογικού Νοσοκομείου «ο Άγιος Σάββας», που μου έδωσε τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω αυτή τη διατριβή στο εργαστήριο της Γενετικής. Επιλύοντας ουσιαστικά προβλήματα, όπως η εύρεση σωστά χαρακτηρισμένου πειραματικού υλικού για την εργασία μου, βοήθησε ώστε να ολοκληρωθεί η παρούσα εργασία χωρίς καμία χρονική καθυστέρηση. Με τη βαθιά κατανόηση του αντικειμένου της κυτταρογενετικής στον καρκίνο του μαστού και τη μεθοδικότητά του βοήθησε ουσιαστικά στην πραγματοποίηση της εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ. Θ. Τράγκα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης, ερευνήτρια στο τμήμα Γενετικής του κέντρου ογκολογικής έρευνας «Γ. Παπανικολάου», υπεύθυνη της Μοριακής Μονάδας, για τις ατελείωτες ώρες που ήταν δίπλα μου, ακούραστη, να δίνει ιδέες, να καθοδηγεί και να διορθώνει. Αισθάνομαι ιδιαίτερα τυχερή που συνεργάστηκα μαζί της, γιατί εκτός των γνώσεων που προσκόμησα, η ίδια αποτέλεσε για μένα ιδιαίτερα ουσιαστικό παράγοντα στη διαμόρφωση του τρόπου σκέψης μου στον τομέα της έρευνας και της συνεργατικότητας.

Την επικεφαλής της Κυτταρογενετικής Μονάδας του Τμήματος Γενετικής Αν. Καθ Γ. Μπάρδη για τις καίριες και εποικοδομητικές παρατηρήσεις στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων μου. Η επιστημονική της κατάρτιση σε συνδυασμό με την



οργανωτικότητα και το συνεχές και ειλικρινές ενδιαφέρον της για μένα ήταν καθοριστικός παράγοντας για την ολοκλήρωση της διατριβής. Την ευχαριστώ για τη δυνατότητα που μου έδωσε να συνεργαστούμε στα πλαίσια ενός προγράμματος ΠΕΝΕΔ, όπου η βοήθειά της ήταν ουσιαστική για την εκμάθηση, τόσο στο θεωρητικό όσο και στο πρακτικό μέρος, της τεχνικής του συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού.

Τη συνάδελφο και φίλη Δρ. Νέλλη Κούρτη, ερευνήτρια στο εργαστήριο Βιοχημείας του κέντρου Ογκολογικής Έρευνας «Γ. Παπανικολάου». Την ευχαριστώ θερμά για την υποστήριξη, την εμπιστοσύνη της και την προσοχή με την οποία μελέτησε το κείμενο της διατριβής. Η βοήθειά της υπήρξε ουσιαστική τόσο στο θεωρητικό όσο και στο τεχνικό μέρος της δουλειάς μου.

Στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής ουσιαστικής σημασίας ήταν η βοήθεια του καθηγητή Ογκολογικής Γενετικής στο Πανεπιστήμιο του Οσλο της Νορβηγίας Sverre Heim, ενός από τους θεμελιωτές της γενετικής του καρκίνου. Συνέβαλλε αποφαστικά προσφέροντας μας τα καταλληλα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την μελέτη και συνεισφέροντας στην συγγραφή των δημοσιεύσεων που προέκυψαν. Πολύτιμη ήταν και η συμβολή του καθηγητή της Ογκολογικής Γενετικής στο Πανεπιστήμιο του Πόρτο της Πορτογαλίας Manuel Teixeira τόσο στην πειραματική διαδικασία όσον και στην συγγραφή των δημοσιεύσεων.

Τον Δρ Χ. Τσιαπάλη, διευθυντή του εργαστηρίου Βιοχημείας του Ερευνητικού Τμήματος του Νοσοκομείου «ο Άγιος Σάββας» για την ηθική υποστήριξη και το συνάδελφο Δρ. Θ. Δημητριάδη για τις συμβουλές του και την καθοδήγηση από την πρώτη μέρα που έφτασα στο εργαστήριο. Τη Δρ. Μαρτίνα Σαμιωτάκη για την πολύτιμη βοήθειά της στην μετάφραση των παθολογοανατομικών εκθέσεων των ασθενών που προέρχονταν από τη Δανία. Την Αλεξάνδρα Παπακώστα τεχνολόγο του τμήματος για το συνεχές ενδιαφέρον της και τα καλά της λόγια, όπως και τους άλλους συναδέλφους του τμήματος την Χαρούλα Τσαρουχά, τη Δήμητρα Πάντου, τη Λουίζα Μαχαίρα και την Ελένη Ρίζου καθώς και τη γραμματέα του τμήματος κα Βασιλική Κουτσούγερα για τη διαρκή συμπαράστασή τους.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω φίλους και συγγενείς που μου συμπαραστάθηκαν με ιδιαίτερη αναφορά στους φίλους μου Αντώνη Γιαννόπαπα, για την απίστευτη υπομονή



του, τη Δέσποινα Ιακωβάκη, την Κατερίνα Βένερη, τον Αποστόλη Μπελμέζη και την Βάσω Θεοδώρου για το κουράγιο που μου έδιναν σε κάθε στιγμή αδυναμίας όπως και το Γιώργο Γιαννόπουλο που έλυνε πρόθυμα κάθε τεχνικό πρόβλημα του υπολογιστή μου! Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον αγαπημένο μου γιατρό Αν. Καθηγητή στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων κο Μίλτο Βασιλείου γιατί χωρίς εκείνον ίσως να μην είχα ξεκινήσει όλη τη ιστορία που διαβάζετε παρακάτω!

Αυτή τη διατριβή όμως την αφιερώνω στους γονείς μου και τον αδελφό μου για την ακούραστη ηθική υποστήριξή τους σ' αυτή την προσπάθειά μου, όπως πάντα άλλωστε. Είναι μια ευκαιρία να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για την πραγματοποίηση ενός στόχου που ξεκίνησε με το πτυχίο της Βιοχημείας στη Γαλλία, συνεχίστηκε με τις μεταπτυχιακές σπουδές και ολοκληρώνεται σήμερα μ' αυτή την εργασία. Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε σας τους τρεις που με διαβάζετε τώρα, γιατί χωρίς τη δικιά σας βοήθεια, δεν θα είχα φτάσει ως εδώ.

Σας ευχαριστώ όλους...





## Κατάλογος συμβολισμών και συντμήσεων

|         |  |
|---------|--|
| DCIS    | πορογενές καρκίνωμα <i>in situ</i> (ductal carcinoma)                |
| LCIS    | λοβιακό καρκίνωμα <i>in situ</i> (lobular carcinoma <i>in situ</i> ) |
| IDC     | ενδοπορογενές καρκίνωμα <i>in situ</i> (intraductal carcinoma)       |
| NOS     | πορογενή καρκινώματα μη ειδικού τύπου (non otherwise specified)      |
| CGH     | συγκριτικός γενωμικός υβριδισμός (comparative genomic hybridization) |
| amp     | ενισχυμένο σήμα ( <u>amplification</u> )                             |
| con     | παρακείμενα γειτνιάζοντα σήματα ( <u>connected signals</u> )         |
| dim     | μειωμένη ένταση σήματος ( <u>diminished signal intensity</u> )       |
| enh     | ενισχυμένη ένταση σήματος ( <u>enhanced signal intensity</u> )       |
| ish     | <i>in situ</i> υβριδισμός ( <u>hybridization</u> )                   |
| rev ish | ανάστροφος <i>in situ</i> υβριδισμός                                 |
| hsr     | ομογενώς χρωσμένη περιοχή ( <u>homogeneously staining region</u> )   |



# ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Σελίδα

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I.- Ο ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ – Η ΑΣΘΕΝΕΙΑ</b>                                | <b>1</b>  |
| I. 1. Επιδημιολογία  | 2         |
| I. 2. Ο ρόλος των κληρονομούμενων και περιβαλλοντικών παραγόντων             | 3         |
| <b>II. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΜΑΣΤΟΥ</b>                    | <b>8</b>  |
| II. 1 Ανάπτυξη   | 8         |
| II. 2. Ιστολογική εξέταση των τμημάτων του μαστού                            | 10        |
| <b>III.- ΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΙΑΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ</b>                               | <b>12</b> |
| III. 1. Διαταραχή των φυσιολογικών βιολογικών μηχανισμών                     | 12        |
| III. 1. α. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός  | 12        |
| - Ενδοκυτταρικοί διαβιβαστές   | 14        |
| - Μετα-μεταγραφική διαδικασία  | 14        |
| III. 1. β. Απόπτωση  | 16        |
| - Ατελεύτητος κυτταρικός πολλαπλασιασμός                                     | 17        |
| III. 1. γ. Διαφοροποίηση – Αγγειογένεση                                      | 18        |
| Διήθηση ιστών και μετάσταση  | 19        |
| III. 2. Κλινικοπαθολογικοί χαρακτήρες – Κλασσικοί προγνωστικοί δείκτες       | 21        |
| III. 2. α. Ρυθμός πολλαπλασιασμού  | 21        |
| III. 2. β. Ιστολογικός τύπος   | 22        |
| III. 2. γ. Βαθμός ιστολογικής κακοήθειας ή διαφοροποίησης                    | 23        |
| III. 2. δ. Μέγεθος του όγκου   | 24        |
| III. 2. ε. Υποδοχείς στεροειδικών ορμονών                                    | 24        |
| III. 2. στ. Διήθηση των λεμφαδένων   | 26        |
| III. 3. Μεταβόλές του γονιδιώματος – Ο καρκίνος του μαστού ως γενετική νόσος | 27        |
| III. 3. α. Ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια                          | 27        |
| III. 3. β. Μεθοδολογική προσέγγιση προσδιορισμού των γενετικών ανωμαλιών     | 30        |



|  |           |
|--|-----------|
| <b>IV. Η ΘΕΩΡΙΑ ΤΗΣ ΠΟΛΥΣΤΑΔΙΑΚΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΓΕΝΕΣΗΣ</b>                   | <b>34</b> |
| IV. α. Μοντέλα καρκινογένεσης  | 34        |
| IV. β. Υπάρχει μοντέλο καρκινογένεσης στον καρκίνο του μαστού;         | 36        |
| <b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b>                                 | <b>40</b> |
| <b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>   |           |
| <b>I. ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ</b>  | <b>43</b> |
| - Κλινικοπαθολογικά δεδομένα.  | 43        |
| <b>II. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA</b>   | <b>44</b> |
| 1. Η απομόνωση DNA από δείγματα παγωμένου ιστού                        | 44        |
| 2. Έλεγχος ποιότητας του DNA   | 44        |
| 3. Μέθοδοι ανάλυσης του εξαγόμενου DNA                                 | 45        |
| α. Συγκριτικός Γενωμικός Υβριδισμός                                    | 45        |
| β. Μελέτη έλλειψης ετεροζυγωτίας                                       | 46        |
| <b>III. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA</b>  | <b>47</b> |
| 1. Η απομόνωση του RNA από δείγματα παγωμένου ιστού                    | 47        |
| 2. Έλεγχος ποιότητας του RNA   | 48        |
| 3. Μέθοδοι ανάλυσης του εξαγόμενου RNA                                 | 48        |
| Α. Παρασκευή cDNA  | 48        |
| Β. Μελέτη μεταγραφικού δυναμικού του γονιδίου RhoC                     | 48        |
| <b>IV. ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ</b> | <b>49</b> |
| 1. Η μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνών                                | 49        |
| 2. Μέθοδοι εξέτασης συστατικών του κυτταρικού εκχυλίσματος             | 50        |
| α) Μέτρηση σχετικής ενεργότητας της τελομεράσης                        | 50        |
| β) Ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης PCNA                          | 51        |
| γ) Ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης c-erbB2/c-neu                 | 52        |
| δ) Μέτρηση της ειδικής ενεργότητας του ενζύμου Πολύ(A) πολυμεραση      | 52        |
| ε) Μελέτη της πρωτεΐνης FHIT με Western blot                           | 54        |
| <b>V. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ</b>   | <b>56</b> |
| <b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>  |           |
| <b>I. ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ ΟΓΚΟΙ</b>  | <b>57</b> |
| α. Περιγραφή του Δείγματος   | 57        |
| β. Μελέτη γενετικών ανωμαλιών σε σχέση με τις κλινικοπαθολογικές       |           |



|   |     |
|---|-----|
| παραμέτρους και τους βιολογικούς μηχανισμούς.   | 58  |
| 1. Γενετική πολυπλοκότητα και κλινικοπαθολογικοί χαρακτήρες                                 | 60  |
| 2. Γενετική πολυπλοκότητα και βιολογικές παράμετροι.  | 61  |
| 3. Γενετικό προφίλ των όγκων.   | 62  |
| α. Γενετικές ανωμαλίες και κλινικοπαθολογικοί χαρακτήρες                                    | 62  |
| β. Γενετικές ανωμαλίες και βιολογικές παράμετροι  | 66  |
| γ. Συσχετίσεις βιολογικών παραμέτρων με τους κλινικοπαθολογικούς παράγοντες και μεταξύ τους | 68  |
| 1. Βιολογικές παράμετροι και κλινικοπαθολογικοί χαρακτήρες                                  | 68  |
| 2. Συσχετίσεις Βιολογικών παραμέτρων μεταξύ τους  | 69  |
| δ. Πολυεστιακότητα  | 69  |
| <b>II. ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ</b>  | 70  |
| <b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>   | 72  |
| <b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΕΛΛΗΝΙΚΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>  | 98  |
| <b>ABSTRACT</b>   | 105 |
| <b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>   | 108 |
| <b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ</b>  |     |
| 1. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I: πίνακες   |     |
| 2. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II: Διαγράμματα  |     |
| 3. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III: Σχήματα και εικόνες   |     |



# ΕΙΣΑΓΩΓΗ



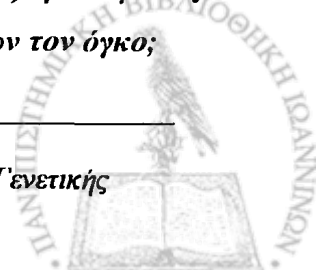
## ***I.- Ο καρκίνος του μαστού – Η ασθένεια***

---

---

Ο καρκίνος του μαστού είναι σήμερα η συχνότερη νεοπλασματική ασθένεια στις γυναίκες. 182.800 περιστατικά αναφέρονται ετησίως στις Η.Π.Α. (1) και παρά την έγκαιρη διάγνωση και καλύτερη θεραπεία που προσφέρονται, χάρη στην προηγμένη τεχνολογία, 15% των γυναικών που πάσχουν θα πεθάνουν τελικά από την ασθένεια αυτή (1). Σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί και στον προσδιορισμό των κρίσιμων σημείων του κυτταρικού κύκλου που 'ευθύνονται' για την εμφάνιση και τη μετέπειτα εξέλιξη του όγκου. Όμως, οι ειδικοί βιοχημικοί και μοριακοί μηχανισμοί που υπεισέρχονται σε πολλά από τα στάδια της καρκινογένεσης δεν έχουν ακόμη πλήρως διευκρινιστεί.

Είναι γενικά παραδεκτό, ότι η κακοήθης εξαλλαγή συνδέεται με *γενετικές και επιγενετικές αλλαγές* που απορυθμίζουν βιολογικούς μηχανισμούς και οδηγούν σε ατελεύτητο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και/ή μη φυσιολογικό κυτταρικό θάνατο ή απόπτωση (2,3). Αυτές οι γενετικές ανωμαλίες, άλλες κληρονομούμενες και άλλες επίκτητες, συνδέονται με την καρκινογένεση και αφορούν την ενεργοποίηση των *πρωτοογκογονιδίων* και την αδρανοποίηση των *ογκοκατασταλτικών γονιδίων*. Εκτός από τις κληρονομούμενες μεταλλάξεις, που αφορούν ένα μικρό ποσοστό των γενετικών ανωμαλιών, οι υπόλοιπες - επίκτητες - φαίνεται να επηρεάζονται από φυσικούς (π.χ. ακτινοβολία), χημικούς (π.χ. καρκινογόνα) και βιολογικούς (π.χ. ιοί) περιβαλλοντικούς παράγοντες (4). Για περίπτωση του καρκίνου του μαστού δεν έχει δοθεί μέχρι σήμερα ένα ικανοποιητικό μοντέλο για την εξέλιξη της νόσου, όπως συμβαίνει στην περίπτωση του καρκίνου του εντέρου. Το βασικό ερώτημα που παραμένει, όσο αφορά τον καρκίνο του μαστού, είναι *πόσες και ποιες γενετικές αλλαγές επιτρέπουν την προώθηση της κυτταρικής εξαλλαγής με αποτέλεσμα τον καρκινικό φαινότυπο. Υπάρχει ποσοτική ή/και ποιοτική συσχέτιση μεταξύ γενετικών ανακατατάξεων και κλινικοπαθολογικών παραμέτρων (όπως ιστοπαθολογικός τύπος, στάδιο της νόσου κ.λ.π.) ή/και μεταξύ γενετικών ανακατατάξεων και βιολογικών δεικτών που χαρακτηρίζουν τον όγκο;*



## 1. 1. Επιδημιολογία

Ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο συνηθισμένη μορφή κακοήθους νεοπλασματος στις γυναίκες των ανεπτυγμένων χωρών αγγίζοντας το 26-30% όλων των τύπων καρκίνου (1,4,5,6). Όγκοι μαστού είχαν περιγραφεί ήδη από τους Αιγύπτιους χιλιάδες χρόνια π.Χ.. Είναι όμως ο Ιπποκράτης και στη συνέχεια ο Γαλληνός που τους περιγράφουν και ασχολούνται με την αιτιολογία, πρόγνωση και θεραπεία τους (7). Στα τέλη του 17ου αιώνα ο Henri Francois Le Drog περιγράφει το καρκίνωμα του μαστού σαν εντοπισμένη νόσο στα αρχικά της στάδια με δυνατότητα όμως μετάστασης μέσω της λεμφικής οδού, πράγμα που θεωρούσε στοιχείο κακής πρόγνωσης.

Οι πιο σημαντικές όμως παρατηρήσεις που χαρακτηρίζουν τον καρκίνο του μαστού σαν ξεχωριστό τύπο όγκου γίνονται στα τέλη του 19ου αιώνα, όταν σχετίζεται ο καρκίνος του μαστού με τη λειτουργία των ωθηκών. Το 1889 ο Albert Schinzer προτείνει τη χρήση της ωθηκεκτομής πριν τη μαστεκτομή, βασιζόμενος στην εκτίμηση ότι η μετεμμηνοπαυσιακή μορφή της νόσου είχε καλύτερη πρόγνωση από ότι η προεμμηνοπαυσιακή (7). Αυτές οι πρώιμες παρατηρήσεις πάνω στην αλληλεπίδραση ωθηκών – μαστού εξακολουθούν και σήμερα να αποτελούν ένα από τα βασικά στοιχεία πάνω στα οποία αναπτύσσεται η διάγνωση, πρόγνωση, πρόληψη και θεραπεία του καρκίνου του μαστού.

Η συχνότητα της νόσου αυξάνεται στις ανεπτυγμένες, αλλά και τις υπανάπτυκτες χώρες (1,6). Στις Η.Π.Α. για παράδειγμα, η συχνότητα αυξάνεται με ποσοστά 1-2% κάθε χρόνο από το 1960, ενώ αντίστοιχα ποσοστά ισχύουν και για τις περισσότερες χώρες της Ευρώπης (1,6). Στην Ιαπωνία, που είχε και εξακολουθεί να έχει χαμηλά ποσοστά καρκίνου του μαστού, η συχνότητα της νόσου σε γυναίκες ηλικίας 35-44 χρονών διπλασιάστηκε από το 1960 ως το 1985 (8). Στατιστικές μελέτες για τις τελευταίες δύο δεκαετίες, δείχνουν ότι υπάρχει μία μείωση της θνησιμότητας από καρκίνο του μαστού σε γυναίκες νεότερες των 65 χρόνων, αλλά και παράλληλη αύξηση για τις γυναίκες μεγαλύτερες των 65, σε χώρες όπως οι Η.Π.Α., ο Καναδάς, η Αυστρία, η Γερμανία, η Σουηδία και το Ηνωμένο Βασίλειο (9-15). Τέτοιες τάσεις δεν παρουσιάζονται σε χώρες όπως η Ελλάδα, η Ουγγαρία, η Ιταλία, η Πολωνία (16-19).



## ***1.2. Ο ρόλος των κληρονομούμενων και περιβαλλοντικών παραγόντων***

Οι διαφορετικές συχνότητες εμφάνισης καρκίνου του μαστού σχετίζονται σ' ένα βαθμό με την παρουσία ή την απουσία ορισμένων καλά τεκμηριωμένων παραγόντων κινδύνου όπως:

★ **φύλο.** Ο καρκίνος του μαστού παρουσιάζει 100-200 φορές μεγαλύτερη συχνότητα στις γυναίκες παρά στους άντρες (20,21).

★ **ηλικία.** Ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού αυξάνει δραματικά με την ηλικία (22).

★ **κοινωνικο-οικονομική κατάσταση.** Ο καρκίνος του μαστού παρουσιάζεται ιδιαίτερα αυξημένος σε γυναίκες με υψηλότερο οικονομικό και μορφωτικό επίπεδο και φαίνεται να σχετίζεται με τον τρόπο ζωής (διατροφή, ηλικία πρώτης εγκυμοσύνης, χρήση εξωγενών ορμονών και κατανάλωση αλκοόλ) (23,24,25).

★ **εθνικότητα.** Ομάδες διαφορετικών εθνικοτήτων εμφανίζουν διαφορετικές συχνότητες καρκίνου του μαστού. Ομάδες των περιοχών της Ασίας έχουν πολύ μικρότερη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού από γυναίκες της Βόρειας Ευρώπης. Μελέτες υποστηρίζουν ότι Εβραίες γυναίκες, κυρίως όσες έχουν οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού, έχουν τέσσερις φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού από άλλες ομάδες (26). Μελέτες σε πληθυσμούς που μεταναστεύουν δείχνουν, ότι όταν ομάδες χαμηλού κινδύνου (όπως οι Κινέζοι) μετακινούνται προς περιοχές υψηλού κινδύνου (όπως η Χαβάι), η συχνότητα καρκίνου του μαστού αυξάνεται γρήγορα, προσεγγίζοντας τη συχνότητα των ενδημικών πληθυσμών μετά από μία ή δύο γενιές (27).

★ **Οικογενειακό ιστορικό / γενετική.** Η παρουσία οικογενειακού ιστορικού είναι γνωστό πως αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα προδιάθεσης για τον καρκίνο του μαστού (28). Το γεγονός ότι ένα οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού είναι ο κυριότερος παράγοντας κινδύνου για την ασθένεια αυτή δηλώνει την αιτιατή σχέση της ασθένειας με τους γενετικούς παράγοντες. Παρ' ότι το 1/3 των γυναικών με καρκίνο του μαστού εμφανίζεται να έχει οικογενειακό ιστορικό, με έναν ή και περισσότερους συγγενείς πρώτου βαθμού με καρκίνο του μαστού, το ποσοστό των κρουσμάτων που



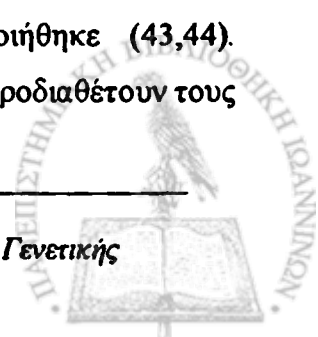


σχετίζονται με γενετικά τεκμηριωμένη κληρονομούμενη προδιάθεση είναι μόλις 4-9% του συνολικού αριθμού των κρουσμάτων (29-31). Με βάση τα μέχρι σήμερα δεδομένα φαίνεται ότι η ασθένεια μεταβιβάζεται ως αυτοσωμικό επικρατές χαρακτηριστικό με υψηλή διεισδυτικότητα (31). Άτομα με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού, ιστορικό καρκίνου του μαστού και ωοθηκών, ή/και ιστορικό εμφάνισης καρκίνου σε νεαρή ηλικία, ή/και αμφοτερόπλευρου καρκίνου του μαστού (28) παρουσιάζουν υψηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε σχέση με άτομα χωρίς τα παραπάνω χαρακτηριστικά (22, 23, 28, 32-34).

Δύο σημαντικά γονίδια που προδιαθέτουν για κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού, τα *BRCA1* και *BRCA2*, έχουν ως σήμερα ταυτοποιηθεί, αλλά αναμένονται και άλλα, αφού τουλάχιστον στο ένα τρίτο των περιπτώσεων οικογενούς καρκίνου δεν έχει ακόμη εντοπιστεί κάποιο γονίδιο προδιάθεσης (35). Μελέτες έλλειψης ετεροζυγωτίας και ανάλυση σύνδεσης (linkage analysis) παρείχαν κάποιες ενδείξεις για την παρουσία ενός τρίτου γονιδίου προδιάθεσης για καρκίνο του μαστού στη θέση 8p (8p12p22) (36,37), ενώ μελέτες των δύο τελευταίων ετών εντοπίζουν το γονίδιο αυτό στη θέση 13q21 (38,39).

Η εντόπιση του γονιδίου *BRCA1* στη θέση 17q21 έγινε με ανάλυση σύνδεσης (40) και στη συνέχεια το γονίδιο ταυτοποιήθηκε με positional cloning (41). Ένας μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων έχουν αναφερθεί (42), οι περισσότερες από τις οποίες συνεπάγονται μείωση του μήκους της πολυπεπτιδικής αλυσίδας ή απουσία της πρωτεΐνης *BRCA1*. Μεταλλάξεις του γονιδίου *BRCA1* έχουν βρεθεί στο 80-90% των οικογενειών με κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού-ωοθήκης. Η μεγαλύτερη πλειοψηφία των μεταλλάξεων του *BRCA1* βρίσκεται σε άτομα μετρίου ως υψηλού κινδύνου. Τα χαρακτηριστικά των καρκίνων του μαστού που συνδέονται με μεταλλάξεις αυτού του γονιδίου είναι η μικρή ηλικία εμφάνισης, ο υψηλός ρυθμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού, το υψηλό ποσοστό όγκων με αρνητικούς υποδοχείς στεροειδών και το μεγαλύτερο ποσοστό διήθησης στους λεμφαδένες σε σχέση με τους σποραδικούς καρκίνους (41).

Ένα δεύτερο γονίδιο προδιάθεσης στον καρκίνο του μαστού, το *BRCA2*, χαρτογραφήθηκε στη θέση 13q12q13 και αργότερα κλωνοποιήθηκε (43,44). Μεταλλάξεις αυτού του γονιδίου στα κύτταρα της γεννητικής σειράς προδιαθέτουν τους



φορείς κυρίως για καρκίνο του μαστού και σε μικρότερο βαθμό για καρκίνο της ωοθήκης. Αυτό το γονίδιο φαίνεται να ενέχεται στο 40-45% των οικογενειών με κληρονομούμενο site-specific καρκίνο του μαστού, συμπεριλαμβανομένων των περισσότερων οικογενειών με περιπτώσεις ανδρικού καρκίνου του μαστού (43,45,46). Το γονίδιο *BRCA2* σχετίζεται με χαμηλή μιτωβρίθεια και υψηλότερο βαθμό παρουσίας σωληνίσκων από τους σποραδικούς καρκίνους (45). Χαρακτηριστικές μεταλλάξεις αυτών των γονιδίων έχουν εντοπιστεί στους Εβραίους της φυλής Ashkenazi (43). Στον ελληνικό πληθυσμό η πιο χαρακτηριστική μετάλλαξη αναφέρεται η 5382insC για το γονίδιο *BRCA1*, ενώ καινούριες μεταλλάξεις έχουν βρεθεί και για τα δύο γονίδια *BRCA1* και *BRCA2* (47,48,49).

**★ενδοκρινείς και αναπαραγωγικοί παράγοντες.** Πολλές μελέτες έχουν δείξει μία στενή σχέση μεταξύ των γυναικείων ορμονών, των οιστρογόνων, και της εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Η αφαίρεση των ωοθηκών μειώνει δραματικά τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (35). Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει επανειλημμένα ότι η όψιμη εμμηνόπαυση (μετά τα 55) (50), η πρόωμη εμμηναρχή (51), η ατεκνία και η μεγάλη ηλικία (>35) τής πρώτης εγκυμοσύνης (52) επηρεάζουν και είναι στενά συνδεδεμένες με την εμφάνιση καρκίνου του μαστού (21,52,53). Αμφισβητούμενος παράγοντας κινδύνου είναι η γαλουχία (21).

**★εξωγενείς ορμόνες.** Από τους εξωγενείς ορμονικούς παράγοντες έχει μελετηθεί εκτεταμένα η πιθανότητα συμβολής των αντισυλληπτικών φαρμάκων στην αύξηση του κινδύνου εμφάνισης της νόσου (25,55-60). Τα πρόσφατα στοιχεία, σε αντίθεση με παλαιότερες έρευνες, καταγράφουν ένα υψηλότερο κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου του μαστού σε γυναίκες που έκαναν μακροχρόνια λήψη ορμονών από τον πρώτο τοκετό (61,62).

**★περιβαλλοντικοί παράγοντες, παχυσαρκία και διαίτα.** Το γεγονός ότι σε πληθυσμούς που μεταναστεύουν από περιοχές χαμηλού κινδύνου προς περιοχές υψηλού κινδύνου η συχνότητα καρκίνου του μαστού αυξάνεται γρήγορα, προσεγγίζοντας τη συχνότητα των ενδημικών πληθυσμών μετά από μία ή δύο γενιές (27) δείχνει ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση καρκίνου του μαστού. Οι περισσότεροι παράγοντες κινδύνου αυτής της κατηγορίας στηρίζονται κυρίως



στις διατροφικές διαφορές μεταξύ των ομάδων υψηλού και χαμηλού κινδύνου (20,21,22,27,35,63,64,65).

**★έκθεση σε ακτινοβολία.** Η έκθεση στην ιονίζουσα ακτινοβολία είναι ένας γνωστός παράγοντας κινδύνου για τον καρκίνο του μαστού. Επιζήσαντες ατομικής βόμβας και ασθενείς (όπως εκείνοι που πάσχουν από τη νόσο του Hodgkin) που δέχθηκαν ακτινοβολία παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα καρκίνου του μαστού (35,66,67,68). Όμως, ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου μετά από συνήθεις ραδιολογικές εξετάσεις είναι ελάχιστος, και όπως φαίνεται οι ακτινολόγοι δεν παρουσιάζουν αυξημένες πιθανότητες για καρκίνο του μαστού (69).

**★καλοήθειες νόσοι του μαστού.** Οι καλοήθειες νόσοι του μαστού αντιπροσωπεύουν περίπου το 65% όλων των νοσημάτων του μαστού με πιο συχνή την ινοκυστική μαστοπάθεια (70). Η ινοκυστική μαστοπάθεια περιγράφει μια ποικιλία καλοήθων νοσημάτων του μαστού και η σχέση της με τον καρκίνο του μαστού έχει συζητηθεί επί χρόνια (71). Μελέτες δείχνουν ότι η παρουσία καλοήθων νόσων στο μαστό συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου (35,71,72,73). Σήμερα γίνεται δεκτό ότι η επιθηλίωση των πόρων (υπερπλασία) χωρίς να συνοδεύεται από ατυπία αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου κατά 1,9 φορές. Στην περίπτωση εμφάνισης άτυπης υπερπλασίας ο κίνδυνος αυξάνεται κατά 5,3 φορές και σε άτομα με οικογενειακό ιστορικό αυξάνεται κατά 11 φορές (72,74). Παρόλα αυτά οι περισσότερες από τις καλοήθειες νόσους δε δίνουν στατιστικά σημαντική αύξηση του κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου.

**★συνδυασμός παραγόντων.** Παρόλο που οι προαναφερθέντες παράγοντες έχουν ανεξάρτητη επίδραση στην εμφάνιση της νόσου, τα αποτελέσματα της αλληλεπίδρασης μεταξύ τους χρειάζονται περισσότερη μελέτη. Διάφορα μοντέλα στατιστικής ανάλυσης έχουν αναφερθεί προκειμένου να σχεδιαστεί ένα πολυπαραγοντικό σύστημα μελέτης που θα συμπεριλαμβάνει πολλούς παράγοντες κινδύνου (75-81). Παρά τη συνεχιζόμενη έρευνα, ο ακριβής ρόλος και η συμβολή όλων των προδιαθεσιακών παραγόντων στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού δεν έχει αξιολογηθεί σε βαθμό που θα επέτρεπε μια συστηματική και επιλεγμένη πρόληψη. Η πλειοψηφία των γυναικών εκτίθεται σε ένα συνδυασμό παραγόντων που άλλοι είναι επιβαρυντικοί και άλλοι προστατευτικοί. Ταυτόχρονα η συμβολή των επιβαρυντικών παραγόντων δεν είναι γνωστό αν δρα

αθροιστικά ή πολλαπλασιαστικά. Ένα άλλο στοιχείο είναι πως μια σειρά παράγοντες εμφανίζονται σαν επιβαρυντικοί για μια ομάδα γυναικών, ενώ για άλλες όχι, και επιπλέον ο ρόλος τους μεταβάλλεται στις διάφορες ηλικίες (77,81).



## II. Ανάπτυξη και ιστολογία του φυσιολογικού μαστού

---

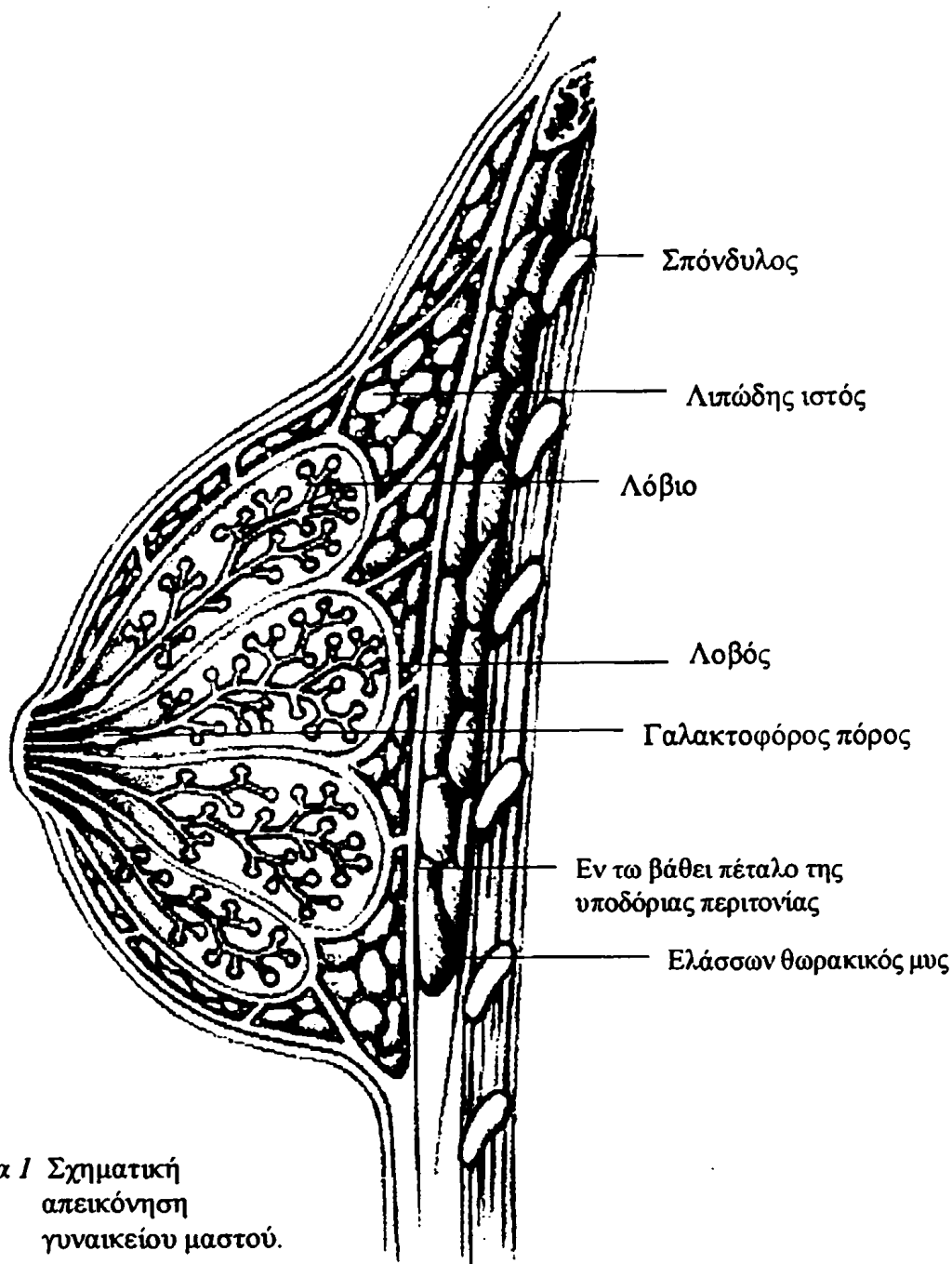
### II.1 Ανάπτυξη

Ο μαστός σχηματίζεται κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη από τη μαστική γραμμή, μία πάχυνση της επιδερμίδας που αναπτύσσεται αμφοτερόπλευρα στην πρόσθια επιφάνεια του σώματος μεταξύ των εκφύσεων των άνω και κάτω άκρων. Η αρχέγονη αυτή γραμμή εμφανίζεται αρχικά περίπου κατά τη διάρκεια της 6ης εμβρυϊκής εβδομάδας και στη συνέχεια ατροφεί, εκτός από το τμήμα της από το οποίο θα αναπτυχθεί ο μαστικός αδένας (αρχέγονη καταβολή θηλής).

Αργότερα, τον 6ο μήνα, από τη βασική στοιβάδα της αρχέγονης θηλής αναπτύσσονται προς το χόριο 15 έως 20 συμπαγείς αρχικά επιθηλιακές καταδύσεις που ως τον 9ο μήνα σχηματίζουν αυλό. Ο μαστός αποτελείται από διακλαδιζόμενους πόρους και ο μεσεγγυματικός ιστός γύρω από τους πόρους αυτούς διαφοροποιείται σε συνδετικό ιστό. Κατά τη διάρκεια της ήβης στα κορίτσια και πριν από την εμμηναρχή, παρατηρείται ανάπτυξη και διόγκωση των μαστών που οφείλεται σε υπερπλασία τόσο των πόρων όσο και του υποστρώματος που τους περιβάλλει. Οι πόροι επιμηκύνονται, ενώ από τα τελικά τυφλά άκρα τους σχηματίζονται πολλαπλά μικρά, σακκοειδή ανευρίσματα (στοιχειώδεις αδενοκυψέλες). Συγχρόνως παρατηρείται υπερπλασία του επιθηλίου και αθροίσεις επιθηλιακών κυττάρων που αργότερα θα σχηματίσουν αυλό.

Στη γυναίκα της αναπαραγωγικής ηλικίας, ο μαστός είναι πλέον ένας διαφοροποιημένος αδένας που αποτελείται από 15 έως 20 κύριους εκφορητικούς πόρους, με πολλαπλές δενδροειδείς διακλαδώσεις κατά μήκος της πορείας τους προς τη θηλή, και από απειράριθμες αδενοκυψέλες που κρέμονται από τις τελικές και τυφλές απολήξεις των πόρων. Οι αδενοκυψέλες όπως διατάσσονται σε ομάδες, σχηματίζουν *λόβια*, και πολλά λόβια, 10-100, σχηματίζουν *λοβούς*. Αυτοί είναι 15-20, όσοι δηλαδή και οι πόροι και διατάσσονται ακτινοειδώς γύρω από τη θηλή.





Σε όλες τις περιπτώσεις υπάρχει υπόστρωμα ινώδους συνδετικού ιστού και λίπους πλούσιο σε αιμοφόρα αγγεία, λεμφοφόρα αγγεία και νεύρα. Η στοιχειώδης αυτή οργάνωση επιτρέπει τη διάκριση του αδένου σε δύο κύρια μέρη, το εκκριτικό και το εκφορητικό. Το εκκριτικό μέρος του μαστού συγκροτείται από το λόβιο με τους λεπτότατους τελικούς λοβιακούς πόρους και χαρακτηρίζεται ως τελική προλοβιακή ή απλώς λοβιακή μονάδα. Το εκφορητικό μέρος

του αδένου διαμορφώνεται από τους κύριους εκφορητικούς πόρους του μαζικού αδένου. Αυτοί, γνωστότεροι ως γαλακτοφόροι πόροι, αντιστοιχούν ένας σε κάθε λοβό και εκβάλλουν στην επιφάνεια της θηλής με ανεξάρτητα στόμια. Λίγο πριν την εκβολή τους οι γαλακτοφόροι πόροι εμφανίζουν ατρακτοειδή διεύρυνση, το γαλακτοφόρο κόλπο. Είναι εντυπωσιακό ότι τα αδενικά αυτά συστατικά αποτελούν λιγότερο από το 10% του ώριμου μαστού, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό είναι συνδετικός ιστός και λίπος.

Η οπίσθια επιφάνεια του μαστού είναι υποκοίλη και έρχεται σε συνάφεια με το μείζονα θωρακικό μυ και, σε μικρότερη έκταση, με τον πρόσθιο οδοντωτό. Από τους μυς αυτούς ο μαστός χωρίζεται με την εν τω βάθει ή θωρακική περιτονία, καθώς και με λεπτή ζώνη χαλαρού συνδετικού ιστού που, παρεμβαλλομένη μεταξύ περιτονίας και μαστού, επιτρέπει στο όργανο κάποιο βαθμό κινητικότητας. Από καθαρά πρακτικής πλευράς, ο μαστός διακρίνεται σε 4 τεταρτημόρια (άνω έσω, άνω έξω, κάτω έξω, κάτω έσω) και μία κεντρική περιοχή σε ακτίνα 1 εκ. από τη θηλαία άλω. Από τα τμήματα αυτά του μαστού, το άνω έξω τεταρτημόριο εμπεριέχει τη μεγαλύτερη ποσότητα αδενικού ιστού, γεγονός που ευθύνεται για τη συχνότερη εντόπιση του καρκίνου στη θέση αυτή.

## **II. 2 Ιστολογική εξέταση των τμημάτων του μαστού**

α) Η λοβιακή μονάδα αποτελείται από τη *βασική μεμβράνη* και δύο κυρίως τύπους διαφοροποιημένων κυττάρων: τα *επιθηλιακά κύτταρα*, που καταλαμβάνουν το εσωτερικό των αδενοκυψελών και του αυλού των τελικών πόρων, και τα *μυοεπιθηλιακά*, που διατάσσονται μεταξύ της βασικής μεμβράνης και του επιθηλίου. Τα επιθηλιακά κύτταρα είναι εμπλουτισμένα με υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης και η προσδοκώμενη λειτουργία τους είναι εκκριτική. Τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα περιβάλλουν τις αδενοκυψέλες και, κυρίως, τους τελικούς λοβιακούς πόρους. Χάρη στις συσταλτικές ιδιότητες των μυονηματίων τους επιτυγχάνεται η έξοδος του εκκρίματος από τα επιθηλιακά κύτταρα και η προώθησή του στο σύστημα των εκφορητικών πόρων. Επισημαίνεται η παρουσία μικρών σφαιροειδών κυττάρων, τα οποία φαίνεται να αντιπροσωπεύουν πρόδρομες μορφές των μυοεπιθηλιακών κυττάρων.



β) Το υπόστρωμα του αδένου είναι βλενώδους σύστασης, με ελάχιστες ελαστικές ίνες και μεγάλη ευαισθησία στις ορμόνες, ενώ γύρω από τους μεγάλους εκφορητικούς πόρους εμφανίζεται λιγότερο διαφοροποιημένο.

γ) Ενδιαφέρον παρουσιάζει η λεπτή κατασκευή της θηλής και της θηλαίας άλως. Τα μορφώματα αυτά ουσιαστικά αποτελούν τμήματα της υπόλοιπης επιδερμίδας, διακρίνονται από αυτή για την εντυπωσιακή αύξηση της μελανίνης και την ευκαιριακή παρουσία διαυγών κυττάρων στη βασική τους στιβάδα. Η θηλαία άλως περιέχει και αυτή πολυάριθμους σμηγματογόνους αδένες, τους αλωαίους ή αδένες του Montgomery, που εκβάλλουν απευθείας, ή από κοινού με τους γαλακτοφόρους πόρους, στην επιφάνεια του δέρματος.





### ***III.- Τα χαρακτηριστικά μιας κακοήθειας***

---

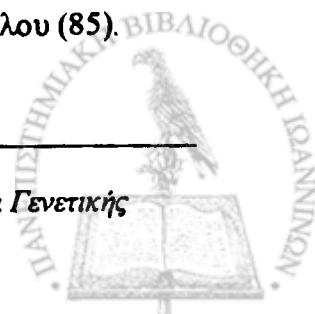
#### ***III.1. Διαταραχή των φυσιολογικών βιολογικών μηχανισμών***

Ο καρκίνος χαρακτηρίζεται από συσσώρευση ανώμαλων κυτταρικών κλώνων σαν συνέπεια μη φυσιολογικού κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ο οποίος είναι απαραίτητος, συχνά όμως μη επαρκής για την δημιουργία του όγκου. Τα καρκινικά κύτταρα γενικά χαρακτηρίζονται από την έκτοπη ή/και την αλλοιωμένη ποσοτικά ή ποιοτικά έκφραση ενός ή περισσότερων γονιδίων με αποτέλεσμα την απορύθμιση των λειτουργιών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης καθώς και της διαφοροποίησης. Όμως μία απορύθμιση μίας ή περισσότερων από αυτές τις λειτουργίες έχει σαν συνέπεια έναν αλλοιωμένο φαινότυπο και σε ορισμένες περιπτώσεις καρκίνο.

##### ***III.1.a Κυτταρικός πολλαπλασιασμός***

Ένας ολοκληρωμένος κυτταρικός κύκλος προϋποθέτει τη διαδοχική μετάβαση από τη μία φάση του στην επόμενη. Ο έλεγχος για τη μετάβαση από τη μία φάση του κύκλου στην άλλη γίνεται από ρυθμιστές (ενεργοποιητές και αναστολείς) που καθορίζουν την περαιτέρω πορεία στα συγκεκριμένα στάδια του κύκλου. Η δράση δε των ρυθμιστών επάγεται από μηνύματα που προέρχονται από το εσωτερικό (μετάδοση κάποιου μηνύματος μέχρι τον πυρήνα) ή/και το εξωτερικό (απάντηση στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα) του κυττάρου.

Η πορεία του κυτταρικού κύκλου καθορίζεται από ενδοκυτταρικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες γνωστές ως κυκλίνες, οι οποίες ανταποκρίνονται σε μιτογόνα και αντιμιτογόνα μηνύματα (82,83) και δρουν πάνω στις κινάσες (Cdk) (84). Η κυκλίνη D1, βασικός ρυθμιστής του κυτταρικού κύκλου, σχηματίζει σύμπλοκα με τις κινάσες Cdk4 και Cdk6 που φωσφορυλιώνουν την Rb πρωτεΐνη, την αδρανοποιούν και επιτρέπουν μετάβαση του κυττάρου από την G1 στην S φάση του κύκλου (85).



Η υπερέκφραση της κυκλίνης D1 διαπιστώθηκε σε πολλούς καρκίνους στον άνθρωπο και οφείλεται σε γονιδιακή αύξηση ή μετατόπιση του αντίστοιχου γονιδίου. Το γονίδιο της κυκλίνης D παρουσιάζει ενίσχυση στο 15-20% των όγκων του μαστού, και υπερεκφράζεται στο 35-50% περίπου των όγκων (86,87). Στον καρκίνο του μαστού παρατηρούνται αλλαγές στην έκφραση και άλλων μορίων που ενέχονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου όπως στους αναστολείς των κινασών Cdk's - p16 (88), p21, p27, p57 (89).

Στο μαστό ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου είναι και ορισμένοι αυξητικοί παράγοντες που ελέγχουν τη μετάβαση του κυττάρου από τη μία φάση του κυτταρικού κύκλου στην άλλη (όπως οι PDGF, EGF, IGF-1, TGF-β) και εκκρίνονται από τα στρωματικά κύτταρα. Η παρακρινής παραγωγή των παραγόντων αυτών μπορεί να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των φυσιολογικών και των καρκινικών κυττάρων και σε ορισμένες περιπτώσεις η παρεμβολή στη δράση τους μπορεί να αποτελέσει μια στρατηγική για θεραπεία στον καρκίνο του μαστού (90).

Οι EGF, TGF-α και IGF-2 παράγονται και εκκρίνονται σε καλλιέργειες κυτταρικών σειρών καρκινικών κυττάρων του μαστού, αλλά και σε καρκινώματα από ασθενείς με καρκίνο του μαστού (91-93) και θεωρούνται ότι δρουν σαν μιτογόνα για τα επιθηλιακά αυτά κύτταρα. Οι PDGF και IGF μπορεί να είναι υπεύθυνοι για τον πολλαπλασιασμό του μεσεγχυματικού στρωματικού στοιχείου που υφίσταται σε πολλούς καρκίνους του μαστού (94,95).

Μέλη της οικογένειας υποδοχέων του EGF συνιστούν και οι υποδοχείς *erbB2* (HER2 ή neu), HER3, HER4. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί πάνω από 10 παράγοντες που ανήκουν σ' αυτήν την οικογένεια και 4 διαφορετικοί υποδοχείς (*erbB1-4*) (96). Η διέγερση των υποδοχέων αυτής της οικογένειας οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού SOS-Ras-Raf-MAP που είναι καθοριστική στην προώθηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (97). Οι αλλαγές της έκφρασης των συγγενών προς των EGF πεπτιδίων και των υποδοχέων τους στον καρκίνο του μαστού υπαινίσσεται την συμμετοχή τους στην πορεία της καρκινογένεσης (98,99). Πιο χαρακτηριστική περίπτωση αυξημένης έκφρασης είναι αυτή των υποδοχέων *c-erbB1* (100) και κυρίως του *c-erbB2* που υπερεκφράζεται στο 20-40% περίπου των σποραδικών καρκινωμάτων



του μαστού (101). Ένα ποσοστό υπερέκφρασης του *erbB2* οφείλεται σε επέκταση του γονιδίου, ενώ το υπόλοιπο φαίνεται πως είναι αποτέλεσμα απορύθμισης της έκφρασής του. Ο υποδοχέας *erbB2* δρα, σύμφωνα με τα μέχρι σήμερα δεδομένα, μέσω του ετεροδιμερισμού του με τους υπόλοιπους υποδοχείς της οικογένειας και κυρίως με τον *erbB1*. Ο υποδοχέας *erbB2* αυξάνει τη σταθερότητα του συμπλόκου και επιμηκύνει το χρόνο δράσης του που είναι η μεταφορά μηνυμάτων που οδηγούν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (102). Είναι χαρακτηριστικό επίσης πως η υπερέκφραση των *erbB1* και *erbB2* στον καρκίνο του μαστού συνδυάζεται συνήθως με φαινότυπο που δεν εκφράζει υποδοχείς οιστρογόνων (103).

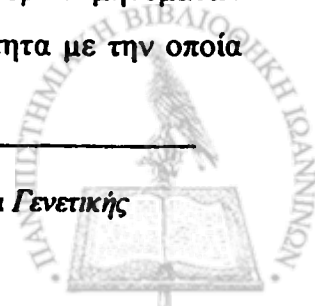
#### **- Ενδοκυτταρικοί διαβιβαστές**

Μετά τη λήψη του σήματος από το εξωτερικό του κυττάρου το επόμενο βήμα είναι η μετάδοση του σήματος στον πυρήνα και αυτό επιτυγχάνεται με μία ετερογενή ομάδα μορίων, που είναι γνωστοί ως *δευτερογενείς διαβιβαστές* (πρωτείνες ή μικρά μόρια όπως η φωσφορική ινοζιτόλη, το κυκλικό AMP και ιόντα). Στον πυρήνα, σε απάντηση της δράσης των διαβιβαστών ενεργοποιούνται γονίδια-μεταγραφικοί παράγοντες. Αντίθετα, η καταστατολή της δράσης μεταγραφικών παραγόντων εμποδίζει τα κύτταρα να μπουν στη φάση G1.

Αυτό γίνεται μέσω της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης Rb, η οποία δημιουργεί σύμπλοκο με τον παράγοντα μεταγραφής E2F και εμποδίζει τη μεταγραφή γονιδίων των οποίων οι υποκινητές εξαρτώνται από τον E2F (104). Σε μοριακό επίπεδο, το σύνολο των αντιπολλαπλασιαστικών μηνυμάτων μεταδίδεται στο κύτταρο μέσω του μονοπατιού της Rb πρωτεΐνης και των ομολόγων της P107 και P130 (105). Αλλαγές έχουν σημειωθεί και στην έκφραση της Rb πρωτεΐνης λόγω απώλειας ενός αλληλόμορφου του γονιδίου (έλλειψη ετεροζυγωτίας (LOH) στο 13q14), η έκταση όμως και η σημασία τους δεν έχει διερευνηθεί επαρκώς στο μαστό.

#### **- Μετα-μεταγραφική διαδικασία**

Εκτός από μεταβολές στο επίπεδο μεταγραφής των γονιδίων στον καρκίνο, αλλοιώσεις μπορεί να παρατηρηθούν και στη μετα-μεταγραφική πορεία μηνυμάτων RNA (που αφορούν τη σταθερότητα των μηνυμάτων και την ταχύτητα με την οποία



μεταφράζονται σε πρωτεΐνες). Ένα σημαντικό παράδειγμα είναι ο παράγοντας eIF4 του οποίου τα επίπεδα είναι 3-10 φορές υψηλότερα στο καρκίνο του μαστού σε σύγκριση με φυσιολογικό ιστό ή καλοήθεις όγκους (106).

Η προσθήκη μιας επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας AMP (πολυαδενυλική ουρά) στο 3' άκρο του πρόδρομου ετερογενούς RNA (hnRNA) είναι μια γενικευμένη διαδικασία στην ωρίμανση του mRNA των ευκαρυωτικών κυττάρων και ρυθμίζεται από ένα πολύ-πρωτεϊνικό σύμπλοκο. Η πολυαδενυλική ουρά του mRNA συνεισφέρει στη σταθερότητα του mRNA, στη μεταφορά του – μετακίνησή του από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και τη μεταφρασιμότητά του (107). Αλλαγές όμως παρατηρούνται στον καρκίνο και στο στάδιο της πολυαδενυλίωσης.

Η δράση ορισμένων από τους παράγοντες που συμμετέχουν στη διαδικασία της πολυαδενυλίωσης ρυθμίζεται στη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και της διαφοροποίησης (108). Ένας από αυτούς τους παράγοντες είναι και η πολυ(A)πολυμεράση (PAP) που υπερφωσφορυλιώνεται από την p34 (cdc2)/cyclin B (MPF), στη διάρκεια της M φάσης του κύκλου, με αποτέλεσμα σ' αυτή τη φάση να εμφανίζει χαμηλή ενεργότητα (109).

Η ενεργότητα της PAP εμφανίζεται να αυξάνεται σε ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ηρεμούντα κύτταρα (110). Επίσης, η διέγερση λεμφοκυττάρων με φυτοαιματοσυγκολλητίνη (PHA) οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων ενεργότητας της PAP (111,112). Παροδική αύξηση της ενεργότητας της PAP παρατηρείται κατά την επαγωγή προς τη διαφοροποίηση (113,114). Στη φάση όμως της τελικής διαφοροποίησης, όπου ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων μειώνεται, η ενεργότητά της εμφανίζεται και αυτή μειωμένη (115).

Στις οξείες λεμφοβλαστικές λευχαιμίες παρατηρούνται επίπεδα ενεργότητας της PAP υψηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα στις χρόνιες λεμφοκυτταρικές λευχαιμίες και στα φυσιολογικά περιφερικά λεμφοκύτταρα (116). Στη B-χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία βρέθηκε ότι όσο υψηλότερα ήταν τα επίπεδα ενεργότητας της PAP τόσο δυσμενέστερη ήταν η πρόγνωση, βάσει κλινικών και εργαστηριακών κριτηρίων (117). Αντίστοιχα, στις χρόνιες μυελογενείς λευχαιμίες η υψηλότερη τιμή ενεργότητας της PAP μετρήθηκε στη βλαστική φάση της νόσου σε σχέση με τις άλλες φάσεις (118).



Στον καρκίνο του μαστού βρέθηκε πως τα επίπεδα ενεργότητας της PAP σχετίζονται με το στάδιο της νόσου (TNM stage) και με τη διήθηση των επιχώριων λεμφαδένων. Ταυτόχρονα, βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της PAP και της υπερέκφρασης του *c-erbB2*, καθώς και με τους ορμονικούς υποδοχείς, ενώ δε βρέθηκε συσχέτιση με το μέγεθος του όγκου, την ηλικία των ασθενών και τον ιστολογικό τύπο (119).

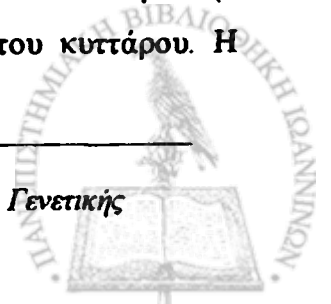
Στον τομέα της πρόγνωσης σε ένα δείγμα 288 ασθενών με μέσο όρο παρακολούθησης 58 μηνών βρέθηκε πως τα επίπεδα ενεργότητας της PAP αποτελούν ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη για την ομάδα ασθενών με αρνητικούς για διήθηση λεμφαδένες (120).

### III.1.β. Απόπτωση

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, απόπτωση, είναι ένας μηχανισμός που εξασφαλίζει την ομοιόσταση όλων των ιστών και οδηγεί σε καταστροφή κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί μη επιδιορθώσιμες βλάβες. Αυτός ο μηχανισμός απαιτεί αυστηρή ρύθμιση και η δυσλειτουργία του μπορεί να οδηγήσει σε εκτεταμένη κυτταρική επιβίωση και να συμβάλλει στην ογκογένεση.

Το αποπτωτικό μονοπάτι διαιρείται σε διάφορα επίπεδα που καταλήγουν στις χαρακτηριστικές αποπτωτικές δομές που συνοδεύουν τον κυτταρικό θάνατο, δηλαδή συμπύκνωση του κυτταροπλάσματος και της χρωματίνης και τεμαχισμός του DNA. Μόριο κλειδί της απόπτωσης είναι μια πρωτεΐνη, η p53. Απώλεια της δράσης της p53 στον καρκίνο έχει σαν αποτέλεσμα την καταστολή της απόπτωσης. Αλλαγές στα επίπεδα της πρωτεΐνης έχουν βρεθεί στο 20-25% των όγκων, ενώ στη δομή – σαν αποτέλεσμα γονιδιακών μεταλλάξεων - στο 15-30% περίπου (121,122). Ένας άλλος παράγοντας που ενέχεται στην απόπτωση είναι η πρωτεΐνη bcl-2, η υπερέκφραση της οποίας σε συνεργασία με άλλους παράγοντες καταστέλλει τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (123). Στον καρκίνο του μαστού έχει μία ιδιόζουσα συμπεριφορά, γιατί η έκφραση της τείνει να μειώνεται όσο εξελίσσεται η νόσος (από 79-91% στα *in situ* σε 45-79% στα διηθητικά καρκινώματα) (124).

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού της απόπτωσης έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των κασπασών που στοχεύουν στην καταστροφή του κυττάρου. Η



απενεργοποίηση του p21 και του Rb από τις κασπάσες κατά τη διάρκεια βλαβών του DNA είναι ένα παράδειγμα συσχέτισης απόπτωσης και κυτταρικού κύκλου. Η δράση των κασπασών αναιρείται από αναστολείς που έχουν εντοπιστεί στους περισσότερους τύπους καρκίνου στον άνθρωπο στον πνεύμονα, το πάγκρεας, το έντερο, τον προστάτη, το μαστό και το λέμφωμα non-Hodgkin (125).

#### *- Ατελεύτητος κυτταρικός πολλαπλασιασμός*

Τα φυσιολογικά κύτταρα μπορούν να πραγματοποιήσουν ένα συγκεκριμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων. Αυτό το όριο τίθεται, εν μέρει τουλάχιστον, από ένα μηχανισμό ελέγχου του μήκους των τελομερών, τα οποία είναι επαναλαμβανόμενες μη κωδικοποιούμενες ακολουθίες στα άκρα των χρωμοσωμάτων.

Σε κάθε διαίρεση το μήκος των τελομερών μειώνεται. Τα τελομερή πλούσια σε νουκλεοτιδικές βάσεις γουανίνη και κυτοσίνη, αποτελούνται από ακολουθίες που επαναλαμβάνονται κάθε 5-8 ζεύγη βάσεων και ποικίλουν ανάλογα με το είδος του οργανισμού. Ο ρόλος των τελομερών είναι να αποτρέψουν το χρωμοσωμικό ανασυνδυασμό, γεγονός απαραίτητο για τη σταθερότητα του γενετικού υλικού. Χρωμοσώματα με μειωμένα τελικά άκρα είναι ασταθή, συνδέονται μεταξύ τους ή χάνονται κατά την κυτταρική διαίρεση (126,127). Τα ανθρώπινα τελομερή περιέχουν κυρίως την ακολουθία TTAGGG που μπορεί να φτάνει μέχρι τις 15kb (128,129). Πειράματα σε πρωτόζωα έδειξαν ότι τα τελομερή συνδέονται με πρωτείνες και οδηγούν στο σχηματισμό ενός νουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου της τελομεράσης (130).

Η τελομεράση είναι μια ριβονουκλεοτιδική πολυμεράση της οποίας ο ρόλος είναι η διατήρηση των τελομερών με τη προσθήκη τελομερικών επαναλαμβανόμενων ακολουθιών (131,132). Η τελομεράση είναι ενεργή στα κύτταρα της γεννητικής σειράς με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν μεγάλα τελομερή (10-14kb). Η απουσία της στα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα έχει σαν συνέπεια τη σταδιακή μείωση των τελομερών των χρωμοσωμάτων. Τα μειωμένα τελομερή έχουν σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία βλαβών στο DNA γεγονός που δίνει το έναυσμα για διακοπή του κυτταρικού κύκλου μέσω της p53. Έχει δειχθεί ότι ανωμαλίες των τελομερών μπορεί να οδηγήσει σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε γρήγορα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα (133).



Μελέτες σε ποντίκια που δεν εκφράζουν τελομεράση έδειξαν ότι η απορύθμιση των τελομερών οδηγεί στην ανάπτυξη επιθηλιακών όγκων με κυτταρογενετικά προφίλ παρόμοια με τα ανθρώπινα (133,134). Έχει παρατηρηθεί ότι 71-95% των καρκινωμάτων του μαστού στον άνθρωπο εκφράζουν τελομεράση (135-139). Πιθανά, η *de novo* ενεργοποίηση της τελομεράσης στον καρκίνο μπορεί να εξασφαλίζει στο κύτταρο ένα μηχανισμό επιβίωσης εμποδίζοντας τη συσσώρευση γενετικών ανωμαλιών.

Από την άλλη, η *de novo* έκφραση του ενζύμου μπορεί να συνδέεται με καρκινογένεση. Συνεχής έκφραση της τελομεράσης επάγει την ιστοειδική δημιουργία καρκινωμάτων σε ποντίκια (140). Συγκεκριμένα τα ποντίκια αυτά παρουσιάζουν καρκινώματα στο μαστό και το δέρμα (επιθηλιακής προέλευσης). Επιπλέον, σε κυτταρικές σειρές με ενεργοποιημένο *ras*, η ενεργότητα της τελομεράσης μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση με τρόπο που είναι ανεξάρτητος από το μήκος των τελομερών (141).

### III.1.γ. Διαφοροποίηση - Αγγειογένεση

Η διαφοροποίηση ξεκινά λίγο μετά τις πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις που ακολουθούν τη γονιμοποίηση. Κατά την ανάπτυξη η ικανότητα ενός κυττάρου να πολλαπλασιάζεται συνδέεται αντίστροφα με το στάδιο διαφοροποίησης του. Οι παράγοντες που ελέγχουν τη διαφοροποίηση είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς, ενδοκυτταρικά μόρια σήμανσης και παράγοντες μεταγραφής. Στα έμβρυα, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός είναι ο κύριος τρόπος με τον οποίο η κυτταρική μάζα αυξάνεται. Όσο όμως ο οργανισμός αναπτύσσεται ο πολλαπλασιασμός περιορίζεται. Κάποια διαφοροποιημένα κύτταρα συνεχίζουν να διαιρούνται, αλλά άλλα σταματούν. Τα εμβρυικά κύτταρα έχουν ένα πλεονέκτημα αύξησης που δεν έχουν τα κύτταρα του ενήλικα. Πολλαπλασιάζονται γρήγορα, ικανά για μεγάλη εξάπλωση, εκκρίνουν παράγοντες που αυξάνουν την τοπική τροφοδοσία αίματος (αγγειογένεση), και παράγουν ένζυμα που καταστρέφουν τις βασικές μεμβράνες. Αυτά τα χαρακτηριστικά συναντώνται και στα κύτταρα των όγκων.

Η παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών μέσω των αιμοφόρων αγγείων είναι κρίσιμος παράγοντας για την λειτουργία και επιβίωση όλων των κυττάρων. Το γεγονός αυτό καθιστά απαραίτητη τη γειτνίαση (σε απόσταση μικρότερη από 100μm)

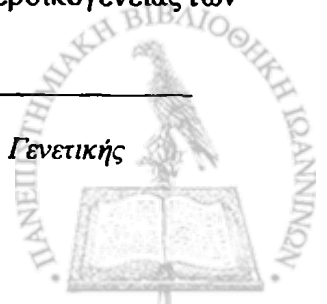


όλων σχεδόν των κυττάρων ενός ιστού με ένα τριχοειδές αιμοφόρο αγγείο. Εξαιτίας αυτής της εξάρτησης από τα παρακείμενα αγγεία γίνεται φανερό πως τα καρκινικά κύτταρα που πολλαπλασιάζονται μέσα σ'έναν ιστό πρέπει να έχουν την ικανότητα να επάγουν και να προωθούν το σχηματισμό αγγείων έτσι ώστε να διευκολύνουν την ανάπτυξή τους (142). Τα μέχρι σήμερα δεδομένα της έρευνας δείχνουν πως αυτή η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων είναι ένα πρώιμο στάδιο στην καρκινογένεση και είναι αυτό που ουσιαστικά θα επιτρέψει τη γρήγορη αύξηση των κυττάρων και το σχηματισμό μακροσκοπικά ορατού όγκου. Ο έλεγχος της αγγειογένεσης επιτυγχάνεται μέσω της δράσης παραγόντων που την προωθούν και παραγόντων που την αναστέλλουν. Η ανατροπή της ισορροπίας αυτών των παραγόντων μπορεί να οδηγήσει στην ενεργοποίηση της αγγειογένεσης (143). Αρκετοί από τους παράγοντες που ενέχονται στον έλεγχο της αγγειογένεσης εμφανίζουν αλλαγμένη ή αλλοιωμένη έκφραση στον καρκίνο του μαστού (144,145). Ένας από τους πλέον μελετημένους αγγειογενετικούς παράγοντες είναι ο αγγειοενδοθηλιακός παράγων VEGF. Η ανίχνευση αυτού του παράγοντα στους πορογενείς όγκους του μαστού αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα. Ανασταλτικός για την αγγειογένεση παράγοντας είναι η θρομβοσπονδίνη -1 (146) που ενεργοποιείται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 (147). Στους καρκίνους παρατηρείται απώλεια της έκφρασης της θρομβοσπονδίνης-1.

#### **- Διήθηση ιστών και μετάσταση**

Αργά ή γρήγορα στη διάρκεια της εξέλιξης των περισσότερων όγκων, κύτταρα από τον απομακρυνσμένο όγκο διηθούν τους παρακείμενους ιστούς και στη συνέχεια μετακινούνται σε απομακρυνσμένα σημεία όπου μπορεί να οδηγήσουν στη δημιουργία νέων όγκων - μεταστάσεων. Η απόκτηση από μέρος των καρκινικών κυττάρων αυτής της ικανότητας απαιτεί μια σειρά αλλαγές που μόνο ένα μικρό μέρος τους είναι κατανοητό με τα μέχρι τώρα δεδομένα. Σε μηχανιστικό επίπεδο η διήθηση και η μετάσταση είναι στενά συνδεδεμένες διαδικασίες και απαιτούν παρόμοιες αλλαγές που σε γενικές γραμμές περιλαμβάνουν αλλαγές στη φυσική σύνδεση-συνοχή των κυττάρων με το μικροπεριβάλλον τους και στην ενεργοποίηση εξωκυτταρικών πρωτεασών.

Από τα μόρια που διαμεσολαβούν στη συνοχή των κυττάρων μεταξύ τους (cell adhesion molecules CAMs) αλλαγές έχουν διαπιστωθεί σε μέλη της υπεροικογένειας των





ανοσοσφαιρινών και της οικογένειας των καντχερινών (cadherins) (149), ενώ στα μόρια σύνδεσης με το εξωκυτταρικό σύμπλεγμα, οι αλλαγές εντοπίζονται στις ιντεγκρίνες (150). Οι πλέον μελετημένες αλλαγές αφορούν την έκφραση και τη λειτουργία της E-καντχερίνης, μίας πρωτεΐνης που απουσιάζει από την πλειοψηφία των επιθηλιακών όγκων (149). Από την άλλη, οι εξωκυτταρικές πρωτεάσες δρουν μεταβάλλοντας τη δομή διαφόρων παραγόντων, οι οποίοι με μία σειρά μηχανισμών επιτρέπουν τη διήθηση και τη μετακίνηση των καρκινικών κυττάρων διαμέσου των αιμοφόρων αγγείων (151,152).

Μελέτες πάνω στη διαδικασία της μετάστασης, έχουν πραγματοποιηθεί και σε άλλες κατηγορίες πρωτεϊνών όπως αυτές της οικογένειας *K-ras*, υπεύθυνες για τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και την οργάνωση του κυτταρικού σκελετού (153). Πρόσφατα δεδομένα συνδέουν τα επίπεδα έκφρασης μιας υποκατηγορίας πρωτεϊνών, που σχετίζονται με τις *K-ras*, με το μεταστατικό χαρακτήρα όγκων του πορογενούς αδενοκαρκινώματος του παγκρέατος (154) και του φλεγμονώδους του καρκίνου του μαστού (155,156). Αυτές οι πρωτεΐνες είναι γνωστές ως Rho πρωτεΐνες (A, B, C) και είναι υπεύθυνες για την οργάνωση του κυτταρικού σκελετού και τη διατήρηση της στερεοδομής του κυττάρου (157).



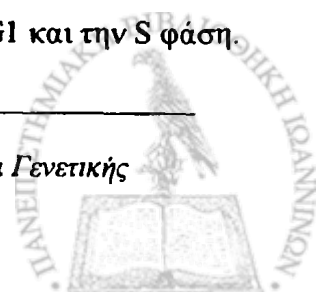
### III.2. Κλινικοπαθολογικοί χαρακτήρες – Κλασσικοί προγνωστικοί δείκτες

#### III.2.a Ρυθμός πολλαπλασιασμού

Η μέτρηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων είναι μεγάλης προγνωστικής σημασίας για πολλούς τύπους καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού. Είναι φανερό πως απόλυτη μέτρηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού δεν είναι εφικτή γι' αυτό έχουν προταθεί και εφαρμόζονται μια σειρά μεθοδολογικές προσεγγίσεις για την εκτίμησή του, χωρίς ωστόσο να λείπουν οι αντιφάσεις ανάμεσα στα ευρήματα αυτών των μεθόδων. Η πιο παλιά και σχεδόν καθολικά εφαρμοζόμενη μέθοδος είναι η μέτρηση του αριθμού των μιτώσεων σε ιστοπαθολογικές τομές ρουτίνας. Ο αριθμός των μιτώσεων – που εκφράζεται σαν αριθμός ανά 10 πεδία μεγάλης μεγένθυσης ή ανά 1000 κύτταρα- έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με την πρόγνωση (158). Η κριτική της μεθόδου εστιάζεται στην υποκειμενικότητα της αναγνώρισης των μιτώσεων, στις διαφορές στα πρωτόκολλα μέτρησης και σε τεχνικούς παράγοντες που επηρεάζουν το αποτέλεσμα.

Η ανίχνευση πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους είναι η πιο πρόσφατη εξέλιξη στις προσπάθειες μέτρησης του ρυθμού πολλαπλασιασμού των όγκων του μαστού. Το μονοκλωνικό αντίσωμα MIB1 ανιχνεύει μία όχι πλήρως χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη, την Ki67, η οποία είναι παρούσα σ' όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου εκτός της G<sub>0</sub> και της πρώιμης G<sub>1</sub> (159). Η θετική για το Ki67 σήμανση των όγκων σχετίζεται καλά με άλλους δείκτες του ρυθμού πολλαπλασιασμού όπως το μιτωτικό δείκτη. Σχετίζεται επίσης και με ορισμένους από τους κλασσικούς προγνωστικούς δείκτες όπως ο βαθμός κακοήθειας (Grade) και τους ορμονικούς υποδοχείς. Μια σειρά εργασίες δείχνουν επίσης συσχέτιση της θετικότητας για Ki67 με αρνητική πρόγνωση (160).

Μια άλλη πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ανιχνεύεται και σε τομές παραφίνης είναι το πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιαζόμενου κυττάρου (*proliferating cell nuclear antigen PCNA*). Το PCNA είναι μία πρωτεΐνη που δρα σαν συν-παράγοντας της πολυμεράσης δ και τα επίπεδα σύνθεσής της σχετίζονται με το ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού και σύνθεσης του DNA (161). Στον κυτταρικό κύκλο φαίνεται να συσσωρεύεται στον πυρήνα στο τέλος της φάσης G<sub>1</sub> και την S φάση.



Μια σειρά εργασίες έχουν δείξει συσχέτιση της παρουσίας του PCNA και κακής πρόγνωσης (162,163).

### III.2.β. Ιστολογικός τύπος

Η πιο καθιερωμένη κατάταξη των νεοπλασματικών ανωμαλιών βασίζεται σ'εκείνη που συντάχθηκε από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (World Health Organization, WHO), το 1981 (164), με σκοπό την υιοθέτηση ενός ενιαίου συστήματος χαρακτηρισμού όγκων. Με σκοπό τον ιστολογικό χαρακτηρισμό των καρκινικών τύπων μέχρι σήμερα, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες κατατάξεις των όγκων του μαστού. Η τελική διάγνωση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την εμπειρία του παθολογοανατόμου, ενώ λόγω των διαφόρων υποκειμενικών κριτηρίων συχνά δεν αποκλείεται να υπάρχει σύγχυση ως προς τον τρόπο κατάταξης των όγκων. Εξαιτίας της πολυπλοκότητας της κατηγοριοποίησης των όγκων του μαστού, θα αναφερθούν περιληπτικά ορισμένες βασικές κατηγορίες και ομάδες νεοπλασμάτων -που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των όγκων και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής- οι οποίες όμως δεν ακολουθούν πιστά την κατάταξη της WHO.

Οι όγκοι που δημιουργούνται από το *επιθήλιο των πόρων* μπορούν να βρεθούν μόνο στο εσωτερικό των πόρων προέλευσης, δηλαδή οι όγκοι είναι ενδοπορογενείς και δεν διαπερνούν τη βασική μεμβράνη, ούτε εισχωρούν στο περιβάλλον στρώμα. Συνήθως τέτοιοι όγκοι προέρχονται από μεγάλους πόρους και παρουσιάζονται υπό τη μορφή διαφόρων τύπων. Αν αναπτυχθούν μέσα στους πόρους με θηλώδη μορφή χαρακτηρίζονται ως *θηλώδη καρκινώματα*. Αυτή η ποικιλία καρκινωμάτων, αναφέρεται συχνά σαν ενδοπορογενές καρκίνωμα ή πορογενές καρκίνωμα *in situ*.

Οι πιο συχνά αναφερόμενοι ιστολογικοί τύποι καρκινωμάτων *in situ* είναι ο φαγεσωρικός (*comedo*), ο ηθμοειδής (*cribriform*), ο στερεός (*solid*), ο θηλώδης (*papillary*) και ο μικροθηλώδης (*micropapillary*). Οι ιστολογικές διαφορές συνδέονται με διαφορές στη βιολογική συμπεριφορά. Ο δείκτης σήμανσης με θυμιδίνη (δείκτης πολλαπλασιασμού) ποικίλλει ανάλογα με τα ιστολογικά χαρακτηριστικά. Υψηλός δείκτης βρίσκεται στον φαγεσωρικό τύπο και χαμηλός στο ηθμοειδές, στο θηλώδες και το στερεό. Ο φαγεσωρικός τύπος φαίνεται ότι μπορεί να εξελιχθεί γρήγορα σε μεταστατικό καρκίνο.



Ένας άλλος τύπος όγκου είναι ο *λοβιακός* που προέρχεται από τα μικρά άκρα των πόρων του μαστού. Η αντίστοιχη κατηγορία *in situ* χαρακτηρίζεται από ομάδες αναπλαστικών κυττάρων με χαμηλό αριθμό πυρήνων που γεμίζει και επεκτείνεται στα λόβια χωρίς προσπέλαση της βασικής μεμβράνης. Το 50% των *in situ* καρκινωμάτων του μαστού είναι λοβιακά.

Όταν τα κύτταρα προσπελάσουν τη βασική μεμβράνη ο καρκίνος λέγεται *διηθητικός*. Και σ' αυτήν την κατηγορία διακρίνουμε τα πορογενή και τα λοβιακά διηθητικά καρκινώματα. Τα πορογενή διηθητικά καρκινώματα χωρίς ειδικό τύπο ιστολογικής δομής χαρακτηρίζονται ως καρκινώματα μη ειδικού τύπου (NOS) και αποτελούν περίπου το 80% των καρκίνων του μαστού. Κατά κανόνα δεν γίνονται μεγάλα σε μέγεθος, συχνά κάνουν μεταστάσεις στους λεμφαδένες και έχουν κακή πρόγνωση. Στα διηθητικά πορογενή καρκινώματα που παρουσιάζουν ειδικό τύπο ιστολογικής δομής ανήκουν τα: *μυελιογενή, σωληνώδη και τα βλενωδή ή κολλοειδή*

Τέλος, δύο άλλες υποομάδες συνιστούν ξεχωριστές εκδηλώσεις του καρκίνου του μαστού: η νόσος του Paget στον καρκίνο του μαστού που συναντάται στο 1-4% όλων των ασθενών με καρκίνο του μαστού και ο φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού που χαρακτηρίζεται από κοκκίνισμα του δέρματος. Πολλοί άλλοι τύποι καρκίνων έχουν περιγραφεί αλλά δεν έχουν ομοδοποιηθεί εξαιτίας των λίγων περιστατικών που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, όπως το αδενοκυστικό καρκίνωμα, το καρκινοσάρκωμα, το σκιρρώδες καρκίνωμα, το μεταπλαστικό και το βασικοκυτταρικό καρκίνωμα.

### **III.2.γ. Βαθμός ιστολογικής κακοήθειας ή διαφοροποίησης**

Γενικά, οι όγκοι που εμφανίζουν υψηλό βαθμό διαφοροποίησης έχουν την καλύτερη πρόγνωση. Το σύστημα σύνθετης διαβάθμισης (Combined Grade) όπως προτάθηκε από τους Bloom και Richardson (1957) στήριξαν την κατάταξη των όγκων στους αρχιτεκτονικούς μορφολογικούς χαρακτήρες (σχηματισμός σωληνίσκων, αριθμός πυρηνοκινήσιών ανά 10 οπτικά πεδία μεγάλης μεγεθύνσεως και κυτταρική ατυπία), ενώ ο Black καθιέρωσε τον πυρηνικό βαθμό κακοήθειας (grade) του όγκου που βασίζεται στο βαθμό της πυρηνικής ατυπίας. Η συνάρτηση αυτών των βαθμών κακοήθειας με την πρόγνωση και την επιβίωση είναι άμεση. Σύμφωνα με αυτόν οι όγκοι διακρίνονται σε



καλής διαφοροποίησης (Grade I), μέτριας διαφοροποίησης (Grade II) και χαμηλής διαφοροποίησης (Grade III). Ο βαθμός διαφοροποίησης (TNM staging) αποτελεί σημαντικό προγνωστικό δείκτη ιδιαίτερα όταν συνδιάζεται με το μέγεθος του όγκου και την κατάσταση των λεμφαδένων (166).

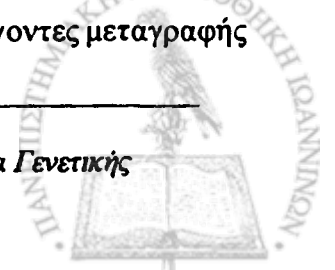
### **III.2.δ. Μέγεθος του όγκου**

Το μέγεθος του πρωτογενή όγκου αντανακλά ως ένα βαθμό το χρόνο εξέλιξης της νόσου και παρότι συσχετίζεται με την κατάσταση και τον αριθμό των θετικών λεμφαδένων, αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη. Υπάρχει άμεση θετική συσχέτιση με την πιθανότητα ανάπτυξης μεταστάσεων, αλλά και με το χρόνο μέχρι την επιδείνωση ο οποίος βραχύνεται όσο αυξάνει το μέγεθος του όγκου (167).

### **III. 2. ε. Υποδοχείς στεροειδικών ορμονών**

Η οιστραδιόλη ρυθμίζει τη μορφολογία των επιθηλιακών κυττάρων του όγκου και μαζί με ορισμένους αναστολείς των αυξητικών παραγόντων ρυθμίζει και την ανάπτυξή του (168). Η οιστραδιόλη επίσης ρυθμίζει την έκφραση πολλών γονιδίων που κωδικοποιούν πεπτιδία και πρωτεΐνες που συμμετέχουν στους μηχανισμούς ελέγχου ανάπτυξης των κυττάρων του μαστού. Η δράση αυτών των αυξητικών παραγόντων επιτυγχάνεται μέσω εξειδικευμένων υποδοχέων. Οι υποδοχείς των πολυπεπτιδικών ορμονών βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη, ενώ οι υποδοχείς της οικογένειας των στεροειδών ορμονών βρίσκονται στο εσωτερικό των κυττάρων ή στον πυρήνα. Η αλληλεπίδραση των παραγόντων αύξησης, των κυτοκινών και των ορμονών με ειδικούς υποδοχείς της μεμβράνης συμμετέχουν σε μία αλυσίδα ενδοκυτταρικών βιοχημικών σημάτων που οδηγούν στην ενεργοποίηση ή καταστολή έκφρασης πολλών γονιδίων. Πολλές από αυτές τις ορμόνες παίζουν ένα λειτουργικό ρόλο στην αύξηση των επιθηλιακών κυττάρων του μαστού, στην ανάπτυξη και στη γαλουχία. Αφού ο φυσιολογικός ιστός του μαστού ρυθμίζεται από αυτές τις ορμόνες και τους υποδοχείς τους, δεν είναι περίεργο που τα κακοήθη κύτταρα που προέρχονται από αυτό τον ιστό μπορούν επίσης να εκφράζουν υποδοχείς πολλών από αυτές τις ορμόνες και διατηρούν κάποιο βαθμό ορμονικής εξάρτησης.

Οι υποδοχείς οιστρογόνων ανήκουν στην υπερ-οικογένεια των στεροειδικών υποδοχέων και λειτουργικά αποτελούν στεροειδοεξαρτώμενους παράγοντες μεταγραφής



(168). Έχουν βρεθεί δύο γονίδια που κωδικοποιούν την παραγωγή των οιστρογονικών υποδοχέων το ESRA (169) που κωδικοποιεί τον ERα και το ESRB που κωδικοποιεί τον ERβ (170), ενώ έχουν βρεθεί άλλα 3 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με σημαντική ομολογία με τους υποδοχείς οιστρογόνων. Στο φυσιολογικό μαστό αλλά και στον καρκίνο του μαστού έχουν βρεθεί και οι δύο μορφές αν και ERβ έχουν βρεθεί σε ποσοστό μικρότερο από τους ERα (171).

Πολλαπλές διαφορετικές παραλλαγές των ERα και ERβ έχουν βρεθεί στο φυσιολογικό μαστό, σε καρκινικές σειρές του μαστού και στους όγκους του μαστού. Οι παραλλαγές αυτές είναι λειτουργικές και συχνά έχουν ανταγωνιστική δράση μεταξύ τους, και ορισμένες από αυτές θεωρείται πιθανό ότι σχετίζονται με την ορμονοαπάντηση των όγκων (172). Μια σειρά μεταλλάξεις έχουν παρατηρηθεί στα γονίδια των οιστρογονικών υποδοχέων ορισμένες από τις οποίες έχουν σαν αποτέλεσμα τη σύνθεση υποδοχέων που είναι ενεργοί χωρίς τη σύνδεση των οιστρογόνων. Οι μορφές αυτές εμφανίζονται σε όγκους και γνωστές καρκινικές σειρές που με τις κλασικές μεθόδους ανίχνευσης εμφανίζονται να μην έχουν οιστρογονικούς υποδοχείς. Η δράση ορισμένων από τους υποδοχείς αναστέλλεται από τα αντι-οιστρογόνα και έτσι πιθανά ερμηνεύεται το φαινόμενο της απάντησης σε αντι-οιστρογονική θεραπεία ενός ποσοστού από τους θεωρούμενους ως μη εξαρτώμενους όγκους (173).

Παρά την εκτενή μελέτη που έχει γίνει σε μεγάλες σειρές ασθενών, η προσπάθεια συσχέτισης της παρουσίας ή όχι των οιστρογονικών υποδοχέων (ER+ έναντι ER-) με την πρόγνωση δεν έχει δείξει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων. Οι περισσότερες μελέτες σημειώνουν μια μικρή αλλά υπαρκτή διαφορά στο ελεύθερο νόσου διάστημα και στη συνολική επιβίωση υπέρ των ασθενών με θετικούς υποδοχείς. Η κύρια χρησιμότητα του προσδιορισμού των ER είναι η σημασία τους ως προβλεπτικών παραγόντων για την ανταπόκριση στην ορμονική θεραπεία.

Η μέτρηση της συγκέντρωσης των υποδοχέων προγεστερόνης, που καθορίζουν την ανταπόκριση των κυττάρων του μαστού στις προγεστίνες, χρησιμοποιείται σαν συμπληρωματικός δείκτης των υποδοχέων οιστρογόνων σε σχέση με την πρόγνωση και την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στην ορμονοθεραπεία (174). Έχει αναφερθεί πως οι όγκοι που είναι αρνητικοί για υποδοχείς προγεστερόνης έχουν χειρότερη πρόγνωση και



μειωμένη ανταπόκριση στην ορμονοθεραπεία κυρίως ανάμεσα στους όγκους που είναι αρνητικοί για υποδοχείς οιστρογόνων (174,175,176).

Η συγκεντρωτική ανάλυση των αποτελεσμάτων από 133 τυχαιοποιημένες μελέτες που έγινε από το Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group (EBCTG) το 1998 (177), έδειξε ότι η χορήγηση του αντιοιστρογόνου ταμοξιφένη σε ασθενείς με θετικούς υποδοχείς οιστρογόνων μειώνει τις πιθανότητες υποτροπής κατά 26% και θανάτου κατά 25% ανά έτος. Αντίστοιχα ποσοστά μείωσης υποτροπών και θανάτου αναφέρονται και με τη μαστεκτομή στους ασθενείς <50 χρόνων. Επίσης διαπιστώθηκε ότι η ταμοξιφένη μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου στον άλλο μαστό κατά 39%. Όσον αφορά την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία, η τελευταία αναδρομική ανάλυση του EBCTG το 1998 (178) δε διαπιστώνει σημαντικές διαφορές στην ανταπόκριση μεταξύ ασθενών με θετικούς και αρνητικούς υποδοχείς.

### *III.2.στ. Διήθηση των λεμφαδένων*

Ο καλύτερα τεκμηριωμένος και ευρύτερα χρησιμοποιούμενος προγνωστικός δείκτης στον καρκίνο του μαστού είναι η ύπαρξη ή όχι καθώς και ο αριθμός των διηθημένων επιχώριων λεμφαδένων. Οι γυναίκες που έχουν καρκίνο του μαστού και δεν εμφανίζουν διήθηση των μασχालιαίων λεμφαδένων έχουν 70-80% πιθανότητες να επιβιώσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα (10-15 χρόνια) χωρίς εμφάνιση μεταστάσεων, ενώ ασθενείς με θετικούς για διήθηση λεμφαδένες έχουν 80% πιθανότητα για εμφάνιση απομακρυσμένων μεταστάσεων μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Και στις δύο κατηγορίες εμφανίζονται διαφοροποιήσεις όσον αφορά το χρόνο επιβίωσης χωρίς μεταστάσεις και το συνολικό χρόνο επιβίωσης (179). Επίσης όσο μεγαλύτερος είναι αυτός ο αριθμός των διηθημένων λεμφαδένων, τόσο αυξάνονται οι πιθανότητες υποτροπής και μειώνεται η συνολική επιβίωση (180,181,182). Παρόλο που η διήθηση των λεμφαδένων είναι ακόμα ο περισσότερο χρησιμοποιούμενος προγνωστικός δείκτης, ένα ποσοστό 15-45% ασθενών που δεν παρουσιάζουν μεταστάσεις στους λεμφαδένες πεθαίνει ενώ παράλληλα ένα ποσοστό μέχρι 15% ασθενών με διήθηση στους λεμφαδένες επιβιώνει. Εξαιτίας αυτού του περιορισμού, γίνεται προσπάθεια για την εύρεση και άλλων προγνωστικών δεικτών, κυρίως σε ασθενείς που δεν εμφανίζουν μετάσταση στους λεμφαδένες.



### **III. 3. Μεταβολές του γονιδιώματος – Ο καρκίνος του μαστού ως γενετική νόσος**

Μετά τις προτάσεις του Boveri έναν αιώνα πριν, πρόσφατα πειραματικά δεδομένα έχουν επιβεβαιώσει ότι η μοριακή βάση του καρκίνου στον άνθρωπο είναι δομικές και/ή λειτουργικές αλλοιώσεις συγκεκριμένων γονιδίων, των οποίων η φυσιολογική λειτουργία είναι να ελέγχουν την κυτταρική αύξηση και τη διαφοροποίηση (183,184). Οι μηχανισμοί της κυτταρικής διαίρεσης, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης είναι παρόμοιες στα φυσιολογικά και τα καρκινικά κύτταρα. Οι διαφορές μεταξύ τους οφείλονται στην απουσία ή λανθασμένη λειτουργία ρυθμιστικών μηχανισμών στην περίπτωση του καρκινικού κυττάρου.

#### **III. 3. α. Ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια**

Ο προσδιορισμός και ο χαρακτηρισμός γενετικών στοιχείων που παίζουν ρόλο στην παθογένεση του καρκίνου στον άνθρωπο επετεύχθη με την ανάπτυξη τεχνικών ανασυνδυασμού του DNA τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Μία σημαντική τεχνική ήταν αυτή της επιμόλυνσης, που βοήθησε στην αποσαφήνιση της δράσης των ιικών ογκογονιδίων. Τα τελευταία έχουν χαρακτηριστεί ως γενετικά στοιχεία ικανά να δίνουν ογκογενείς ιδιότητες σε RNA ιούς γνωστούς ως ρετροϊούς (185,186). Στη συνέχεια με τη βοήθεια αυτής της τεχνικής βρέθηκαν γονίδια κυτταρικής διαφοροποίησης μη ιικής προέλευσης. Σε φυσιολογικά κύτταρα αυτά τα γενετικά στοιχεία ιικής (ή μη) προέλευσης ονομάστηκαν *πρωτοογκογονίδια*, ενώ όταν παρουσιάζουν αλλοιώσεις χαρακτηρίζονται *ογκογονίδια*, όπως στην περίπτωση του καρκίνου (187,188). Η 2η πειραματική προσέγγιση αφορά τον προσδιορισμό κυτταρογενετικών ανωμαλιών στα καρκινικά κύτταρα, κυρίως αυτά του αιμοποιητικού συστήματος. Πολλά ογκογονίδια έχουν εντοπιστεί με μοριακή κλωνοποίηση σε σημεία θραύσης των χρωμοσωμάτων που περιλαμβάνουν μετατοπίσεις, αναστροφές και σημειακές μεταλλάξεις τμημάτων του γενετικού υλικού και σε περιοχές γονιδιακής ενίσχυσης. Τα προϊόντα των ογκογονιδίων είναι συχνά αυξητικοί παράγοντες ή υποδοχείς τους και μεταγραφικοί παράγοντες. Τα ογκογονίδια που εκφράζονται στον καρκίνο του μαστού συμπεριλαμβάνουν μέλη της





οικογένειας *myc* και *gas* (*c-myc*, *H-gas-1*), και τα μέλη της οικογένειας των υποδοχέων EGF (EGFR, *erbB*), συμπεριλαμβάνοντας *erbB2* (HER2 ή *neu*), HER3, HER4.

Η εντόπιση χρωμοσωμικών ελλείψεων είναι καθοριστική στη διαδικασία του προσδιορισμού και της κλωνοποίησης μιας ακόμη κατηγορίας γονιδίων που συνδέονται με τον καρκίνο, τα *ογκοκατασταλτικά* γονίδια. Σε αντίθεση με τα ογκογονίδια που ενεργοποιούνται με επικρατείς μεταλλάξεις και των οποίων η δραστηριότητα είναι να ενεργοποιούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια συμπεριφέρονται σαν αναστολείς του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα φυσιολογικά κύτταρα και δεν εκφράζονται στα καρκινικά. Συνήθως, οι μεταλλάξεις που απενεργοποιούν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι υπολειπόμενου τύπου (189).

Μελέτες σε διάφορους τύπους καρκίνου οδηγούν σε ανακάλυψη καινούργιων υποψηφίων ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Πρόσφατα δεδομένα πάνω σε μια έλλειψη στη χρωμοσωμική περιοχή 3p14.2 δίνουν σοβαρές ενδείξεις για την ύπαρξη ενός νέου ογκοκατασταλτικού γονιδίου, του *FHIT* (190). Το γονίδιο αυτό απενεργοποιείται με έλλειψη σε καρκινικές κυτταρικές σειρές και πρωτογενείς όγκους του πνεύμονα (191), της κεφαλής και του λαιμού (192), του μαστού (193), του στομάχου και του εντέρου (194) και άλλων οργάνων, ενώ πιστεύεται ότι ενέχεται στην καρκινογένεση (195).

Πρόσφατα μια τρίτη κατηγορία γονιδίων που συνδέονται με τον καρκίνο προσδιορίστηκε χάρη στην ανάλυση όγκων ειδικού τύπου, όπως όγκοι στους οποίους ένα κληρονομούμενο μεταλλαγμένο γονίδιο παίζει σημαντικό ρόλο. Τα γονίδια που ενέχονται σ' αυτή την κατηγορία αναφέρονται σαν μεταλλαξιγόνα ή γονίδια που εμπλέκονται στη διόρθωση του DNA-mismatch repair. Παρόλο που δεν συνδέονται άμεσα με τη διαδικασία της καρκινογένεσης, αυτά τα γονίδια όταν απενεργοποιούνται εκθέτουν τα κύτταρα σε υψηλό κίνδυνο μεταλλάξεων, που ενδεχομένως να ενέχονται στην ενεργοποίηση των ογκογονιδίων και την απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (196).

Ανεξάρτητα από τη μεγάλη ετερογένεια που παρατηρείται, ισχύει για τον καρκίνο του μαστού όπως και για την πλειοψηφία των καρκινωμάτων ότι συγκεκριμένες μοριακές αλλαγές ευθύνονται για την εξαλλαγή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό. Η



συσσώρευση αυτών των γενετικών αλλαγών έχουν σαν αποτέλεσμα συγκεκριμένες μεταβολές στη φυσιολογία και τη δομή του κυττάρου που το καθιστούν καρκινικό.

Είναι φανερό πως οι αλλαγές αυτές μαζί με άλλες που δε γίνονται αντιληπτές με την κυτταρογενετική ανάλυση έχουν σαν αποτέλεσμα τη μεταβολή της λειτουργίας ενός σημαντικού αριθμού γονιδίων από τα οποία ορισμένα μόνο έχουν περιγραφεί (197). Τα γονίδια αυτά συμμετέχουν σε διάφορες λειτουργίες του κυττάρου π.χ. πολλαπλασιασμό, έλεγχο κυτταρικού κύκλου, μεταφορά μηνυμάτων κ.λ.π. Μία σειρά από τις αλλαγές που παρατηρούνται στα διηθητικά καρκινώματα εμφανίζονται και σε στάδια της νόσου που θεωρούνται πρώιμα καθώς και σε καλοήθεις νόσους του μαστού (198-201). Για παράδειγμα η έλλειψη του 16q και 17p έχει περιγραφεί στην άτυπη υπερπλασία και οι ελλείψεις αυτές όπως και άλλες που είναι συχνές στο διηθητικό καρκίνωμα (6p, 7p, 8p, 9p, 11p, 17p) έχουν βρεθεί και σε *in situ* καρκινώματα (202). Υπάρχουν επίσης στοιχεία που δείχνουν πως αυτές όπως και άλλες γενετικές βλάβες εμφανίζονται στα πρώιμα στάδια της νόσου και διατηρούνται σ'όλη τη διάρκεια της εξέλιξής της (202). Για παράδειγμα η επέκταση του *c-myc* έχει διαπιστωθεί σε καρκινώματα *in situ* και σε παρακείμενο διηθητικό καρκίνωμα ή η υπερέκφραση του *c-erbB2* και της κυκλίνης D1 καθώς και μεταλλάξεις στο p53 έχουν καταγραφεί σε καρκινώματα *in situ*, σε παρακείμενο διηθητικό καρκίνωμα και στη μετάσταση (203).

Αντίστοιχα, συγκεκριμένες μεταλλάξεις του p53 εμφανίζονται σε όλα τα στάδια εξέλιξης της νόσου και ταυτόχρονα ο αριθμός των κυττάρων που τις φέρουν αυξάνει όσο εξελίσσεται σε διηθητική μορφή, ενώ η έκφραση του *bcl-2* μειώνεται. Σε επίπεδο χρωμοσωμικών αλλαγών υπάρχουν αλλοιώσεις που εμφανίζονται σε προκαρκινικές καταστάσεις και ταυτόχρονα και σε πιο εξελιγμένα στάδια της νόσου όπως οι *del(1;16)q10;p10*, *del(3p)*, *del(6p)* (204-206), ενώ υπάρχουν και αλλαγές που εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα σε ορισμένα στάδια όπως έλλειψη του 6q και του 16q σε μη μεταστατικούς όγκους και η έλλειψη του 18 σε μεταστατικούς όγκους (207). Σε γενικές γραμμές οι γενετικές αλλαγές στον καρκίνο του μαστού συμβαίνουν αρκετά νωρίς – τα *in situ* καρκινώματα εμφανίζουν τις περισσότερες από τις αλλαγές που παρατηρούνται στα διηθητικά και τα μεταστατικά καρκινώματα και οι αλλαγές αυτές διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα σε κλινικά όμοιους όγκους (208).



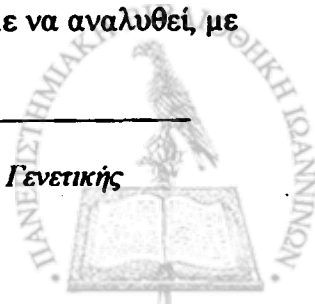
Οι πιο συχνές επίκτητες βλάβες που παρατηρούνται στον καρκίνο του μαστού αφορούν μεγάλες ελλείψεις ή και προσθήκες του γενετικού υλικού. Η μεγάλη πλειοψηφία των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού εμφανίζει πολλαπλά παραδείγματα τέτοιων βλαβών. Έχουν περιγραφεί τουλάχιστον 11 διαφορετικές ανωμαλίες που παρατηρούνται επανειλημμένα στον καρκίνο του μαστού, είτε μεμονωμένες σαν μοναδικές ανωμαλίες, είτε ταυτόχρονα σαν τμήμα πιο σύνθετων ανωμαλιών (209,210). Αυτές περιλαμβάνουν τις δομικές ανωμαλίες  $der(1;16)(q10;p10)$ ,  $i(1)(q10)$ ,  $del(1)(q11-12)$ ,  $del(1)(q42)$ ,  $del(3)(p12-13 p14-21)$ ,  $der(16)(q21-22)$  και τις αριθμητικές αλλαγές +7, +8, +12, +18, +20. Οι πιο συχνές χρωμοσωμικές ανισορροπίες είναι η εμφάνιση πρόσθετων χρωμοσωμάτων ή τμημάτων σκελών τους όπως των 19, 7, 8 και 20 και ελλείψεις του X, 1p, 1q, 3p, 6q, 8p, 11p, 11q, 13q, 16q, 17p, 19p, 19q και 22.

### III. 3. β. Μεθοδολογική προσέγγιση προσδιορισμού των γενετικών ανωμαλιών

Τεχνικές μοριακής γενετικής, όπως ο φθορίζων *in situ* υβριδισμός (Fluorescent In Situ Hybridization: FISH), ο συγκριτικός γενωμικός υβριδισμός (Comparative Genomic Hybridization) και ο πολυχρωματικός φθορίζων υβριδισμός (Multi-color FISH: M-FISH) επιτρέπουν μια πολύ καλή μεθοδολογική προσέγγιση για την ανάλυση των γενετικών ανωμαλιών.

Ο φθορίζων υβριδισμός 'επιλεγμένων στόχων', με τη χρήση ενός ή περισσότερων ανιχνευτών δίνει απαντήσεις σε προεπιλεγμένα ερωτήματα με ναι ή όχι, για την ύπαρξη συγκεκριμένων κάθε φορά αριθμητικών ή δομικών ανωμαλιών. Με αυτή την προσέγγιση μπορούμε να προσδιορίσουμε ακριβέστερα, από ότι με την κλασσική κυτταρογενετική, δομικές ανακατατάξεις. Επιπλέον, μπορούμε να μελετήσουμε το γενετικό υλικό των κυττάρων που βρίσκονται στη μεσόφαση, ενώ η κλασσική κυτταρογενετική προυποθέτει την ύπαρξη μεταφάσεων.

Ο συγκριτικός γενωμικός υβριδισμός δίνει τη συνολική εικόνα των γενετικών ανακατατάξεων που υπάρχουν σε όλα τα χρωμοσώματα στην *in vivo* κατάσταση, όμως μόνο των μη ισοζυγισμένων (πλεόνασμα ή έλλειψη γενετικού υλικού). Πρόκειται για μια εφαρμογή του ανάστροφου *in situ* υβριδισμού, που συνίσταται στην *in situ* υβριδοποίηση πολύπλοκων ανιχνευτών DNA που προέρχονται από ιστό που θέλουμε να αναλυθεί, με



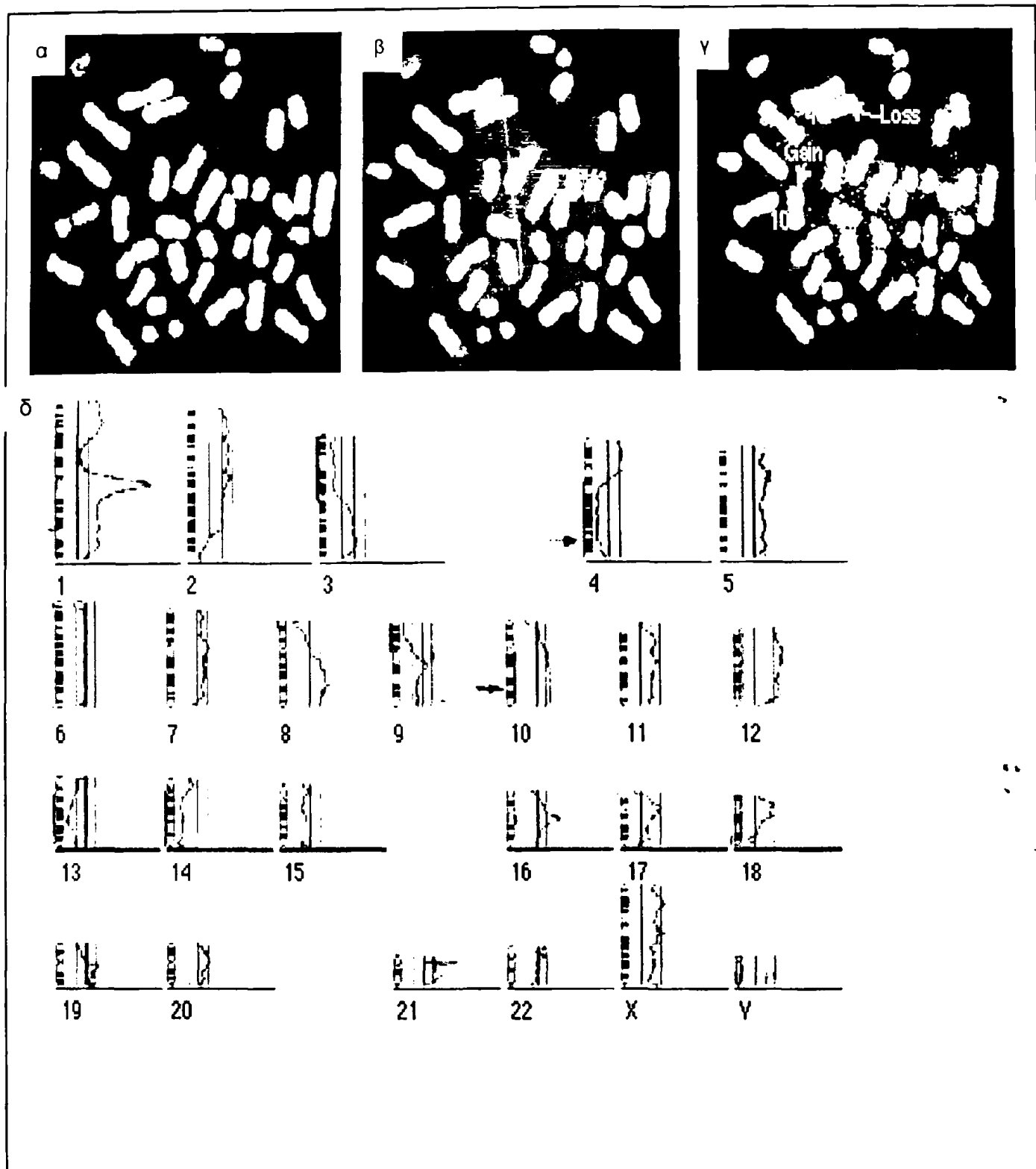
φυσιολογικά χρωμοσώματα αναφοράς. Η τεχνική αυτή εντοπίζει αλλαγές που προέρχονται από αύξηση ή μείωση ολόκληρων χρωμοσωμάτων ή τμημάτων τους μέσα στο κύτταρο. Χρωμοσώματα ή χρωμοσωμικά τμήματα με ενισχυμένο ή ελαττωμένο πηλίκιο (ratio) φθορίζουσας έντασης δηλώνουν αύξηση ή μείωση του αριθμού αντιγράφων τους με αναφορά το φυσιολογικό. Η CGH προσέγγιση αφενός μεν συνέβαλε στην περαιτέρω πιστοποίηση γενετικών ανακατατάξεων που είχαν ανιχνευθεί με την κυτταρογενετική, αφετέρου δε πρόσθεσε νέα δεδομένα. Ένα από τα σημαντικότερα ευρήματα αυτής της προσέγγισης ήταν ο εντοπισμός μιας νέας περιοχής με γονιδιακή επέκταση στον καρκίνο του μαστού που δεν είχε εντοπιστεί με τις μέχρι τότε συνήθεις προσεγγίσεις. Βρέθηκε ότι στην περιοχή 20q13 συνέβαινε γονιδιακή επέκταση σε πολλά καρκινώματα του μαστού (210) καθώς και ότι οι συχνότερα εντοπιζόμενες περιοχές με γονιδιακή επέκταση στον καρκίνο του μαστού τοποθετούνται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 8, όπου μεταξύ άλλων γονιδίων τα οποία μέχρι σήμερα δεν γνωρίζουμε, βρίσκεται και το γονίδιο *c-myc* ένα από τα γονίδια που έχει ήδη ενοχοποιηθεί για τον καρκίνο του μαστού. Οι περισσότερες μελέτες στον καρκίνο του μαστού, δείχνουν ότι οι πιο συχνές γονιδιακές ενισχύσεις αφορούν τα χρωμοσώματα 1 και 8 (210). Άλλες χρωμοσωμικές περιοχές που έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα είναι οι 17q, 8p, 16p, 6p, 7q, 10p και 11q, με μικρότερη όμως συχνότητα. Στον καρκίνο του μαστού εκτός από τις γονιδιακές ενισχύσεις, έχουν ήδη αναφερθεί και πολλαπλές ελλείψεις γενετικού υλικού, γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση ότι στην ανάπτυξη του όγκου ενέχεται και η παράλληλη απώλεια πολλών ογκοκατασταλτικών γονιδίων (210). Σύμφωνα με κυτταρογενετικές μελέτες, συχνές ανακατατάξεις έχουν αναφερθεί στο 16q.

Ο πολυχρωματικός φθορίζων υβριδισμός χρησιμοποιώντας διαφορετικά χρώματα ή ψευδοχρώματα (όσα και τα χρωμοσώματα) επιτρέπει τον προσδιορισμό πολύπλοκων ανακατατάξεων ακόμη και των μη ισοζυγισμένων, όμως μειονεκτεί σε σχέση με το CGH γιατί προϋποθέτει καλλιέργεια των κυττάρων (*in vitro* προσέγγιση) και επίσης είναι απαραίτητη η μιτωτική δραστηριότητα, η οποία δεν είναι πάντοτε εφικτή. Από την άλλη, με δεδομένο ότι οι περισσότερες γενετικές ανωμαλίες στα επιθηλιακά καρκινώματα είναι μη ισοζυγισμένες (211,212), η τεχνική της CGH προσφέρει πολύτιμες πληροφορίες στη μελέτη καρκινωμάτων όπως αυτά του μαστού.



Όλες οι παραπάνω τεχνικές είναι ιδανικές για τη μελέτη μεταθέσεων όταν μάλιστα οι αντίστοιχες περιοχές δεν έχουν ήδη κλωνοποιηθεί. Όμως είναι ακατάλληλες για τη μελέτη έλλειψης ετεροζυγωτίας, καθότι δεν είναι δυνατή η παρατήρηση της απώλειας ενός μόνο αλληλόμορφου. Σε τέτοιες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται τεχνικές της μοριακής βιολογίας, όπως Southern blotting, heterodublex analysis κ.α. που δίνουν τη δυνατότητα ανίχνευσης γενετικών αλλαγών ακόμα και σε ένα μόνο αλληλόμορφο.





Εικόνα 2: Συγκριτικός γενωμικός υβριδισμός. Α) Μετάφαση δείγματος προς εξέταση (όγκος μαστού), επεξεργασία με πράσινο ιχνηθέτη β) Μετάφαση δείγματος αναφοράς, επεξεργασία με κόκκινο ιχνηθέτη γ) σύνθετη εικόνα που προκύπτει μετά από υβριδισμό των γενετικών υλικών που αντιστοιχούν στις παραπάνω μεταφάσεις (συνδυασμός τριών επιμέρους χρωματισμών, επεξεργασία με DAPI, κόκκινο και πράσινο ιχνηθέτη) δ) αποτέλεσμα ανάλυσης με CGH, με πράσινο χρώμα συμβολίζονται οι γενετικές ενισχύσεις και με κόκκινο οι γενετικές ελλείψεις

## ***IV. Η θεωρία της πολυσταδιακής καρκινογένεσης***

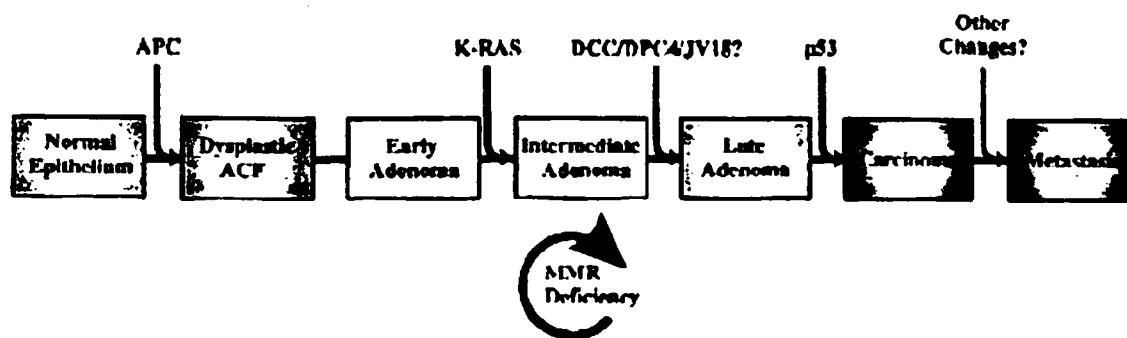
---

### ***IV. α. Μοντέλα καρκινογένεσης***

Η θεωρία για την καρκινογένεση, όπως διαμορφώθηκε έως σήμερα, βασίζεται κυρίως σε πειραματικά μοντέλα και παρουσιάζει τη συγκεκριμένη διαδικασία να αποτελείται από τρία βασικά στάδια (πολυσταδιακή διαδικασία): Εναρξη – Προώθηση και Εξέλιξη.

Τα διάφορα στάδια της καρκινογένεσης στον άνθρωπο μπορεί να μελετηθούν μόνο έμμεσα. Μελέτες στις οποίες αναλύονται περιστατικά καρκίνου σε σχέση με την ηλικία υποδεικνύουν, ότι τέσσερα ως έξι ανεξάρτητα βήματα είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη του όγκου (2113,214). Η άποψη αυτή ενισχύθηκε από κυτταρογενετικές και μοριακές μελέτες των νεοπλασματικών κυττάρων, που έδειξαν ότι τη χρονική στιγμή της ανάλυσης των όγκων οι γενετικές αλλαγές που εντοπίζονται είναι όχι μία αλλά πολλαπλές, οπότε συμφωνούν με τη θεωρία της πολυσταδιακής καρκινογένεσης (215-219). Μέχρι και σήμερα διάφορα μοντέλα έχουν προταθεί που συνδέουν την καρκινογένεση με σταδιακές αλλαγές στο γενετικό υλικό των κυττάρων. Από αυτά το πλέον παραδεκτό αν και με τροποποιήσεις είναι αυτό που πρότειναν για το παχύ έντερο οι Fearon and Vogelstein το 1990 (216). Σύμφωνα με το εν λόγω μοντέλο, ο τελικός μετασχηματισμός του ομαλού επιθηλίου σε καρκίνωμα οφείλεται σε μία αλληλουχία γενετικών αλλαγών στα γονίδια APC, K-RAS, DCC, P53, υποδηλώνοντας ότι ο καρκίνος είναι συνέπεια πολλαπλών γενετικών αλλαγών (σχήμα 3).





**Σχήμα 3:** Γενετικές ανωμαλίες που συνδέονται με την καρκινογένεση του καρκίνου του εντέρου. Η δημιουργία νεοπλασματος ξεκινά με μεταλλάξεις στο γονίδιο APC, ενώ η εξέλιξη του όγκου προέρχεται από μεταλλάξεις σε άλλα γονίδια (που αναγράφονται στο σχήμα). Ασθενείς που κληρονομούν μεταλλάξεις στο APC εμφανίζουν δυσπλαστικές κρυπτικές θέσεις (ACF), ορισμένες από τις οποίες προχωρούν καθώς αποκτούν περισσότερες μεταλλάξεις, όπως φαίνεται στο σχήμα, ενώ η απώλεια σε MMR επιταχύνει τη διαδικασία. Το *k-ras* είναι ένα ογκογονίδιο που χρειάζεται μόνο μία γενετική αλλαγή για την ενεργοποίησή του. Τα υπόλοιπα γονίδια που αναγράφονται είναι ογκοκατασταλτικά που απαιτούν δύο γενετικά συμβάντα (ένα σε κάθε αλληλόμορφο) για την παύση της ενεργότητάς τους. Το χρωμόσωμα 18q21 μπορεί να περιλαμβάνει πολλά διαφορετικά ογκοκατασταλτικά γονίδια που παίζουν κάποιον ρόλο στη νεοπλασία του εντέρου. Τα *DCC*, *DPC4*, και *JV18-1* είναι μερικά από τα υποψήφια. Η ποικιλία των γενετικών ανωμαλιών που παρουσιάζεται σε διάφορες περιπτώσεις μπορεί να οφείλεται στη βιολογική ετερογένεια και τα κλινικά χαρακτηριστικά του κάθε ασθενή ξεχωριστά. (σχήμα από **Kenneth W. Kinzler and Bert Vogelstein Cell (87) 159–170, 1996**).

Η βασική αυτή άποψη, δηλαδή ότι ο καρκίνος δημιουργείται όχι από ένα αλλά από πολλαπλά γενετικά συμβάντα ήταν αποτέλεσμα *in vivo* παρατηρήσεων. Πολύ πρόσφατα επετεύχθη και η πειραματική τεκμηρίωση. Ο Lundberg και οι συνεργάτες του για πρώτη φορά κατάφεραν να μετατρέψουν ομαλά ανθρώπινα κύτταρα σε καρκινικά, μέσα σε φιάλες καλλιέργειας μέσω του συνδυασμού γενετικών αλλαγών (220).

Ένα ερώτημα βέβαια το οποίο ανακύπτει είναι, ποιες από τις ανιχνευόμενες γενετικές ανωμαλίες στους όγκους είναι απαραίτητες για την έναρξη του σχηματισμού του όγκου (πρωτογενείς αλλαγές) και ποιες εμφανίζονται στην πορεία της εξέλιξης του (δευτερογενείς αλλαγές). Οι πρωτογενείς αλλαγές αντιπροσωπεύουν καθοριστικά (gate limiting) βήματα για την εγκαθίδρυση του νεοπλασματος και συχνά είναι συγκεκριμένες για ειδικούς τύπους όγκων. Οι δευτερογενείς αλλαγές προκύπτουν σε επόμενα στάδια μέσω κλωνικής εξέλιξης και μπορεί να είναι ενορχηστρωτές για τη δημιουργία προχωρημένων φαινοτυπικών αλλαγών που χαρακτηρίζουν τους όγκους (221-223).



Παρότι οι πολλαπλές γενετικές αλλαγές των νεοπλασματικών κυττάρων εμφανίζονται σε κάποιες περιπτώσεις με επιλεκτική σειρά διαδοχής, αυτό που καθορίζει τα βιολογικά χαρακτηριστικά του όγκου είναι το σύνολο των αλλαγών και όχι η σειρά της διαδοχής τους (215,216,224).

Σε ανθρώπινα κύτταρα η ταχύτητα των αυθαίρετων μεταλλάξεων έχει εκτιμηθεί περίπου σε  $2 \cdot 10^{-7}$  ανά γονίδιο σε κάθε κυτταρική διαίρεση (133). Επειδή αυτή η τιμή είναι ανεπαρκής για να δικαιολογήσει τον υψηλό αριθμό των μεταλλάξεων που ανιχνεύονται σε πολλά νεοπλάσματα, διατυπώθηκε η άποψη ότι τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν ένα μεταλλακτικό φαινότυπο που προκαλείται από την απενεργοποίηση γονιδίων που μετέχουν στην αντιγραφή, επιδιόρθωση του DNA ή στο χρωμοσωμικό διαχωρισμό (225,226). Η αυξημένη μεταλλαξιμότητα των νεοπλασματικών κυττάρων μπορεί επίσης να αποδοθεί στην διαρκή παρουσία ενός καρκινογόνου ή στην ύπαρξη διατροφικών ελλείψεων στο περιβάλλον του όγκου λόγω ανεπαρκούς παροχής αίματος (226).

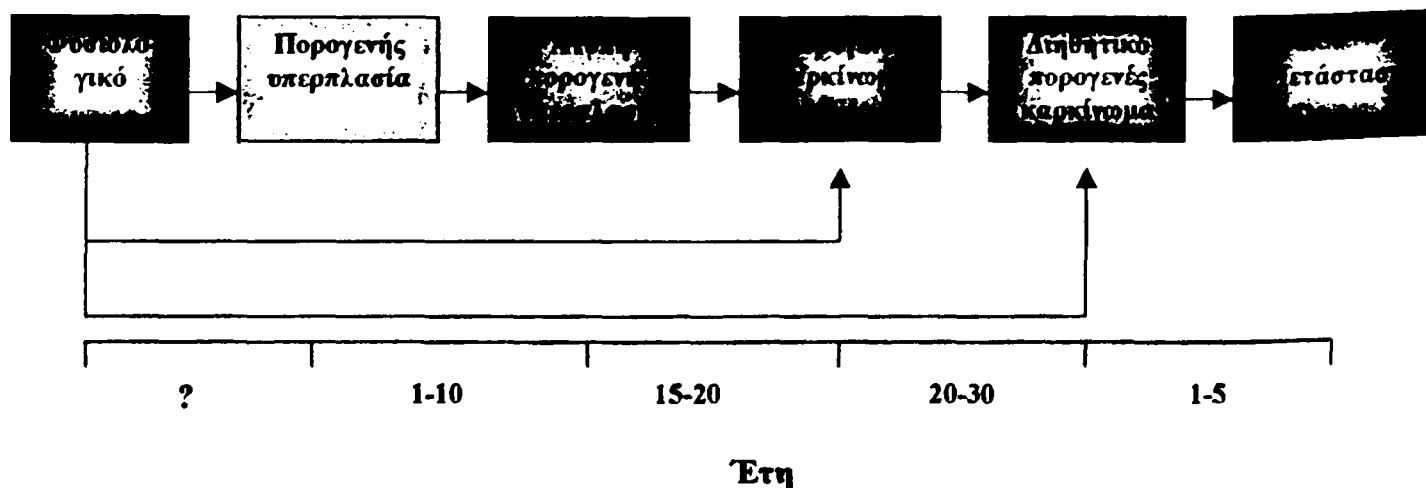
Σημειώνεται ότι εκτός από την προοδευτική αύξηση της ετερογένειας της γενετικής του σύστασης (γενετική απόκλιση), ένας νεοπλασματικός κυτταρικός πληθυσμός μπορεί προοδευτικά να γίνει περισσότερο ομογενής (γενετική σύγκλιση) ή και να διατηρήσει τη γενετική του σύσταση σταθερή (227). Ποιο χαρακτηριστικό κυριαρχεί κάθε στιγμή σε ένα νεόπλασμα εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ δύο ανταγωνιζόμενων δυνάμεων: *της γονιδιακής αστάθειας που διευκολύνει την εμφάνιση της βιολογικής ποικιλότητας και της πίεσης της Δαρβινικής επιλογής που κρίνει ποιοι από τους εμφανιζόμενους υποκλώνους είναι περισσότερο ικανοί να επιβιώσουν σε κάθε δεδομένη στιγμή.*

#### **IV.β. Υπάρχει μοντέλο καρκινογένεσης στον καρκίνο του μαστού;**

Στο μαστό η μεγάλη πλειοψηφία των νεοπλασμάτων είναι καρκινώματα, δηλαδή κακοήθεις όγκοι του επιθηλίου. Αν εξαιρέσουμε τον κληρονομούμενο τύπο που αποτελεί μόνο το 10% των συνολικών περιπτώσεων, ο καρκίνος του μαστού είναι μια πολύπλοκη και ετερογενής ασθένεια σε κλινικό και βιολογικό επίπεδο. Παρόλη την ετερογένεια που παρουσιάζει όμως, η φυσική εξέλιξη των καρκινωμάτων του μαστού διαγράφεται μέσα



από διαδοχικά κλινικά και παθολογικά στάδια. Με βάση τις διάφορες ιστολογικές παρατηρήσεις θεωρείται ως μια πολυσταδιακή διαδικασία και ακολουθεί μια συγκεκριμένη σειρά γεγονότων (228,229), όπως είναι γνωστό από άλλες κακοήθειες. Στον ανθρώπινο μαστό η πορογενής υπερπλασία και η άτυπη πορογενής υπερπλασία αντιστοιχεί στα αρχικά στάδια της νεοπλαστικής αύξησης και προχωρεί προοδευτικά σε πορογενές καρκίνωμα *in situ*, διηθητικό πορογενές καρκίνωμα και πιθανώς μετάσταση, όπως επίσης φυσιολογικά κύτταρα μπορούν να δώσουν πορογενές καρκίνωμα *in situ* ή διηθητικό (σχήμα 4). Ο χρόνος που απαιτείται για αυτές τις εξαλλαγές είναι πολύ δύσκολο να καθοριστεί, από τη στιγμή που κατά τη διάρκεια της πολυσταδιακής αυτής διαδικασίας άγνωστοι παράγοντες μπορεί να σταματήσουν την εξέλιξη της και οι υπερπλαστικές αλλοιώσεις να υποχωρήσουν και ποτέ να μην οδηγηθούν σε κακοήγη εξαλλαγή. Εντούτοις, ενώ οι περισσότεροι ερευνητές αναγνωρίζουν τα πορογενή καρκινώματα *in situ* ως μη υποχρεωτική προ-αλλοίωση, οι υπερπλασίες και τα λοβιακά *in situ* καρκινώματα αντιμετωπίζονται περισσότερο ως δείκτες κινδύνου παρά ως πρώιμα στάδια ενός μελλοντικού διηθητικού καρκίνου του μαστού (230,231).



Σχήμα 4: Προτεινόμενο μοντέλο καρκινογένεσης *in vivo* για τον καρκίνο του μαστού στον άνθρωπο (από Russo J., Barnabs N., Higgy N. Et al, (229))

Έχει παρατηρηθεί κατά την εξέταση παρασκευασμάτων μαστεκτομής ότι συνυπάρχουν περιοχές με όλες τις εναλλαγές από την καλοήγη υπερπλασία των πόρων μέχρι την άτυπη ή οριακή κατάσταση όπου η διαγνωστική δυσκολία είναι μεγάλη και η

διάγνωση βασίζεται σε ένα μεγάλο ποσοστό σε υποκειμενικά κριτήρια. Σημειώνεται ότι παρατηρήθηκε πως το καρκίνωμα *in situ* προκύπτει μέσα ή στην ακτίνα των εστιών της άτυπης επιθηλιακής υπερπλασίας (232), και ο διηθητικός καρκίνος του μαστού όταν εμφανίζεται φαίνεται ότι εδράζεται στην ίδια περιοχή όπου είχε διαγνωσθεί με βιοψία το καρκίνωμα *in situ* (232).

Εκτός από τον κύριο όγκο, τουλάχιστον το 30% των γυναικών με καρκίνο του μαστού έχουν επιμέρους εστίες καρκινώματος (233). *Η πολυεστιακότητα και η αμφοτερόπλευρη* εντόπιση καρκίνου του μαστού σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση και μπορούν να εμφανισθούν συγχρόνως ή ετεροχρονισμένα. Ο κίνδυνος ανάπτυξης ενός καρκινώματος στον ετερόπλευρο μαστό μετά την θεραπεία ενός πρώτου όγκου αναφέρεται στο 1-2% ανά έτος (234,235). Η βιολογική σχέση μεταξύ των διαφορετικών όγκων που εμφανίζονται στον ίδιο ασθενή παραμένει αντιφατική, αφού μόνο με την ιστοπαθολογική εικόνα δεν είναι δυνατό να επιλυθεί το ερώτημα εάν αυτοί είναι αναπτυξιακά ανεξάρτητοι ή όχι (231,236,237).

Με στόχο να εξετασθεί η ύπαρξη ενός μοντέλου της πορείας εξέλιξης του καρκίνου του μαστού, μελετήθηκαν 3000 ασθενείς που υπέστησαν ριζική μαστεκτομή στο ίδιο νοσοκομειακό ίδρυμα. Η πορεία της υγείας τους παρακολούθηθηκε για 15 με 30 χρόνια. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει μεγάλος βαθμός συσχέτισης μεταξύ του ρυθμού πολλαπλασιασμού, του μεγέθους του όγκου κατά την στιγμή πρώτης διήθησης στους λεμφαδένες και του μεγέθους του όγκου κατά την εμφάνιση της πρώτης μετάστασης σε άλλο όργανο (238). Οι ερευνητές εκτιμούν ότι τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να χαρακτηρίσουν τον καρκίνο του μαστού ως μία ασθένεια με διαδοχικά στάδια ποικίλης χρονικής διάρκειας.

Πεδίο εκτεταμένης έρευνας στον καρκίνο του μαστού αποτελεί ο εντοπισμός της χρονικής στιγμής της μετάστασης (239,240). Κάποιοι μελετητές ισχυρίζονται ότι οι μεταστάσεις εμφανίζονται σε πολύ πρώιμα στάδια της πορείας της ασθένειας και ότι ο καρκίνος του μαστού θα έπρεπε να θεωρηθεί μια ασθένεια με συστηματική εξέλιξη μετά από την εμφάνισή της. Άλλοι βασίζόμενοι στη μείωση της θνησιμότητας, που προκύπτει



με σωστή παρακολούθηση και πρώιμη χειρουργική επέμβαση, δηλώνουν ότι οι καρκίνοι του μαστού μεθίστανται αργότερα (240).

Παρόλη την πληθώρα μοριακών και γενετικών αλλαγών που έχουν αναφερθεί για τον καρκίνο του μαστού στον άνθρωπο, η παθογενετική σημασία αυτών των γεγονότων σε σχέση με τα διάφορα στάδια κατά την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού είναι ακόμη πολύ λίγο κατανοητή. *Το βασικό ενδιαφέρον των ερευνητών ήταν και συνεχίζει να είναι η ικανότητα να διακρίνουν τις γενετικές ανωμαλίες που είναι κρίσιμες για την εμφάνιση του όγκου από εκείνες που είναι συνέπεια της γενετικής αστάθειας.*



**ΣΚΟΠΟΣ**  
**ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**



Παρά το γεγονός ότι ο καρκίνος του μαστού, ως ο συχνότερος όγκος της γυναίκας έχει μια ξεχωριστή σημασία, υπάρχει ακόμη σήμερα βασική δυσκολία στην κατανόηση της βιολογικής του συμπεριφοράς και των μηχανισμών που τη διέπουν. Ενώ υπάρχει μία πληθώρα νέων γενετικών (καταγραφή επαναλαμβανόμενων χρωμοσωμικών ανωμαλιών, γονιδιακών αλλαγών) και μοριακών δεδομένων (τελομεράση, πολυμεράση κ.α.) και η γνώση μας σαφώς είναι σημαντικά βαθύτερη από παλιότερα, εξακολουθεί και σήμερα η μετάσταση στους λεμφαδένες να αποτελεί το αξιολογότερο προγνωστικό στοιχείο. Ένα μοντέλο καρκινογένεσης αρκετά θεμελιωμένο όπως το μοντέλο των Fearon και Vogelstein για την καρκινογένεση στο παχύ έντερο, παρά τις διάφορες προτάσεις, για τον μαστό δεν έχει προς το παρόν τεκμηριωθεί.

Η κατάσταση αυτή οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι ο καρκίνος του μαστού αποτελεί μια εξαιρετικά πολύπλοκη συστηματική νόσο, που χαρακτηρίζεται από έντονη κλινικοπαθολογική εντός του όγκου αλλά και μεταξύ των όγκων ετερογένεια, αλλά και σε άλλα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, όπως στη διηθητικότητα, στη μεταστικότητα, στην πολυεστιακότητα και στην αμφοτεροπλευρότητα, αλλά και στο γεγονός της μετρίτητας ή/και επιλεκτικότητας των μεθοδολογικών προσεγγίσεων.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της κλινικοπαθολογικής εξέλιξης (από την έναρξη της νεοπλασματικής διαδικασίας ως τη μετάσταση), αλλά και των βασικών βιολογικών παραμέτρων διαμέσου των γενετικών ανακατατάξεων.

Ο βασικός αυτός σκοπός επιμερίζεται στα ακόλουθα ερωτήματα:

I. Γενετική πολυπλοκότητα (CGH). Υπάρχει κάποια συσχέτιση της γενετικής πολυπλοκότητας του όγκου με τους κλινικοπαθολογικούς χαρακτήρες; Μήπως κάθε διαφορετική γενετική και βιολογική συμπεριφορά χαρακτηρίζει ένα διαφορετικό ιστολογικό τύπο; Το γεγονός ότι διάφοροι ιστολογικοί τύποι μπορεί να σχετίζονται με διαφορετικά επίπεδα γενετικής πολυπλοκότητας αναφέρεται και σε άλλες μελέτες. Οι περισσότερες όμως περιορίζονται στο διαχωρισμό των λοβιακών και των πορογενών καρκινωμάτων, συμπεριλαμβάνοντας μικρότερο αριθμό δειγμάτων από αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για την παρούσα εργασία. Ο περαιτέρω διαχωρισμός των ιστολογικών τύπων και η εξέταση ενός ικανοποιητικού αριθμού δειγμάτων θα μπορούσε να δώσει μια πιο εμπειριστατωμένη εικόνα του γενετικού και βιολογικού προφίλ των όγκων.



II. Μήπως η έκτοπη έκφραση ορισμένων βιολογικών παραμέτρων είναι συνάρτηση της γενετικής πολυπλοκότητας; Μέχρι σήμερα κανένας βιολογικός παράγοντας δεν έχει μελετηθεί σε συνάρτηση με τη συσσώρευση των γενετικών ανωμαλιών που εμφανίζουν οι πρωτογενείς όγκοι του μαστού γενικά ή σε κάποια ξεχωριστή υποκατηγορία ιστολογικού τύπου. Μια τέτοια ανάλυση θα μπορούσε να δώσει καινούρια δεδομένα για το ρόλο των βιολογικών παραγόντων ως προς τη συσσώρευση γενετικών ανωμαλιών κατά την εξέλιξη της νόσου ή το αντίθετο.

III. Επιμέρους γενετικές ανωμαλίες και κλινικοπαθολογικοί χαρακτήρες. Σε αρκετές μελέτες έχουν γίνει προσπάθειες σύνδεσης επιμέρους γενετικών ανωμαλιών με υψηλό βαθμό κακοήθειας ή άλλους κλινικοπαθολογικούς χαρακτήρες. Μέχρι σήμερα τα αποτελέσματα είναι αντιφατικά. Μήπως κάποιες γενετικές ανωμαλίες εμφανίζονται από τα πρώτα στάδια της εμφάνισης της νόσου και άλλες αργότερα; Ποιες θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως οι πιθανές πρωτογενείς και ποιες οι δευτερογενείς γενετικές μεταβολές που εμφανίζονται σ' αυτή τη διεργασία σαν συνέπεια της γενετικής αστάθειας; Υπάρχουν κάποιες γενετικές ανωμαλίες κοινές για όλους τους τύπους καρκίνου του μαστού;

IV. Με σκοπό να εξετάσουμε αν οι μεταβολές που συσσωρεύονται κατά την καρκινογένεση είναι τυχαίες ή αντανακλούν επιρροές του βιολογικού υποστρώματος, μελετήσαμε πολυεστιακούς όγκους. Το φαινόμενο της πολυκλωνικής καρκινογένεσης στο μαστό έχει περιγραφεί από διάφορες ομάδες, γεγονός που δυσκολεύει την εξαγωγή συμπερασμάτων και την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου, τουλάχιστον όσον αφορά τις γενετικές ανωμαλίες. Τι ομοιότητες και τι διαφορές μπορεί να παρουσιάζουν όγκοι που προέρχονται από τον ίδιο ασθενή αλλά από διαφορετικά σημεία;

V. Υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των βιολογικών παραγόντων και των κλινικοπαθολογικών χαρακτήρων των όγκων του μαστού; Τι αντανακλούν οι πιθανές συσχετίσεις βιολογικών παραγόντων μεταξύ τους και οι διακυμάνσεις των τιμών των εξεταζόμενων παραμέτρων;

VI. Η μετάσταση στους λεμφαδένες είναι ο σημαντικότερος παράγοντας κακής πρόγνωσης για ασθενείς με καρκίνο του μαστού. Μια σειρά φαινοτυπικών χαρακτηριστικών του πρωτογενούς όγκου του μαστού φαίνεται να σηματοδοτεί τη διαδικασία της μετάστασης. Ποιες γενετικές και βιολογικές διαφορές παρουσιάζουν οι



πρωτογενείς όγκοι καρκίνου του μαστού σε σχέση με τις αντίστοιχες μεταστάσεις; Υπάρχουν κάποιες παράμετροι (γενετικό προφίλ ή άλλοι δείκτες) των όγκων που προσδιορίζουν το μεταστατικό φαινότυπο;

Με σκοπό τη διερεύνηση των παραπάνω ερωτημάτων μελετήθηκαν πρωτογενείς όγκοι καρκίνου του μαστού καθώς και μεταστάσεις στους λεμφαδένες και ορισμένες καλοήθειες. Στα δείγματα που αναλύθηκαν προσδιορίστηκε το γενετικό τους προφίλ και εξετάστηκαν ορισμένες βιολογικές παράμετροι, των οποίων η έκτοπη ή απορυθμισμένη έκφραση έχει προταθεί ότι συνδέεται με διάφορα στάδια της καρκινογένεσης.





# **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**



## I. Συλλογή Δειγμάτων

Μελετήθηκαν 147 πρωτογενείς όγκοι μαστού, 15 μεταστατικοί όγκοι και 12 καλοήθειες. Η πλειοψηφία των δειγμάτων προήλθε από νοσοκομείο Odense της Δανίας (ασθενείς που νοσηλεύτηκαν στο νοσοκομείο κατά την περίοδο 1992 μέχρι 1998), ενώ ένας μικρότερος αριθμός προέρχονταν από ασθενείς που χειρουργήθηκαν στο νοσοκομείο «ο Άγιος Σάββας» στην Αθήνα (και νοσηλεύτηκαν κατά το έτος 1996).

Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο κάτω από κατάλληλες συνθήκες ώστε να διατηρηθούν στους  $-70^{\circ}\text{C}$  και οι μετρήσεις των παραμέτρων πραγματοποιήθηκαν μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα από τη λήψη τους, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η δυνατότητα αξιόπιστης μέτρησης της ενζυμικής ενεργότητας (PAP, τελομεράσης). Οι μετρήσεις όλων των παραμέτρων επιδιώχθηκε να είναι ποσοτικές με σκοπό να μην υπόκεινται σε υποκειμενικές εκτιμήσεις. Η χρήση των μεθόδων Western blot και Elisa επιλέχθηκε, γιατί διευκολύνει την ποσοτική μέτρηση των παραμέτρων και γιατί οι μέθοδοι αυτές είχαν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στο εργαστήριο Βιοχημείας του Ερευνητικού Κέντρου «Γ. Παπανικολάου» όπου και πραγματοποιήθηκε ένα μεγάλο μέρος αυτής της μελέτης.

### ➤Κλινικοπαθολογικά δεδομένα

Για τους περισσότερους ασθενείς υπήρχαν πλήρη στοιχεία όσον αφορά την ιστοπαθολογική αξιολόγηση, που περιλαμβάνει τον ιστολογικό τύπο του όγκου, το βαθμό κακοήθειας, το μέγεθος, την παρουσία ή απουσία υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης και τις μεταστάσεις αν υπάρχουν.

Ο ιστολογικός τύπος καθορίστηκε με βάση την κατάταξη κατά WHO (164) με μικρές παραλλαγές. Στη μελέτη συμπεριλαμβάνονται πορογενή και λοβιακά καρκινώματα *in situ* και διηθητικά καθώς και καλοήθειες σε μικρότερο όμως αριθμό.

Ο βαθμός κακοήθειας προσδιορίστηκε με βάση την κατάταξη κατά Bloom και Richardson (165). Ο προσδιορισμός του βαθμού κακοήθειας βασίστηκε στο συνδυασμό τριών παραμέτρων: στο σχηματισμό σωληνίσκων, τον αριθμό μιτώσεων και τον πυρηνικό πλειομορφισμό και ποσοτικοποιήθηκαν προκειμένου να επιτρέψουν τη μελέτη της πολυπλοκότητας των γενετικών ανωμαλιών. Κάθε παράμετρος βαθμολογείται από 1-



3 και το σύνολό τους αντιστοιχεί σε grade I (3-5), grade II (6 ή 7) και grade III (8 ή 9). Οι ορμονικοί υποδοχείς μετρήθηκαν με ανοσοϊστοχημεία. Βάσει στατιστικών μελετών αρνητικοί ως προς τους ορμονικούς υποδοχείς θεωρούνται όγκοι με τιμές <10% πρωτεΐνης, ενώ θετικοί >10% πρωτεΐνη.

Ο κάθε όγκος χωρίστηκε με νυστέρι σε 3 μέρη προκειμένου να πραγματοποιηθεί απομόνωση DNA, RNA και κυτταρικού εκχυλίσματος. Ο χωρισμός έγινε σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά τη χειρουργική αφαίρεση του όγκου σε τρυβλίο Petri, σε πάγο και κάτω από στείρες συνθήκες.

## II. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

1) Η απομόνωση DNA από δείγματα φρέσκου παγωμένου ιστού πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Wingel et al. (241). Σύμφωνα μ' αυτό 2.5g φρέσκου ιστού από κάθε δείγμα ομογενοποιήθηκαν μέσα σε σωληνάριο με 900μl ρυθμιστικού διαλύματος TNE (1X). Μετά την ομογενοποίηση προστέθηκαν 25μl διαλύματος SDS 20% (τελική συγκέντρωση 0,5%), καθώς και 20μl πρωτεϊνάση K (σε τελική συγκέντρωση 200μg/ml). Το μίγμα ανακινήθηκε και επώαστηκε στους 37°C για 24 ώρες ή περισσότερο. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν μια σειρά εκχυλίσεων με φαινόλη, φαινόλη - χλωροφόρμιο σε αναλογία 1/1 και στο τέλος μόνο χλωροφόρμιο (το χλωροφόρμιο που χρησιμοποιήθηκε είναι εξισορροπημένο με ισοαμυλική αλκοόλη 24/1). Σε κάθε στάδιο το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 12000 rpm για 5' περίπου. Μετά από κάθε φυγοκέντρηση γινόταν προσεχτική παραλαβή της υδατικής φάσης. Το DNA κατακρημνίστηκε με τη μεταφορά της υδατικής φάσης του τελευταίου σταδίου σε παγωμένη απόλυτη αιθανόλη. «Ψαρεύτηκε» και μεταφέρθηκε σε αιθανόλη 75%, όπου φυγοκεντρήθηκε σε 7500 rpm για 5'. Το ίζημα στέγνωσε σε θερμοκρασία δωματίου και αναδιαλύθηκε σε κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος TE (1X) και φυλάχθηκε στους 4°C.

2) Ο έλεγχος ποιότητας του DNA πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% κ.ο. στην οποία προστέθηκε και διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου σε



τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml. 5μl από κάθε δείγμα DNA (με διάλυμα μπλε της βρωμοφαινόλης και της γλυκερόλης) τοποθετήθηκε στις ανάλογες θέσεις πάνω στο πήκτωμα. Η ηλεκτροφόρηση γινόταν χρησιμοποιώντας ως μέσο ρυθμιστικό διάλυμα TBE (0,5X) στα 4 V/cm για δύο ώρες. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα μεταφερόταν σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας για παρατήρηση και φωτογράφιση.

### 3) Μέθοδοι ανάλυσης του εξαγόμενου DNA

#### α) ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟΣ ΓΕΝΩΜΙΚΟΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία που περιγράφηκε από τους Kallionemi et al. με τις τροποποιήσεις των Kraggerud et al (242,243). Συγκεκριμένα έγινε εξαγωγή του DNA από τμήμα εξεταζόμενου όγκου και από κύτταρα περιφερικού αίματος υγιούς γυναίκας σύμφωνα με την κλασσική μεθοδολογία και σημάνθηκε μέσω της διαδικασίας *nick translation*.

⊙ *nick translation* Η DNA πολυμεράση I της E. coli προσθέτει νουκλεοτίδια στο ελεύθερο 3' άκρο που δημιουργείται, όταν μία από τις αλυσίδες της διπλής έλικας του μορίου του DNA σπάει. Το ίδιο ένζυμο, χάρη στην 5' → 3' εξωνουκλεολυτική δράση του μπορεί να αφαιρεί νουκλεοτίδια από το 5' άκρο που είναι ελεύθερο. Η ταυτόχρονη απώλεια νουκλεοτιδίων από το άκρο 5' και η προσθήκη άλλων στο 3' έχουν σαν αποτέλεσμα μια διαδοχική κίνηση κατά μήκος του μορίου DNA. Μ' αυτή τη διαδικασία φθοριούχα dUTPs ενσωματώνονται στο γενωμικό DNA του εξεταζόμενου δείγματος και προκύπτουν ιχνηθέτες μήκους μεταξύ 300 και 2000bp. Τα φθοριοχρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη σήμανση στη δικιά μας περίπτωση ήταν, MaqFITC-12dCTP και FITC-12-dUTP (για το DNA του όγκου) και Texas Red-6-dCTP Texas Red-6-dUTP (για το φυσιολογικό DNA) (New England Nuclear, Boston). Η σήμανση πραγματοποιήθηκε για 2 ώρες στους 15°C και η αντίδραση σταματά με θέρμανση στους 70°C για 10'. Τα μη ενσωματωμένα νουκλεοτίδια απομακρύνθηκαν με αιθανόλη και το προϊόν διατηρήθηκε στους -20°C. Το μέγεθος του σημασμένου ιχνηθέτη προσδιορίστηκε με ακρίβεια σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και έγινε ορατό με βρωμιούχο αιθίδιο, κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.



☺ **Υβριδισμός του ιχνηθέτη στις μεταφάσεις στόχους.** Ίδιες ποσότητες DNA, περίπου 800 ng, από τα δύο σημασμένα δείγματα (του όγκου και το φυσιολογικό) αναμείχθηκαν με 20 ng μη σημασμένου Cot-1 DNA (Life Technologies, Rockville, MD). Το συνολικό DNA κατακρημνίστηκε με αιθανόλη και αφού στέγνωσε στον αέρα αναδιαλύθηκε σε διάλυμα υβριδοποίησης (Vysis, Dowers Grove, IL). Οι φυσιολογικές μεταφάσεις λήφθηκαν από καλλιέργεια λεμφοκυττάρων από υγιείς δότες ή από παρασκευάσματα που διατίθενται στο εμπόριο (Vysis Downers Grove, IL). Μετά την αποδιάταξη των χρωμοσωμάτων και των DNA ανιχνευτών (σε υψηλές θερμοκρασίες και κατάλληλα διαλύματα) πραγματοποιήθηκε ο υβριδισμός ο οποίος διέρκεσε 2-3 μέρες σε κλίβανο με υγρασία και θερμοκρασία 37°C. Μετά από μία σειρά διαδοχικών εκπλύσεων τα παρασκευάσματα καλύφθηκαν με διάλυμα antifade DAPI (Vectashield Vector laboratories, Burlingame, CA).

☺ **ανάλυση.** Σε κάθε περιστατικό επελέγησαν και αναλύθηκαν τουλάχιστον 10 μεταφάσεις. Ειδικότερα η ανάλυση έγινε σε κατάλληλο μικροσκόπιο (Zeiss Axioplan fluorescence microscope) και με ηλεκτρονικό σύστημα ανάλυσης (Isis Metasystems). Τα χρωμοσώματα αναγνωρίστηκαν με βάση την ανεστραμμένη εικόνα τους με τη χρωστική DAPI και υπολογίστηκε η ένταση του σήματος υβριδισμού κατά μήκος κάθε χρωμοσώματος. Τα δεδομένα που λήφθηκαν από κάθε μετάφαση συνυπολογίστηκαν για την εξαγωγή αναλογιών με 95% αξιοπιστία για κάθε χρωμόσωμα. Οι οριακές τιμές 1.25 και 0.75 χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση αυξήσεων και ελλείψεων DNA αντίστοιχα. Σε κάθε πείραμα υβριδοποίησης χρησιμοποιήθηκαν ένας αρνητικός μάρτυρας (φυσιολογικό DNA) και ένας θετικός (DNA από την κυτταρική σειρά LOVO που έχει γνωστές ανωμαλίες). Η περιγραφή των αλλαγών που εντόπισε η μέθοδος CGH έγινε σύμφωνα με τους κανόνες της ISCN (1995) (244).

☺ **Εκτίμηση της γενετικής πολυπλοκότητας.** Ο συνολικός αριθμός των γενετικών αλλαγών που εντοπίστηκαν με CGH υπολογίστηκε προσθέτοντας των αριθμό των ενισχύσεων (ή/και των επεκτάσεων όπου σημειώθηκαν) και των απωλειών σε κάθε περιστατικό.



### β) ΜΕΛΕΤΗ ΕΛΛΕΙΨΗΣ ΕΤΡΟΖΥΓΩΤΙΑΣ

Η έλλειψη ετεροζυγωτίας μελετήθηκε στην περιοχή 3p του γονιδιώματος με τη βοήθεια των markers D3S1300R/F, D3S1261R/F, D3S1312R/F, D3S1271R/F, D3S1276R/F που καλύπτουν την περιοχή με τη μεγαλύτερη συχνότητα θραύσης (FRA3B). Οι ιχνηθέτες σημάνθηκαν με ραδιενεργό  $\gamma^{32}$ -ATP (1μl ρυθμιστικού διαλύματος κινάσης 10X, 1 μl ενζύμου πολυνουκλεοτιδικής κινάσης T4, 3 μl  $\gamma^{32}$ -ATP, 5 μl ενός από τους εμπρόσθιους ιχνηθέτες) και ακολούθησε επώαση για 30' στους 37°C.

2 μl από το δείγμα DNA αναμίχθηκαν με 8.5 μl μείγματος PCR (0.4 μl σημασμένου εμπρόσθιου εκκινητή, 0.2 μl μη σημασμένου εμπρόσθιου εκκινητή, 0.4 μl μη σημασμένου ανάστροφου εκκινητή, 3 μl ρυθμιστικού διαλύματος για την πολυμεράση, 1.8 μl διαλύματος χλωριούχου μαγνησίου, 2.4 μl μίγματος d-NTPs 10mM και 0.3 μl Taq πολυμεράση) προς τελικό όγκο 30 μl. 30 κύκλοι PCR πραγματοποιήθηκαν κάτω από τις εξής συνθήκες: 5' στους 95°C, αποδιάταξη στους 93°C (40''), υβριδισμός εκκινητών στους 55°C (40'') και επιμήκυνση στους 72°C (1') και τέλος 5' στους 72°C.

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πραγματοποιήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 6% με ουρία 7,7M (9ml 30% ακρυλαμίδιο/πολυακρυλαμίδιο (19:1), 12ml 5x TBE (pH 8,3), 28g ουρίας σε τελικό όγκο 60ml, 200 μl Ammonium persulfate 10% και 24 μl TEMED). 2-4μl αποδιαταγμένου δείγματος μεταφέρθηκε στο πήκτωμα όπου και ηλεκτροφορήθηκε. Η ανάλυση προαγματοποιήθηκε με το πέρας της ηλεκτροφόρησης και μετά από φωτογράφιση του πηκτώματος.

### III. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA

1) Η απομόνωση του RNA από δείγματα παγωμένου ιστού πραγματοποιήθηκε μετά ομογενοποίηση των δειγμάτων σε κατάλληλο ομογενοποιητή. Συγκεκριμένα, 100 mg ιστού μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο πολυπροπυλένου και ομογενοποιήθηκαν με 1 ml Trizol Reagent και η όλη διαδικασία έγινε σε πάγο. Για κάθε 10 λεπτά ομογενοποίησης ακολούθησε μία διακοπή του ομογενοποιητή για 10 λεπτά ώστε να μην έχουμε αύξηση της θερμοκρασίας στο μίγμα. Προκειμένου να επιτευχθεί ολικός διαχωρισμός των συμπλόκων των νουκλεοπρωτεϊνών, αφήσαμε τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου για

5 λεπτά. Προσθέσαμε 200μl χλωροφόρμιου. Σκεπάσαμε τα δείγματα, ανακινήσαμε και φυγοκεντρήσαμε το δείγμα στις 12000g για 15 λεπτά στους 4°C. Η φυγοκέντρωση χώρισε το μίγμα σε τρεις φάσεις μία κόκκινη οργανική (που περιέχει τις πρωτεΐνες), μία θολή ενδιάμεση (DNA) και μία άχρωμη (RNA). Μεταφέραμε την υδατική φάση σε καινούργιο σωληνάριο και προσθέσαμε 0.5ml ισοπροπανόλης. Αφήσαμε το δείγμα να ισορροπήσει για 5-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Φυγοκεντρήσαμε στις 12000xg για 10 λεπτά στους 4°C. Το RNA καθιζάνει με τη μορφή ιζήματος. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και ξεπλύνουμε το ίζημα με 1 ml αιθανόλης 75%. Αναδέψαμε και φυγοκεντρήσαμε το δείγμα στις 7500 x g για 5 λεπτά στους 4°C. Τέλος το RNA στέγνωσε για 5-10 λεπτά σε ζεστό-ξηρό αέρα και αναδιαλύθηκε σε 20μl DEPC H<sub>2</sub>O. Τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -80°C.

2) Ο έλεγχος ποιότητας του RNA πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% κ.ο. στην οποία προστέθηκε και διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0,5μg/ml. Δείγματα RNA και χρωστική σε αναλογία 1/3 θερμάνθηκαν για 10 λεπτά, έτσι ώστε να γίνει η αποδιάταξη του RNA και τοποθετήθηκαν στις ανάλογες θέσεις πάνω στο πήκτωμα. Η ηλεκτροφόρηση έγινε χρησιμοποιώντας ως μέσο το διάλυμα TBE (0,5X) στα 3 V/cm για δύο ώρες. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα μεταφέρθηκε σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας για παρατήρηση και φωτογράφιση.

### 3) Μέθοδοι ανάλυσης του εξαγόμενου RNA

#### α) ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ cDNA

1-5 μg RNA του εξεταζόμενου δείγματος μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο μαζί με 1μl oligo-dT (500μg/ml). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε στον πάγο. Συμπληρώσαμε με DEPC νερό σε τελικό όγκο 11μl. Ακολούθησε επώαση στους 70°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 1μl αναστολέας RNAσης, 4μl ρυθμιστικού διαλύματος, 2μl διαλύματος DTT 0,1mM, 1μl μίγματος dNTPs (10mM) το καθένα, 1μl ένζυμο ανάστροφη μεταγραφάση (200U) και ακολουθήσε επώαση στους 42°C για 60 λεπτά. Τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -20°C.



### β) Μελέτη μεταγραφικού δυναμικού του γονιδίου RhoC

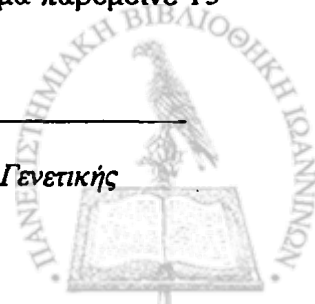
Η μελέτη του μεταγραφικού δυναμικού του γονιδίου RhoC, πραγματοποιήθηκε με relative PCR (5μl ρυθμιστικού διαλύματος PCR (10X), 5μl μίγματος dNTPs 2mM, 3μl MgCl<sub>2</sub>, 1 μl εκκινητές για το RhoC, 1μl εκκινητές για τη β-μικροσφαιρίνη, 0.5 μl Taq πολυμεράση και 1 μl δείγματος cDNA). Οι συνθήκες PCR (για 25 κύκλους) ήταν οι εξής: αποδιάταξη στους 94°C για 30'', υβριδισμός των ανιχνευτών στους 54°C για 1' και επιμήκυνση στους 72°C 1'. Η έκφραση του γονιδίου μελετήθηκε ως προς γονίδιο αναφοράς (β-μικροσφαιρίνη). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν έπειτα από ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5% για 1 ώρα στα 4V/cm.

## IV. ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ

Η ομογενοποίηση των δειγμάτων των όγκων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολουθείται για την παραλαβή του κυτταρικού εκχυλίσματος για τον προσδιορισμό των ορμονικών υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης. 100mg όγκου ομογενοποιήθηκαν σε 0.5 ml ρυθμιστικού διαλύματος (10mM Tris pH=7.4, 1.5mM EDTA, 5mM Na-molybdate, 5mM DTT). Οι σωλήνες όπου έγινε η ομογενοποίηση ήταν μέσα σε μείγμα πάγου και υγρού αζώτου. Η ομογενοποίηση έγινε με ομογενοποιητή Polytron (Sorvall). Στη συνέχεια το ομογενοποιημένο μίγμα φυγοκεντρήθηκε στα 16000xg για 1h στους 4<sup>0</sup> C. Το υπερκείμενο φυλάχθηκε στους -80<sup>0</sup>C μέχρι τη χρήση του.

1) Η μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνών έγινε με τα αντιδραστήρια Dc Protein Assay (BioRad) με μια βελτίωση της κλασικής μεθόδου Lowry (245), που επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης ακόμα και με παρουσία απορρυπαντικών (όπως το SDS).

Προετοιμάσαμε 3-5 αραιώσεις του πρότυπου διαλύματος πρωτεΐνης BSA (από 0.2mg/ml μέχρι 1.5mg/ml) προκειμένου να προσδιορίσουμε την καμπύλη αναφοράς. 100μl πρότυπου ή δείγματος αναμίχθηκαν με 500μl αντιδραστηρίου A (αλκαλικό διάλυμα τρυγικού χαλκού) και 4ml αντιδραστηρίου B (Folin). Το μείγμα παρέμεινε 15'





σε θερμοκρασία δωματίου και η μέτρηση απορρόφησης στο φωτόμετρο έγινε στα 750nm. Το χρώμα παραμένει σταθερό για 1 ώρα περίπου.

## 2) Μέθοδοι εξέτασης συστατικών του κυτταρικού εκχυλίσματος

### α) ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΧΕΤΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της τελομεράσης χρησιμοποιήθηκε το kit Telomerase PCR ELISA (Roche). Η τεχνική περιλάμβανε τρία στάδια: α) αντίδραση τελομεράσης, β) πολλαπλασιασμό του προϊόντος της αντίδρασης της τελομεράσης με PCR και γ) προσδιορισμό της ποσότητας του προϊόντος με μία ανοσοενζυμική φωτομετρική μέθοδο υψηλής ευαισθησίας. Το δεύτερο στάδιο ονομάζεται TRAP από τα αρχικά των λέξεων Telomeric Repeat Amplification Protocol, και παρεμβάλλεται μεταξύ αντίδρασης και προσδιορισμού προϊόντος, γιατί αυξάνει θεαματικά την ποσότητά του, ώστε να διευκολυνθεί η μέτρηση.

Συγκεκριμένα, 10μg πρωτεΐνης από κάθε δείγμα προστέθηκαν σε 25 μl μείγματος αντίδρασης τελομεράσης και επώαστηκαν για 30' στους 25<sup>0</sup> C. Η αντίδραση σταματήσε με θέρμανση των δειγμάτων για 5' στους 94<sup>0</sup> C και επακολούθησε πολλαπλασιασμός του προϊόντος της αντίδρασης της τελομεράσης με PCR στις παρακάτω συνθήκες: αποδιάταξη στους 94<sup>0</sup> C για 30'', υβριδισμός των ιχνηθετών στους 50<sup>0</sup> C για 30'' και επιμήκυνση του προϊόντος στους 72<sup>0</sup> C για 90''. Μετά από 30 κύκλους το πρόγραμμα ολοκληρώθηκε με 10' στους 72<sup>0</sup> C και το προϊόν διατηρήθηκε στους 4<sup>0</sup> C.

Ο ένας από τους δυο εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για το PCR είναι βιοτινιλωμένος. Στη συνέχεια για κάθε δείγμα, 2.5μl προϊόντος PCR αναμίχθηκαν με 10μl διαλύματος αποδιάταξης και τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10' όπου προστέθηκαν 100μl ρυθμιστικού διαλύματος υβριδισμού για την τελομεράση και για την εσωτερική αναφορά. Τα προϊόντα (100μl από κάθε δείγμα) δεσμεύτηκαν μέσω της βιοτίνης που περιέχουν σε στρεπταβιδίνη ακινητοποιημένη σε πλάκα ELISA (2 ώρες στους 37<sup>0</sup> C). Οι ιχνηθέτες είναι σημασμένοι με διγοξυγενίνη και ο εντοπισμός τους έγινε με αντίσωμα για την διγοξυγενίνη. Το αντίσωμα ήταν συνδεδεμένο με υπεροξειδάση (Anti-DIG-HRP ) η οποία με οξείδωση του υποστρώματός της (TMB) παρήγαγε



χαρακτηριστικό χρώμα του οποίου η απορρόφηση μετρήθηκε στα 450nm (με μήκος κύματος αναφοράς στα 690nm).

Τα επίπεδα ενεργότητας της τελομεράσης σε ένα δεδομένο δείγμα προσδιορίστηκαν με τη σύγκριση του σήματος του δείγματος με αυτό δειγμάτων αναφοράς που περιέχονταν στο kit. Οι τιμές ενεργότητας εκφράστηκαν είτε σαν μονάδες οπτικής πυκνότητας (OD units) είτε σαν μονάδες σχετικής ενεργότητας σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$RTA = \frac{(A_s - A_{s0}) / A_{s, is}}{(A_{TS8} - A_{TS8,0}) / A_{TS8, IS}} \times 100$$

Όπου,

RTA : σχετική ενεργότητα της τελομεράσης

$A_s$  : απορρόφηση του δείγματος

$A_{s0}$  : απορρόφηση των αρνητικών μαρτύρων

$A_{s, is}$  : η απορρόφηση της εσωτερικής αναφοράς του δείγματος

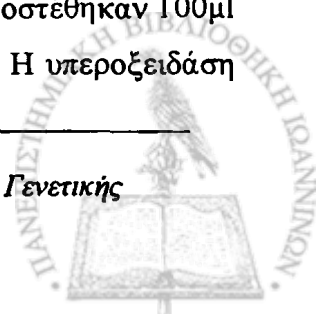
$A_{TS8}$  : η απορρόφηση του μάρτυρα

$A_{TS8,0}$  : η απορρόφηση του ρυθμιστικού διαλύματος

$A_{TS8} A_{TS8, IS}$  : η απορρόφηση της εσωτερικής αναφοράς του μάρτυρα

### β) ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ PCNA

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε το kit της Qiagen "PCNA Elisa". Πρόκειται για μια ανοσοενζυμική μέθοδο «σάντουιτς» κατά την οποία χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού του κλώνου PC10 και πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού. Ένα πολυκλωνικό αντίσωμα, ειδικό για την ανθρώπινη πρωτεΐνη PCNA, ήταν ακινητοποιημένο στην επιφάνεια των 96 πηγαδιών μιας πλάκας ELISA, 50μl δείγματος ή προτύπου και 50μl βιοτινυλιωμένου μονοκλωνικού αντισώματος μεταφέρθηκαν στα πηγάδια και επώαστηκαν για 2 ώρες. Το μη δεσμευμένο υλικό απομακρύνθηκε με διαδοχικά ξεπλύματα και προστέθηκαν 100μl διαλύματος συμπλόκου υπεροξειδάσης και ενός τρίτου αντισώματος. Η υπεροξειδάση



καταλύει την οξειδωση ενός άχρωμου διαλύματος τετραμέθυλ-βενζυδίνης (TMB) σε μπλε διάλυμα (ή κίτρινο μετά από προσθήκη του αντιδραστηρίου για να σταματήσει η αντίδραση) η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της ποσότητας PCNA του δείγματος. Το προϊόν της αντίδρασης μετρήθηκε ποσοτικά στο φωτόμετρο. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια μίας καμπύλης αναφοράς, χρησιμοποιώντας αραιώσεις γνωστών συγκεντρώσεων, καθαρής ανθρώπινης PCNA. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε μονάδες OD/mg  $10^{-1}$  πρωτεΐνης.

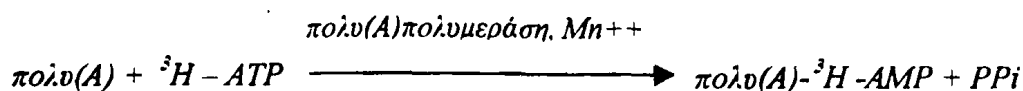
#### γ) ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ c-erbB2/c-neu

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε το kit της Qiagen "c-erbB2/c-neu Elisa". Η τεχνική βασίζεται σε μια ανοσοενζυμική μέθοδο «σάντουιτς» κατά την οποία χρησιμοποιούνται δύο μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού. Ένα αντίσωμα, ειδικό για την ανθρώπινη πρωτεΐνη c-erbB2/c-neu, ήταν ακινητοποιημένο στην επιφάνεια των 96 πηγαδιών μιας πλάκας ELISA. 100μl δείγματος ή προτύπου προς εξέταση μεταφέρθηκε στα πηγάδια και επώαστηκε για 2 ώρες. Το μη δεσμευμένο υλικό απομακρύνθηκε με διαδοχικά ξεπλύματα και προστέθηκε το 2ο αντίσωμα. Το 2ο αντίσωμα έφερε προσδεσμένη υπεροξειδάση. Η υπεροξειδάση καταλύει την οξειδωση ενός άχρωμου διαλύματος τετραμέθυλ-βενζυδίνης (TMB) σε μπλε διάλυμα (ή κίτρινο μετά από προσθήκη του αντιδραστηρίου για να σταματήσει η αντίδραση) η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της ποσότητας c-erbB2/c-neu του δείγματος. Το προϊόν της αντίδρασης μετρήθηκε ποσοτικά στο φωτόμετρο σε μήκη κύματος 450/595 nm, μέσα σε 30' μετά την προσθήκη του διαλύματος. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια με τη βοήθεια μίας καμπύλης αναφοράς, χρησιμοποιώντας αραιώσεις γνωστών συγκεντρώσεων, καθαρής ανθρώπινης c-erbB2/c-neu. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε μονάδες OD/mg  $10^{-1}$  πρωτεΐνης.

#### δ) ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΙΔΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΠΟΛΥ(A) ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ

Η μέθοδος προσδιορισμού της ενεργότητας της πολύ(A)πολυμεράσης στηρίχθηκε στην παρακάτω αντίδραση:



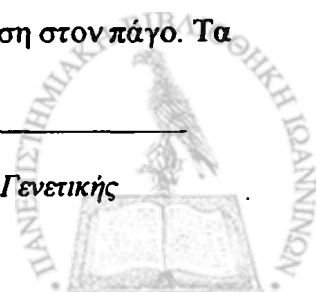


Το πολυ(A) ή πολυαδενυλικό οξύ είναι ένα ομοπολυμερές που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες AMP. Η πολυ(A)πολυμεράση καταλύει παρουσία δισθενών μεταλλικών ιόντων την αντίδραση συνέχισης πολυμερισμού  ${}^3\text{H-ATP}$  στο πολυ(A) (στο άκρο 3'-OH) ελευθερώνοντας πυροφωσφορικό οξύ (PPi). Ανάλογα με την ποιότητα και την ποσότητα της πολυ(A)πολυμεράσης στο δείγμα, έχουμε μεγαλύτερη ή μικρότερη ενσωμάτωση ραδιενεργού τριτίου στο πολυ(A) σε ορισμένο χρόνο.

Το πολυμερές που συντίθεται κατακρημνίζεται σε χάρτινα φίλτρα GF/C με διάλυμα τριχλωροξικού οξέος χρησιμοποιείται παρουσία πυροφωσφορικού νατρίου που δεν επιτρέπει την συνέχιση της αντίδρασης προς τα δεξιά. Μετά το σταμάτημα της αντίδρασης γίνεται ξέπλυμα των χαρτιών GF/C ώστε να απομακρυνθούν τα

ραδιενεργά μόρια ATP, που δεν ενσωματώθηκαν στο πολυ(A). Το τρίτιο είναι ένας β-εκπομπέας μικρής έντασης με αποτέλεσμα η ακτινοβολία να μην μπορεί να διαπεράσει τους πλαστικούς σωλήνες που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της ενεργότητας. Γι' αυτό χρησιμοποιείται διάλυμα σπινθηρισμού που περιέχει τον πρωτογενή σπινθηριστή PPO (2,5-διφαινυλοξαζόλιο) και τον δευτερογενή POPOP (1,4-δισ-2-(5-φαινυλοξαζόλιο)-βενζόλιο), διαλυμένα σε τολουόλιο. Το τολουόλιο απορροφά την ενέργεια των εκπεμπόμενων ηλεκτρονίων και τη μεταφέρει στον πρωτογενή σπινθηριστή PPO, ο οποίος την απορροφά και εκπέμπει φως, μήκους κύματος 380nm. Ο δευτερογενής σπινθηριστής μετακινεί το μήκος κύματος του υπεριώδους φωτός του πρωτογενή σπινθηριστή, σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, ώστε να έχουμε καλύτερη μέτρηση από τον φωτοπολλαπλασιαστή του β-μετρητή.

Συγκεκριμένα, 20μg πρωτεΐνης από κάθε δείγμα μεταφέρθηκαν σε 40μl διαλύματος A (20l Tris HCL 1M pH=8.3, 2l MnCl<sub>2</sub> 50mM, 1l 400mM β-μερκαπτοαιθανόλη, 5,6l 18mM poly(A), 10l 10mM [ ${}^3\text{H}$ ] ATP, 10 cpm/pmol) σε σωλήνα Eppendorf στον πάγο. Μετά από ανάδευση ο σωλήνας τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 37°C. Μετά το πέρασμα του κατάλληλου χρόνου (1, 2, 3 και 3.5 h) τοποθετήθηκαν 20μl από κάθε δείγμα σε χαρτί GF/C Whatman που εμβαπτίστηκε σε δοχείο με διάλυμα 5% τριχλωροξικού οξέος (TCA) υπό μερική ανάδευση στον πάγο. Τα



χαρτιά των δειγμάτων ξεπλύθηκαν 3 φορές με TCA 5% για 5 λεπτά στον πάγο, υπό ανάδευση. Στη συνέχεια στέγνωσαν όλη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου. Την επόμενη μέρα το κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε σωλήνα που περιέχει 5ml διαλύματος σπινθηρισμού (3g PPO και 0,3g POPOP /lt τολουόλιου) και έγινε μέτρηση σε β-μετρητή σπινθηρισμού για 5 λεπτά/δείγμα.

Ο υπολογισμός της ενεργότητας (U/mg πρωτεΐνης) έγινε χρησιμοποιώντας τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Ειδική ενεργότητα} = \frac{(V_{\delta}) \cdot \text{cpm}}{(V_x) \cdot r_A \cdot V_K \cdot t \cdot c}$$

όπου

$V_{\delta}$  = ο τελικός όγκος διαλύματος αντίδρασης σε μl

cpm = αριθμός μετρούμενων κτύπων από τον μετρητή σπινθηρισμού

$V_x$  = όγκος διαλύματος αντίδρασης στο GF/C σε μl

$r_A$  = ειδική ενεργότητα του  $^3\text{H}$ -ATP σε cpm/pmol

t = χρόνος επώασης σε ώρες

$V_K$  = αρχικός όγκος κυτταρικού εκχυλίσματος σε μl

c = συγκέντρωση πρωτεΐνης κυτταρικού εκχυλίσματος δείγματος όγκου σε mg/ml  
(1mg/ml)

Ως μονάδα ενζυμικής ενεργότητας ορίστηκε η ποσότητα του ενζύμου που ενσωματώνει 1nmol ραδιενεργού μονονουκλεοτιδίου μέσα σε 1 ώρα. Η ειδική ενεργότητα εκφράζεται σε μονάδες ενζυμικής ενεργότητας ανά mg πρωτεΐνης (U/mg πρωτεΐνης)

Υπολογίστηκαν τέσσερις τιμές ενεργότητας για κάθε δείγμα αφού έγινε επώαση για τέσσερα χρονικά διαστήματα και στη συνέχεια υπολογίστηκε ο μέσος όρος αυτών.



**ε) ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ FHIT ΜΕ WESTERN BLOT**

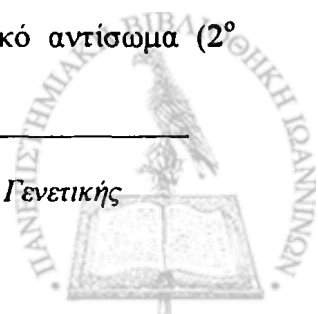
- **Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε SDS-PAGE πήκτωμα** Η ανάλυση της πρωτεΐνης έγινε με ηλεκτροφόρησή της σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε αποδιατακτικές συνθήκες. Η σύσταση της φάσης στοίβαξης (stacking gel) του πήκτωματος είναι 3,9% acrylamide-bisacrylamide (29:1) σε 125mM Tris-HCl pH 6.8 και 0.1% SDS και της φάσης διαχωρισμού 12% acrylamide-bisacrylamide σε 375mM Tris-HCl, pH 8.8 και 0.1% SDS.

Τση ποσότητα πρωτεΐνης από τα δείγματα (20 μg) ανάχθηκε σε τελικό όγκο 15μl με SDS-PAGE sample buffer (500 μl 10% SDS, 500μl γλυκερόλης, 400μl 1M Tris-HCL pH 6.8, 3.1ml H<sub>2</sub>O), προστέθηκαν 1,5μl 2-μερκαπτοαιθανόλης και 0,1μl διαλύματος μπλε της βρομοφαινόλης (1% σε 1M Tris-HCl pH 6.8). Τα δείγματα έβρασαν για 5' και ηλεκτροφορήθηκαν ( διάλυμα ηλεκτροφόρησης: 30.3gr Tris-base, 144.2gr glycine, 10gr SDS, διαλυμένα σε τελικό όγκο 1lt, pH 8.3) αρχικά στη φάση στοίβαξης στα 80V/50mA και τελικά στη φάση διαχωρισμού στα 150 V/60mA για 2-3hrs.

-**Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη** Η μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη έγινε με ηλεκτρομεταφορά (246) με τη συσκευή της Bio-Rad σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Χρησιμοποιήθηκαν οι μεμβράνες Immobilon-P (Millipore) και η μεμβράνη μετά το πέρας της μεταφοράς της φυλάχθηκε στους

-20C<sup>0</sup>. Η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς εκτιμήθηκε από την ποσοτική μεταφορά των βαμμένων πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες μοριακού βάρους (Bio-Rad : Prestained SDS-PAGE Standards)

-**Ανοσοπροσδιορισμός των ακινητοποιημένων στη μεμβράνη πρωτεϊνών με χημειοφωταύγεια** Αρχικά η μεμβράνη επώαστηκε για 10-14 h σε Blotto/Tween (5% BSA (fraction V) , 0.1% Tween 20 σε PBS) στους 4<sup>0</sup>C. Στο στάδιο αυτό έγινε "μπλοκάρισμα" των κενών θέσεων της μεμβράνης για να αποτραπεί η μη ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων στη μεμβράνη. Με διαδοχικά πλυσίματα απομακρύνθηκαν μη δεσμευμένα μόρια. Η αρχή της μεθόδου στηρίχθηκε στην ειδική αντίδραση της πρωτεΐνης (αντιγόνου) που βρισκόταν ακινητοποιημένη στη μεμβράνη, με ειδικό μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό αντίσωμα (1<sup>ο</sup> αντίσωμα) που την αναγνώριζε σε αραιώση 1/1000 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από τα απαραίτητα ξεπλύματα της μεμβράνης το 1<sup>ο</sup> αντίσωμα αναγνωρίστηκε από δεύτερο μη ειδικό αντίσωμα (2<sup>ο</sup>



αντίσωμα), το οποίο και φέρει προσδεδεμένο ένζυμο. Το ένζυμο ήταν υπεροξειδάση (*horseradish peroxidase*) σε αραιώση 1:10000 που καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης, με αποτέλεσμα την παραγωγή χημειοφωταύγειας σε φιλμ (*Hyperfilm-ECL, Amersham*).

## Ε) ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση, οι πίνακες και τα διαγράμματα έγιναν με την υποστήριξη ηλεκτρονικού υπολογιστή και την χρήση των προγραμμάτων SPSS και Excel.

Για την εύρεση σχέσεων μεταξύ ποσοτικών μεταβλητών, με κανονική κατανομή (κατά προσέγγιση) χρησιμοποιήθηκαν οι συντελεστές Pearson και Spearman. Για τη σύγκριση των μέσων τιμών δυο ομάδων χρησιμοποιήθηκε η στατιστική δοκιμασία του Student (t-test). Στην περίπτωση που οι συγκρινόμενες κατηγορίες ήταν πάνω από δύο χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διακύμανσης προς μία διεύθυνση (ANOVA). Στην περίπτωση σύγκρισης ποσοτικών μεταβλητών σε ζεύγη δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η στατιστική δοκιμασία paired t-test. Στη στατιστική ανάλυση για την εύρεση σχέσεων μεταξύ ποιοτικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικές στατιστικές δοκιμασίες. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν το κριτήριο του  $\chi^2$ , το κριτήριο του Fisher, και ο συντελεστής Spearman.



# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ





## ***I. Πρωτογενείς Όγκοι***

### ***A. Περιγραφή του Δείγματος – Κλινικοπαθολογικά δεδομένα***

Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται συνοπτικά τα στοιχεία που αφορούν τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των 147 πρωτογενών όγκων που εξετάστηκαν.

Η ηλικία των ασθενών κυμαινόταν από 31 – 95 χρόνων με μέση τιμή τα 61,5 χρόνια. Η πλειοψηφία των ασθενών ανήκε στην ηλικιακή κατηγορία άνω των 45 χρόνων (90,2%), ενώ κάτω των 45 χρόνων ήταν το 9,8%.

Το μέγεθος των όγκων που εξετάστηκαν ήταν σχετικά μικρό και κυμαινόταν από 5mm ως 9 cm. Η πλειοψηφία των όγκων παρουσίαζε μέγεθος μικρότερο από 13 mm (5mm – 0,13 cm) και αντιστοιχούσε στο 92,7 % του συνολικού πληθυσμού, ενώ μόνο το 7,3% είχε μέγεθος μεγαλύτερο από 1cm.

Η κατανομή των όγκων με βάση το βαθμό ιστολογικής κακοήθειας (grade) ήταν: grade I 20,4 %, grade II 41,7 %, grade III 37,9 %.

Η ύπαρξη μεταστάσεων στους επιχώριους λεμφαδένες διευρενήθηκε στο 81,6% των όγκων και από αυτούς το 42,5 % ήταν θετικοί για διήθηση και το 57,5% αρνητικοί. Ο αριθμός των διηθημένων λεμφαδένων που αναφέρθηκαν ήταν από 1 έως 27 με μέση τιμή το 6.

48,6% των όγκων βρέθηκαν θετικοί για τους υποδοχείς οιστρογόνων και το 33,8% για τους υποδοχείς προγεστερόνης (θετικοί ως προς τους υποδοχείς θεωρήθηκαν οι όγκοι με παρουσία υποδοχέων >10%).

Η ιστοπαθολογική κατάταξη, που πραγματοποιήθηκε σε υλικό άμεσα γειτονικό προς εκείνο που χρησιμοποιήθηκε για γενετική ανάλυση, έγινε με βάση τις υποδείξεις κατά WHO. Η κατηγορία των πορογενών καρκινωμάτων περιλάμβανε 6 πορογενή καρκινώματα μη διηθητικού τύπου DCIS (4,1%), 4 θηλώδη (2,7%), 3 ηθμοειδή (2,1%) και 26 φαγεσωρικά (17,7%) εκ των οποίων δύο παρουσίαζαν εστίες ενδοπορογενούς καρκινώματος (IDC), διηθητικά πορογενή καρκινώματα μη ειδικού τύπου (NOS) εκ των οποίων 59 ήταν αμγή (40,8%) ενώ άλλα 11 παρουσίαζαν εστίες μη διηθητικού καρκινώματος (7,5%), 6 σωληνώδη χαμηλής διαφοροποίησης (4,1%), 4 βλενώδη και 1 μυελογενές. Τα 15 λοβιακά (10,3%) που εξετάστηκαν περιλάμβαναν 10 αμιγώς λοβιακά



και 5 με εστίες *in situ* λοβιακού ή πορογενούς καρκινώματος. Τέλος στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν και 6 καρκινώματα μικτού τύπου δηλ. πορογενή με λοβιακά στοιχεία και 2 νευροενδοκρινικά καρκινώματα. Όπως φαίνεται από την αναλυτική παρουσίαση των ιστολογικών τύπων, οι κατηγορίες που αντιπροσωπεύονται από ικανοποιητικό αριθμό δειγμάτων ήταν τα πορογενή διηθητικά καρκινώματα μη ειδικού τύπου, τα φαγεσωρικά και τα λοβιακά διηθητικά καρκινώματα, και μελετήθηκαν σαν διαφορετικές κατηγορίες.

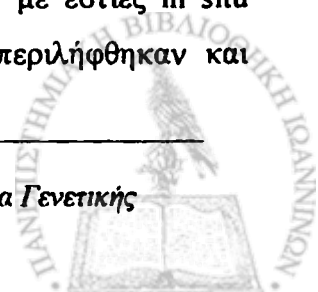
### ***B. Μελέτη γενετικών ανωμαλιών σε σχέση με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους και τους βιολογικούς μηχανισμούς.***

Η μελέτη των γενετικών ανωμαλιών πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της τεχνικής του συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού (CGH), η οποία ολοκληρώθηκε επιτυχώς σε 82 δείγματα πρωτογενών όγκων του μαστού. Στον Πίνακα 2α δίνονται οι γενετικές ανακατατάξεις που αντιστοιχούν σε κάθε δείγμα..

Η κατανομή των δειγμάτων στα 82 περιστατικά όσον αφορά τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους έγινε προσπάθεια να είναι περίπου η ίδια με εκείνη του συνολικού πληθυσμού.

57,1% των όγκων βρέθηκαν θετικοί για τους υποδοχείς οιστρογόνων και το 55,1% για τους υποδοχείς προγεστερόνης (πάνω από 10%). Ο βαθμός ιστολογικής κακοήθειας ήταν γνωστός για το 58% των όγκων και η κατανομή είναι grade I 20,7 %, grade II 46,6 %, grade III 32,7 %. Η ύπαρξη μεταστάσεων στους επιχώριους λεμφαδένες διερευνήθηκε στο 73% των όγκων και από αυτούς το 35,6 % ήταν θετικοί για διήθηση και το 64,4% αρνητικοί.

Σύμφωνα με την ιστοπαθολογική κατάταξη, τα πορογενή καρκινώματα περιλάμβαναν: 4 μη διηθητικού τύπου DCIS (4,8%), 2 θηλώδη (2,4%), 2 ηθμοειδή (2,4%), 20 φαγεσωρικά (24,3%) εκ των οποίων δύο παρουσίαζαν σημαντικό στοιχείο ενδοπορογενούς καρκινώματος (IDC), πορογενή διηθητικά μη ειδικού τύπου NOS (39, 50,0%) εκ των οποίων 7 παρουσίαζαν εστίες πορογενούς *in situ*, 2 βλενωδή και 1 μυελογενές. Στα λοβιακά εμπεριέχονταν 6 αμιγώς λοβιακά και 3 με εστίες *in situ* λοβιακού ή πορογενούς καρκινώματος. Τέλος στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν και



καρκινώματα μικτού τύπου δηλ. πορογενή με λοβιακά (1) και 2 νευροενδοκρινικά καρκινώματα.

- αποτελέσματα ανάλυσης γενετικών ανωμαλιών με τη μέθοδο του συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από το CGH (Πίνακας 2α) 77 από τα 82 περιστατικά παρουσίαζαν μη ισοζυγισμένες ανακατατάξεις. Ο αριθμός των μη ισοζυγισμένων ανακατατάξεων στο σύνολο των δειγμάτων κυμαινόταν από 0 έως 32 με μέση τιμή 7,76 ανά περιστατικό. Ο αριθμός των γονιδιακών ενισχύσεων κυμαινόταν από 0 έως 20 ανά περιστατικό (μέση τιμή στο συνολικό πληθυσμό 4,1 ανωμαλίες, και 4,6 μεταξύ των δειγμάτων που παρουσίαζαν γονιδιακή ενίσχυση), ενώ αντίστοιχα των γονιδιακών ελλείψεων από 0 έως 13 (μέση τιμή στο συνολικό πληθυσμό 3,2 και 4,5 μεταξύ των δειγμάτων που παρουσίαζαν έλλειψη). Σημαντική συσχέτιση παρουσίαζαν μεταξύ τους το σύνολο των γονιδιακών ενισχύσεων και γονιδιακών ελλείψεων ( $r=0,652$ ;  $p<0,001$ ).

Οι γενετικές ανωμαλίες που ανιχνεύθηκαν αναλύθηκαν με δύο διαφορετικούς τρόπους:

1ον ως ένα ενιαίο σύνολο, αποδίδοντας το συνολικό γενωμικό δυναμικό των ανακατατάξεων του κυττάρου (γενετική πολυπλοκότητα) ανεξάρτητα από το είδος της γενετικής ανακατάταξης (ενίσχυση, έλλειψη ή επέκταση)

2ον κάθε μία ανωμαλία ξεχωριστά, αποδίδοντας αυτό που πραγματικά σημαίνει δηλαδή μία γενετική περιοχή ή θέση στην οποία εδράζονται ένα ή περισσότερα γονίδια

- αποτελέσματα ανάλυσης βιολογικών παραμέτρων

Στον Πίνακα 2β απεικονίζονται οι μέγιστες και ελάχιστες τιμές των βιολογικών παραμέτρων που μετρήθηκαν καθώς και οι αντίστοιχοι μέσοι όροι. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις του PCNA και του eγB2 εκφράζονται σε μονάδες OD/mg  $10^{-1}$  πρωτεΐνης και κυμαίνονται από 0,0 ως 13,4 και από 0,8 ως 13 αντίστοιχα, η ενεργότητα της πολυ(A)-πολυμεράσης κυμαίνεται από 0 ως 122,78 μονάδες ενζυμικής ενεργότητας/μg πρωτεΐνης, ενώ για την τελομεράση υπολογίζεται η σχετική ενεργότητα του ενζύμου με εύρος τιμών από 0 ως 4248,00. Η μελέτη έκφρασης των άλλων δύο βιολογικών παραμέτρων - FHIT και RhoC- πραγματοποιείται με Western blot και RT-PCR



αντίστοιχα και υπολογίζεται από κατάλληλο σύστημα επεξεργασίας εικόνας με υπολογιστή.

### **B1. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΟΛΥΠΛΟΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΕΣ**

Ως γενετική πολυπλοκότητα ορίστηκε το σύνολο των γενετικών ενισχύσεων (ή/και γενετικών εκεκτάσεων όπου σημειώθηκαν) και των απωλειών που εντοπίστηκαν με CGH σε κάθε περιστατικό. Ο μέσος όρος των γενετικών ανωμαλιών στο συνολικό πληθυσμό ήταν 8 και σε ορισμένες περιπτώσεις η στατιστική επεξεργασία έγινε ξεχωριστά για τα περιστατικά με λιγότερες ή περισσότερες ανωμαλίες από το μέσο όρο (57 δείγματα είχαν ανωμαλίες ίσες ή λιγότερες από 8, ενώ 25 περισσότερες από 8).

Όπως φαίνεται από τον *Πίνακα 3*, σημαντική συσχέτιση παρουσιάστηκε μεταξύ της γενετικής πολυπλοκότητας και της παρουσίας ή της απουσίας υποδοχέων οιστρογόνων (περισσότερες ανωμαλίες παρουσιάζονται στις περιπτώσεις με αρνητικούς υποδοχείς). Περισσότερες κατά μέσο όρο ανωμαλίες εμφάνισαν και τα περιστατικά που δεν παρουσίασαν διήθηση στους λεμφαδένες σε σχέση με εκείνα που είχαν, χωρίς όμως αυτή η διαφορά να ήταν στατιστικά σημαντική. Αντίθετα καμία συσχέτιση δεν παρουσιάστηκε μεταξύ της ηλικιακής κατανομής και των γενετικών ανακατατάξεων, καθώς ούτε και με τους υποδοχείς προγεστερόνης.

Στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε στις γενετικές ανακατατάξεις σε σχέση με το βαθμό κακοήθειας ( $p=0,002$ ). Πιο αναλυτικά η σύγκριση μεταξύ γενετικής πολυπλοκότητας και καθενός των παραγόντων που συνιστούν το βαθμό κακοήθειας έδειξε μία στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του υψηλού μιτωτικού δείκτη και του σχηματισμού σωληνίσκων και της παρουσίας πολλών γενετικών αλλαγών που προσδιορίστηκαν με CGH. Μία τέτοια συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε με τον πυρηνικό πλειομορφισμό (*Πίνακας 4*).

Η γενετική πολυπλοκότητα ποικίλλει επίσης με τον ιστολογικό τύπο. Στο *Σχηματική απεικόνιση 1* (Παράρτημα III) δίνονται συνοπτικά οι μέσες τιμές των γενετικών ανωμαλιών στους διάφορους ιστολογικούς τύπους (στη στατιστική επεξεργασία λαμβάνονται υπόψη και τα περιστατικά χωρίς ανωμαλίες). Όπως φαίνεται, τα πορογενή καρκινώματα *in situ* παρουσίασαν το χαμηλότερο μέσο όρο αριθμού



γενετικών ανωμαλιών (2,5). Ακολουθούν τα βλεννώδη (5), τα πορογενή διηθητικά μη ειδικού τύπου (6,38), τα φαγεσωρικά (12,20) και τα θηλώδη με το μεγαλύτερο μέσο όρο (24,5). Το μοναδικό μυελογενές που αναλύθηκε εμφάνισε το μικρότερο αριθμό ανωμαλιών (2).

Απ'όλες τις κατηγορίες ιστολογικών τύπων, τα φαγεσωρικά καρκινώματα και τα πορογενή διηθητικά μη ειδικού τύπου συγκέντρωσαν ικανό αριθμό δειγμάτων που επιτρέπει περαιτέρω ανάλυση. Συγκρίνοντας τα πορογενή διηθητικά μη ειδικού τύπου καρκινώματα με τα υπόλοιπα πορογενή διαπιστώνουμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά το μέσο όρο των γενετικών αλλαγών μεταξύ τους ( $p < 0,001$ ). Συγκρίνοντας τις δύο, ως προς τον αριθμό των δειγμάτων, βασικές κατηγορίες, δηλαδή τα φαγεσωρικά και τα διηθητικά μη ειδικού τύπου υπάρχει επίσης στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p = 0,002$ ).

Η κατηγορία των λοβιακών καρκινωμάτων που περιλαμβάνει μόνο διηθητικά καρκινώματα (9 περιστατικά) παρουσίασε μέσο όρο ανωμαλιών 4,89. Συγκρίνοντας τα λοβιακά και τα πορογενή καρκινώματα δεν διαπιστώσαμε στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p = 0,224$ ), όσον αφορά τη γενετική πολυπλοκότητα, ενώ αντίθετα στατιστικά σημαντική διαφορά διαπιστώσαμε μεταξύ των λοβιακών και των φαγεσωρικών καρκινωμάτων ( $p = 0,006$ ). Όπως φαίνεται τα σαφώς χαρακτηρισμένα *in situ* καρκινώματα, παρουσιάζουν το χαμηλότερο μέσο όρο αριθμού γενετικών ανωμαλιών σχετικά με όλες τις άλλες κατηγορίες (ιστολογικοί τύποι που θεωρητικά ανήκουν στα πορογενή *in situ* καρκινώματα, κατατάχθηκαν στην κατηγορία των διηθητικών καρκινωμάτων όταν στην παθολογοανατομική αναφορά αναφερόταν ότι ο όγκος είχε διαπεράσει τη βασική μεμβράνη).

## **B2. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΟΛΥΠΛΟΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ.**

Στο σύνολο των πρωτογενών όγκων μελετήθηκε η έκφραση ορισμένων βιολογικών παραγόντων που παρουσιάζουν αυξημένη ή έκτοπη έκφραση σε καρκινικά κύτταρα (PCNA, *c-myc*, B2, τελομεράση και πολύ(A)-πολυμεράση) σε συνάρτηση με τη γενετική πολυπλοκότητα των αντίστοιχων όγκων. Στον Πίνακα 5 απεικονίζονται οι πιθανές συσχετίσεις των βιολογικών παραμέτρων που μελετήθηκαν σε σχέση με τις γενετικές ανακατατάξεις στο σύνολο των δειγμάτων, αλλά και όταν χωρίσουμε τον

πληθυσμό σε περιστατικά με λίγες ή πολλές γενετικές ανωμαλίες. Στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ενεργότητας της τελομεράσης και των γενετικών ανωμαλιών εμφανίστηκε μόνο στην περίπτωση των δειγμάτων με λίγες ανωμαλίες (<8) ( $p=0,027$ ) (διάγραμμα 1α). Η σχέση αντιστρέφεται για τα δείγματα με μεγαλύτερο αριθμό ανωμαλιών, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική. Οι τάσεις αυτές περιγράφονται καλύτερα από τη δευτεροβάθμια εξίσωση  $Y=aX^2 + \beta X + \gamma$ , όπου  $X$  ο αριθμός των γενετικών ανωμαλιών και  $Y$  οι τιμές ενεργότητας της τελομεράσης (διάγραμμα 1β). Όταν εξετάστηκαν ξεχωριστά οι δύο ιστολογικοί τύποι που διέθεταν ικανοποιητικό αριθμό δειγμάτων, φάνηκε ότι η θετική συσχέτιση των γενετικών ανωμαλιών και της ενεργότητας της τελομεράσης διατηρούνταν στην περίπτωση των πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μη ειδικού τύπου, και μάλιστα ήταν στατιστικά σημαντική (coef.=0,388,  $p=0,016$ ), ενώ στην περίπτωση των φαγεσωρικών η τάση αυτή αντιστρεφόταν χωρίς να είναι στατιστικά σημαντική (coef.=-0,324,  $p=0,164$ ) (διαγράμματα 2α, 2β). Οι υπόλοιποι παράγοντες που εξετάστηκαν δεν παρουσίασαν καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το αριθμό των γενετικών ανωμαλιών συνολικά ή σε κάθε ομάδα ξεχωριστά (περισσότερες από 8 ή λιγότερες από 8 ανωμαλίες).

Συγκρίνοντας τους μέσους όρους τιμών έκφρασης (t-test) άλλων πρωτεϊνών που μελετήθηκαν πολύ(Α)-πολυμεράση, τελομεράση, PCNA και *c-erbB2* μεταξύ των δειγμάτων με μεγάλο ή μικρό αριθμό ανωμαλιών δεν εμφανίστηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά. (Πίνακας 6).

### B3 ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ - ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΕΣ.

Όπως φαίνεται παραστατικά στο *διάγραμμα 3*, στο συνολικό πληθυσμό αύξηση του γενετικού υλικού παρατηρήθηκε πιο συχνά στις περιοχές 1q (54,9%), 8q (29,3%) και λιγότερο στις 8p (23,2%), 16p (20,8%), 17q (18,3%), 20q (18,3%), ενώ οι πιο συχνές ελλείψεις παρουσιάστηκαν στις περιοχές 8p (19,5%), 11q (23,2%), 13q (20,7%), 16q (34,1%). Γονιδιακή επέκταση παρουσίασαν 16 περιπτώσεις στις περιοχές 1q (4), 6p (1), 7p (3), 7q (1), 8q (6), 10p (1), 11q (2), 17q (2), 20q (2).

Για τον προσδιορισμό επιμέρους περιοχών στους παραπάνω βραχίονες, αναλύθηκαν όλες οι ανακατατάξεις που παρατηρήθηκαν σε κάθε περίπτωση με υψηλή

συχνότητα στο συνολικό πληθυσμό. Στην περίπτωση του 1q η περιοχή που φάνηκε να ενέχεται περισσότερο είναι η 1q31 (82,75%), όπως φαίνεται από το *διάγραμμα 4α*. Στο 8q μεγαλύτερη συχνότητα παρατηρήθηκε στην περιοχή 8q24 (90,47%) (*διάγραμμα 4β*). Για την περίπτωση των 8p, 16p και 20q αύξηση παρουσίασαν όλα τα περιστατικά στις περιοχές 8p11pter, 16p11p13 και 20q11q13 αντίστοιχα. Τα περισσότερα περιστατικά που εμφάνισαν αύξηση στο 17q παρουσίασαν πιο συχνά αυξημένη την περιοχή 17q24 (64,28%). Στις περιπτώσεις των ελλείψεων στο 8p πιο συχνή έλλειψη εμφανίστηκε η περιοχή 8p23 (94,44%), στο 82,35% των δειγμάτων που παρουσίασαν έλλειψη στο 16q παρουσίασαν έλλειψη όλου του βραχίονα q, στην περίπτωση έλλειψης στο 11q η περιοχή που απουσίαζε από όλα τα δείγματα ήταν 11q24, ενώ το 13q δεν παρουσίαζε καμία συχνή περιοχή.

Διαιρώντας τον πληθυσμό των πρωτογενών όγκων σε 2 κατηγορίες με βάση το συνολικό αριθμό γενετικών ανωμαλιών (μεγαλύτερο ή μικρότερο του μέσου όρου) έγινε σύγκριση της συχνότητας εμφάνισης συγκεκριμένων γενετικών ανακατατάξεων σε σχέση με τη γενετική πολυπλοκότητα (*Πίνακας 7*). Στον πίνακα 7 όπου το χρωμοσωμικό τμήμα είναι χωρίς πρόσημο, π.χ. 1q, ο αριθμός των δειγμάτων που αναφέρονται δεν παρουσιάζουν γενετικές ανωμαλίες σ' αυτό το χρωμοσωμικό βραχίονα. Όπου το χρωμοσωμικό τμήμα είναι με θετικό πρόσημο, π.χ. +1q, ο αριθμός των δειγμάτων παρουσιάζουν αύξηση και αντίστοιχα όπου είναι με αρνητικό παρουσιάζουν έλλειψη στον αντίστοιχο χρωμοσωμικό βραχίονα. Όπως φαίνεται, οι ανωμαλίες +1q, +16p και -16q είναι ανεξάρτητες από το συνολικό αριθμό των γενετικών ανωμαλιών. Αντίθετα, για τις υπόλοιπες περιοχές υπάρχει μια στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισής τους ανάμεσα στα περιστατικά με χαμηλό μέσο όρο ανωμαλιών και τα περιστατικά με υψηλό μέσο όρο. Στις περισσότερες περιπτώσεις μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης μιας ανωμαλίας φάνηκε να συμβαδίζει με τη συσσώρευση γενετικών ανωμαλιών (μεγαλύτερη συχνότητα στα περιστατικά με αριθμό ανωμαλιών μεγαλύτερο του μέσου όρου).

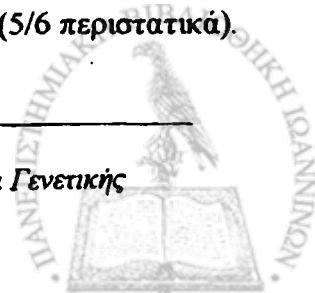
Στο *διάγραμμα 5* παρουσιάζονται οι γενετικές ανακατατάξεις σε σχέση με τους υποδοχείς οιστρογόνων (θετικοί - αρνητικοί). Δείγματα θετικά ως προς τους υποδοχείς οιστρογόνων παρουσίασαν πιο συχνά αύξηση στις περιοχές 1q, 8q, 16p και 20q και



έλλειψη στις περιοχές 16q, 11q. Δείγματα αρνητικά ως προς τους υποδοχείς οιστρογόνων παρουσίασαν αύξηση με μεγαλύτερη συχνότητα στις ίδιες περιοχές και επιπλέον στην 10p και έλλειψη στην περιοχή 8p. Συγκρίνοντας τα προφίλ των δύο κατηγοριών (θετικούς και αρνητικούς υποδοχείς οιστρογόνων), φάνηκε να υπάρχει μεγαλύτερη διασπορά και πιο συχνή εμφάνιση ανωμαλιών στα περιστατικά με αρνητικούς υποδοχείς οιστρογόνων και ότι ορισμένες περιοχές παρουσιάζονταν πιο αυξημένες ή με πιο συχνές ελλείψεις στη μία ή την άλλη κατηγορία. Για παράδειγμα οι θετικοί για υποδοχείς οιστρογόνων όγκοι είχαν μεγαλύτερη συχνότητα αύξησης της περιοχής 1q και έλλειψης της περιοχής 16q, ενώ οι αρνητικοί για υποδοχείς οιστρογόνων όγκοι παρουσίαζαν μεγαλύτερη συχνότητα αύξησης της περιοχής 8q, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά μεταξύ τους. Τέλος κάποιες περιοχές εμφανίστηκαν μόνο στην κατηγορία των αρνητικών για υποδοχείς οιστρογόνων δειγμάτων, όμως μόνο η αύξηση στην περιοχή 10p παρουσίασε σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 κατηγοριών (Πίνακας 8).

Στο *διάγραμμα 6* παρουσιάζονται οι χρωμοσωμικές περιοχές με γονιδιακή αύξηση ή έλλειψη σε σχέση με θετικούς και αρνητικούς λεμφαδένες. Στους θετικούς λεμφαδένες μεγαλύτερη συχνότητα παρουσίασαν οι χρωμοσωμικές περιοχές 1q, 8q, 16p, 17q και 20q όπου παρατηρήθηκε αύξηση, ενώ έλλειψη εμφάνισαν πιο συχνά περιοχές 11q και 16q. Οι αρνητικοί λεμφαδένες παρουσίασαν επίσης αύξηση στις ίδιες περιοχές και έλλειψη στις περιοχές 11q, 13q, 16q. Συγκρίνοντας θετικούς και αρνητικούς λεμφαδένες (test  $\chi^2$ ), ορισμένες ανωμαλίες συναντήθηκαν μόνο στους θετικούς ή στους αρνητικούς λεμφαδένες, χωρίς όμως να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους (Πίνακας 9).

Σε μία προσπάθεια προσδιορισμού χαρακτηριστικών γενετικών ανακατατάξεων σε σχέση με τον ιστολογικό τύπο του όγκου, στα *διάγραμματα 7, 8, 9* απεικονίζονται οι γενετικές ανακατατάξεις που προσδιορίστηκαν με CGH για τις κατηγορίες που συγκεντρώθηκε ικανοποιητικός αριθμός δειγμάτων: διηθητικά πορογενή μη ειδικού τύπου, φαγεσωρικά και διηθητικά λοβιακά. Όπως φαίνεται τα μη διηθητικά καρκινώματα παρουσιάζουν χαρακτηριστική γονιδιακή ενίσχυση στην περιοχή 1q (5/6 περιστατικά).





Στην περίπτωση των πορογενών καρκινωμάτων μη ειδικού τύπου, οι πιο χαρακτηριστικές ενισχύσεις σημειώθηκαν στο 1q (45,45%), 8q (18,18%), 8p (13,63%), 17q και 20q (13,63%), ενώ σημαντικές ελλείψεις παρατηρήθηκαν στις περιοχές 8p, 11q (18,18%), 13q (13,13%) και 16q (29,54%). Τα φαγεσωρικά καρκινώματα παρουσίασαν γονιδιακή ενίσχυση πιο συχνά στις περιοχές 1q, 8q, 8p, 20q με συχνότητες 55%, 65%, 25% και 30% αντίστοιχα, ενώ ελλείψεις παρουσιάστηκαν στις περιοχές 11q (30%), 16q (20%). Στα λοβιακά καρκινώματα παρόλο που ο αριθμός των περιστατικών ήταν κατά πολύ μικρότερος από τις άλλες δύο κατηγορίες παρουσιάστηκε εμφανής γονιδιακή ενίσχυση στις περιοχές 8p (77,77%), 1q (44,44%) και έλλειψη στο 16q (55,55%) και 11q (33,33%).

Από συγκριτική μελέτη των παραπάνω κατηγοριών φάνηκε πως τα πορογενή διηθητικά καρκινώματα μη ειδικού τύπου είχαν περίπου τις ίδιες μη ισοζυγισμένες γενετικές ανακατατάξεις με τα φαγεσωρικά, αλλά σε μικρότερη συχνότητα. Στο *διάγραμμα 10* φαίνεται καθαρά ότι γενετικές ανωμαλίες παρατηρήθηκαν σε όλη την έκταση του γονιδιώματος στην περίπτωση των φαγεσωρικών σε σχέση με τα πορογενή διηθητικά. Κάποιες διαφορές στη συχνότητα συγκεκριμένων γενετικών ανωμαλιών μεταξύ των κατηγοριών αυτών δε φάνηκε να είναι στατιστικά σημαντικές. Αντίθετα όμως ορισμένες γενετικές ανωμαλίες φάνηκε να είναι χαρακτηριστικές μιας συγκεκριμένης κατηγορίας ιστολογικού τύπου όπως στην περίπτωση της γονιδιακής ενίσχυσης στο 8p που παρουσιάστηκε σε σημαντικό βαθμό στα λοβιακά. Επίσης θα πρέπει να τονιστεί ότι η γονιδιακή ενίσχυση στο 1q και η έλλειψη στο 16q συναντήθηκαν και στις τρεις κατηγορίες και σε σημαντικό βαθμό στο εσωτερικό της καθεμιάς.

Στον *Πίνακα 10* απεικονίζονται οι πιο συχνές γενετικές ανακατατάξεις σε σχέση με το βαθμό ιστολογικής κακοήθειας (Grade). Όπως φάνηκε στατιστικά σημαντική διαφορά παρουσίασαν μεταξύ τους οι δύο κατηγορίες (I-II και III) όταν υπήρχε κάποια γενετική ενίσχυση στις περιοχές 8q, 10p, και 20q και έλλειψη στις περιοχές 3p, 8p και 14q. Μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης γενετικών ανωμαλιών σ' αυτές τις περιοχές αναφέρθηκε σε περιστατικά με το μεγαλύτερο βαθμό κακοήθειας.

Αναλύοντας το βαθμό ιστολογικής κακοήθειας στους 3 παράγοντες που τον συνθέτουν (σχηματισμός σωληνίσκων, πυρηνικός πλειομορφισμός, μιτωτικός δείκτης), φάνηκε ότι ο μιτωτικός δείκτης συνδέεται με τις γενετικές ανακατατάξεις που βρίσκονται



στις περιοχές 3p, 8p, 8q, 10p, 14q και 15q (*Πίνακας 11*). Στατιστικά σημαντική ήταν η διαφορά στην εμφάνιση ανωμαλιών στις συγκεκριμένες χρωμοσωμικές περιοχές, ανάμεσα στην κατηγορία με υψηλό μιτωτικό δείκτη και στην κατηγορία με χαμηλό μιτωτικό δείκτη.

Μετά από σύγκριση των φαγεσωρικών και των διηθητικών πορογενών καρκινωμάτων σε σχέση με το συνολικό βαθμό κακοήθειας και τους επιμέρους παραγοντές που τον συνιστούν, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Τα περισσότερα πορογενή διηθητικά ανήκαν στις κατηγορίες 1-2 βαθμού ιστολογικής κακοήθειας, ενώ το αντίθετο ίσχυε για τα φαγεσωρικά. Αναλύοντας το βαθμό κακοήθειας τους συντελεστές του, παρατηρήσαμε ότι τα φαγεσωρικά εμφάνισαν υψηλές τιμές για καθένα απ' αυτούς (σχηματισμός σωληνίσκων, μιτωτικό δείκτη, πυρηνικός πλειομορφισμός) (*Πίνακας 12*). Περαιτέρω στατιστική ανάλυση και στις άλλες ιστοπαθολογικές κατηγορίες δεν ήταν εφικτή λόγω του σχετικά μικρού αριθμού δειγμάτων.

#### **B4. ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ - ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ**

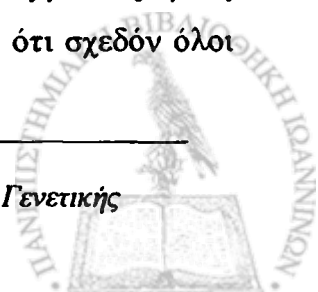
Για να ελέγξουμε αν υπάρχει συσχέτιση απορρυθμισμένων βιολογικών μηχανισμών στον καρκίνο του μαστού με τις χρωμοσωμικές ανακατατάξεις στις συγκεκριμένες περιοχές υψηλής συχνότητας που εντοπίσαμε συγκρίναμε την έκφραση ορισμένων βιολογικών παραμέτρων στο συνολικό πληθυσμό και σε κάθε κατηγορία ιστολογικού τύπου με ικανοποιητικό αριθμό δειγμάτων. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις βιολογικές παραμέτρους που εξετάσαμε (εκτός από το *c-erbB2* και το *FHIT*) είναι γνωστό ότι εδράζονται εκτός των χρωμοσωμικών αυτών περιοχών. Άρα, οποιαδήποτε συσχέτιση αυτών των παραμέτρων με τις επιμέρους γενετικές ανακατατάξεις δεν θα οφείλεται σε αλλαγή (επέκταση ή έλλειψη) των συγκεκριμένων γονιδίων, αλλά πιθανότατα σε αλλαγή της έκφρασης αντίστοιχων γονιδιακών προϊόντων. Ο εντοπισμός συσχέτισης μεταξύ συγκεκριμένων χρωμοσωμικών ανακατατάξεων και απορρύθμισης συγκεκριμένου βιολογικού μηχανισμού είναι σημαντικός για τη διαλεύκανση (αποσαφήνιση) του μηχανισμού και της ταυτοποίησης των παραγόντων που συμμετέχουν σ' αυτόν.



Στον *πίνακα 13* απεικονίζονται οι μέσοι όροι τιμών των παραγόντων που εξετάστηκαν στο συνολικό πληθυσμό ανά χρωμοσωμική περιοχή (που παρουσίασε εμφανή γονιδιακή ενίσχυση ή έλλειψη). Όπως φαίνεται, στο συνολικό πληθυσμό το PCNA παρουσίασε μια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων που είχαν ενίσχυση της περιοχής 8p και εκείνων που δεν είχαν, ενώ η ενεργότητα της πολυμεράσης φαίνεται να συνδέεται με την ενίσχυση της περιοχής 1q και έλλειψη της 16q.

Επίσης, μελετήθηκαν οι μέσοι όροι τιμών των παραγόντων ανά χρωμοσωμική ανακατάταξη στα πορογενή διηθητικά μη ειδικού τύπου, στα φαγεσωρικά και τα λοβιακά καρκινώματα (*Πίνακες 14,15,16* αντίστοιχα). Η στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκφραση του PCNA σε περίπτωση γονιδιακής ενίσχυσης της περιοχής 8p παρατηρείται επίσης στα φαγεσωρικά καρκινώματα, όπου η ίδια τάση παρατηρήθηκε και στις περιοχές +8q και -13q. Όπως φαίνεται τα λοβιακά καρκινώματα δεν παρουσίασαν κάποια σχέση μεταξύ των μοριακών χαρακτήρων και των επιμέρους γενετικών ανακατατάξεων. Όσον αφορά την έκφραση της τελομεράσης, στατιστικά σημαντική αύξηση της ενεργότητας της παρατηρήθηκε στα φαγεσωρικά σε περίπτωση έλλειψης της περιοχής 11q και στα πορογενή σε περίπτωση ενίσχυσης της περιοχής 1q. Η πολυμεράση παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την ενεργότητα στην περίπτωση ενίσχυσης της περιοχής 8q μόνο στα πορογενή καρκινώματα μη ειδικού τύπου.

Παρατηρούμε ότι ανά ιστοπαθολογικό τύπο καρκινωμάτων οι συσχετίσεις χρωμοσωμικών ανακατατάξεων και βιολογικών παραμέτρων διαφοροποιούνται. Θέλοντας να ελέγξουμε αν ισχύει και αντίστροφα η υπόθεσή μας, δηλαδή αν η χρωμοσωμική ανακατάταξη συγκεκριμένου γονιδίου είναι δυνατόν να συνδέεται με απορρύθμιση συγκεκριμένων βιολογικών μηχανισμών επιλέξαμε να μελετήσουμε το γονίδιο *FHIT*. Το *FHIT* αναγνωρίστηκε πρόσφατα σαν ογκοκατασταλτικό γονίδιο και βρέθηκε ότι εδράζεται στην περιοχή 3p14. Η έκφρασή του μελετήθηκε σε 54 όγκους. Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης φάνηκε να κυμαίνονται στα διάφορα δείγματα χωρίς να σημειωθεί πλήρης απώλεια. Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου (μετά από Western blot- *εικόνα 3*), έδειξε πολύ καλή συσχέτιση με την πού(A)-πολυμεράση ( $p=0,006$ ) και με την τελομεράση ( $p<0,001$ ) (*Πίνακας 17a*). Συγκρίνοντας ακραίες τιμές έκφρασης του *FHIT* (πολύ χαμηλή ή πολύ υψηλή) με τους μέσους όρους των άλλων μοριακών παραγόντων που μελετήθηκαν, διαπιστώνουμε ότι σχεδόν όλοι



παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης στις περιπτώσεις που το FHIT υπερεκφράζεται, μόνο όμως η πολυ(A)-πολυμεράση και η τελομεράση δίνουν στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα (Πίνακας 17β).

Συχνά η μειωμένη έκφραση αυτού του γονιδίου αναφέρεται σαν αποτέλεσμα έλλειψης ενός αλληλόμορφου του γονιδίου (LOH). Στην παρούσα μελέτη για να διαπιστωθεί η συχνότητα έλλειψης ενός ή και των δύο αλληλομόρφων αυτής της περιοχής πραγματοποιήθηκε μελέτη έλλειψης ετεροζυγωτίας σε μία σειρά 18 δειγμάτων (8 καλοήθειών και 10 καρκινωμάτων) με 8 διαφορετικούς εκκνητές που κάλυπταν την περιοχή 3p14. Απώλεια αλληλόμορφου δεν παρατηρήθηκε σε καμία καλοήθεια παρά μόνο σε καρκινώματα και συγκεκριμένα για τον ανιχνευτή D3S1300.

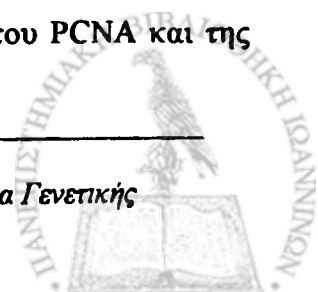
### ***Γ. Συσχετίσεις βιολογικών παραμέτρων με τους κλινικοπαθολογικούς παράγοντες και μεταξύ τους***

#### **Γ1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΕΣ**

Σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές στις καλοήθειες, οι παράγοντες αυτοί (PCNA, *erbB2*, τελομεράση και πολυ(A)-πολυμεράση) παρουσιάστηκαν εμφανώς αυξημένοι στους πρωτογενείς όγκους. Συγκεκριμένα, για το PCNA η μέση τιμή στις καλοήθειες ήταν 0,62, για την πολυμεράση 1,03 και την τελομεράση 29,21, ενώ στους όγκους ήταν 3,24, 14,88, 1092,39 αντίστοιχα.

Στον Πίνακα 18 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές έκφρασης των βιολογικών παραγόντων που μελετήθηκαν στους πρωτογενείς όγκους σε σχέση με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους, την ηλικία, το βαθμό ιστολογικής κακοήθειας, την παρουσία μετάστασης στους λεμφαδένες, τους υποδοχείς οιστρογόνων και τους υποδοχείς προγεστερόνης.

Από τη σύγκριση των μέσων τιμών έκφρασης των βιολογικών παραμέτρων με τις ηλικιακές κατηγορίες προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του *c-erbB2* (εντονότερη έκφραση στις μεγαλύτερες ηλικίες,  $p=0,042$ ) και της τελομεράσης (χαμηλότερα επίπεδα σε προχωρημένες ηλικίες,  $p=0,027$ ). Αντίθετα καμία συσχέτιση δεν βρέθηκε με το βαθμό ιστολογικής κακοήθειας. Στατιστικά σημαντική διαφορά φάνηκε και μεταξύ των επιπέδων της τελομεράσης και του PCNA και της



παρουσίας υποδοχέων οιστρογόνων, ( $p=0,004$  και  $0,041$  αντίστοιχα). Στην περίπτωση της τελομεράσης ο μέσος όρος ενεργότητας ήταν μικρότερος στους αρνητικούς για υποδοχείς οιστρογόνων όγκους, ενώ στους ίδιους όγκους τα επίπεδα του PCNA φάνηκε να ανεβαίνουν. Όσον αφορά τη μετάσταση στους λεμφαδένες φαίνεται μια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των θετικών και αρνητικών για μετάσταση σε λεμφαδένες ως προς την έκφραση του *c-erbB2* ( $p<0,001$ ).

Επαναλαμβάνοντας τη μελέτη των βιολογικών παραμέτρων σε κάθε ιστολογικό τύπο με ικανοποιητικό αριθμό δειγμάτων προέκυψαν τα εξής:

Ψ στα διηθητικά πορογενή καρκινώματα μη ειδικού τύπου στατιστικά σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των επιπέδων ενεργότητας της τελομεράσης και των ηλικιακών κατηγοριών ( $p=0,006$ ), των επιπέδων έκφρασης του *c-erbB2* και της διήθησης (ή μη) των λεμφαδένων ( $p=0,002$ ) και της ενεργότητας της τελομεράσης και των υποδοχέων οιστρογόνων ( $p=0,051$ ).

Ψ στα διηθητικά λοβιακά στατιστικά σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε μεταξύ των επιπέδων ενεργότητας της τελομεράσης και των ηλικιακών κατηγοριών ( $p=0,032$ ), της τελομεράσης και των υποδοχέων οιστρογόνων ( $p=0,035$ ) και του PCNA και των υποδοχέων οιστρογόνων ( $p=0,037$ ).

Ψ στα φαγεσωρικά καρκινώματα στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ηλικία παρουσιάζουν τα επίπεδα έκφρασης του PCNA και του *c-erbB2* ( $p=0,013$  και  $0,016$  αντίστοιχα) και ο βαθμός ιστολογικής κακοήθειας με τα επίπεδα έκφρασης του *erbB2* ( $p=0,016$ ).

## Γ2. ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥΣ

Στον Πίνακα 19, αναφέρονται οι συσχετίσεις μεταξύ των βιολογικών παραμέτρων που εξετάστηκαν. Όπως φαίνεται, το PCNA παρουσιάζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την πολυ(Α)-πολυμεράση ( $p<0,001$ ) και την τελομεράση ( $p=0,015$ ), ενώ πιο έντονη είναι η συσχέτιση μεταξύ της πολυ(Α)-πολυμεράσης και της τελομεράσης ( $p<0,001$ ).

Πραγματοποιώντας τις ίδιες αναλύσεις σε κάθε ιστολογικό τύπο ξεχωριστά, η στατιστικά σημαντική συσχέτιση της πολυ(Α)-πολυμεράσης με το PCNA διατηρείται



στα φαγεσώρικά ( $p=0,015$ ) και τα λοβιακά ( $p<0,001$ ), ενώ της τελομεράσης με την πολυ(A)-πολυμεράση διατηρείται μόνο στα λοβιακά ( $p= 0,001$ ). Στην κατηγορία των πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μη ειδικού τύπου χάνεται κάθε στατιστικά σημαντική συσχέτιση.

#### ***Δ. Πολυεστιακότητα***

Ενδιαφέρον παρουσίασαν χωριστά και 11 ασθενείς με πρωτογενείς όγκους, που εμφάνισαν είτε αμφοτερόπλευρο καρκίνο του μαστού είτε περισσότερες από μία εστίες καρκίνου στον ίδιο μαστό. Η πολυεστιακότητα αποτελεί ένα σχετικά σύνθητες φαινόμενο στον καρκίνο του μαστού. Στους ασθενείς αυτούς έγινε σύγκριση του γενετικού προφίλ αλλά και των βιολογικών παραγόντων προκειμένου να διαπιστωθούν πιθανές διαφορές μεταξύ τους.

Τα αποτελέσματα ήταν ενδιαφέροντα δείχνοντας διαφορές ως προς το γενετικό προφίλ των όγκων που προέρχονταν από διαφορετικά σημεία του ίδιου ασθενή, όπως επίσης και στην έκφραση των βιολογικών παραμέτρων που μελετήθηκαν (*Πίνακες 20 και 3*).

## ***II. Μετάσταση***

15 μεταστάσεις σε λεμφαδένες μελετήθηκαν παράλληλα με τους αντίστοιχους πρωτογενείς και με βάση το υλικό που ήταν διαθέσιμο πραγματοποιήθηκε γενετική ανάλυση (CGH) ή/και μέτρηση έκφρασης των παραμέτρων PCNA, c-erbB2, τελομεράσης και πολύ(A) πολυμεράσης.

Σε 5 ζευγάρια (πρωτογενής όγκος και μετάσταση) πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση, όσον αφορά τις γενετικές ανακατατάξεις. Όπως φαίνεται ή δεν υπήρξε καμία διαφορά μεταξύ των πρωτογενών όγκων και των αντίστοιχων μεταστάσεων ως προς τις γενετικές ανακατατάξεις ή οι μεταστάσεις παρουσιάζουν 1-2 επιπλέον γενετικές αλλαγές (*Πίνακας 21*).



Σ' όλα τα ζευγάρια που εξετάστηκαν (15 συνολικά), η ανάλυση των παραμέτρων που εξετάστηκαν έδειξε υψηλότερες τιμές έκφρασης στις μεταστάσεις απ'ότι στους αντίστοιχους πρωτογενείς όγκους, χωρίς όμως να εμφανίζεται καμία στατιστικά σημαντική διαφορά, προφανώς λόγω της μεγάλης διακύμανσης τιμών. Παρόλ' αυτά αν εξετάσουμε κάθε ζευγάρι χωριστά (πρωτογενή όγκο και την αντίστοιχη μετάσταση) διαπιστώνουμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική αύξηση της ενεργότητας της πολυ(Α)-πολυμεράσης στο εσωτερικό κάθε ζεύγους (*Πίνακας 22α*).

Συγκρίνοντας, επίσης, την έκφραση του *FHIT* μεταξύ των πρωτογενών όγκων και των μεταστάσεων παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων με προφανή αύξηση της έκφρασής τους στους μεταστατικούς όγκους (*πίνακας 22β*).

Ένα από τα γονίδια που έχουν αναφερθεί ότι ενέχονται στη μεταστατική διαδικασία διαφόρων όγκων είναι το *RhoC*. Προκειμένου να διαπιστώσουμε πιθανή συμμετοχή του στην μετάσταση του καρκίνου του μαστού, εξετάστηκαν 41 πρωτογενείς και 11 μεταστατικοί όγκοι ως προς την έκφραση αυτού του γονιδίου με RT-PCR. Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των πρωτογενών όγκων και των μεταστάσεων. Όμως, στο σύνολο των πρωτογενών όγκων παρατηρήθηκε ότι στα περισσότερα φαγεσωρικά καρκινώματα το *Rho C* εκφραζόταν, ενώ στο 50% των πορογενών μη ειδικού τύπου σημειώθηκε απουσία έκφρασης του γονιδίου ( $p=0,005$ ) (*Πίνακας 23α*). Μελετώντας την απουσία ή υπερέκφραση του γονιδίου σε σχέση με τις βιολογικές παραμέτρους που εξετάστηκαν παράλληλα, παρατηρήσαμε μια στατιστικά σημαντική αύξηση της ενεργότητας της πολυ(Α)-πολυμεράσης και μείωση των επιπέδων έκφρασης του *c-erbB2*, στις περιπτώσεις που το *Rho C* υπερεκφραζόταν ( $p=0,029$  και  $0,042$  αντίστοιχα) (*Πίνακας 23β*).



# ΣΥΖΗΤΗΣΗ





Οι μέχρι σήμερα μελέτες της γενετικής σύστασης (χρωμοσωμικές και γονιδιακές ανακατατάξεις) καλοήθων και κακοήθων τύπων νεοπλασιών έχουν καταδείξει χαρακτηριστικές γενετικές ανωμαλίες σε ορισμένους τύπους νεοπλασιών. Έχει παρατηρηθεί, άλλοι όγκοι να παρουσιάζουν μόνο μια χρωμοσωμική ανωμαλία (πρωτογενής) και άλλοι περισσότερες από μία (δευτερογενείς χρωμοσωμικές ανωμαλίες) (247). Παρόλο που διαφαίνεται μια παράλληλη πορεία ανάμεσα στην εξέλιξη της κακοήθειας και τον αριθμό των γενετικών ανωμαλιών, σε κάποιες περιπτώσεις η πίεση της δαρβινικής επιλογής ευνοεί την επικράτηση όγκων με μειωμένη καρυοτυπική πολυπλοκότητα (248).

Αύξηση του αριθμού των σωματικών μεταλλάξεων, σαν αποτέλεσμα δράσης ενδογενών και εξωγενών παραγόντων που προκαλούν βλάβη στο DNA και λαθών που γίνονται κατά τη διάρκεια της αντιγραφής, έχουν ήδη μελετηθεί σε ανθρώπινα κύτταρα και ιστούς, αλλά και σε άλλους οργανισμούς όπως ο ποντικός. Το βασικό ερώτημα που παραμένει είναι πότε το εύρος και το είδος των σποραδικών μεταλλάξεων είναι τέτοιο που επιτρέπει την έναρξη και προώθηση της διαδικασίας της μεταλλαγής με συνέπεια την περαιτέρω αύξηση των γενετικών ανωμαλιών που εμφανίζονται στη πλειοψηφία των καρκίνων του ανθρώπου.

Ο καρκίνος του μαστού χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια όσον αφορά το βιολογικό προφίλ αλλά και την κλινική εξέλιξη που αντανακλάται στη διαφορική ανταπόκριση σε θεραπείες (249). Η εμφάνιση του καρκίνου του μαστού και η εξέλιξη του συνδυάζεται στις περισσότερες περιπτώσεις με συσσωρευμένες γενετικές ανωμαλίες που πιθανώς διαμορφώνουν το φαινότυπο του όγκου. Το κλειδί για την εύρεση προγνωστικών δεικτών και θεραπευτικών στόχων φαίνεται να είναι ο χαρακτηρισμός γονιδίων και βιοχημικών οδών που ενέχονται στην καρκινογένεση του μαστού. Συνεπώς μια κατάταξη με βάση μοριακούς – γενετικούς χαρακτήρες του όγκου θα ήταν όχι μόνο χρήσιμο αλλά και απαραίτητο συμπλήρωμα στα κλασικά κλινικοπαθολογικά κριτήρια. Όμως η ταυτοποίηση αυτών των γονιδίων και η διαλεύκανση των βιοχημικών οδών δεν έχει ακόμα ολοκληρωθεί. Η σάρωση των χρωμοσωμικών θέσεων για τον εντοπισμό των πιο συχνών ελλείψεων ή ενισχύσεων στο γονιδίωμα είναι το πρώτο βήμα στην προσπάθεια για τον εντοπισμό αυτών των χαρακτήρων των όγκων που θα βοηθούσαν σε μια νέα συστηματική γενετική/μοριακή κατάταξή τους. Ο επόμενος στόχος των



ερευνητών είναι η διάκριση των γενετικών ανωμαλιών που είναι κρίσιμες για το σχηματισμό του όγκου από εκείνες που επέρχονται σαν συνέπεια της γενετικής αστάθειας που προκαλείται.

Η CGH είναι μια σχετικά νέα μοριακή κυτταρογενετική μέθοδος που επιτρέπει, με ένα μόνο πείραμα, την ανίχνευση των γενετικών μη ισοζυγισμένων ανωμαλιών, δηλαδή περισσότερων ή λιγότερων ανάπτυπων DNA αλληλουχιών κατά μήκος όλου του γονιδιώματος σε όγκους, έχοντας σαν αναφορά φυσιολογικό DNA (242). Η τεχνική αυτή έχει εφαρμοστεί σε μια πληθώρα τύπων όγκων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, και έχει βοηθήσει στον εντοπισμό άγνωστων μέχρι τώρα ενισχύσεων και ελλείψεων στο γονιδίωμα (210).

Στην παρούσα μελέτη έγινε μία προσπάθεια καταμέτρησης και αξιολόγησης των γενετικών ανωμαλιών σε διάφορους τύπους καρκίνου του μαστού τόσο σε σχέση με τους κλινικοπαθολογικούς χαρακτήρες όσο και με το βιολογικό προφίλ των όγκων προκειμένου να διαπιστωθεί αν συνδέονται ή όχι με κάποια στάδια στην πορεία της καρκινογένεσης. Εξετάστηκαν 147 πρωτογενείς όγκοι, 15 μεταστάσεις και 12 καλοήθειες. Ένα μέρος των πρωτογενών όγκων και των μεταστάσεων αναλύθηκαν με CGH, και προσδιορίστηκαν η γενετική πολυπλοκότητα και το γενετικό προφίλ του κάθε εξεταζόμενου δείγματος. Παράλληλα με τον προσδιορισμό των γενετικών ανωμαλιών εξετάστηκαν ορισμένες βιολογικές παράμετροι των οποίων η έκτοπη έκφραση έχει προταθεί να συνδέεται με διάφορα στάδια της καρκινογένεσης ή παράγοντες που αποτελούν χρησιμοποιούμενους προγνωστικούς δείκτες. Έτσι, σε όλα τα δείγματα μελετήθηκαν ως προς την έκφραση ή την ενεργότητά τους οι πρωτείνες: *PCNA*, *c-erbB2*, τελομεράση και πολύ(A)-πολυμεράση, ενώ σε επιλεγμένες κατηγορίες δειγμάτων μελετήθηκε η έκφραση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *FHIT* καθώς και το γονίδιο *RhoC*, που έχει προταθεί ότι συνδέεται με τη μετάσταση.

➤ Η γενετική πολυπλοκότητα υπολογίστηκε προσθέτοντας τον αριθμό των ενισχύσεων (και των επεκτάσεων όπου εντοπίστηκαν) και των απωλειών που εντοπίστηκαν με CGH σε κάθε περιστατικό.



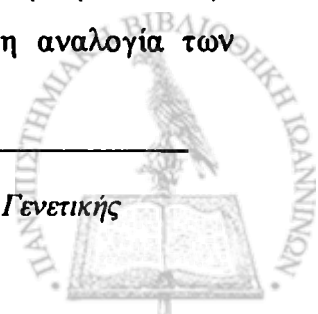
- Οι κλινικοπαθολογικοί χαρακτήρες που εξετάστηκαν αφορούν:
  - ✓ την ηλικία των ασθενών
  - ✓ το μέγεθος του όγκου, που δεν είναι ενδεικτικό μόνο της 'ηλικίας' (χρόνο εξέλιξης) του όγκου, αλλά αντανακλά και διαφορετικούς ρυθμούς ανάπτυξης
  - ✓ το βαθμό ιστολογικής κακοήθειας (Grade) που συνυπολογίζει στοιχεία που αφορούν το βαθμό διαφοροποίησης, την πυρηνική ατυπία και τη μιτωτική δράση
  - ✓ την παρουσία ή απουσία υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης
  - ✓ την κατάσταση των επιχώριων λεμφαδένων που αποτελεί τον πιο ισχυρό προγνωστικό δείκτη και χαρακτηρίζει τη δυνατότητα των όγκων να μεθίστανται
  - ✓ και τον ιστολογικό τύπο – βασικό κριτήριο βιολογικής και μορφολογικής ταξινόμησης

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έγινε ξεχωριστά στους πρωτογενείς όγκους και στις μεταστάσεις, χρησιμοποιώντας σαν αναφορά τις αντίστοιχες τιμές που προέκυψαν από τις καλοήθειες. Ενδιαφέρον παρουσίασαν και οι παρατηρήσεις σε πρωτογενείς όγκους με περισσότερες από μία εστίες που εμφανίζονται σε διαφορετικά σημεία στον ίδιο ασθενή (πολυεστιακότητα).

## **I. Πρωτογενείς όγκοι**

### **I.1 Γενετική πολυπλοκότητα**

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα στο συνολικό πληθυσμό των πρωτογενών όγκων το 94% περίπου των περιστατικών που αναλύθηκαν παρουσιάζουν μη ισοζυγισμένες ανακατατάξεις με μέση τιμή 7,76 γενετικές ανωμαλίες ανά περιστατικό. Μέχρι σήμερα, παρόμοιες μελέτες αναφέρουν περίπου 5-7 γενετικές ανωμαλίες ανά περιστατικό (250,251,252). Η μικρή σχετικά απόκλιση που παρουσιάζουν τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης ίσως να οφείλεται στον αριθμό των εξεταζόμενων δειγμάτων (στην παρούσα εργασία είναι περισσότερα από τις ήδη υπάρχουσες), την προέλευση του υλικού που αναλύθηκε (σε ορισμένες εργασίες τα δείγματα είναι μέσα σε παραφίνη ενώ στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε παγωμένος ιστός) καθώς και η αναλογία των



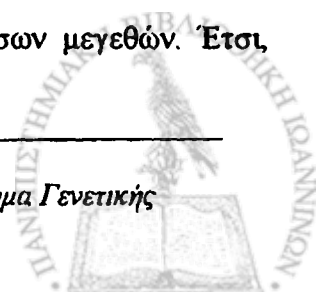
ιστολογικών τύπων των δειγμάτων που αναλύθηκαν, αφού όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, η ιστοπαθολογική κατάταξη συσχετίζεται με διαφορετικά επίπεδα γενετικής πολυπλοκότητας.

Το πρώτο ερώτημα που τέθηκε κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων ήταν αν η γενετική πολυπλοκότητα συνδέεται με τους κλινικοπαθολογικούς χαρακτήρες των όγκων και τη βιολογική συμπεριφορά τους.

### ***1.1.α. Γενετική πολυπλοκότητα και κλινικοπαθολογικοί χαρακτήρες: Σημαντική συσχέτιση με ιστολογικό τύπο, grade και άλλες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους***

Στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ της γενετικής πολυπλοκότητας και των διαβαθμίσεων κακοήθειας (Grade) στο συνολικό πληθυσμό. Περισσότερες γενετικές ανωμαλίες ανιχνεύτηκαν σε όγκους με υψηλό βαθμό κακοήθειας (Grade III) από όγκους με χαμηλότερο (Grade I και II). Παρατηρήθηκε επίσης, ότι τα περιστατικά που εμφανίζουν πολλές γενετικές ανακατατάξεις χαρακτηρίζονται από υψηλό μιτωτικό δείκτη και ενισχυμένη πυρηνική ατυπία (δύο από τους παράγοντες που συνιστούν το βαθμό ιστολογικής κακοήθειας). Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με ευρήματα άλλων ομάδων (251,253) που συσχετίζουν υψηλό βαθμό ιστολογικής κακοήθειας με αυξημένο αριθμό γενετικών ανωμαλιών και υψηλό μιτωτικό δείκτη. Με δεδομένο ότι ο μιτωτικός δείκτης είναι χαρακτηριστικός του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, οι παρατηρήσεις αυτές θα μπορούσαν να δικαιολογηθούν από το γεγονός ότι υψηλός μιτωτικός δείκτης αντιστοιχεί σε γρήγορο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ο γρήγορος κυτταρικός πολλαπλασιασμός οδηγεί με τη σειρά του σε γρήγορη μείωση του μήκους των τελομερών ή λάθη κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA και συνεπώς συσσώρευση μεταλλάξεων και γενετικών ανωμαλιών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η γενετική πολυπλοκότητα δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την ηλικία των ασθενών ή το μέγεθος του όγκου. Όσον αφορά το μέγεθος του όγκου θα πρέπει να σημειωθεί, ότι οι όγκοι που εξετάστηκαν είχαν σχετικά μικρή διάμετρο στο μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού (92,7% του συνολικού πληθυσμού παρουσιάζει μέγεθος μικρότερο από 13 mm), ενώ μόνο το 7,3% έχει μέγεθος μεγαλύτερο από 1cm χωρίς να υπάρχουν διαβαθμίσεις ενδιάμεσων μεγεθών. Έτσι,



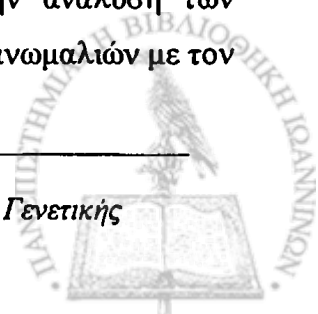
περαιτέρω στατιστικές αναλύσεις σε σχέση με το μέγεθος του όγκου δεν θα έδιναν αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα.

Η εκτενέστερη ως σήμερα μελέτη που συνδυάζει κυτταρογενετική ανάλυση και ιστοπαθολογικά στοιχεία στον καρκίνο του μαστού περιλαμβάνει 125 όγκους (254). Σε αυτήν φαίνεται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση του χρωμοσωμικού αριθμού με τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας του όγκου, τη μιτωτική δραστηριότητα και την ηλικία του ασθενούς, ενώ οι μη ισοζυγισμένες δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες συσχετίζονται με την υψηλή μιτωτική δραστηριότητα και την ικανότητα διήθησης.

Τα ευρήματα της παρούσης διατριβής, που αφορούν μη ισοζυγισμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, συμφωνούν με τις παραπάνω παρατηρήσεις ως προς το βαθμό ιστολογικής κακοήθειας και τη μιτωτική δραστηριότητα. Αντίθετα, καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δε βρέθηκε μεταξύ των όγκων που εμφάνισαν μετάσταση στους λεμφαδένες από τους υπόλοιπους.

Από τα αποτελέσματα, επίσης φαίνεται ότι περισσότερες ανωμαλίες παρατηρούνται στους όγκους που δεν έχουν υποδοχείς οιστρογόνων απ' ότι σε εκείνους που έχουν. Η διαφορά αυτή μεταξύ των δύο κατηγοριών είναι στατιστικά σημαντική και ίσως να δικαιολογείται από το γεγονός ότι κύτταρα αρνητικά ως προς τους υποδοχείς οιστρογόνων είναι λιγότερο διαφοροποιημένα από τα κύτταρα που εμφανίζουν υποδοχείς οιστρογόνων (180). Μια τέτοια σχέση μεταξύ του αριθμού των γενετικών ανωμαλιών και του βαθμού διαφοροποίησης έχει διατυπωθεί και σε άλλες εργασίες (254,256). Μια μελέτη με *microarrays* με σκοπό την ταξινόμηση των όγκων του μαστού με βάση την έκφραση πολλών γονιδίων ταυτόχρονα έδειξε ότι οι όγκοι που ήταν θετικοί για τους υποδοχείς οιστρογόνων χαρακτηρίζονταν από σχετικά ενισχυμένη έκφραση πολλών γονιδίων, αλλά κανένας όγκος δεν παρουσίαζε υψηλά επίπεδα *Erb-B2* (257). Στην ίδια μελέτη προτείνεται η κατάταξη των όγκων σε τρεις διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με το «μοριακό προφίλ» τους: α) σε όγκους που είναι θετικοί για τους υποδοχείς οιστρογόνων, β) σε βασικού τύπου και γ) σε θετικούς για *ErbB2*. Σημαντικό στοιχείο αυτής της πρότασης είναι ότι οι κλινικά χαρακτηριζόμενοι όγκοι ως «αρνητικοί για υποδοχείς οιστρογόνων» αποτελούν μια ξεχωριστή κατηγορία.

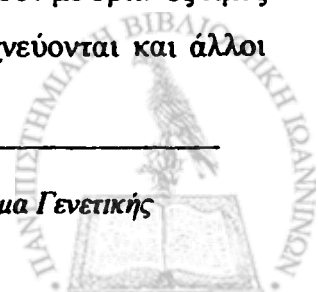
Μια σειρά σημαντικών παρατηρήσεων προέκυψαν από την ανάλυση των απολεσμάτων και αφορούν τη συσχέτιση του πλήθους των γενετικών ανωμαλιών με τον



ιστολογικό τύπο των όγκων που εξετάστηκαν. Παρόλο που δε διαπιστώσαμε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο βασικών ιστολογικών κατηγοριών (λοβιακά και πορογενή) όσον αφορά τη γενετική πολυπλοκότητα, εντοπίσαμε διαφορές μεταξύ των υποκατηγοριών των πορογενών καρκινωμάτων. Αναλυτικότερα, ο χαμηλότερος αριθμός γενετικών ανωμαλιών αντιστοιχούσε στα *in situ* πορογενή καρκινώματα, ακολουθούσαν τα βλεννώδη, τα πορογενή διηθητικά μη ειδικού τύπου, τα φαγεσωρικά και τέλος τα θηλώδη με το μεγαλύτερο μέσο όρο. Το μοναδικό μυελογενές που αναλύθηκε εμφάνιζε το μικρότερο αριθμό ανωμαλιών. Τα λοβιακά καρκινώματα παρουσίαζαν περίπου τον ίδιο αριθμό γενετικών ανωμαλιών με τα βλεννώδη. Μετά από σύγκριση των ομάδων μεταξύ τους, η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των πορογενών καρκινωμάτων μη ειδικού τύπου και των φαγεσωρικών. Παράλληλα, τα περισσότερα φαγεσωρικά καρκινώματα χαρακτηρίζονταν από υψηλότερο βαθμό κακοήθειας από τα υπόλοιπα πορογενή διηθητικά που στην πλειοψηφία τους ανήκαν στις κατηγορίες grade I-II. Την ίδια εικόνα μας έδωσε και η εξέταση του μιτωτικού δείκτη.

Το γεγονός ότι διάφοροι ιστολογικοί τύποι μπορεί να σχετίζονται με διαφορετικά επίπεδα γενετικής πολυπλοκότητας αναφέρεται και από άλλες μελέτες που έγιναν τόσο με τη μέθοδο CGH όσο και με την κλασική κυτταρογενετική (254, 258,259,260). Σύμφωνα με τα μέχρι σήμερα κυτταρογενετικά δεδομένα τα λοβιακά καρκινώματα παρουσιάζουν στην πλειοψηφία τους καρυότυπο περί τη διπλοειδία, ενώ τα θηλώδη, τα σωληνοειδή και τα βλεννώδη (ιστολογικοί τύποι καλής πρόγνωσης) παρουσιάζουν σχετικά απλές καρυοτυπικές ανωμαλίες (258,259). Αντίθετα τα μυελοειδή καρκινώματα φαίνεται να έχουν καρυότυπους τόσο πολύπλοκους όσο αυτοί των συνηθέστερων πορογενών. Επιπλέον τα φαγεσωρικά καρκινώματα είναι συχνά γενετικά περισσότερο πολύπλοκα από ότι τα πορογενή διηθητικά μη ειδικού τύπου.

Οι διαφορές που παρατηρούνται στα αποτελέσματα αυτών των μελετών και της δικής μας αφορούν ιστολογικούς τύπους που αντιπροσωπεύονται από μικρό αριθμό δειγμάτων και στη δική μας και στις άλλες μελέτες, όπως τα θηλώδη, ώστε να μην είναι εφικτή η υιοθέτηση της μιας ή της άλλης άποψης. Πάντως, εφόσον η CGH απαιτεί η έλλειψη ή αύξηση μιας περιοχής να παρατηρείται τουλάχιστον στο 50% (ή και σε περισσότερο για υπερδiploειδή όγκο) των κυττάρων που θα εξεταστούν με οριακές τιμές 0.75 και 1.25 αντίστοιχα, μόνο μεγάλης εξάπλωσης κλώνοι ανιχνεύονται και άλλοι



μικρότερης ανάπτυξης δεν εντοπίζονται. Από την άλλη πλευρά, το πλεονέκτημα της κυτταρογενετικής να εντοπίζει μικρούς κυτταρικούς πληθυσμούς και κλώνους με μόνο ισοζυγισμένες ανακατατάξεις μπορεί να αναιρείται από την πιθανολογούμενη διαδικασία επιλογής κλώνων *in vitro* κατά την καλλιέργεια του δείγματος. Έτσι, εξηγούνται και περιπτώσεις όπου η μέθοδος CGH εντοπίζει αλλαγές που δεν εμφανίζονται καρνοτυπικά. Ίσως μόνο ο συνδυασμός των δύο μεθόδων να μπορεί να δώσει πληρέστερη εικόνα σε αρκετές περιπτώσεις (253). Από την άλλη, παρά το γεγονός ότι η CGH αποκαλύπτει γενετικές ανωμαλίες του μέσου όρου ενός πληθυσμού κυττάρων, σε ορισμένες περιπτώσεις οι αλλαγές που ανιχνεύονται μπορεί να αποδοθούν σε ένα κλώνο, πιθανότατα τον κυρίαρχο *in vivo*. Αυτό συμφωνεί με την κοινά αποδεκτή άποψη ότι σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή η δράση της φυσικής επιλογής ευνοεί κυρίως ένα νεοπλασματικό κυτταρικό πληθυσμό. Στους περιορισμούς της κάθε μεθόδου θα πρέπει να προστεθεί και το φαινόμενο της πολυκλωνικής καρκινογένεσης στο μαστό (261,262) που κάνει ακόμα πιο δύσκολη την καταγραφή όλων των χαρακτηριστικών γενετικών ανωμαλιών του όγκου. Παρόλα αυτά η τεχνική της CGH μπορεί να δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα για το γενετικό προφίλ των όγκων του μαστού, δεδομένου ότι οι όγκοι του μαστού είναι καρκινώματα που σε αντίθεση με τα σαρκώματα δεν παρουσιάζουν πολλές με ισοζυγισμένες ανακατατάξεις (211).

Είναι σαφές ότι απαιτείται ανάλυση περισσότερων περιστατικών με συνδυαστικές μεθοδολογικές προσεγγίσεις έτσι ώστε να διευκρινιστεί εάν ο προσδιορισμός της γενετικής πολυπλοκότητας των καρκινωμάτων του μαστού μπορεί να χρησιμεύσει για την επιλογή θεραπευτικού σχήματος.

### ***1.1.β. Γενετική πολυπλοκότητα και βιολογικοί μηχανισμοί: Σύνθετος ρόλος της τελομεράσης στον καρκίνο του μαστού***

Στο συνολικό πληθυσμό η συσσώρευση γενετικών ανωμαλιών δε φάνηκε να σχετίζεται άμεσα με την έκφραση κάποιου από τους βιολογικούς παράγοντες που εξετάστηκαν. Διαιρώντας το σύνολο των δειγμάτων με βάση τον αριθμό των γενετικών ανωμαλιών (περισσότερες και λιγότερες από το μέσο όρο), καμία στατιστικά σημαντική



διαφορά δεν σημειώθηκε στα επίπεδα έκφρασης (μέσοι όροι τιμών) αυτών των παραμέτρων.

Εξετάζοντας στη συνέχεια τη συσχέτιση των βιολογικών παραμέτρων με τον αριθμό των γενετικών ανωμαλιών στα δείγματα στις δύο αυτές κατηγορίες (ως συνεχείς μεταβλητές), παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του αριθμού των γενετικών ανωμαλιών με την ενεργότητα της τελομεράσης σε κάθε ομάδα ξεχωριστά.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η τελομεράση προωθεί την επιβίωση και την ανάπτυξη διατηρώντας το μήκος των τελομερών (263,264). Απουσία ή χαμηλά επίπεδα ενεργότητας της τελομεράσης σε ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα οδηγεί σε μείωση του μήκους των τελομερών, τα οποία κάτω από ένα οριακό μήκος, ενεργοποιούν μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA ή/και απόπτωση. Αυτό το φαινόμενο είναι γνωστό ως γήρανση (265) εξαρτώμενη από τα τελομερή. Συνεπώς, στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού θα περίμενε κανείς μειωμένη ενεργότητα τελομεράσης καθώς συσσωρεύονται οι γενετικές ανωμαλίες.

Στην παρούσα διατριβή η μελέτη του αριθμού των γενετικών ανωμαλιών σε συνάρτηση με την ενεργότητα της τελομεράσης σε διάφορους τύπους όγκους του μαστού, έδειξε δύο διαφορετικές τάσεις που περιγράφηκαν από τη δευτεροβάθμια εξίσωση :  $Y = \alpha X^2 + \beta X + \gamma$ , όπου Y η ενεργότητα της τελομεράσης και X ο αριθμός των γενετικών ανωμαλιών. Σύμφωνα με το μοντέλο της δευτεροβάθμιας εξίσωσης η ενεργότητα της τελομεράσης έδειξε να αυξάνεται με τη συσσώρευση των γενετικών ανωμαλιών, φτάνοντας στη μέγιστη τιμή του όταν οι γενετικές ανωμαλίες άγγιζαν τις 19. Έπειτα η σχέση έδειξε να αντιστρέφεται. Θετικά στατιστικά σημαντική συσχέτιση υπήρχε μεταξύ ενεργότητας της τελομεράσης και γενετικών ανωμαλιών, όταν αυτές είναι λιγότερες από 15. Αντίθετα, δείγματα με γενετικές ανωμαλίες περισσότερες των 19 έδειξαν αρνητική συσχέτιση που ήταν επίσης στατιστικά σημαντική.

Τα αποτελέσματά μας, συμφωνούν με τα πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα που προσδίδουν ένα νέο ρόλο στην τελομεράση εκτός της διατήρησης των τελομερών, που είναι η επιτάχυνση ή η προώθηση του πολλαπλασιασμού (266). Η τελομεράση υπερεκφράζεται στην καρκινογένεση στα ποντίκια, παρά το γεγονός ότι τα ποντίκια έχουν μακριά τελομερή. Συνεπώς συνεχής έκφραση της τελομεράσης συνδυάζεται με προώθηση της καρκινογένεσης σε ιστούς θηλαστικών (όπως του ποντικού) (140). Η πιο

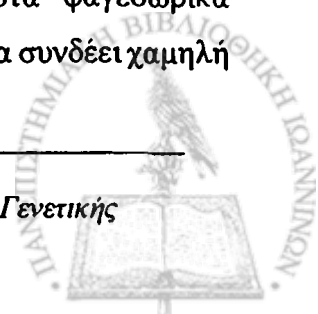


πειστική παρατήρηση για ένα διπλό ρόλο της τελομεράσης προκύπτει από το γεγονός ότι σε ατελεύτητες κυτταρικές σειρές ALT, η έκτοπη έκφραση του μεταλλαγμένου *hTERT*, υπεύθυνου για την καταλυτική δράση του ενζύμου, συμμετέχει στη διαδικασία της καρκινογένεσης σε συνεργασία με το ενεργοποιημένο *H-Ras* χωρίς να είναι ικανό να διατηρεί το μήκος των τελομερών (141).

Συνεπώς τα αποτελέσματα της μελέτης μας μπορεί να αντικατοπτρίζουν ένα διπλό ρόλο της τελομεράσης στον καρκίνο του μαστού, την επιβίωση του κυττάρου και την προώθηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι η ανθρώπινη τελομεράση επιταχύνει την ανάπτυξη των επιθηλιακών κυττάρων μέσω της ρύθμισης κάποιων γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι RB-E2F (267). Είναι πιθανό ότι αυτή η τελευταία λειτουργία του ενζύμου να υπάρχει κυρίως στα αρχικά στάδια της δημιουργίας του όγκου ή ότι είναι χαρακτηριστική κάποιων τύπων όγκων, ενώ σε όγκους με πολλές γενετικές ανωμαλίες ή σε διαφορετικούς τύπους είναι πιθανό να επικρατεί ο ρόλος του ενζύμου που συνδέεται με την επιβίωση (268).

Εξέταση της σχέσης μεταξύ της ενεργότητας της τελομεράσης και του αριθμού των γενετικών ανωμαλιών στις δύο ιστολογικές ομάδες με ικανοποιητικό αριθμό δειγμάτων έδειξε μια θετική συσχέτιση, στατιστικά σημαντική, στα πορογενή καρκινώματα και αρνητική αλλά όχι στατιστικά σημαντική συσχέτιση στο σύνολο των φαγεσωρικών καρκινωμάτων, τα οποία χαρακτηρίζονται (όπως αναφέρθηκε προηγουμένα) και από περισσότερες γενετικές ανωμαλίες. Αυτό το εύρημα μπορεί να σχετίζεται με το ρόλο της τελομεράσης στην καρκινογένεση. Στα πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης ίσως η ενεργότητα της τελομεράσης να αντικατοπτρίζει το ρυθμό πολλαπλασιασμού ή τη διαφοροποίηση των κυττάρων και η ενεργοποίηση του ενζύμου να είναι συνέπεια ποικίλων μεταβολών που οδηγούν σε ογκογένεση (269). Η εξέλιξη του όγκου, που παρατηρείται με τη συσσώρευση των ανωμαλιών, συνοδεύεται από μια αύξηση της ενεργότητας της τελομεράσης στον καρκίνο του μαστού τουλάχιστον στα πρώτα στάδια. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η *de novo* ενεργοποίηση της τελομεράσης προωθεί την καρκινογένεση όπως έχει πρόσφατα προταθεί (140,141).

Στη συνέχεια, η αρνητική ή μάλλον μη θετική συσχέτιση που φαίνεται μεταξύ της ενεργότητας της τελομεράσης και των γενετικών ανωμαλιών στα φαγεσωρικά καρκινώματα και/ή σε όγκους με πολλές γενετικές ανωμαλίες μπορεί να συνδέει χαμηλή



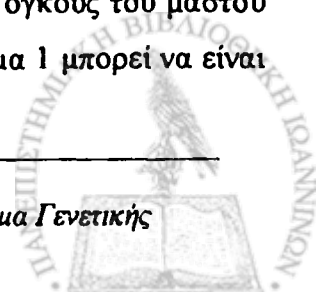
ενεργότητα του ενζύμου με αυξημένη γενετική αστάθεια. Φαίνεται ότι ένα ελάχιστο επίπεδο ενεργότητας της τελομεράσης είναι απαραίτητο για τη συνεχή αύξηση των κυττάρων (270). Αυτό φαίνεται από τα φαγεσωρικά καρκινώματα στα οποία ίσως η ενεργοποίηση της τελομεράσης να έρχεται μετά την τελομερική κρίση και τη μαζική συσσώρευση γενετικών ανωμαλιών. Όμως, σ' αυτή την περίπτωση ένα μεγαλύτερο δείγμα απαιτείται να την εξαγωγή συμπεράσματος.

### *1.2. Γενετικό προφίλ των όγκων. Αύξηση του 1q και έλλειψη του 16q κοινό χαρακτηριστικό όλων των ιστολογικών τύπων*

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την ανάλυση με CGH, συμβαδίζουν με τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα όσον αφορά την παρουσία και τη συχνότητα γονιδιακών ενισχυσεων ή ελλείψεων που έχουν παρατηρηθεί στον καρκίνο του μαστού. Από τους 146 πρωτογενείς όγκους που μελετήθηκαν μόνο 5 δεν παρουσίασαν γενετικές ανωμαλίες. Σε όλα τα χρωμοσώματα παρουσιάστηκαν γονιδιακές ενισχύσεις ή ελλείψεις, όμως ορισμένες περιοχές εμφανίζονταν με μεγαλύτερη συχνότητα.

Συγκεκριμένα, πάνω από 50% του συνολικού πληθυσμού παρουσίασε ενίσχυση του γενετικού υλικού στην περιοχή 1q με μεγαλύτερη συχνότητα την περιοχή 1q31, ενώ το 30% περίπου παρουσίασε ενισχυμένη την περιοχή 8q με μεγαλύτερη συχνότητα στη θέση 8q24. Περίπου 20% των περιστατικών εμφάνισε ενισχυμένες τις περιοχές 17q (με μεγαλύτερη συχνότητα στην περιοχή 17q24), και από 20% στις περιοχές 8p, 16p, 20q, όπου όλα τα περιστατικά παρουσίασαν ενίσχυση στις υποπεριοχές 8p11pter, 16p11p13 και 20q11q13 αντίστοιχα. Γονιδιακή επέκταση παρουσίασαν 16 περιπτώσεις στις περιοχές 1q (4 δείγματα), 6p (1 δείγμα), 7p (3 δείγματα), 7q (1 δείγμα), 8q (6 δείγματα), 10p (1 δείγμα), 11q (2 δείγματα), 17q (2 δείγματα), 20q (2 δείγματα).

Όπως φαίνεται και από άλλες μελέτες στον καρκίνο του μαστού, οι πιο συχνές γονιδιακές ενισχύσεις αφορούν τα χρωμοσώματα 1 και 8 (210). Σε ορισμένες περιπτώσεις υπάρχει ενίσχυση όλου του τμήματος 1q αλλά πιο συχνά παρατηρείται στην περιοχή 1q31 (251). Ενισχύσεις όλου του τμήματος αποδεικνύονται με κυτταρογενετικά δεδομένα που εμφανίζουν πολυσωμία του χρωμοσώματος 1 στους όγκους του μαστού (271-274). Όμως πρέπει να σημειωθεί ότι τα προφίλ στο χρωμόσωμα 1 μπορεί να είναι



πολύ πολύπλοκα, με διάφορες υποπεριοχές να δείχνουν μεγαλύτερη ενίσχυση. Αυτή η πολυπλοκότητα μπορεί να σχετίζεται με διάφορα μοντέλα μη ισοζυγισμένων ανωμαλιών, που δείχνουν πολλές περιοχές με έλλειψη ετεροζυγωτίας στο 1q (275) σε συνδυασμό με ενίσχυση του ενός αλληλόμορφου (277,278). Έτσι ανωμαλίες σ' αυτή την περιοχή μπορεί να συνδυάζουν ελλείψεις και ενισχύσεις.

Η περιοχή 8q αναφέρεται επίσης πολύ συχνά ως ενισχυμένη σε πολλές κυτταρογενετικές μελέτες (278) και φαίνεται να περιλαμβάνει τουλάχιστον ένα γενετικό παράγοντα καθοριστικό για την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού. Το πρωτο-ογκογονίδιο *MYC* βρίσκεται στη χρωμοσωμική θέση 8q24 και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη του πυρήνα 59-62 kDa, η οποία συμμετέχει στον έλεγχο της φυσιολογικής ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης (279). Το πρωτο-ογκογονίδιο *MYC* βρίσκεται συχνά ενισχυμένο σε μεγάλο αριθμό στερεών όγκων. Ο μέσος όρος συχνότητας εμφάνισης είναι 20%, η οποία μεταβάλλεται από 4 – 52% ανάλογα με τη μελέτη (280-282). Πολλές μελέτες δείχνουν μια συσχέτιση του γονιδίου με παράγοντες κακής πρόγνωσης, όπως ο υψηλός βαθμός κακοκήθειας, η μετάσταση στους λεμφαδένες και η ανευπλοειδία. Έχει προταθεί ότι είναι ένα πρόωρο γεγονός στη διαδικασία της καρκινογένεσης.

Υπάρχουν όμως και άλλες περιοχές που δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς και πιθανώς να περιλαμβάνουν κάποια γονίδια σημαντικά για τον καρκίνο του μαστού. Η περιοχή 17q είναι σχετικά μεγάλη και περιλαμβάνει μια σειρά γονιδίων (283). Οι ενισχύσεις στη θέση 17q23q24 είναι ενδιαφέρουσες γιατί συχνά συνδέονται με ενίσχυση του *ERBB2* και γενετική αστάθεια (283-285). Γενικά, στις περισσότερες περιπτώσεις η αστάθεια αυτής της περιοχής οφείλεται σε χρωμοσωμική έλλειψη, αλλά κάποιοι συγγραφείς αναφέρουν αυξημένο αριθμό του ενός αλληλόμορφου και απώλεια του 2<sup>ο</sup> (284,286).

Λίγα είναι γνωστά για την 16p12, εκτός από την παρουσία του γονιδίου *FUS*. Το γονίδιο αυτό ενέχεται στις μεταθέσεις t(16;21) και t(12;16) ως υβριδικό γονίδιο *FUS/TLS* στην οξεία μυελογενή λευχαιμία, στο σάρκωμα του Ewing και το λιποσάρκωμα (287-290). Ενώ, μελέτες στην περιοχή 8p11-p21 σημειώνουν την πιθανή ύπαρξη ογκοκατασταλτικών γονιδίων στον καρκίνο του μαστού (291).

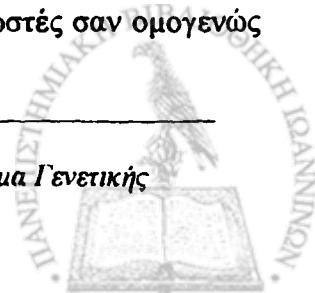
Η περιοχή 20q13 περιλαμβάνει μια σειρά γονιδίων (292). Μελέτες με τη μέθοδο FISH και ιχνηθέτες κοσμιδίων δείχνουν ότι αυτές οι περιοχές παρουσιάζονται



ενισχυμένες με υψηλή συχνότητα σε δείγματα καρκίνου του μαστού, υποστηρίζοντας την άποψη ότι τα αντίστοιχα γονίδια παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού (293,210)

Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι οι περιοχές που συναντώνται ενισχυμένες με μεγαλύτερη συχνότητα παίζουν κάποιο ρόλο στην εξέλιξη του καρκίνου του μαστού. Όμως, λίγα είναι γνωστά για τις γενετικές διαδικασίες που δίνουν τις ενισχύσεις που διαπιστώνουμε με CGH. Οι περιοχές αυτές είναι στις περισσότερες περιπτώσεις μεγάλου μήκους. Οι μελέτες που περιορίζονται σε ήδη γνωστές περιοχές του γονιδιώματος αναφέρονται σε συγκεκριμένους μοριακούς μηχανισμούς που οδηγούν σε καρκίνο του μαστού και υποτιμούν το μέγεθος της γενετικής αστάθειας. Από την άλλη, θα πρέπει να τονιστεί ότι η συχνότητα των ενισχύσεων με CGH, μπορεί να είναι πιο υψηλή και χρειάζονται ειδικοί ιχνηθέτες για να επαληθευτεί, ειδικά όταν ενέχονται μικρές μονάδες γονιδιακής ενίσχυσης. Η ικανότητα του CGH να εντοπίσει μία ενίσχυση εξαρτάται από το βαθμό της ενίσχυσης και την έκταση της περιοχής. Παρόλο που είναι δυνατό να εντοπίσουμε ενισχύσεις ενός αντιγράφου ολόκληρου χρωμοσώματος και έως 5-7 φορές ενισχυμένη έκφραση γνωστών ογκογονιδίων σε ομογενείς κυτταρικές σειρές (242), η ευαισθησία της μεθόδου στους πρωτογενείς όγκους μειώνεται από την παρουσία φυσιολογικών κυττάρων και την ετερογένεια στο εσωτερικό του όγκου.

Η ενίσχυση του γενετικού υλικού είναι μόνο ένας από τους μηχανισμούς με τον οποίο η έκφραση των γονιδίων αυξάνεται στα καρκινικά κύτταρα. Ενίσχυση του γενετικού υλικού στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να περιλαμβάνει μικρές χρωμοσωμικές περιοχές (κυρίως σε στερεούς όγκους) όπως και ολόκληρους χρωμοσωμικούς βραχίονες. Η ενίσχυση χρωμοσωμικού βραχίονα μπορεί να είναι συνέπεια λανθασμένου διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων κατά τη μίτωση, ενώ η γονιδιακή ενίσχυση μπορεί να αντικατοπτρίζει μια διαδικασία επιλογής που οφείλεται στις μεταβολές έκφρασης ορισμένων γονιδίων. Πολλά γονίδια υπερεκφράζονται και με άλλους μηχανισμούς όπως μεταγραφική διαδικασία ή χρωμοσωμική μετάθεση (294). Έτσι, οι συχνότητες των ενισχύσεων που αναφέρονται μπορεί να μην αντικατοπτρίζουν τη σημασία των γονιδίων σε αυτές τις περιοχές. Θα μπορούσαν όμως να θεωρηθούν σαν θέσεις υποψήφιων γονιδίων για την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού. Κυτταρογενετικές αναλύσεις στον καρκίνο του μαστού έδειξαν συχνές χρωμοσωμικές ανωμαλίες γνωστές σαν ομογενώς



χρωσμένες περιοχές (HSR), που αντιπροσωπεύουν πολύ μικρά χρωμοσωμικά τμήματα (295).

Όσον αφορά τις ελλείψεις, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης μας η πιο συχνή έλλειψη που παρατηρήθηκε ήταν στην περιοχή 16q, όπου στο μεγαλύτερο μέρος των δειγμάτων απουσιάζει ολόκληρος ο βραχίονας. Ελλείψεις παρατηρήθηκαν και σε άλλες περιοχές όπως 8p (με συχνότερη εμφάνιση της έλλειψης 8p23). Σε μικρότερο ποσοστό έλλειψη παρατηρήθηκε και στις θέσεις 11q24 και 13q.

Πολλαπλές ελλείψεις γενετικού υλικού έχουν ήδη αναφερθεί στο καρκίνο του μαστού γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση ότι η παράλληλη απώλεια πολλών ογκοκατασταλτικών γονιδίων ενέχονται στην ανάπτυξη του όγκου (296). Συχνές ανακατατάξεις έχουν αναφερθεί στο 16q σύμφωνα με κυτταρογενετικές μελέτες. Αυτές οι αλλαγές έχουν αναφερθεί σαν πρόωρα γεγονότα στη διαδικασία της καρκινογένεσης (271,274). Οι περισσότεροι καρκίνοι του μαστού δείχνουν πλήρη έλλειψη του 16q, ενώ τουλάχιστον 2 περιοχές έχουν αναφερθεί προτείνοντας την ύπαρξη ογκοκατασταλτικών γονιδίων στην περιοχή 16q23.1-24.1 (297).

### ***1.2.α. Επιμέρους γενετικές ανωμαλίες και γενετική πολυπλοκότητα: Η αύξηση του 1q και η έλλειψη του 16q είναι καθοριστικές ανωμαλίες στον καρκίνο του μαστού***

Παράλληλες ενισχύσεις των αλληλουχιών του DNA σε διαφορετικές περιοχές συμβαίνουν συχνά. Από διάφορες μελέτες προκύπτει ότι η γενετική αστάθεια και η δυνατότητα για γονιδιακή ενίσχυση μπορεί να είναι καθοριστικοί παράγοντες στην εξέλιξη του καρκίνου, επιτρέποντας στα κύτταρα να υπερεκφράζουν πολλά διαφορετικά γονίδια. Όμως είναι επίσης πιθανό, ότι σε γενετικά ασταθή κύτταρα, η random ενίσχυση αλληλουχιών DNA να συνδυάζεται με κάποιο κρίσιμο ογκογονίδιο του οποίου ο ρόλος είναι καθοριστικός για τη δημιουργία και την ανάπτυξη του όγκου.

Στην παρούσα μελέτη η γενετική αστάθεια φαίνεται να συμβαδίζει με την αύξηση της συχνότητας των περισσότερων γενετικών ανωμαλιών. Διαιρώντας τον πληθυσμό σε όγκους με πολλές ανωμαλίες και όγκους με λίγες (< ή > του μέσου όρου των γενετικών ανωμαλιών), η συχνότητα εμφάνισης των περισσότερων επιμέρους γενετικών ανωμαλιών αυξάνει όσο αυξάνει η γενετική πολυπλοκότητα. Υπάρχουν όμως κάποιες γενετικές ανωμαλίες που δε φαίνεται να συμβαδίζουν με τη συσσώρευση γενετικών ανωμαλιών



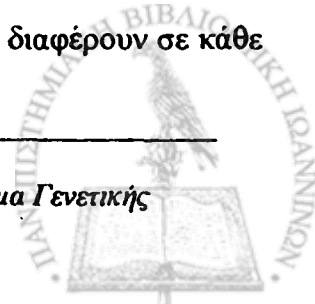
όπως η ενίσχυση στο 1q, και 16p και έλλειψη στο 16q. Συγκεκριμένα αυτές οι περιοχές εμφανίζονται με την ίδια περίπου συχνότητα στους όγκους με λίγες ανωμαλίες και σ'εκείνους με πολλές. Με βάση αυτή την παρατήρηση θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι οι αλλαγές αυτές είναι καθοριστικές ή πρωταρχικές. Οι γονιδιακές ενισχύσεις στο 1q και γονιδιακές ελλείψεις στο 16q έχουν περιγραφεί σε πολλές μελέτες και έχουν αναφερθεί ως πρωτογενείς γενετικές αλλαγές στον καρκίνο του μαστού (210,297,278).

### ***1.2.β. Επιμέρους γενετικές ανωμαλίες και κλινικοπαθολογικοί χαρακτήρες.***

Αναφέρθηκε προηγουμένα ότι αύξηση της γενετικής πολυπλοκότητας συμβαδίζει με μεγαλύτερο βαθμό ιστολογικής κακοήθειας και συγκεκριμένα με υψηλότερο μιτωτικό δείκτη. Το ερώτημα που προκύπτει είναι αν συγκεκριμένες γενετικές ανωμαλίες είναι χαρακτηριστικές του βαθμού κακοήθειας ή άλλων κλινικοπαθολογικών χαρακτήρων.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα τα περισσότερα περιστατικά με υψηλό βαθμό κακοήθειας (grade III) χαρακτηρίζονται από έλλειψη ή ενίσχυση στις περιοχές 3p, 8p, 8q, 10p, 14q. Όγκοι με γενετικές ανακατατάξεις σ'αυτές τις περιοχές φαίνεται να σχετίζονται και με υψηλότερο μιτωτικό δείκτη. Από την άλλη, η παρουσία ή απουσία υποδοχέων οιστρογόνων στους όγκους φαίνεται να συνδέεται με τη συχνότητα εμφάνισης ορισμένων γενετικών ανωμαλιών. Συγκρίνοντας τα προφίλ των δύο κατηγοριών (θετικούς και αρνητικούς υποδοχείς οιστρογόνων), φαίνεται ότι υπάρχει μεγαλύτερη διασπορά και πιο συχνή εμφάνιση ανωμαλιών στα περιστατικά με αρνητικούς υποδοχείς οιστρογόνων. Τέλος, κάποιες περιοχές εμφανίζονται μόνο στην κατηγορία των αρνητικών για υποδοχείς οιστρογόνων δειγμάτων, όμως μόνο η ενίσχυση στην περιοχή 10p παρουσιάζει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο κατηγοριών (μόνο αρνητικοί υποδοχείς οιστρογόνων παρουσιάζουν αύξηση στο 10p). Όσον αφορά την ικανότητα των όγκων να μεθίστανται, όγκοι με διήθηση τους λεμφαδένες δεν παρουσιάζουν διαφορετικό προφίλ γενετικών ανωμαλιών από τους όγκους που δεν παρουσιάζουν διήθηση.

Συγκεκριμένες γενετικές ανακατατάξεις δε φαίνεται να χαρακτηρίζουν τους ιστολογικούς τύπους. Αντίθετα όμως, οι συσχετίσεις των κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των όγκων με τις επιμέρους γενετικές ανωμαλίες διαφέρουν σε κάθε



ιστολογικό τύπο. Για παράδειγμα, στην περίπτωση των πορογενών καρκινωμάτων μη ειδικού τύπου οι ανωμαλίες στις περιοχές 8q, 10p και 20q φαίνεται να συνδέονται με υψηλό βαθμό κακοήθειας και υψηλό μιτωτικό δείκτη. Γεγονός που δεν ισχύει για τα φαγεσωρικά καρκινώματα. Από την άλλη, εμφανής γονιδιακή ενίσχυση στις περιοχές 8p, 1q και έλλειψη στο 16q παρουσιάζονται στα λοβιακά καρκινώματα, παρόλο που ο αριθμός των περιστατικών είναι κατά πολύ μικρότερος από τις άλλες δύο κατηγορίες. Τέλος στα μη διηθητικά καρκινώματα, η πιο χαρακτηριστική γονιδιακή ενίσχυση είναι στην περιοχή 1q (5/6 περιστατικά).

Συγκρίνοντας τη συχνότητα εμφάνισης των επιμέρους γενετικών ανωμαλιών στις διάφορες ιστολογικές κατηγορίες, κάποιες περιοχές που φαίνεται να υπάρχουν σε μεγαλύτερο βαθμό στη μία κατηγορία ή στην άλλη δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Ένα ενδιαφέρον σημείο είναι η γονιδιακή αύξηση στο 8p, που ενώ παρουσιάζεται σε σημαντικό βαθμό στα λοβιακά στο συνολικό πληθυσμό εμφανίζεται με μειωμένη συχνότητα, ίσως επειδή ο αριθμός των πορογενών καρκινωμάτων μη ειδικού τύπου και των φαγεσωρικών είναι πιο σημαντικός και καλύπτει αυτή την τάση. Επίσης θα πρέπει να τονιστεί ότι η γονιδιακή αύξηση στο 1q και η έλλειψη στο 16q συναντώνται και στις τρεις κατηγορίες και σε σημαντικό βαθμό στο εσωτερικό της καθεμιάς.

Με τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα καμία συγκεκριμένη γενετική ανωμαλία δεν έχει αναφερθεί να συνδέεται με ιστοπαθολογικούς χαρακτήρες όγκων του μαστού. Οι περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται κυρίως στις διαφορές που παρατηρούνται μεταξύ των πρωτογενών και μεταστατικών όγκων όπως επίσης και μεταξύ πορογενών καρκινωμάτων *in situ* με διηθητικά πορογενή καρκινώματα χωρίς όμως ακόμα να προκύπτουν συγκεκριμένα στοιχεία.

### **1.2 .γ. Επιμέρους γενετικές ανωμαλίες και βιολογικοί παράγοντες**

Όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα ορισμένες περιοχές του γονιδιώματος φαίνεται να συνδέονται με τη διαδικασία της καρκινογένεσης περισσότερο από κάποιες άλλες. Μια τέτοια περίπτωση αποτελεί και η γονιδιακή έλλειψη στη χρωμοσωμική θέση 3p που, σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, φαίνεται να συνδέεται με υψηλό μιτωτικό

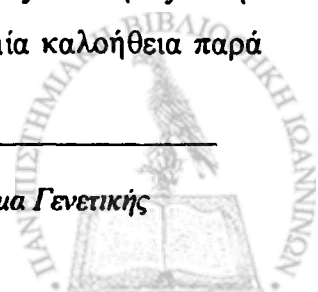


δείκτη. Έλλειψη σ' αυτή την περιοχή και συγκεκριμένα στο 3p14 διαπιστώθηκε, με τη βοήθεια της CGH, σε 4 δείγματα πρωτογενών όγκων.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, παρά την πολυπλοκότητα και ποικιλότητα που παρουσιάζουν οι όγκοι του μαστού, μία από τις λίγες ανωμαλίες που επανειλημμένα έχει εντοπιστεί πρώτα με κυτταρογενετική ανάλυση και ύστερα με μεθόδους προσδιορισμού έλλειψης ετρεροζυγωτίας, είναι η απώλεια γενωμικού υλικού στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 3 (298, 299, 300, 210). Το πιο μικρό τμήμα που έχει αναφερθεί στις περισσότερες περιπτώσεις είναι το 3p14 (300,209). Η χρωμοσωμική περιοχή 3p14 παρουσιάζει ενδιαφέρον γιατί εμφανίζει συχνά γενετικές και κυτταρογενετικές αλλοιώσεις σε ένα μεγάλο φάσμα στερεών όγκων όπως η κληρονομούμενη μετατόπιση t(3;8)(p14.2;q24.1) (301) στην περίπτωση του καρκίνου των νεφρών και γιατί εκεί εδράζεται μία από τις πιο συχνές περιοχές θραύσης του DNA και πιθανός στόχος μεταλλαξιογόνων ουσιών, η *FRA3B* (302). Η γενωμική ακολουθία αυτής της περιοχής είναι όμοια με τη νουκλεοτιδική δομή του γονιδίου *FHIT* και συμπίπτει με την πιο κοινή απώλεια αλληλόμορφου στον σποραδικό καρκίνο του μαστού. Αυτά τα ευρήματα δίνουν στο *FHIT* την ιδιότητα ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου.

Το ογκοκατασταλτικό γονίδιο *FHIT*, που εδράζεται στην περιοχή 3p14.2, έχει μέγεθος μεγαλύτερο από 1Mb. Ανήκει στην κατηγορία της υπεροικογένειας πρωτεϊνών με τριάδες ιστιδίνης (303) και η αντίστοιχη πρωτεΐνη (MB 16.800Da) υδρολύει την τριφωσφορική διαδενοσίνη. Το γονίδιο αυτό έχει βρεθεί απενεργοποιημένο μετά από απώλεια της συγκεκριμένης περιοχής σε καρκινικές κυτταρικές σειρές και πρωτογενείς όγκους του πνεύμονα (191), της κεφαλής και του λαιμού (192), του μαστού (193), του στομάχου και του εντέρου (190) και άλλων οργάνων. Απώλειες στο 3p έχουν διαπιστωθεί και στις καλοήθεις νόσους του μαστού (201,304,305) και στα *in situ* πορογενή καρκινώματα (204), γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στην υπόθεση ότι οι απώλειες σ' αυτή την περιοχή είναι πιθανά πρόωρα γεγονότα στη διαδικασία της καρκινογένεσης.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη έλλειψης ετεροζυγωτίας σε 8 καλοήθη νεοπλάσματα και σε 10 καρκινώματα με 8 διαφορετικούς εκκινητές στην περιοχή 3p14. Απώλεια αλληλόμορφου δεν παρατηρήθηκε σε καμία καλοήθεια παρά





μόνο σε καρκινώματα και συγκεκριμένα για τον εκκινητή D3S1300. Ο εκκινητής D3S1300 αντιστοιχεί στην περιοχή που βρίσκεται το εξώνιο 5 του γονιδίου *FHIT*, γεγονός που συμφωνεί με τη διεθνή βιβλιογραφία αφού στις περισσότερες περιπτώσεις αλλοιωμένα προϊόντα μεταγραφής προέρχονται από την ένωση του εξωνίου 3 με τα εξώνια 7, 8 ή 9 οδηγώντας στην ομόζυγη έλλειψη του εξωνίου 5 (περιοχή που συμπεριλαμβάνει και το σημείο θραύσης *FRA3B*).

Στην παρούσα διατριβή, εκτός από τη μελέτη έλλειψης ετεροζυγωτίας πραγματοποιήθηκε μελέτη έκφρασης της πρωτεΐνης *FHIT* σε καλοήθεις και κακοήθεις όγκους με Western blot. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια διακύμανση των επιπέδων της πρωτεΐνης στα δείγματα που εξετάστηκαν χωρίς όμως πλήρη απώλεια έκφρασης σε κάποιο από αυτά. Αυτό θα μπορούσε να πει κανείς ότι ήταν αναμενόμενο, αφού στα αντίστοιχα κυτταρικά εκχυλίσματα των όγκων δεν υπάρχει ομογενής πληθυσμός κακοήθων κυττάρων λόγω της μεγάλης ετερογένειας των όγκων του μαστού.

Από την άλλη, σε κυτταρικές σειρές και καρκινώματα του μαστού έχουν αναφερθεί διάφορα προϊόντα ματίσματος του γονιδίου. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι Negri et al. (1996) (193) πραγματοποίησαν ανάλυση σε κυτταρικές σειρές και σε πρωτογενείς όγκους του μαστού για πιθανές ανωμαλίες στην μεταγραφή του γονιδίου. Απώλεια έκφρασης των *FHIT* mRNA διαπιστώθηκε στο 10% των όγκων. Αλλοιωμένα και φυσιολογικά μετάγραφα βρέθηκαν σε 4 δείγματα. Αλληλουχοποίηση των μεταλλαγμένων μεταγράφων έδειξε ότι προήλθαν από ένωση του εξωνίου 3 με τα εξώνια 7,8 ή 9. Αλληλουχοποίηση των μεταγράφων που αντιστοιχούσαν στο μέγεθος του φυσιολογικού, έδειξε ότι σε πολλές περιπτώσεις εκτός από τα φυσιολογικά στο ίδιο MB υπήρχαν και αλλοιωμένα προϊόντα μεταγραφής, τα οποία παρουσίαζαν έλλειψη κωδικοποιούμενων εξωνίων. Η ταυτόχρονη παρουσία ανώμαλων και φυσιολογικών μεταγράφων στον ίδιο όγκο μπορεί να οδηγεί στην επικράτηση μίας μορφής (αλλοιωμένης) της πρωτεΐνης με σημαντική μείωση της άλλης (φυσιολογικής), ή ακόμη να είναι συνέπεια της ετερογένειας του κυτταρικού πληθυσμού, όπου ορισμένα κύτταρα εκφράζουν το φυσιολογικό γονίδιο *FHIT*. Όμως διάφορα προϊόντα ματίσματος του γονιδίου έχουν αναφερθεί και σε μη νεοπλασματικά κύτταρα γεγονός που υποστηρίζει την άποψη ότι τα ανώμαλα *FHIT* mRNA μπορεί να μην χαρακτηρίζουν τον καρκίνο του μαστού (305).



Παρόλα αυτά, αφού το γονίδιο παρουσιάζεται αλλοιωμένο στον καρκίνο του μαστού με σχετικά υψηλή συχνότητα έλλειψης ετροζυγωτίας, θα μπορούσαν να του αποδοθούν ιδιότητες παρόμοιες με αυτές του p53 γνωστού ογκοκατασταλτικού γονιδίου, όπου θα μπορούσε να εμποδίζει την ανάπτυξη των κυττάρων *in vitro* και θα καταστέλει την καρκινογένεση *in vivo*.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η υπερέκφραση του *FHIT* σε επίπεδο πρωτεΐνης φαίνεται να συνδέεται με υπερέκφραση της πολυμεράσης και της τελομεράσης: δείγματα με πολύ χαμηλή ή πολύ υψηλή έκφραση του *FHIT* παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ τους όσον αφορά τους προαναφερθέντες βιολογικούς παράγοντες. Όπως προαναφέρθηκε η πολυ(A)-πολυμεράση παρουσιάζει υψηλά επίπεδα έκφρασης στις μεταστάσεις, ενώ η έκφραση της τελομεράσης αυξάνεται παράλληλα με τη συσσώρευση γενετικών ανωμαλιών. Ίσως η υπερέκφραση της *FHIT* πρωτεΐνης να αντικατοπτρίζει μια προσπάθεια του κυττάρου να συγκρατήσει τη συσσώρευση πολλών γενετικών ανωμαλιών τουλάχιστον στα πρώτα στάδια της εξέλιξης του όγκου.

Η εξέταση των υπόλοιπων βιολογικών παραγόντων δεν έδειξε εμφανή συσχέτιση με κάποια από τις επιμέρους γενετικές ανωμαλίες, όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες (306). Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση όμως είναι ότι οποιαδήποτε συσχέτιση που παρατηρείται στο συνολικό πληθυσμό, δεν διατηρείται σε όλους τους ιστολογικούς τύπους. Για παράδειγμα, στο συνολικό πληθυσμό το PCNA παρουσιάζει μια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων που έχουν ενίσχυση της περιοχής 8p και εκείνων που δεν έχουν. Αυτή η στατιστικά σημαντική διαφορά συναντάται κυρίως στα φαγεσωρικά καρκινώματα στα οποία η ίδια τάση παρατηρείται και στις περιοχές 8q και 13q. Η ενεργότητα της πολύ(A)-πολυμεράσης φαίνεται να συνδέεται με την ενίσχυση της περιοχής 1q και έλλειψη της 16q στο συνολικό πληθυσμό. Στην περίπτωση των πορογενών καρκινωμάτων μη ειδικού τύπου, η πολυμεράση φαίνεται να συνδέεται με ενίσχυση της περιοχής 8q. Όσον αφορά την έκφραση της τελομεράσης, στατιστικά σημαντική αύξηση της ενεργότητας της παρατηρείται στα φαγεσωρικά σε περίπτωση ενίσχυσης της περιοχής 11q, στα πορογενή σε περίπτωση ενίσχυσης των περιοχών 1q και 17q και στα λοβιακά σε περίπτωση ενίσχυσης της περιοχής 8p.



Όπως φαίνεται η εικόνα που δίνει ο συνολικός πληθυσμός των όγκων διαφέρει από την εικόνα του κάθε ιστολογικού τύπου. Κάθε ιστολογικός τύπος έχει διαφορετικό βιολογικό προφίλ και πιθανώς να συνδέεται με διαφορετική κλινική εξέλιξη.

#### *✓ πολυεστιακότητα*

Ενδιαφέρον παρουσίασαν και 11 ασθενείς με πρωτογενείς όγκους, που παρουσίαζαν είτε αμφοτερόπλευρο καρκίνο του μαστού είτε περισσότερες από 1 εστίες καρκίνου στον ίδιο μαστό. Η πολυεστιακότητα αποτελεί ένα σχετικά σύνηθες φαινόμενο στον καρκίνο του μαστού. Στους ασθενείς αυτούς έγινε σύγκριση του γενετικού προφίλ αλλά και του φαινότυπου προκειμένου να διαπιστωθούν πιθανές διαφορές μεταξύ τους. Όπως φαίνεται δείγματα από τον ίδιο ασθενή παρουσιάζουν διαφορετικό γενετικό προφίλ και διαφορετική βιολογική συμπεριφορά. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τη μεγάλη ετερογένεια που χαρακτηρίζει τον καρκίνο του μαστού τόσο σε γενετικό όσο και σε βιολογικό επίπεδο. Το φαινόμενο της πολυκλωνικής καρκινογένεσης στο μαστό έχει περιγραφεί από διάφορες ομάδες, γεγονός που δυσκολεύει την εξαγωγή συμπερασμάτων και την παρακολούθηση της εξέλιξης της νόσου, τουλάχιστον όσον αφορά τις γενετικές ανωμαλίες. Όποια και αν είναι η εξήγηση της εμφάνισης της πολυκλωνικότητας γεγονός είναι ότι οι όγκοι του μαστού παρουσιάζουν υψηλό βαθμό εσωτερικής γενετικής ετερογένειας σε σχέση με άλλους τύπους νεοπλασίας. Επιπλέον, φαίνεται ότι η ετερογένεια αυτή έχει και ανατομική έκφραση αφού διαφορετικοί κλώνοι κυριαρχούν σε διαφορετικές περιοχές ενός όγκου. Τα δεδομένα επίσης δηλώνουν ότι οι διαφορετικοί υποπληθυσμοί νεοπλασματικών κυττάρων μπορεί να διαθέτουν διαφορετικά χαρακτηριστικά κακοήθειας (262). Κατά πάσα πιθανότητα οι ξεχωριστοί κυτταρικοί πληθυσμοί τελικά δρουν συλλογικά για την έκφραση του φαινότυπου του όγκου. Κάτι τέτοιο προτείνει νέες εξηγήσεις, για ένα μέρος τουλάχιστον της φαινοτυπικής ετερογένειας που παρατηρείται συχνά στους κυτταρικούς πληθυσμούς των όγκων του μαστού.

### *1.3. Κλινικοπαθολογικοί και βιολογικοί παράγοντες.*

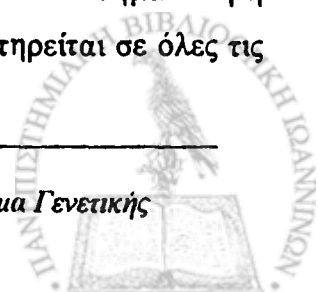
Το σύνολο των παρατηρήσεων που προέκυψαν από αυτή τη μελέτη για τις συσχετίσεις των βιολογικών παραμέτρων μεταξύ τους, αλλά και με τις καθιερωμένες κλινικοπαθολογικές

παραμέτρους συμβαδίζουν με όσα αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία. Κάποιες αποκλίσεις που παρατηρήθηκαν είναι πιθανό να οφείλονται στο γεγονός ότι στην πλειοψηφία οι μετρήσεις αυτών των παραγόντων στη βιβλιογραφία προσεγγίζονται με ανοσοιστοχημικές μεθόδους, ενώ στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να καταμετρηθούν με μεθόδους ανεξάρτητες από τον παρατηρητή. Όπως πρόεκυψε από τις μετρήσεις έκφρασης των βιολογικών παραμέτρων, το σύνολο των πρωτογενών όγκων χαρακτηρίζεται από ποικίλα επίπεδα έκφρασης των βιολογικών παραγόντων που εξετάστηκαν και είναι φανερή η διαφορά μεταξύ των κακοηθειών και των καλοηθειών.

Συγκεκριμένα στις καλοήθειες οι μετρήσεις έδειξαν σχεδόν μηδενική έκφραση των βιολογικών παραμέτρων, ενώ αντίθετα στους πρωτογενείς όγκους η έκφραση αυξάνεται κατακόρυφα.

Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις των βιολογικών παραγόντων στο συνολικό πληθυσμό των πρωτογενών όγκων αξιολογήθηκαν -σε σχέση με τους κλινικοπαθολογικούς χαρακτήρες. Όπως στην περίπτωση των γενετικών ανωμαλιών, έτσι και κατά την ανάλυση του βιολογικού προφίλ, η σχέση των βιολογικών παραγόντων με τους κλινικοπαθολογικούς χαρακτήρες, παρουσιάζει διαφορές ανάμεσα στους διάφορους ιστολογικούς τύπους.

➤ η έκφραση του PCNA στο σύνολο των δημοσιευμένων μελετών βρέθηκε ότι έχει θετική συσχέτιση με το βαθμό ιστολογικής κακοήθειας (307,308) και το μέγεθος του όγκου (163). Στην παρούσα μελέτη η έκφραση του PCNA που προσδιορίστηκε ποσοτικά με ELISA παρουσίασε διαφορές μεταξύ των όγκων που είχαν χαρακτηριστεί Grade I και των όγκων της κατηγορίας Grade II, III που χαρακτηρίζονταν από υψηλότερες τιμές, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά μεταξύ τους. Στατιστικά σημαντική διαφορά παρουσίασαν τα επίπεδα έκφρασης του PCNA μεταξύ των όγκων που είναι θετικοί για υποδοχείς οιστρογόνων από τους αντίστοιχους αρνητικούς. Στους όγκους που είναι αρνητικοί για υποδοχείς οιστρογόνων παρατηρούνται υψηλότερες τιμές (στην περίπτωση των διηθητικών λοβιακών καρκινωμάτων ισχύει το αντίθετο). Υψηλότερες τιμές PCNA παρατηρούνται επίσης σε όγκους με μετάσταση στους λεμφαδένες χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά με τους όγκους χωρίς μετάσταση και η σχέση αυτή παρατηρείται σε όλες τις

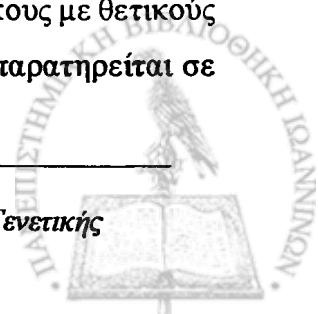


ιστολογικές υποκατηγορίες. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι τιμές του PCNA στις ηλικίες < και > από 60 στους διάφορους ιστολογικούς τύπους. Στο συνολικό πληθυσμό όπως και στα NOS καρκινώματα η έκφραση του PCNA μειώνεται σε μεγάλες ηλικίες. Αντίθετα, στα λοβιακά και τα φαγεσωρικά αυξάνεται, με εμφανή στατιστικά σημαντική διαφορά στα φαγεσωρικά.

➤ Η έκφραση του *erbB2* έχει μελετηθεί σε σχέση με παραμέτρους, όπως η κατάσταση διήθησης των λεμφαδένων (309,310,311), η έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων, ο ιστολογικός τύπος και το βαθμό ιστολογικής διαβάθμισης (196). Τα αποτελέσματα όμως των μελετών είναι πολλές φορές αντιφατικά. Στην παρούσα μελέτη στον συνολικό πληθυσμό παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των θετικών και αρνητικών για μετάσταση σε λεμφαδένες όγκων. Παρόλο που τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα δε φαίνεται να συνδέουν υψηλά επίπεδα έκφρασης του *erbB2* με την ηλικία, σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, στα φαγεσωρικά καρκινώματα, τα επίπεδα έκφρασης του *erbB2* παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ηλικία.

➤ Η τελομεράση έχει διερευνηθεί κυρίως σε σχέση με το ρόλο της στην καρκινογένεση και τη διαδικασία γήρανσης των κυττάρων (134). Στην παρούσα μελέτη η τελομεράση παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση με την ηλικία. Ο μέσος όρος ενεργότητας είναι μικρότερος στους αρνητικούς για υποδοχείς οιστρογόνων όγκους και η σχέση αυτή διατηρείται σε κάθε ιστολογικό τύπο. Πολλές μελέτες για την προγνωστική σημασία της τελομεράσης έχουν δείξει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων ενεργότητας της τελομεράσης και υψηλού βαθμού κακοήθειας (135). Έχει επίσης αναφερθεί ότι η συχνότητα μετάστασης στους λεμφαδένες σε ασθενείς με όγκους αρνητικούς ως προς την τελομεράση είναι μικρότερη από ασθενείς με θετική τελομεράση (139). Στην παρούσα μελέτη καμία συσχέτιση δε βρέθηκε μεταξύ της ενεργότητας της τελομεράσης και κάποιου κλινικοπαθολογικού παράγοντα όπως grade, μέγεθος όγκου, μετάσταση στους λεμφαδένες.

➤ η πολυμεράση φαίνεται να είναι περισσότερο αυξημένη σε όγκους με θετικούς λεμφαδένες χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική. Η τάση αυτή παρατηρείται σε



όλες τις υποκατηγορίες εκτός των φαγεσωρικών που αντιστρέφεται. Η ενεργότητα της πολυμεράσης, όπως έχει εναφερθεί, είναι προγνωστικής σημασίας στην περίπτωση της χρόνιας λευχαιμίας (117). Στον καρκίνο του μαστού η ενεργότητα της συνδέεται με άλλους παράγοντες κακής πρόγνωσης (119). Έχει τάση να παρουσιάζεται αυξημένη σε ασθενείς με υψηλό βαθμό κακοήθειας και σε ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες. Στον καρκίνο του μαστού ο βαθμός της διήθησης στους λεμφαδένες είναι ένας από τους κύριους παράγοντες πρόγνωσης (179). Από την άλλη, περίπου 30% των όγκων που είναι αρνητικοί ως προς τους λεμφαδένες επανέρχονται μετά από 5 χρόνια. Η ερώτηση που προκύπτει είναι αν η υπερέκφραση της πολυμεράσης συνδέεται ή προσδίδει βιολογικά χαρακτηριστικά στους όγκους που τους κάνει περισσότερο επιθετικούς

#### 1.4. Συσχετίσεις των βιολογικών παραγόντων

Η έκφραση του PCNA σχετίζεται με την ύπαρξη κυττάρων που βρίσκονται σε φάσεις ενεργού πολλαπλασιασμού (312). Ισχυρή θετική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ των τιμών της πολυμεράσης και της έκφρασης του PCNA. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η πολυμεράση αντανακλά ως ένα βαθμό το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων του όγκου. Όμως, η θετική συσχέτιση της πολυμεράσης με το PCNA συνεχίζει να ισχύει στην περίπτωση των αρνητικών λεμφαδένων, ενώ στους θετικούς λεμφαδένες η συσχέτιση αυτή φαίνεται πως ελαχιστοποιείται ή παύει να υπάρχει, και αυτό πιθανά υποδηλώνει πως οι υψηλές τιμές της πολυμεράσης που παρατηρούνται σε αυτή την κατηγορία σχετίζονται και με άλλα, εκτός του ρυθμού πολλαπλασιασμού, χαρακτηριστικά των όγκων. Όπως φαίνεται, η στατιστικά σημαντική συσχέτιση της πολυμεράσης με το PCNA ισχύει για τα φαγεσωρικά και τα λοβιακά καρκινώματα.

Η υπερέκφραση του *erbB2* σχετίζεται με τη δυνατότητα των καρκινικών κυττάρων να ανταποκρίνονται με διαφορετικό τρόπο από τα φυσιολογικά κύτταρα σε εξωγενή αυξητικά μηνύματα (313). Η υπερέκφραση του *erbB2* αποτελεί δυσμενή προγνωστικό δείκτη και σχετίζεται με ανεξάρτητο των οιστρογόνων φαινότυπο, με δείκτες πολλαπλασιασμού και με αυξημένη μεταστατική ικανότητα (314,315). Η έκφραση του *erbB2* στην παρούσα μελέτη δεν βρέθηκε να σχετίζεται με την έκφραση κάποιου από τους εξεταζόμενους παράγοντες.



## II. Μετάσταση

Για τους ασθενείς με καρκίνο στερεών όγκων ο σημαντικότερος παράγοντας κακής πρόγνωσης είναι η πιθανή μετάσταση, δηλαδή η διασπορά των κυττάρων από την πρωτογενή εστία σε άλλα σημεία του σώματος. Πολλές θεωρίες μετάστασης έχουν μελετηθεί σαν πειραματικά μοντέλα. Όμως, αυτές οι απλουστευμένες μορφές δεν είναι αντιπροσωπευτικές για τους μηχανισμούς ρύθμισης *in vivo*, όπου μεγάλης σημασίας φαίνεται να είναι οι αλληλεπιδράσεις των καρκινικών κυττάρων με το μικροπεριβάλλον (316).

Μια σειρά φαινοτυπικών αλλαγών σε ένα καρκινικό κύτταρο όγκου μαστού προηγούνται της μετάστασης. Αυτές οι αλλαγές αντικατοπτρίζουν μια συσσώρευση γενετικών αλλαγών που μπορεί να ενεργοποιούν ογκογονίδια ή να απενεργοποιούν ογκοκατασταλτικά γονίδια. Γονίδια που πιθανόν να ενέχονται στη διαδικασία της μετάστασης έχουν μελετηθεί σε πειραματικά μοντέλα. Στον άνθρωπο για τον καρκίνο του μαστού δεν είναι ακόμα γνωστό αν κάποιες χρωμοσωμικές περιοχές εμπλέκονται στη μεταστατική διαδικασία, εξαιτίας της δυσκολίας εφαρμογής των μεθόδων ανίχνευσης γενετικών ανωμαλιών σαν δευτερογενή γεγονότα (μεταστάσεις σε μακρυνά σημεία που είναι σπανίως διαθέσιμο υλικό).

Με τα μέχρι σήμερα δεδομένα, συγκριτική μελέτη πρωτογενών όγκων και μεταστάσεων στους λεμφαδένες έδειξε ότι είναι παρόμοιοι φαινοτυπικά, όπως ορίζεται από την ιστολογία, τον πολλαπλασιασμό (317-319) και έκφραση ογκογονιδίων (320,321). Από την άλλη έχει αναφερθεί εμφάνιση κάποιων επιπλέον ανωμαλιών σε δευτερογενείς στερεούς όγκους, όπως αυξημένα επίπεδα έκφρασης του επιδερμικού παράγοντα αύξησης (EGFR) (322) και του ειδικού mRNA της κινάσης συνοχής (323) στον καρκίνο του μαστού, μείωση της έκφρασης της καντερίνης E στο σκληρώδες καρκίνωμα της κεφαλής και του λαιμού (324) και μεταλλάξεις των p16INK4 και p15INK4B γονιδίων στον καρκίνο του πνεύμονα (325). Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι η γενετική εξέλιξη από το πρωτογενή καρκίνο σε δευτερογενή οφείλεται σε γενετικές αλλαγές ή/και σε ρυθμιστικά μονοπάτια χωρίς απαραίτητα να υπάρχουν μεταβολές στο DNA.

Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα της διαριβής, όσον αφορά τις γενετικές ανακατατάξεις, στα ζευγάρια δειγμάτων (πρωτογενής όγκος και μετάσταση) που πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση, δεν παρατηρείται καμία σχεδόν διαφορά μεταξύ τους. Η γενετική πολυπλοκότητα δε φαίνεται να γίνεται περισσότερο ή λιγότερο έντονη στους μεταστατικούς όγκους, αλλά ούτε και κάποια γενετική ανωμαλία εμφανίζεται χαρακτηριστική των πρωτογενών ή των μεταστατικών όγκων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία κάποιες μελέτες παρουσιάζουν αύξηση των γενετικών ανωμαλιών στις μεταστάσεις και κάποιες όχι. Κάποιες μελέτες αναφέρουν ότι η πιο έντονη διαφορά στις γενετικές ανωμαλίες παρατηρείται μεταξύ των *in situ* και διηθητικών πορογενών καρκινωμάτων.

Στα 15 ζευγάρια δειγμάτων που εξετάστηκαν στη μελέτη μας, η εξέταση των βιολογικών παραγόντων κατέγραψε τάσεις για υψηλότερες τιμές έκφρασης στις μεταστάσεις απ'ότι στους αντίστοιχους πρωτογενείς όγκους, όμως μόνο η πολυ(A)-πολυμεράση, το FHIT και το *RhoC* εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων.

Συγκεκριμένα, σύγκριση των επιπέδων της πολυ(A)-πολυμεράσης σε όγκους και τις αντίστοιχες μεταστάσεις έδειξε υψηλότερα επίπεδα ενεργότητας της πολυμεράσης σε μεταστάσεις, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί είτε στο ότι οι μεταστάσεις εμπεριέχουν υψηλότερη συγκέντρωση κακόηθων κυττάρων, είτε στο ότι μεταξύ των καρκινικών κυττάρων αυτά που παρουσιάζουν υψηλότερη ενεργότητα πολυμεράσης είναι πιο πιθανό να κάνουν μετάσταση.

Η έκφραση του PCNA βρέθηκε υψηλότερη στις μεταστάσεις αλλά χωρίς να συσχετίζεται με την ενεργότητα της πολυ(A)-πολυμεράσης υποστηρίζοντας την άποψη ότι υπερέκφραση της πολυ(A)-πολυμεράσης, που διαχωρίζεται από τον πολλαπλασιασμό, μπορεί να είναι χαρακτηριστική ενός μεταστατικού κυττάρου. Η σχέση της πολυμεράσης με το δείκτη πολλαπλασιασμού ισχύει μόνο στην περίπτωση των όγκων με αρνητικούς λεμφαδένες. Η πολυ(A)-πολυμεράση είναι ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης για τους όγκους χωρίς διήθηση στους λεμφαδένες (120). Μία εναλλακτική υπόθεση είναι ότι η «απεξάρτηση» της ενεργότητας της πολυ(A)-πολυμεράσης από τον πολλαπλασιασμό σε όγκους με θετικούς λεμφαδένες αντανακλά



την απορρύθμιση της έκφρασης της πολυμεράσης και δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα να είναι χαρακτηριστικό των μεταστατικών όγκων. Αντίθετα θα μπορούσαμε να υποστηρίξουμε ότι η «απεξάρτηση» του PCNA από την πολύ(A)-πολυμεράση αντικατοπτρίζει το μεταστατικό δυναμικό του όγκου. Η ερώτηση που προκύπτει είναι αν η υψηλή ενεργότητα της πολύ(A)-πολυμεράσης που είναι ανεξάρτητη από τον πολλαπλασιασμό είναι χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων με μεταστατικό δυναμικό.

Η ουρά του πολύ(A) παίζει ένα ρόλο κλειδί στη σταθερότητα και τη μεταφραστικότητα του mRNA, ενώ η ενεργότητα της πολύ(A)-πολυμεράσης επηρεάζει την έκφραση των mRNAs που φέρουν την πολλαπλάσιμη ουρά. Όμως μπορεί να υποστηριχθεί ότι η υπερέκφραση της πολύ(A)-πολυμεράσης έχει εντονότερη επίδραση στα ασταθή ή λιγότερο ανταγωνιστικά για μετάφραση mRNA. Επειδή το περισσότερο ασταθές και λιγότερο ικανό για μετάφραση mRNA συνήθως κωδικοποιεί πρωτοοογονίδια και αυξητικούς παράγοντες, η υπερέκφραση της πολυμεράσης μπορεί να επηρεάσει την έκφραση μιας κατηγορίας γονιδίων που συμμετέχουν στην κακοήθεια και την εξέλιξη του όγκου. Η έκτοπη έκφραση πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε βασικές κυτταρικές διαδικασίες όπως των παραγόντων της μεταγραφικής διαδικασίας, έχει ήδη καταδειχθεί στον καρκίνο. Το πιο αντιπροσωπευτικό παράδειγμα είναι ο μεταγραφικός παράγοντας eIF4, του οποίου τα επίπεδα είναι 3-10 φορές υψηλότερα στο καρκίνο του μαστού σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιστό ή τους καλοήθεις όγκους (106). Η ενισχυμένη έκφραση της πολύ(A)-πολυμεράσης φαίνεται να συμμετέχει στη μετάσταση σύμφωνα με *in vitro* δεδομένα. Ο κυτταρικός υποδοχέας TF, που με την ενεργοποίηση του ξεκινά τη διαδικασία πήξης του αίματος, παίζει επίσης ρόλο στη μετάσταση μέσω της συμμετοχής του στην νέο αγγειογένεση. Ένα από τα πρώτα γεγονότα που ακολουθούν την ενεργοποίησή του είναι η ενίσχυση της έκφρασης της πολύ(A)-πολυμεράσης και μάλιστα σε βαθμό υψηλότερο από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες που εμφανίζονται να επηρεάζονται (326).

Εκτός από την πολυμεράση, στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρείται μεταξύ των πρωτογενών όγκων και των αντίστοιχων μεταστάσεων όσον αφορά την έκφραση του *FHIT*. Το *FHIT* παρουσιάζεται αυξημένο στους μεταστατικούς όγκους. Θεωρώντας ότι

το *FHIT* είναι πιθανό ογκοκατασταλτικό γονίδιο η υπερέκφρασή του στις μεταστάσεις δείχνει ότι οι κλώνοι που επιλέγονται και προχωρούν σε μετάσταση δεν παρουσιάζουν αλλοιωμένο το γονίδιο. Με βάση τις μέχρι τώρα παρατηρήσεις οι όγκοι περιλαμβάνουν φυσιολογικά και αλλοιωμένα μετάγραφα του γονιδίου. Τα κύτταρα που έχουν το φυσιολογικό γονίδιο οδηγούνται σε απόπτωση και δεν προχωρούν σε μετάσταση. Τα κύτταρα που επιβιώνουν περιέχουν μετάγραφα φυσιολογικά και αλλοιωμένα. Έτσι, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι κατά τη διαδικασία της μετάστασης η έκτοπη έκφραση του γονιδίου προσπαθεί να μειώσει το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων που διέφυγαν της απόπτωσης και έγιναν μεταστατικά ή ότι τα αποτελέσματα αντιστοιχούν σε μη λειτουργική πρωτεΐνη λόγω λάθους κατά τη μεταγραφή.

Σήμερα γίνονται προσπάθειες για την κατάταξη των όγκων με βάση το γενετικό προφίλ. Μελέτη σε DNA microarrays (327) σε κυτταρικές σειρές μεταστατικού μελανώματος στον άνθρωπο και στο ποντίκι, έδειξε ότι ορισμένα γονίδια όπως το *Rho C*, μπορούν να ενεργοποιήσουν τη μετάσταση από μόνα τους. Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώθηκε και από άλλη μελέτη (328), όπου βρέθηκε ότι 17 γονίδια παρουσίαζαν υψηλότερα επίπεδα στις μεταστάσεις από ότι στους πρωτογενείς όγκους, ενώ μόνο 3 παρουσίαζαν αυξημένη έκφραση σε όλες τις μεταστάσεις του ανθρώπου και του ποντικού. Ένα από αυτά τα γονίδια ήταν και το *RhoC*.

Το *Rho C* ανήκει στην οικογένεια των GTP-υδρολυτικών ενζύμων, ορισμένα από τα οποία είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση της κυτταρικής «μετανάστευσης» (329). Το *Rho C* συσχετίζεται με τα *RhoA* και *Rho B*. Σε αντίθεση με το *ras* τα τρία *Rho* γονίδια δεν έχουν βρεθεί μεταλλαγμένα στον καρκίνο στον άνθρωπο, αλλά συμμετέχουν στη μετατροπή ενός κυττάρου σε καρκινικό, όσον αφορά την κυτταρική κίνηση και διήθηση, τουλάχιστον κάτω από πειραματικές συνθήκες (330,331).

Το *RhoC* έχει μελετηθεί και στον καρκίνο του μαστού, σ' έναν ιδιαίτερο ιστοπαθολογικό τύπο που είναι και ο πιο επιθετικός (155). Όπως φαίνεται *in vivo* το γονίδιο παρουσιάζει υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στα καρκινώματα απ' ότι στο φυσιολογικό ιστό, ενώ σε καρκινικές σειρές φαίνεται να συμπεριφέρεται σαν ογκογονίδιο που οδηγεί σε διηθητικό φαινότυπο. Αυτή η διαφορά έκφρασης μεταξύ

καρκινωμάτων και φυσιολογικού επιθηλίου γίνεται λιγότερο έντονη σε άλλους τύπους καρκίνου του μαστού (331), όπου φαίνεται όμως ότι αυξημένη έκφραση του *RhoC* σχετίζεται με υψηλό βαθμό κακοήθειας και υψηλό μιτωτικό δείκτη.

Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά μεταξύ των μεταστατικών και των πρωτογενών όγκων όσον αφορά την έκφραση του *RhoC*. Αντίθετα, στο σύνολο των πρωτογενών όγκων, παρατηρήθηκε ότι τα περισσότερα φαγεσωρικά καρκινώματα εκφράζουν το *Rho C*, ενώ τα περισσότερα πορογενή μη ειδικού τύπου όχι, και η διαφορά μεταξύ αυτών των δύο ομάδων είναι στατιστικά σημαντική.

Από την άλλη, συγκρίνοντας τις ακραίες τιμές της έκφρασης του γονιδίου με τους βιολογικούς παράγοντες που εξετάστηκαν παρατηρούμε μια στατιστικά σημαντική αύξηση της ενεργότητας της πολυμεράσης στις περιπτώσεις που το *Rho C* υπερεκφράζεται και μείωση των επιπέδων έκφρασης του *erbB2*.



**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**  
**&**  
**ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**



Ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο συνηθισμένη μορφή κακοήθους νεοπλασματος στις γυναίκες των ανεπτυγμένων χωρών. Παρόλη την πληθώρα μοριακών και γενετικών αλλαγών που έχουν αναφερθεί για τον καρκίνο του μαστού στον άνθρωπο, η παθογενετική σημασία αυτών των γεγονότων κατά την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού είναι ακόμη πολύ λίγο κατανοητή.

Είναι κατανοητό πως η εύρεση προγνωστικών δεικτών που θα χαρακτηρίζουν με ευκολία και ακρίβεια το στάδιο του όγκου και της πιθανότητας που υπάρχει για μετάσταση, θα βοηθούν αποτελεσματικά στο σχεδιασμό της κατάλληλης θεραπείας. Συνεπώς η σύνδεση των βιολογικών και γενετικών χαρακτήρων του όγκου με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους θα ήταν χρήσιμο συμπλήρωμα στην κλασσική παθολογοανατομία. Η ταυτοποίηση όλων αυτών των γονιδίων και των βιολογικών παραγόντων δεν έχει ακόμα ολοκληρωθεί. Η κύρια μελέτη πλέον γίνεται με σκοπό τη διάκριση των γενετικών ανωμαλιών που είναι κρίσιμες για το σχηματισμό του όγκου – πρωταρχικές - από εκείνες που έρχονται σαν συνέπεια της γενετικής αστάθειας

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια αποσαφήνισης της συσχέτισης των γενετικών αλλαγών και βιολογικών παραγόντων με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους σε πρωτογενείς όγκους και μεταστάσεις στους λεμφαδένες του μαστού. Προσδιορίστηκε η γενετική πολυπλοκότητα και μελετήθηκαν οι επιμέρους γενετικές ανωμαλίες και αναζητήθηκαν πιθανές συσχετίσεις με ορισμένες βιολογικές παραμέτρους και κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων και των αντίστοιχων μεταστάσεών τους.

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 147 πρωτογενείς όγκους μαστού και 15 μεταστάσεις, ενώ όπου ήταν αναγκαίο αναλύθηκαν και δείγματα υπερπλασιών που χρησιμοποιήθηκαν σαν τιμές αναφοράς. Ο προσδιορισμός των γενετικών ανωμαλιών επιτεύχθηκε με τη μέθοδο του συγκριτικού γενωμικού υβριδισμού (CGH), ενώ η γενετική πολυπλοκότητα υπολογίστηκε προσθέτοντας τον αριθμό των ενισχύσεων και των απωλειών που εντοπίστηκαν στο γενετικό υλικό κάθε ασθενούς. Οι κλινικοπαθολογικοί χαρακτήρες που εξετάστηκαν αφορούσαν την ηλικία των ασθενών, το μέγεθος του όγκου, το βαθμό ιστολογικής κακοήθειας (Grade), την παρουσία ή απουσία υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης, την κατάσταση των επιχώριων λεμφαδένων και τον ιστολογικό τύπο. Οι βιολογικές παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν οι: PCNA, *c-erbB2*, τελομεράση και πολυμεράση, *FHIT* και *RhoC*.



Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψαν τα εξής:

A. Γενετική πολυπλοκότητα και κλινικοπαθολογικοί χαρακτήρες στους πρωτογενείς όγκους καρκίνου του μαστού

1. 77/82 περιστατικά παρουσίασαν μη ισοζυγισμένες γενετικές ανακατατάξεις. Ο αριθμός των μη ισοζυγισμένων ανακατατάξεων στο σύνολο των δειγμάτων κυμάνθηκε από 0 έως 32 με μέση τιμή 7,76 ανά περιστατικό.
2. Αυξημένος αριθμός γενετικών ανακατατάξεων παρουσίασε θετική συσχέτιση με υψηλό βαθμό ιστολογικής κακοήθειας, υψηλό μιτωτικό δείκτη και πυρηνική ατυπία.
3. Σημαντική συσχέτιση παρουσιάστηκε μεταξύ της γενετικής πολυπλοκότητας και της παρουσίας ή της απουσίας υποδοχέων οιστρογόνων (περισσότερες ανωμαλίες παρουσίασαν όγκοι που ήταν αρνητικοί για υποδοχείς οιστρογόνων), ενώ καμία συσχέτιση δεν παρουσιάστηκε με την ηλικιακή κατανομή ή τους υποδοχείς προγεστερόνης καθώς ούτε και με την εμφάνιση διήθησης σους επιχώριους λεμφαδένες.
4. Στατιστικά σημαντική διαφορά παρουσίασε ο αριθμός των γενετικών ανωμαλιών των φαγεσωρικών καρκινωμάτων (12,20) με αυτό των πορογενών μη ειδικού τύπου (6,38) και των λοβιακών. Τον χαμηλότερο μέσο όρο αριθμού γενετικών ανωμαλιών παρουσίασαν τα πορογενή καρκινώματα *in situ* (2,5), ενώ τον μεγαλύτερο τα θηλώδη (24,5).

B. Γενετική πολυπλοκότητα και βιολογικές παράμετροι στους πρωτογενείς όγκους καρκίνου του μαστού

Από τους βιολογικούς παράγοντες που εξετάστηκαν μόνο η ενεργότητα της τελομεράσης παρουσίασε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τον αριθμό των γενετικών ανωμαλιών σε περιστατικά με λίγες γενετικές ανωμαλίες. Οι μεταβολές της ενεργότητας της τελομεράσης σε σχέση με τη συσσώρευση γενετικών ανωμαλιών περιγράφονται καλύτερα από τη δευτεροβάθμια εξίσωση της μορφής  $Y = \alpha X^2 + \beta X + \gamma$ .

Γ. Γενετικό προφίλ και κλινικοπαθολογικές παράμετροι στους πρωτογενείς όγκους καρκίνου του μαστού

1. Στο συνολικό πληθυσμό αύξηση του γενετικού υλικού παρατηρήθηκε πιο συχνά στις περιοχές 1q (1q31), 8q (8q24) και λιγότερο στις 8p (8p11pter), 16p

(16p11p13), 17q (17q24), 20q (20q11q13), ενώ οι πιο συχνές ελλείψεις παρουσιάστηκαν στις περιοχές 8p (8p23), 11q (11q24), 13q, 16q.

2. Οι περιοχές 1q, 16p, 16q παρουσίασαν ενίσχυση ή έλλειψη (ανάλογα με την περίπτωση) ανεξάρτητα από το συνολικό αριθμό των γενετικών ανωμαλιών, ενώ αντίθετα στις περισσότερες περιπτώσεις η συχνότητα των επιμέρους γενετικών ανωμαλιών συμβάδιζε με τη συσσώρευση γενετικών ανωμαλιών.
3. Μεγαλύτερη διασπορά γενετικών ανωμαλιών κατά μήκος του γονιδιώματος εμφανίστηκε στα περιστατικά με αρνητικούς υποδοχείς οιστρογόνων και διήθηση στους επιχώριους λεμφαδένες.
4. Ορισμένες γενετικές ανωμαλίες φάνηκε να εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα σε μια συγκεκριμένη κατηγορίας ιστολογικού τύπου (όπως στην περίπτωση της γονιδιακής ενίσχυσης στο 8p που παρουσιάζεται σε σημαντικό βαθμό στα λοβιακά). Αντίθετα, οι γενετικές ανακατατάξεις στο 1q και στο 16q σημειώθηκαν σε όλους τους ιστολογικούς τύπους.
5. Γενετικές ανακατατάξεις στις περιοχές 3p, 8p, 8q, 10p, 14q και 15q φάνηκε να συνδέονται με υψηλό μιτωτικό δείκτη.

#### Δ. Γενετικό προφίλ και βιολογικές παράμετροι στους πρωτογενείς όγκους καρκίνου του μαστού

Καμία γενετική ανακατάταξη δε φάνηκε να σχετίζεται απόλυτα με την έκφραση κάποιου βιολογικού παράγοντα στο σύνολο των δειγμάτων που εξετάστηκαν.

#### Ε. Βιολογικές παράμετροι και κλινικοπαθολογικοί χαρακτήρες

- Στις ηλικιακές κατηγορίες, στατιστικά σημαντική διαφορά διαπιστώθηκε στα επίπεδα έκφρασης του *erbB2* και της ενεργότητας της τελομεράσης.
- Δείγματα με/ή χωρίς υποδοχείς οιστρογόνων φάνηκε να παρουσιάζουν να διαφορετικά επίπεδα ενεργότητας της τελομεράσης και έκφρασης του PCNA
- Οι όγκοι που παρουσίασαν μετάσταση στους λεμφαδένες παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του *erbB2* και ενεργότητας της πολυ(A)-πολυμεράσης σε σχέση με εκείνους που δεν εμφάνισαν μετάσταση.
- Η έκφραση του γονιδίου *Rho C* φάνηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό στα φαγεσωρικά καρκινώματα, ενώ τα περισσότερα πορογενή μη ειδικού τύπου ήταν αρνητικά.



### ΣΤ. Συσχετίσεις βιολογικών παραμέτρων μεταξύ τους

Στο συνολικό πληθυσμό των πρωτογενών όγκων, στατιστικά σημαντική συσχέτιση παρουσίασαν το PCNA με την πολυ(Α)-πολυμεράση και την τελομεράση, η πολυ(Α)-πολυμεράση με την τελομεράση (στην κατηγορία των πορογενών διηθητικών καρκινωμάτων μη ειδικού τύπου αυτή η συσχέτιση δεν ισχύει). Επιπλέον, στις περιπτώσεις που το *FHIT* υπερεκφράζεται, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του γονιδίου αυτού με τα επίπεδα ενεργότητας της πολυμεράσης και της τελομεράσης.

### Ζ. Γενετικό και βιολογικό προφίλ σε κοιλνεστιακούς όγκους

Παρατηρήθηκε γενετική και βιολογική ετερογένεια σε όγκους μαστού που προέρχονταν από διαφορετικά σημεία του ίδιου ασθενή.

### Η. Μετάσταση

- Οι μεταστάσεις στους λεμφαδένες εμφάνισαν περισσότερες ή τις ίδιες γενετικές ανωμαλίες με τους αντίστοιχους πρωτογενείς όγκους.
- Στατιστικά σημαντική αύξηση παρουσίασαν η ενεργότητα της πολυ(Α)-πολυμεράσης και η έκφραση του *FHIT* στις μεταστάσεις σε σχέση με τους πρωτογενείς όγκους, ενώ καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρουσίασε η έκφραση του γονιδίου *Rho C* στις μεταστάσεις σε σχέση με τους πρωτογενείς όγκους.





## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

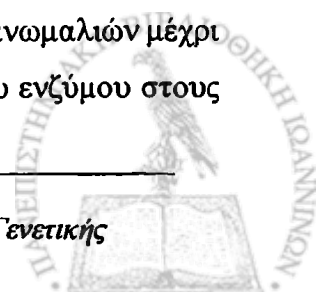
---

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα διατριβή συμβαδίζουν με τα μέχρι σήμερα δεδομένα για την καρκινογένεση του μαστού, θέτουν νέα ερωτήματα και προσθέτουν νέες σημαντικές πληροφορίες ως προς τους τρόπους προσέγγισης και μελέτης της νόσου. Συγκεκριμένα σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας:

Ο αυξανόμενος αριθμός γενετικών ανωμαλιών συμβαδίζει με την εξέλιξη της νόσου, τουλάχιστον όπως αυτή ορίζεται από τα κλινικοπαθολογικά δεδομένα (βαθμός κακοήθειας, δείκτης πολλαπλασιασμού και υποδοχείς οιστρογόνων). Ασθενείς με υψηλό βαθμό κακοήθειας, υψηλό μιτωτικό δείκτη και με απουσία υποδοχέων οιστρογόνων, παρουσίασαν μεγαλύτερο συνολικό αριθμό γενετικών ανωμαλιών σε σχέση με τους υπόλοιπους.

Μελετώντας αναλυτικότερα τις επιμέρους γενετικές ανωμαλίες στο συνολικό πληθυσμό αλλά και σε κάθε ιστολογικό τύπο ξεχωριστά, φαίνεται ότι οι διάφοροι ιστολογικοί τύποι διαφέρουν ως προς το συνολικό αριθμό των γενετικών ανωμαλιών, αυτό που ονομάσαμε γενετική πολυπλοκότητα, αλλά και ως προς το είδος των ανωμαλιών που τις χαρακτηρίζουν (γενετικό προφίλ). Το γεγονός ότι ορισμένες γενετικές ανωμαλίες συναντώνται σε όλες τις κατηγορίες των όγκων και μάλιστα ανεξάρτητα από το συνολικό αριθμό των γενετικών ανωμαλιών που παρουσιάζουν, φαίνεται σαν κάποια αρχικά γεγονότα στην πορεία της καρκινογένεσης να είναι κοινά για όλους τους τύπους όγκων. Για παράδειγμα, ενίσχυση του χρωμοσωμικού βραχίονα 1q και έλλειψη του χρωμοσωμικού βραχίονα 16q είναι κοινή σε όλους τους ιστολογικούς τύπους και δεν συνδέεται με το συνολικό αριθμό των γενετικών ανωμαλιών που παρουσιάζει ο εξεταζόμενος όγκος. Θεωρούμε ότι αυτές οι γενετικές αλλαγές είναι πρωταρχικές ενώ η μετέπειτα συσσώρευση γενετικών αλλαγών είναι χαρακτηριστική για κάθε ιστολογικό τύπο, τουλάχιστον όσον αφορά τη συχνότητα της εμφάνισής τους.

Προσπαθήσαμε με ορισμένες βιολογικές παραμέτρους να διαπιστώσουμε αν το διαφορετικό γενετικό προφίλ των όγκων συσχετίζεται με διαφορετική βιολογική οντότητα των ιστολογικών τύπων. Στην περίπτωση της τελομεράσης διαπιστώσαμε μια συσχέτιση της ενεργότητας του ενζύμου με την αύξηση των γενετικών ανωμαλιών μέχρι ένα σημείο, ενώ παράλληλα φάνηκε μια διαφορετική συμπεριφορά του ενζύμου στους



πορογενείς διηθητικούς όγκους μη ειδικού τύπου και στα φαγεσворικά καρκινώματα παρόλα που οι δύο αυτοί τύποι έχουν κοινό σημείο προέλευσης. Η θετική συσχέτιση της ενεργότητας του ενζύμου με τις γενετικές ανωμαλίες μέχρι ένα σημείο και η αρνητική συσχέτιση μετά δείχνουν πιθανώς ένα διπλό ρόλο της τελομεράσης. Της επιβίωσης από τη μία και του πολλαπλασιασμού από την άλλη. Η παρατήρηση αυτή έχει διατυπωθεί και από άλλους ερευνητές σε *in vitro* συστήματα μόνο εξαιρετικά πρόσφατα. Το γεγονός ότι η συμπεριφορά του ενζύμου δεν είναι ίδια στους δύο προαναφερθέντες ιστολογικούς τύπους θα μπορούσε να οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα βιολογικό δείκτη που συνδέεται με το είδος του ιστού.

Μελετώντας πολυεστιακούς όγκους όμως, διαπιστώσαμε ότι η έκφραση της τελομεράσης όπως και των άλλων βιολογικών παραμέτρων που εξετάστηκαν παρουσιάζουν διαφορετικές τιμές στον ίδιο ασθενή, ακόμα και αν οι διαφορετικές εστίες ανήκαν στον ίδιο ιστολογικό τύπο. Με αυτά τα ευρήματα αποδικνύεται αφενός μεν η πολυπλοκότητα και η ετερογένεια του καρκίνου του μαστού, αφετέρου δε ότι βιολογικές παράμετροι όπως η τελομεράση φαίνεται να σχετίζονται περισσότερο με την εξέλιξη της νόσου παρά με τον ιστολογικό τύπο του όγκου.

Η εξέταση πρωτογενών όγκων σε σχέση με τις μεταστάσεις κατέδειξε διαφορές ως προς τις γενετικές ανωμαλίες, αλλά και ως προς τις βιολογικές παραμέτρους. Υπερέκφραση της πολύ(Α)-πολυμεράσης, του *erbB2* ή του FHT στις μεταστάσεις οδήγησαν στην περαιτέρω εξέταση αυτών των παραμέτρων και τις συσχετίσεις τους με άλλους παράγοντες. Η έκτοπη έκφραση πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε βασικές κυτταρικές διαδικασίες όπως των παραγόντων της μεταγραφικής διαδικασίας, έχει ήδη καταδειχθεί στον καρκίνο. Η πολύ(Α)-πολυμεράση είναι ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης για τους όγκους χωρίς διήθηση στους λεμφαδένες, ενώ όπως διαπιστώθηκε υπερέκφραση της πολύ(Α)-πολυμεράσης διαχωρίζεται από τον πολλαπλασιασμό στις μεταστάσεις. Ίσως λοιπόν η έκφρασή της να είναι χαρακτηριστική ενός μεταστατικού κυττάρου. Η ερώτηση λοιπόν που προκύπτει είναι αν η υψηλή ενεργότητα της πολύ(Α)-πολυμεράσης που είναι ανεξάρτητη από τον πολλαπλασιασμό είναι χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων με μεταστατικό δυναμικό.



**ABSTRACT**

---

Breast cancer is the most common malignant disease in women of developed countries. A lot of molecular and genetic changes have been reported in human breast cancer, but little is known of the pathogenetic significance of these changes at the different stages of the disease. The discovery of prognostic factors, specifying the tumor grade and predicting the potentiality of metastasis could help to the design of the appropriate treatment. The combination of biological and genetic tumor characteristics could be a useful complement to classic pathologoanatomy. The identification of the genes that are implicated in the process of breast carcinogenesis has not been completed yet. Nowadays, most scientific works are focused on the discrimination of primary genetic abnormalities –important for tumor development- from the ones resulting from a general genetic imbalance.

The purpose of this study was to determine the relationship between genetic changes, biological factors and clinicopathological parameters in primary breast tumors and their lymph node metastases. Genetic tumor complexity was determined, and possible correlation with several biological parameters and/or clinicopathological characteristics was studied.

This study was realised on 147 primary breast tumors and 15 lymph node metastases. Hyperplasias were used as control values. Genetic abnormalities were determined by comparative genomic hybridisation (CGH), genetic complexity was calculated by adding the number of enhancements and/or diminutions of total DNA. The clinicopathological parameters considered were age, tumor size, grade, oestrogen / progesterone receptors status (negative or positive), lymph node metastasis and histological type. The biological parameters examined were PCNA, c-erbB2, telomerase, poly(A)polymerase, FHIT and RhoC.

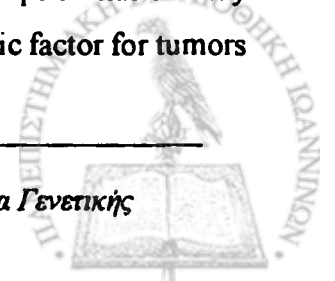
Our results are in agreement with what is already known about breast carcinogenesis, they raise queries and add new information on the pathogenesis of the disease. According to these results: the increased number of genetic changes correlate with the progression of the disease, as this is determined by clinicopathological parameters such as grade, proliferation index etc. Patients with high histological grade,

high mitotic index and without oestrogen receptors had more genetic changes than the others. It appears that various histological types differ in the number –genetic complexity- and in the frequency of genetic changes. The fact that some genetic changes were seen in every histological type, independently of genetic complexity, suggests that these genetic changes characterise the initial steps in carcinogenesis that are common in all tumor types. For example, genetic enhancement on the chromosome 1q and/or diminution on 16q were always seen to all histological types and they don't correlate with increased number of genetic abnormalities. Apart from these common “primaries” genetic changes, each histological tumor type appeared with its own genetic profile resulting from the accumulation of numerous genetic abnormalities.

The question that arose was, if each histological type had his own genetic profile, could we use any biological parameter indicative of the genetic status of the tumor? A positive correlation was seen between telomerase activity levels and genetic changes when the tumor had a low degree of genetic complexity and surprisingly the same correlation was seen in comedo carcinomas and a negative correlation in NOS carcinomas, even if these tumor types had the same origin. The relationship between telomerase activity levels and genetic complexity was best described by a quadratic equation, which could probably reflect a dual role of telomerase, survival and cellular proliferation. Recent *in vitro* studies have shown similar results. On the other hand, the different behaviour of the enzyme in the different histological types could lead to the hypothesis that telomerase is a tissue specific biological marker.

However, the study of multifocal tumors showed that telomerase and other biological parameters expression had different values in different sites of the tumor, even if it was the same histological type. These findings prove the complexity and the heterogeneity of breast cancer and show that biological parameters such as telomerase correlate with disease progression rather than the histological type.

The study of primary tumors and their metastases showed a difference in genetic and biological parameters. Overexpression of poly(A)polymerase, c-erbB2 or FHIT in metastases led to further examination of these parameters. The ectopic expression of protein that participates to principal cellular functions such as transcription has already been shown in cancer. Poly(A)polymerase is an independent prognostic factor for tumors



without lymph node metastasis and overexpression of poly(A)polymerase is dissociated from cellular proliferation in metastases. The expression of poly(A)polymerase may characterise the cellules with metastatic potential.



# **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ**



1. Greenlee RT., MPH, Murray T., Bolden S., Wingo PA. Cancer statistics. CA Cancer J Clin 2000; 50:7-33.
2. Simons J.W. Genetic, epigenetic, dysgenetic, and non-genetic mechanisms in tumorigenesis. Crit Rev Oncogenesis 1995; 6: 261-73.
3. Holliday R. Neoplastic transformation: the contrasting stability of human and mouse cells. Cancer Survey 1996; 28: 103-15.
4. Couch D.B. Carcinogenesis: basic principles. Drug Chem Toxicol. 1996; 19: 133-48.
5. Wingo P.A., Tong T., Bolden S. Cancer statistics. CA Cancer J. Clin. 1995; 45:8.
6. SH Landis, T Murray, and S Bolden, Wingo PA. Cancer statistics, CA Cancer J Clin 1998; 48: 6-29.
7. Coagner F.B. History of breast disease and its treatment. In: Bland K.I, Copeland E.M.(eds) The Breast, Philadelphia, WB Saunders Company, 1991; pp 1-16.
8. Hortobagyi G.N., Buzdar A.U. Current status of adjuvant systemic therapy for primary breast cancer: progress and controversy. CA Cancer J. Cli. 1995; 45: 199-226.
9. Ursin G., Bernstein L., Pike M.C., Breast Cancer. Cancer Surv 1994; 19-20:241-261.
10. Beral V, Hermon C, and Reeves G et al. Sudden fall in breast cancer death rates in England and Wales Lancet 1995; 345: 1642-1643.
11. Brewster D, Everington D, and Harkness E et al. Incidence of and mortality from breast cancer since introduction of screening. Scottish figures show higher incidence and similar mortality [letter; comment] BMJ 1996; 312: 639-640.
12. Game JP, Aspegren K, and Balldin G et al. Increasing incidence of and declining mortality from breast carcinoma. Trends in Malmo, Sweden, 1961-1992 [see comments] Cancer 1997; 79: 69-74.
13. Hermon C and Beral V. Breast cancer mortality rates are levelling off or beginning to decline in many western countries: analysis of time trends, age-cohort and age-period models of breast cancer mortality in 20 countries Br J Cancer 1996; 73: 955-960.



14. Howe HL., Wingo PA., Thun MJ., Ries LA., Rosenberg HM., Feigal EG., Edwards BK. Annual report to the nation on the status of cancer (1973-1998), featuring cancers with recent increasing trends. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:824-42.
15. Quinn M and Allen E. Changes in incidence of and mortality from breast cancer in England and Wales since introduction of screening. United Kingdom Association of Cancer Registries [see comments] *BMJ* 1995; 311: 1391-1395.
16. Bailar JC3 and Gornik HL. Trends in cancer mortality: perspectives from Italy and the United States. *Medicina del Lavoro* 1997; 88: 274-286.
17. Kuri Morales P, Mendez Vargas R, Macias Martinez CG, et al. Compendio del registro histopatologico de neoplasias en Mexico. Mexico, DF, Secretaria de Salud. *Epidemiologia*, 1997.
18. Vecchia C La, Negri E, and Levi F et al. Age, cohort-of-birth, and period-of-death trends in breast cancer mortality in Europe [letter] *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 732-734.
19. Levi F, Vecchia C La, and Negri E et al. Declining cancer mortality in European Union [letter] *Lancet* 1997; 349: 508-509.
20. Colditz GA. Epidemiology of breast cancer *Cancer* 1993; 71: 1480-1489.
21. Kelsey JL and Gammon MD. The epidemiology of breast cancer. [review] *CA Cancer J Clin* 1991; 41: 146-165.
22. Colditz GA, Willett WC, Hunter DJ, et al. Family history, age, and risk of breast cancer. Prospective data from the Nurses' Health Study [see comments]. *JAMA* 1993;270:338-343 [published erratum appears in *JAMA* 1993;270:1548.
23. Henderson IC. Risk factors for breast cancer development *Cancer* 1993; 71: 2127-2140.
24. Hamajima N., Hirose K., Tajima K. et al., Alcohol, tobacco and breast cancer – collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *BJC* 2002; 87:1195-6.
25. Marchbanks PA, McDonald JA., Wilson HG., et al. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 346:2025-32.





26. Egan KM, Newcomb PA, and Longnecker MP et al. Jewish religion and risk of breast cancer [see comments] *Lancet* 1996; 347: 1645-1646.
27. Trichopoulos D, Yen S, and Brown J et al. The effect of westernization on urine estrogens, frequency of ovulation, and breast cancer risk. A study of ethnic Chinese women in the Orient and the USA *Cancer* 1984; 53: 187-192.
28. Weber B., Garber J. Familial breast cancer. In: Harris J., Lippman M., Morrow M., and Hellman S. (eds.). *Diseases of the breast*. Lippincott – Raven, 1996;168.
29. Evans D.G., Fentiman I.S., Mc Pherson K., Asbury D., Ponder B.A., Howell A. Familial breast cancer. *Br. Med. J.* 1994;308: 183-187.
30. Ford D., Easton D.F. The genetics of breast and ovarian cancer *Br. J. Cancer* 1995; 72: 51-5.
31. Newman B, Austin MA, Lee M et al. Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 3044-3048.
32. King MC, Rowell S, and Love SM. Inherited breast and ovarian cancer. What are the risks? What are the choices? *JAMA* 1993; 269: 1975-1980.
33. Lindblom A. Familial breast cancer and genes involved in breast carcinogenesis [review] *Breast Cancer Res Treat* 1995; 34: 171-183.
34. Slattery ML and Kerber RA. A comprehensive evaluation of family history and breast cancer risk. The Utah Population Database [see comments] *JAMA* 1993; 270: 1563-1568.
35. MacMahon B, Cole P, and Brown J. Etiology of human breast cancer: a review [review] *J Natl Cancer Inst* 1973; 50: 21-42.
36. Sobol H., Birnbaum D., Eisinger F Evidence for a third breast cancer susceptibility gene *Lancet*, 1994; 344: 1151-2.
37. Kerangueven F., Essioux L., Dib A., Noguchi T., Allione F., Geneix J., Longy Mk., Lidereau R., Eisinger F., Pebusque MJ., Jacquemier J., Bonaiti-Pellie C., Sobol H., Birnbaum D Loss of heterozygosity and linkage analysis in breast carcinoma: indication for a putative susceptibility gene on the short arm of chromosome 8. *Oncogene*, 1995; 10:1023-6.



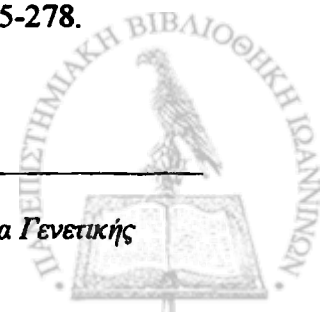
38. Thompson D., Szabo C., Mangion J., Oldenburg R., Odefrey F., Seal S., Barfoot R., Kroeze-Jansema K., Teare D., Rahman N., Renard H., Consortium K., Mann G., et al., Evaluation of linkage of breast cancer to the putative BRCA3 locus on chromosome 13q21 in 128 multiple case families from the Breast Cancer Linkage Consortium. PNAS, 2002; 99:827-831.
39. Antoniou AC., Pharoah PDP., McMullan G., Day NE., Stratton MR., Peto J., Ponder BJ., Easton DF. A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes. BJC 2002; 86:76-83.
40. Hall JM., Lee MK., Newman B., Morrow JE., Anderson LA., Huey B., King MC. Linkage of early onset familial breast cancer to chromosome 17q21. Science 1990; 250: 1684-9.
41. Miki JS, Swensen J., Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K., Tarvigian S., Liu Q., Cochran C., Bennett LM et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science, 1994; 266: 66-71
42. BIC database 2002, [www.nhgri.nih.gov/intramural\\_research](http://www.nhgri.nih.gov/intramural_research)
43. Wooster R Neuhausen SL., Mangion J., Quirk Y., Foerd D., Collins N., Nguyen K., et al., Localization of a breast cancer susceptibility gene BRCA2 to chromosome 13q12-13 Science, 1994; 265: 2088-90.
44. Wooster R., Bingell G., Lancaster J., Swift S., Seal S., Mangion J., Collins N., Gregory S., et al., Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2 Nature, 1995; 378:789-92.
45. Stratton MR, Ford D, Neuhasen S., Seal S., Wooster R., Friedman LS., King MC., Egilson V., Devilee P., McManus R., Daly PA., Smyth E., Ponder BAJ., Peto J., Cannon-Albright LA., Easton DF., Goldgar DE familial male breast cancer is not linked to the BRCA1 locus on chromosome 17q Nature Genet, 1994; 7:103-7.
46. Friedman LS., Gayther SA., Kurosaki T., Gordon D., Noble B., Casey G., Ponder BAJ., Anton-Culver H Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 in a male breast cancer population Am J Hum Genet, 1997; 60:313-9.
47. Ladopoulou A., Kroupis C., Konstantopoulou I. Et al Germ line BRCA1 & BRCA2 in Greek breast/ovarian cancer families: 5382insC is the most frequent mutation observed. Cancer Lett 2002; 185: 61-70.



48. Armakolas A., Ladopoulou A., Konstantopoulou I., et al. BRCA2 gene mutations in greek patients with familial breast cancer. *Hum Mutat* 2002; 19: 81-2.
49. Konstantopoulou I., Kroupis C., Ladopoulou A., et al. BRCA1 mutation analysis in breast/ovarian cancer families from Greece. *Hum Mutat* 2000; 16:272-3.
50. Trichopoulos D., Mac Mahon B., Cole P. Menopause and breast cancer risks. *J. Natl. Cancer Inst.* 1972; 48:605-613.
51. Kampert J.B., Whittemore A.S., Paffenbarger R.S., Jr. Combined effect of childbearing, menstrual events, and body size on age specific breast cancer risk. *Am. J. Epidemiol.* 1988; 128: 962-970.
52. White E. Projected changes in breast cancer incidence due to the trend toward delayed childbearing. *Am. J. Public Health* 1987; 77: 495-497.
53. Henderson BE, Ross RK, and Judd HL et al. Do regular ovulatory cycles increase breast cancer risk? *Cancer* 1985. 56: 1206-1208.
54. Weiss LK., Burkman RT., Cushing-Haugen KL. Hormone replacement therapy regimens and breast cancer risk. *Obstet Gynecol* 2002; 100:1148-58.
55. Pike MC, Henderson BE, and Casagrande JT et al. Oral contraceptive use and early abortion as risk factors for breast cancer in young women *Br J Cancer* 1981. 43: 72-76.
56. Kelsey JL and Berkowitz GS. Breast cancer epidemiology [review] *Cancer Res* 1988; 48: 5615-5623.
57. Armstrong BK. Oestrogen therapy after the menopause—boon or bane? *Med J Aust* 1988; 148: 213-214.
58. Buring JE, Hennekens CH, and Lipnick RJ et al. A prospective cohort study of postmenopausal hormone use and risk of breast cancer in US women *Am J Epidemiol* 1987; 125: 939-947.
59. Henderson BE, Ross R, and Bernstein L. Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture. [review] *Cancer Res* 1988; 48: 246-253.
60. Henderson BE, Ross RK, Lobo RA et al. Re-evaluating the role of progestogen therapy after the menopause *Fertil Steril* 1988; 49: 9S-15S.



61. Malone K., Dalin J., Weiss N. Oral contraceptives in relation to breast cancer. *Epidemiol Rev.* 1993; 15:80-97.
62. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53, 297 women with breast cancer and 100,239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* 1996; 347: 1713-1727.
63. Howe GR, Hirohata T, and Hislop TG et al. Dietary factors and risk of breast cancer: combined analysis of 12 case-control studies *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 561-569.
64. Oliveria SA and Osborne MP. Diet, breast cancer, and case-control studies [comment] *Lancet* 1996; 347: 1346-1346.
65. Trichopoulou A, Katsouyanni K, and Stuver S et al. Consumption of olive oil and specific food groups in relation to breast cancer risk in Greece [see comments] *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 110-116.
66. Land CE. Studies of cancer and radiation dose among atomic bomb survivors. The example of breast cancer [see comments] *JAMA* 1995; 274: 402-407.
67. Bhatia S, Robison LL, and Oberlin O et al. Breast cancer and other second neoplasms after childhood Hodgkin's disease [see comments] *N Engl J Med* 1996; 334: 745-751.
68. Goss PE and Sierra S. Current perspectives on radiation-induced breast cancer [see comments] [review] *J Clin Oncol* 1998; 16: 338-347.
69. Boice Jr JD, Mandel JS, and Doody MM. Breast cancer among radiologic technologists *JAMA* 1995; 274: 394-401.
70. Leis H.P. The diagnosis of breast cancer. *CA Cancer J. Clin.* 1997; 27:209-213.
71. Page DL and Dupont WD. Anatomic indicators (histologic and cytologic) of increased breast cancer risk [review] *Breast Cancer Res Treat* 1993; 28: 157-166.
72. Dupont WD and Page DL. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease *N Engl J Med* 1985; 312: 146-151.
73. Roberts MM, Jones V, and Elton RA et al. Risk of breast cancer in women with history of benign disease of the breast *Br Med J* 1984; 288: 275-278.



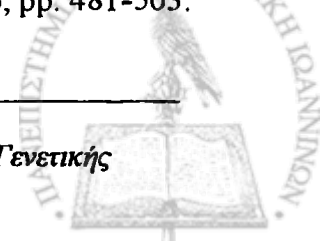
74. Hutter R. Consensus meeting: Is fibrocystic disease of the breast precancerous? Arch Pathol Lab Med. 1986; 110:171.
75. Benichou J, Gail MH, and Mulvihill JJ. Graphs to estimate an individualized risk of breast cancer J Clin Oncol 1996; 14: 103-110.
76. Gail M and Rimer B. Risk-based recommendations for mammographic screening for women in their forties J Clin Oncol 1998; 16: 3105-3114.
77. Gail MH, Brinton LA, and Byar DP et al. Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually [see comments] J Nat Cancer Inst 1989; 81: 1879-1886.
78. Anderson DE and Badzioch MD. Risk of familial breast cancer Cancer 1985; 56: 383-387.
79. Bondy ML, Lustbader ED, and Halabi S et al. Validation of a breast cancer risk assessment model in women with a positive family history [see comments] J Natl Cancer Inst 1994; 86: 620-625.
80. Claus EB, Risch N, and Thompson WD. The calculation of breast cancer risk for women with a first degree family history of ovarian cancer Breast Cancer Res Treat 1993; 28: 115-120.
81. Morrow M. Breast cancer: who and why? In: Jordan V.C. (ed) Tamoxifen for the treatment and prevention of breast cancer. Melville New York: PRR, 1999; 187-205.
82. Polyak K, Lee M-H, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, and Massague J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals Cell 1994. 78: 59-66.
83. Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, and Koff. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest Gene Dev 1994; 8: 9-22.
84. Hartwell LH and Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events Science 1989; 246: 629-634.
85. Walker RA., Jones JL., Chappell S., Walsh T. and Show JA. Molecular pathology of breast cancer and its application to clinical management. Cancer Metast. Rev 1997; 16: 5-27.



86. Hall M and Peters G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer *Adv Cancer Res* 1996; 68: 67-108.
87. Landberg G., Ross G. The cell cycle in breast cancer. *APMIS* 1997; 105: 575-589.
88. Gerard J. and Wilson D.A. High frequency of aberrant p161INK4A expression in human breast cancer *Am.J. Pathol* 1996; 145:15-20.
89. Bergstein I., Molecular Alteration in breast cancer in Bowcock (ed.) *Breast cancer*. Humana Press Inc. 1999; pp. 143-170.
90. Zugmaier G and Lippman ME. Effects of TGF beta on normal and malignant mammary epithelium *Ann N Y Acad Sci* 1990; 593: 272-275.
91. Burroughs KD, Dunn SE, Barrett JC *et al.* Insulin-like growth factor-I: a key regulator of human cancer risk? [editorial; comment] *J.Natl.Cancer Inst* 1999; 91: 579-581.
92. Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA *et al.* Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer. *Lancet* 1998; 351: 1393-1396.
93. Murray PA, Barrett-Lee P, Travers M *et al.* The prognostic significance of transforming growth factors in human breast cancer. *Br J Cancer* 1993; 67: 1408-1412.
94. Relf M, LeJeune S, Scott PA *et al.* Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res* 1997; 57: 963-969.
95. Arteaga CL, Tandon AK, von Hoff DD *et al.* Transforming growth factor beta: potential autocrine growth inhibitor of estrogen receptor-negative human breast cancer cells. *Cancer Res* 1988; 48: 3898-3904.
96. Martinez – Lacaci I., Bianco C., Desantis M., and Salomon D.S. Epidermal growth factor-related peptides and their cognate receptors in breast cancer in Bowcock (ed.) *Breast cancer*. Humana Press Inc. 1999 p. 31-57.
97. Hunter T. Oncoprotein networks *Cell* 1997; 88: 333-346.



98. Normano N., and Ciardello F. EGF related peptides in the pathophysiology of the mammary gland *J. Mam. Gland Biol. Neoplasia* 1997; 2(2): 143-151.
99. Ioachim E., Kamina S., Athanasiadou S., Agnantis N.J. The prognostic significance of epidermal growth factor receptor (EGFR), C-erbB2, Ki-67 and PCNA expression in breast cancer *Anticancer Res* 1996; 16 (B): 3141-3147.
100. Salomon D.S., Brandt R., Ciardiello F., and Normama N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Rev.Oncol./Hematol.* 1995; 19: 183-232.
101. Salomon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.S., Ullrich A., McGuire W.L., Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the Her-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-182
102. Hynes N.H. and Stern D.F. The biology of erbB-2/neu/Her-2 and its role in cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1994; 198: 165-184
103. Nicholson R.I., Mc Clelland R.A., Gee J.M., Manning D.L., Cannon P., Robertson J.F., Ellis I.O. and Blamey R.W. Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer: association with response to endocrine therapy. *Breast Cancer Res. Treat.* 1994; 29: 117-125
104. Goodrich DW, Wang NP, Qian YW, Lee EY, and Lee WH. The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle *Cell* 1991. 67: 293-302.
105. Weinberg R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. 1995; *Cell* 81:323-330
106. Zimmer SG., Debenedetti A., and Graff JR. Translational control of malignancy: the mRNA cap-binding protein, eIF-4E, as a central regulator of tumor formation, growth, invasion and metastasis. *Anticancer Res.*, 2000; 20: 1443-1452.
107. Clogan D.F. and Manley J.L. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes and Development* 1997; 11:2755-2766.
108. Richter J.D. Dynamics of poly (A) addition and removal during development in translation control ( M. Mathews, J. Herhey and N. Sonenberg eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.1996; pp. 481-503.

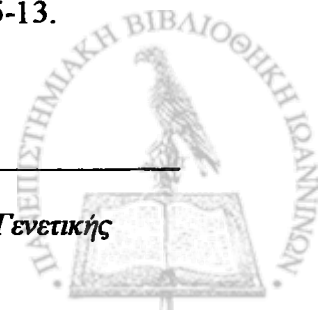


109. Colgan D.F., Murthy K.G.K., Prives C. and Manley J.L. Cell cycle related regulation of poly (A) polymerase by phosphorylation. *Nature* 1996; 384: 282-285.
110. Kazazoglou T., Tsiapalis C.M., Havredaki M. Polyadenylate polymerase activity in stationary and growing cell cultures. *Exp. Cell Biol.* 1987; 55: 164-172.
111. Coleman M.S., Hutton J.J and Bollum F.J. Terminal riboadenylate transferase in human lymphocytes. *Nature* 1974; 248: 407-409.
112. Curtis N., Trangas T., Tsiapalis CM. Increase in the levels of activity of polyadenylic acid metabolising enzymes following phytohaemagglutinin stimulation of human leucocytes. *Mol Cell Biochem.* 1987; 75: 33-42.
113. Simmantor R. and Sachs L. Induction of polyadenylate polymerase and differentiation in Neuroblastoma Cells. *Eur. J. Biochem.* 1975; 55: 9-14.
114. Perez S., Trangas T., Kokkinopoulos P., Tsiapalis C.M. and Papamichail M. Polyadenylic acid metabolising enzyme levels during induction of differentiation in a human leukemia T-cell line with phorbol ester. *JNCI* 1987; 78: 407-409.
115. Adolf G.R. and Swetly P. Pol(A) polymerase activity during cell cycle and erythropoietic differentiation in erythroleukemic mouse spleen cells. *Bioch. Bioph. Acta* 1978; 518:334-344.
116. Trangas T., Curtis N., Pangalis G.A., Cosmides H.V., Ioannide C., Papamichail M. and Tsiapalis C.M. Polyadenylic acid polymerase activity in normal and leukemic human leukocytes. *Cancer Res.* 1984; 44 : 3691-3697.
117. Pangalis G.A., Trangas T., Papanastasiou C.J., Roussou P.A., Tsiapalis C.M. Poly(A) polymerase activity in chronic lymphocytic leukemia of the B cell type, *Acta Haemat.* 1985; 73:31-34.
118. Sasaki R., Minawada J., Bollum F.J., Miura Y. Polyadenylic and polymerase activity in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia Res.* 1990; 14: 273-278.
119. Scorilas A., Curtis N., Yotis J., Talieri M., Michailakis M., Trangas T. Poly (A) polymerase activity levels in breast tumor cytosols *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 1998; 17: 511-518.





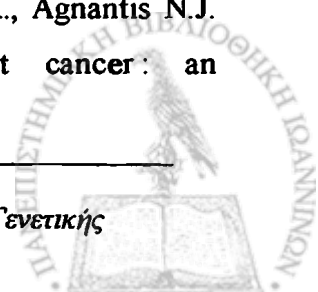
120. Scorilas A., Talieri M., Ardavanis A., Curtis N., Dimitriadis E., Yotis J., Tsiapalis C.M. and Trangas T. Poly(A)polymerase enzymatic activity in primary breast cancer. *Cancer Res.* 2000; 60: 5427-5433.
121. Greenbalatt M.S., Bennett W.P., Hollstein M. and Harris C.C. Mutations in the p53 tumour suppressor gene: Clues to cancer aetiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 1994; 54: 4855-4878.
122. Chang F., Syrjanen and Syrjanen K. Implications of the p53 tumor suppressor gene in clinical oncology *J. Clin. Oncol.* 1995; 13: 1009-1022.
123. Couch F.J. and Weber B.L. Breast cancer, in *The Genetic Basis of Human Cancer* (Volgstein B. and Kinzley K.W., eds) Mc Graw Hill, New York NY. 1998; pp 537-563.
124. Zhang G-J., Kimijima I., Abe R., Kanno M., Kataguta N., Hora K., Watanabe T. and Tsuchiya A. Correlation between the expression of apoptosis-related bcl-2 and p53 oncoproteins and the carcinogenesis and progression of breast carcinomas *Clin. Cancer Res* 1997; 3: 2329-2335.
125. DW Nicholson and NA Thornberry. Caspases: killer proteases *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 299-306.
126. Muller H.J. The remaking of chromosomes. The collecting net. *Woods Hole* 1938;13:181-198.
127. McClintock B: The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 1941; 41: 234-282.
128. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS., et al., A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 6622-6626.
129. Morin GB: The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 1989; 59: 521-529.
130. Allsop RC., Vaziri H., Patterson C. Et al., Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89 : 10114-10118.
131. Greider CW, and Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 1985; 43: 405-13.



132. Feng J, Funk W, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J, et al.. The RNA component of human telomerase. *Science* 1995; 269: 1236-1241.
133. DePhino RA The age of cancer. *Nature* 2000; 408: 248-254.
134. Artandi SE, Chang S, Lee SL, Alson S, Gottlieb GJ, Chin L, and DePhino RA. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* 2000; 406: 641-645.
135. Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T, Kutoi K, Yokoyama T, Gazdar AF, Hiyama K, Piatyszek MA, and Shay JW. Telomerase activity in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 116-22.
136. Rha SY, Park KH, Kim TS, Yoo NC, Yang WI, Roh JK, Min JS, Lee KS, Kim BS, Choi JH et al.. Changes of telomerase and telomere lengths in paired normal and cancer tissues of the breast. *Int J Oncol* 1999; 15: 839-845.
137. Tsao JI, Zhao Y, Lukas J, Yang A, Press M, and Shibata D. Telomerase activity in normal and neoplastic breast. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 627-631.
138. Poremba C, Bockner W, Willenbring H, Schafer K, Otterbach F, Burger H, Diallo R, and Dokhorn-Dworniczak B. Telomerase activity in human proliferative breast lesions. *Int J Oncol* 1998;12: 641-648.
139. Mokbel K, Parris CN, Ghilchik M, Williams G, Newbold R. The association between telomerase, histological parameters, and Ki-67 expression in breast cancer *Am J Surg* 1999;178: 69-72.
140. Artandi SE, Alson S, Tietze MK, Sharpless NE, Ye S, Greenberg RA, Castrillon DH, Horner JW, Weilwe SR, Carrasco RD, and DePinho RA. Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in aging mice. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99, 8191-8196.
141. Stewart SA, Hahn WC, O'Connor BF, Banner EN, Lundberg AS, Modha P, Mizuno H, Brooks MW, Fleming M, Zimonjic DB, et al. Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:12606-12611.



142. Folkman J. 1997 Tumor angiogenesis. In Cancer Medicine J.F. Holland, R.C. Basf, D.L. Morton, F. Frei, D.W. Kafe and R.R Weichselbaum, eds Baltimore MD: Williams and Wilkins pp.181-204.
143. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nature Med. 1995; 1: 27-31.
144. Gasparini G. Angiogenesis in Breast cancer : Molecular genetics, Pathogenesis and Therapeutics. Bowcock A.M. (ed) Humana Press inc Totowa NS 1999; p. 347-371.
145. Hanahan D and Folkman J. Patterns of emerging mechanisms of the angiogenesis switch during tumorigenesis Cell 1996; 86:353-364.
146. Bertin N., Clezardin P., Kubiok R and Frappart Thrombospondin-1 and -2 messenger RNA expression in normal benign, and neoplastic human breast tissues: correlation with prognostic factors, tumor angiogenesis, and fibroblastic desmoplasia Cancer Res. 1997; 57: 396-399.
147. Volpert O., Stellmach V., and Bouk N. The modulation of thrombospondin and other naturally occurring inhibitors of angiogenesis during tumor progression Breast Cancer Res. Treat. 1995; 36: 119-126.
148. Johnson J.P. Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease Cancer Metastasis Rev. 1991; 10:11-22.
149. Christofori G. and Smb H. The role of the cell adhesion molecule E-cadherin as a tumor-suppressor gene. Tren Biochem. Sci. 1999; 24: 73-76
150. Rosfjord E. and Dickinson R. Role of integrins in the development and malignancy of the breast cancer: Molecular Genetic, Pathogenesis and Therapeutics 1999; p. 285-304.
151. Mac Dougall J.R. and Martisian L.M. Matrix metalloproteinases in the pathogenesis of breast cancer in breast cancer: Molecular genetics, Pathogenesis and Therapeutics Bowcock A.M. (ed) Human Press Inc. Totowa N.J. 1999; p.305-324.
152. Ioachim E., Athanassiadou SE, Kamina S., Carassavoglou K., Agnantis N.J. Matrix metalloproteinase expression in human breast cancer: an



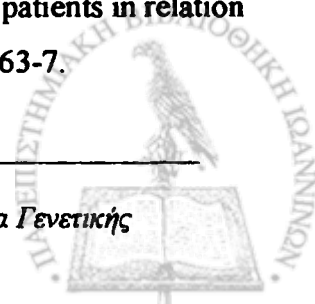
- immunohistochemical study including correlation with cathepsin D, type IV collagen, laminin, fibronectin, EGFR, c-erbB2 oncoprotein, p53, steroid receptor status and proliferative indices. *Anticancer Res* 1998; (3A); 1665-1670.
153. Hall A. The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* 1990; 249: 635-640.
154. Suwa H., Ohshio G., Imamura T., Watanabe G., Aril S., Imamura M., Narumiya S., Hiai H and Fukumoto. Overexpression of the rhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas *British J Cancer* 1998; 77(1): 147-152.
155. Van Golen K.L., Wu ZF, Qiao XT., Bao L.W., Merajver SD. RhoC GTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the inflammatory breast cancer phenotype. *Cancer Res* 2000;60: 5832-8.
156. Fritz G., Just I, Kaina B. Rho GTPases are overexpressed in human tumors *Int J Cancer* 1999; 81: 682-7.
157. Ridley AJ and Hall A The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors *Cell* 1992; 70: 389-399.
158. Baak J.P.A., Kurver P.H.J., De Snoo-Newlaet A.J.E., De Graef S., Makkink B., Boon M. Prognostic indicators in breast cancer-morphometric methods. *Histopathology* 1982; 6: 327-339.
159. Gerdes J., Lemke H., Baisch H., Wacker H.H., Schwab U. And Stain H. Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen by the 17monoclonal antibody Ki-67 *J.Immunol* 1984; 133:1710-15.
160. Deltmar P., Harbeck N., Thomsen C., Pache L., Ziffer P., Fizi K., Sanicke F., Nathath W., Schmitt M., Graelf H., and Hofler H. Prognostic impactof proliferation-associated factors MIB1 (Ki-67) and S-phase in node negative breast cancer. *Brit. J. Cancer* 1997; 75:1525-1533.
161. Mathews MB., Bernstein R.M., Fronza B.R., Garrels.I Identity of the proliferating cells nuclear antigen and cyclin *Nature* 1984; 309: 374-376.



162. Tahan S.R., Neuberg D,S, Diethpach A., Yacoub L. Prediction of early relapse and shortened survival in patients with breast cancer by proliferating cell nuclear antigen score. *Cancer* 1993; 71: 3552-3559.
163. Sheen-Chen S-M, Eng H-L, Chou F-E, Chen W-S. The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen in patients with lymph node positive breast cancer *Arch Surg*1997; 132: 264-267.
164. World Health Organisation (1981). Histological typing of breast tumors. In: Second International histological classification of tumors. Geneva: World Health Organisation.
165. Bloom H.J. and Richardson W.W. Histologic grading and prognosis in breast cancer. *Br. J. Cancer.* 1957; 11: 359-377.
166. Hensen D.E. Cancer patient staging: a perspective study *Arch. Pathol Lab Med.* 1991; 115: 120-121.
167. Insa A., Llich A., Prosper F., Marugon I., Mortinev- Agullo A. And Garcia Conde J. Prognostic factors predicting survival from first recurrence in patients with metastatic breast cancer: analysis of 439 patients. *Breast Cancer Res. Treatm.* 1999; 56: 67-78.
168. Beat M., Gene regulation by steroid hormones *Cell* 1989; 56:335-344.
169. Green G.L., Gilna P., Waterfield M., Baker A., Hort Y. and Shine J. Sequence and expression of human oestrogen receptor complementary DNA. *Science* 1986; 231: 1150-1154.
170. Mosselman S., Polman J., and Dijkema R.E.R.: Identificaaion and characterization of a novel human estrogen receptor *FEBS Lett.* 1996; 392: 49-53.
171. Dotzlaw H., Leyogue E., Watson P.H. and Murphy L.C. Expression of estrogen receptor-beta in human breast tumors. *J. Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82: 2371-2374.
172. Hansen R.K. and Fuqua S.A.W. (1999) The Estrogen Receptor and Breast Cancer in: *Breast Cancer: Molecular Genetics, Pathogenetics, and Therapeutics.* Bowcock A.M. ed. Humana press Inc. Totowa N.J. p. 1-30.



173. Tremblay GB., Tremblay A., Labrie F., Giguere V. Ligand-independent activation of the estrogen receptors alpha and beta by mutations of conserved tyrosine can be abolished by antiestrogens. *Cancer Res* 1998; 38:877-81.
174. Osborne C.K. Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res. Treat.* 1998; 5: 227-238.
175. Nomura Y., Miura S., Koyama H., Enomot K., Kasami F., Yamamoto H., Kimura M., Tominaga T., Lino H., Morimoto T. et al. Relative effect of steroid hormone receptors on the prognosis of patients with operable breast cancer. A univariate and multivariate analysis of 3089 Japanese patients with breast cancer from the Study Group for the Japanese Breast Cancer Society on Hormone Receptors and Prognosis in Breast Cancer. *Cancer* 1992; 69:153-164.
176. Bernoux A., de Cremoux P., Laine-Bidron C., Martin E.C., Asselain B., Magdelenat H. Estrogen Receptor negative and progesterone receptor positive primary breast cancer : pathological characteristic and clinical outcome. Institut Curie, Breast Cancer Study Group. *Breast Cancer Res Treat.* 1998; 49:219-25.
177. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal cytotoxic or immune therapy. *Lancet.* 1992; 339:1-15, 71-85.
178. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Polychemotherapy for early breast cancer: An overview of the randomized trials. *Lancet* 1998; 352: 930-942.
179. Carter C.L., Allen C., Henson D.E. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24,710 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63:181-187.
180. Fisher B., Bauer M., Wicherham D.L., Redmoud C.K., Fisher E.R. Relation number of positive axillary nodes to the prognosis of patient with primary breast cancer. *Cancer* 1983;52:1551-1557.
181. Apostolikas N., Petraki C., Agnantis N.J. The reliability of histologically negative axillary lymph nodes in breast cancer. Preliminary report. *Pathol Res Pract* 1988; 184:35-38.
182. Polednak AP. Survival of lymph node-negative breast cancer patients in relation to number of lymph nodes examined. *Ann Surg* 2003; 237: 163-7.



183. Levine AJ. The genetic origins of neoplasia JAMA 1995; 273: 592.
184. Cooper GM. Oncogenes. Boston: Jones and Bartlett, 1990.
185. Bishop JM. Retroviruses and oncogenes II. In: Les Prix Nobel. Stockholm: Almquist and Wiksell, 1989; p.220-238.
186. Varmus HE. Retroviruses and oncogenes I. In: Les Prix Nobel. Stockholm: Almquist and Wiksell, 1989; p.194-212.
187. Varmus H. An historical overview of oncogenes. In: Weinberg RA, editor. Oncogenes and the molecular origins of cancer. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989; p.3-44.
188. Bishop JM. Oncogenes and clinical cancer. In: Weinberg RA, editor. Oncogenes and the molecular origins of cancer. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989; p.327-358.
189. Fearon ER. Tumor suppressor genes. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. The genetic basis of human cancer. McGraw-Hill Companies, Inc.1998; p.229-236.
190. Ohta M., Inoue H, Cotticelli M.G., Kastury K., Baffa R., Palazzo J., Siprashvili Z., Mori M., Mccue P., Druck T., Croce C.M., Huebner K. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site acid renal carcinoma-associated t(3 ;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers Cell, 1996; 84 : 587-597.
191. Sozzi G., Veronese M.L., Negrini M., Beffa R., Cittielli M.G., Inoue H., Tomielli S., Pilotti S., De Gregorio L., Pastorino U., Pierotti M.A., Ohta M., Huebner K., Croce C.M. The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in lung cancer. Cell, 1996; 85: 17-26.
192. Virgilio L., Schuster M., Gollin S.M., Veronese M.L., Ohta M., Huebner K., Croce C.M. Fhit gene alterations in head and neck squamous cell carcinomas Proc. Natl. acad. Sci. USA, 1996; 93: 9770-9775.
193. Negrini M., Monaco C., Vorechovsky I., Ohta M., Druck T., Baffa R., Huebner K., Croce C. M. The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in breast carcinomas. Cancer Res., 1996; 56: 3173-3179.



194. Boland CR. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. The genetic basis of human cancer. McGraw-Hill Companies, Inc.; 1998.
195. Campiglio M., Pekarsky Y., Menard S., Tagliabue E., Pilotti S. and Croce C.M. FHIT loss of function in human primary breast cancer correlates with advanced stage of the disease. *Cancer Res.* 1999; 59: 3866-3869.
196. Bieche I., and Lidereau R. Genetic alterations in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; 14: 227-251.
197. Blaszyk H., Vaughn C.B., Hortmann A., McGovern R.M., Schroedr J.J., Gunningham J., Schaid D., Sommer S.S., Korach J.S. Novel pattern of PS3 gene mutations in an American black cohort with high mortality from breast cancer *Lancet* 1994; 1: 1195-1197.
198. Larsson C., Bystrom C., Stoog L., Rostein S., Nordenkjold M. Genomic alterations in human breast carcinomas. *Genes Chromosome Cancer* 1990; 2: 191-197.
199. Harada Y., Katagiri T., Ito I., Akiyama F., Sakamoto G., Kasumi F., Nakamura Y., Emi M. Genetic studies of 457 breast cancers. Clinicopathological parameters compared with genetic alterations *Cancer* 1994; 74:2281-2286.
200. Heim S., Teixeira M.R., and Pandis N. Cytogenetic Approaches to breast cancer in Bowcock A.M. (ed.) *Breast Cancer*. Humana Press Inc. 1999 p 373-388.
201. Dietrich C.V., Pandis N., Teixeira M.R., Bardi G., Gerdes A.M., Anderson JA., Heim S. Chromosome abnormalities in benign hyperproliferative disorders of epithelial and stromal breast tissue *Int. J. Cancer* 1995; 60:49-53.
202. Nishizaki T., De Vries J., Chew K., Goodson WH., Ljung BM., Thor A., Woldman F.M. Genetic alterations in primary breast cancers and their metastases: Direct comparison using modified comparative genomic hybridization *Genes Chromosomes and Cancer* 1997; 19:267-272.
203. Watson P.H., Safneck J.R., Le K., Dubi K D., Shim R.P.C. Relationship of c-myc amplification to progression of breast cancer from in situ to invasive tumour and lymph node metastases *J. Natl. Cancer Inst.* 1993; 85:902-907.

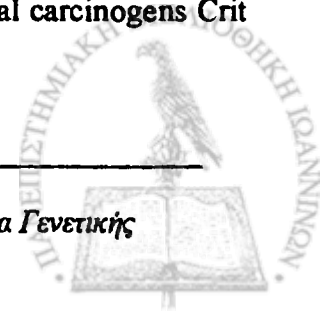




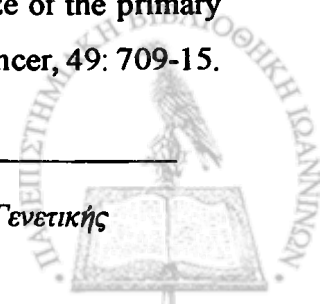
204. Teixeira M.,R., Pandis N., Bardi G., Anderson A., Heim S., Karyotypic comparisons of multiple tumors and normal tissue samples from patients with breast cancer *Cancer Res.* 1996; 56: 855-859.
205. Pandis N., Bardi .G, Jin Y., Dietrich C., Johansson B., Anderson J. et al., Unbalanced t(1 :16) as the sole karyotypic abnormality in a breast carcinoma and the lymph node metastasis *Cancer Genet Cytogenet* 1994 ; 75:158-159.
206. Pandis N., Teixeira M.R., Adeyinka A., Rizou H., Bardi G., Mertens F. et al., Cytogenetic comparisons of primary tumors and lymph node metastases in breast cancer patients *Genes Chrom Cancer* 1998; 22:122-129.
207. Adeyinka A., Mertens F., Idvall I., Bondeson L., Ingvar C., Mittelman F., Pandis N. Different patterns of chromosomal imbalances in metastasizing and non-metastasizing primary breast carcinomas *Int. J. Cancer* 1999; 84:370-375.
208. Gray J.W. and Collins C. Genome changes and gene expression in human solid tumors. *Carcinogenesis* 2000; 21:443-452.
209. Pandis N., Jin Y., Gorunova L., Peterson C., Bardi G., Idvall I., Johansson B., Ingvar C., Mandahl N., Mittelman F., Heim S. Chromosomal analysis of 97 primary breast carcinomas: Identification of eight karyotypic subgroups. *Genes Chromosome and Cancer* 1995; 12: 173-185.
210. Kallionemi A., Kallionemi OP, Piper J., Tanner M., Stokke T., Chen L., Smith HS, Pinkel D., Gray JW., Waldman FM Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 2156-60.
211. Johansson B., Mertens F., Mitelman F. Primary vs secondary neoplasia associated chromosomal abnormalities-Balanced rearrangements vs genome imbalances? *Genes Chrom and Cancer* 1996; 16:155-163.
212. Mitelman F., Mertous F., Johansson B.A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nature Genetics*, 1997;417-419.
213. Peto R. Epidemiology, multistage models, and short - term mutagenesis tests. In: *Origins of human cancer*, pp1403-28. New York: Cold Spring Harbor Laboratory (1977).



214. Dix D The role of aging in cancer incidence: an epidemiological study. *J. Gerontol.* 1989; 44: 10-18.
215. Weinberg RA Oncogenes, antioncogenes and the molecular basis of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 1989; 49:3713-21.
216. Fearon ER, Vogelstein B A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61: 759-67.
217. Sandberg AA. *The chromosomes in Human Cancer and Leukemia*, 2<sup>nd</sup> ed. New York: Elsevier (1990).
218. Mittelman F *Catalog of chromosome Aberrations in Cancer*, 5<sup>th</sup> ed. New York: Wiley-Liss (1994).
219. Heim S, Mitelman F *Cancer Cytogenetics* New York: Wiley-Liss (1995).
220. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS Creation of human tumor cells with defined genetic elements. *Nature* 1999; 409: 464-467.
221. Foulds D, Easton DF. The genetics of breast and ovarian cancer. *Br J. Cancer* 1995; 72:805-12.
222. Nowell PC The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976; 194:23-28.
223. Heim S. Tumor progression: karyotypic keys to multistage pathogenesis. In: Iversen OH (ed), *New Frontiers in Cancer Causation*, pp 247-59. Washington: Taylor & Francis (1993).
224. Kinzler KW, Vogelstein B Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-70.
225. Loeb LA Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 1991; 51: 3075-9.
226. Strauss BS The origin of point mutations in human tumor cells. *Cancer Res.* 1992; 52: 249-53.
227. Heim S, Mandahl N, Mitelman F Genetic convergence and divergence in tumor progression. *Cancer Res* 1988; 48: 5911-6.
228. Russo J., Calaf G. & Russo I.H. A critical approach to the malignant transformation of human breast epithelial cells with chemical carcinogens *Crit Rev Oncogenesis* 1993; 44: 403-17.



229. Russo J., Barnabas N., Higgy N., Salicioni A.M., Wu Y.L. & Russo I.H. Molecular basis of human breast epithelial cell transformation. In Breast Cancer. Advances in biology and therapeutics. Eds: Calvo F, Crepin M and Magdelenat H, John Libbey Eutotext 1996; pp33-43.
230. Page DL, Dupont WD Anatomic markers of human pemalignancy and risk of breast cancer. Cancer 1990; 66: 1326-1335.
231. Page DL, Dupont WD, Rogers LW, Jensen RA, Schuyler PA Continued local recurrence of carcinoma 15-25 years after a diagnosis of low grade ductal carcinoma in situ of the breast treated only by biopsy. Cancer 1995; 76: 1197-1200.
232. Lennington WJ, Jensen RA, Dalton LW, Page DL Ductal carcinoma in situ of the breast. Heterogeneity of individual lesions. Cancer 1994; 73: 118-124.
233. Dawson PJ What is new in our understanding of multifocal breast cancer. Pathol Res Pract 1993; 189: 111-116.
234. Dawson PJ, Baeky PA, Clark RA Mechanisms of multifocal breast cancer: an immunological study Hum Pathol 1995; 26: 965-969.
235. Broet P, de la Rochefoirdiere A, Scholl SM, Fourquet A, Mosseti V, Durand JC, Pouillart P, Asselain B. Contralateral breast cancer: annual incidence and risk parameters. J. Clin Oncol 1995; 13: 1578-1583.
236. Dawson PJ, Maloney T, Gimotty P, Juneau P, Ownby H, Wolman SR. Bilateral cancer. One disease or two? Breast Cancer Res Treat, 1991 19:233-44.
237. Lesser ML, Rosen PP, Kinne DW. Multicentricity and bilaterality in invasive breast carcinoma. Surgery 1982; 91: 234-40.
238. Tubiana M, Konscienly S. Natural history of human breast cancer: recent data and clinical implications. Breast Cancer Res Treat. 1991; 18:125-40.
239. Ponten J., Holmberg L., Trichopoulos D., Kallionemi OP, Kvale G., Wallgren A., Taylor-Papadimitriou J Biology and natural history of breast cancer. Int J Cancer Suppl 1990; 5:5-21.
240. Konscienly S, Tubiana M., Le MG, Valleron AJ, Mouriessse H, Contesso G, Sarrazin D, (1984) Breast cancer: relationship between the size of the primary tumour and the probability of metastatic dissemination Br J Cancer, 49: 709-15.



241. Wigler M., Sweet R., Sim GK., Wold B., Pellicer A., Lacy E., Maniatis T., Silverstein S., Axel R. Transformation of mammalian cells with genes from procaryotes and eucaryotes. *Cell* 1979; 16:777-785.
242. Kallionemi A., Kallioniemi OP, Sudar D., Rudovitz D., Gray JW., Waldman F and Pinkel D Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992; 258:818-821.
243. Kraggerud SM., Szymanska J., Abeler V., Kaem J., Eknaes M., Heim S., Teixeira MR., Trope CG., Peltomaki P., and Lothe RA DNA copy number changes in malignant ovarian germ cell tumors. *Cancer Res.* 2000; 60:3025-30.
244. ISCN (1995): An International System for Human cytogenetic. Nomenclature. Mettelman ed. Basel: S Karger
245. Lowry O.H. Rosebrough N.J., Fary A.I., Randolph R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 1951; 193:265-275.
246. Burnette WN. Western blotting. Electroforetic tranfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radio iodinated protein. *A Anal Biochem* 1981; 112:195-203.
247. Jin Y., Mertens F., Persson B., Warloe T., Gullestad HP., Salemark L., Jin C., Jonsson N., Risberg B., Mandahl N., Mitelman F., Heim S. Nonrandom numerical chromosome abnormalities in basal cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 103:35-42
248. Heim S. Clonal chromosome abnormalities in neoplastic cells: evidence of genetic instability? *Cancer Surv* 1996; 28: 247-60.
249. Tavassoli F.A. and Schnitt S.J. Pathology of the breast Elsevier, New York, 1992.
250. Malamou – Mitsi VD., Syrrou M., Georgiou I., Pagoulatos G., Agnantis NJ. Analysis of chromosomal aberrations in breast cancer by comparative genomic hybridization (CGH). Correlation with histoprognostic variables and c-erbB2 immunoexpression. *J. Exp. Cancer Res.* 1999; 18: 337-361.



251. Courjal F., Theillet C. Comparative genomic hybridization analysis of breast tumors with predetermined profiles of DNA amplification. *Cancer Res.* 1997; 57:4368-77.
252. Ried T., Just KE., Holtgreve-Grez H. et al. Comparative genomic hybridization of formalin – fixed, paraffin embedded breast tumors reveals different patterns of chromosomal gains and losses in fibroadenomas and diploid and aneuploid carcinomas. *Cancer Res* 1995; 55: 5415-23.
253. Kleivi K., Lothe RA, Heim S., Tsarouha H., Kraggerud SM., Pandis N., Papadopoulou A., Andersen J., Jakobsen KS. And Teixeira M. Genome profiling of breast cancer cells selected against in vitro shows copy number changes. *Genes, chromos. And Cancer* 2002; 33:304-309.
254. Pandis N., Idvall I., Bardi G., Jin Y., Gorunova L., Mertens F., Olsson H., Ingvar C., Beroukas K., Mittelman F., Heim S. Correlation between karyotypic pattern and clinicopathologic features in 125 breast cancer cases. 1996; 66:191-196.
255. Bernoux A., de Cremoux P., Laine-Bidron C., Martin E.C., Asselain B., Magdelenat H. Estrogen Receptor negative and progesterone receptor positive primary breast cancer : pathological characteristic and clinical outcome. Institut Curie, Breast Cancer Study Group. *Breast Cancer Res Treat.* 1998; 49:219-25.
256. Adeyinka A., Mertens F., Idvall I., Bondeson L., Invgar C., Heim S., Mitelman F., Pandis N. Cytogenetic findings in invasive breast carcinomas with prognostically favourable histology: a less complex karyotypic pattern? *Int. J. Cancer* 1998; 79:361-364.
257. Perou C.M. Sorlie T., Eisen M.B., Van de rijns, Jeffrey S., Rees C.A., Pollack J.R., Ross D., Johnsen H. et al. Molecular portraits of human breast tumors *Nature* 2000 ; 406 :747-752.
258. Flagiello D., Gerbault-Seureau M., Sastre-Garau X., Padoy E., Vielh P., Durtillaux B. Highly recurrent der(1;16)(q10;p10) and other 16q arm alterations in lobular breast cancer. *Genes Chromosome and Cancer* 1998; 23:300-306.



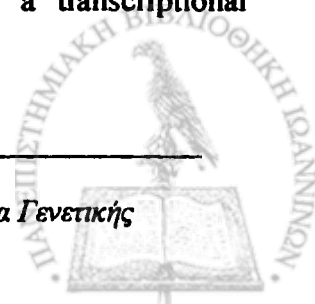
259. Tirkkonen M., Tanner M., Karhu R., Kallionemi A., Isola J., Kallionemi OP  
Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosome  
and Cancer* 1998; 21:177-184.
260. Teixeira MR., Pandis N., Bardi G., Andersen JA., Mittelman F., Heim S. Clonal  
heterogeneity in breast cancer : karyotypic comparisons of multiple intra- and  
extra- tumorous samples from 3 patients . *Int J Cancer* 1995; 63:63-68.
261. Teixeira MR., Pandis N., Bardi G., Andersen JA., Heim S. Karyotypic  
comparisons of multiple tumorous and macroscopically normal surrounding  
tissue samples from patients with breast cancer. *Cancer Res.* 1996b; 56:855-  
859.
262. Vos CB., ter Haar NT., Rosenberg C., Petersen JL., Cleton-jansen AM.,  
Cornelisse CJ., van de Vijver MJ. Genetic alterations on chromosome 16  
and 17 are important features of ductal carcinoma in situ of the breast and are  
associated with histological type. *Br J Cancer*, 1999; 81:1410-18.
263. Greider CW Telomere length regulation. *Ann Rev Biochem* 1996; 65: 337-65.
264. Izumi H, Hara T, Oga A, Matsuda K, Sato Y, Nalto K, and Sasaki K High  
telomerase activity correlates with the stabilities of genome and DNA ploidy in  
renal cell carcinoma. *Neoplasia* 2002; 4, 103-111.
265. Hackett JA, Feldser DM and Greider CW Telomere dysfunction increases  
mutation rate and genomic instability. *Cell* 2001;106, 275-286.
266. McEachern MJ, Blackburn EH. Runaway telomere elongation caused by  
telomerase RNA gene mutations. *Nature* 1995; 376: 403-409.
267. Xiang H, Wang J, Mao Y, Liu M, Reddy VN, Li DW Human telomerase  
accelerates growth of lens epithelial cells through regulation of the genes  
mediating Rb/E2F pathway. *Oncogene* 2002; 21: 3784-3791.
268. Anna Papadopoulou et al. Trangas T., Teixeira M., Heim S., Dimitriadis E.,  
Tsarouha H., Andersen JA., Evangelou E., Ioannidis P., Agnandis N., Pandis N.  
Telomerase activity and genetic alterations in primary breast carcinomas.  
*Neoplasia* 2003;5:170-8.
269. Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D, Hannon GJ Myc activates telomerase.  
*Genes Devel.* 1998; 12: 1769-1744.



270. Hamad NM, Banik SSR, Counter CM Mutational analysis defines a minimum level of telomerase activity required for tumorigenic growth of human cells. *Oncogene* 2002; 21, 7121-7125.
271. Durtillaux B., Gerbault-Seureau M., and Zafrani B. Characterization of chromosomal anomalies in human breast cancer. A comparison of 30 paradiploid cases with few chromosome changes *Cancer Genet. Cytogenet.* 1990; 49: 203-217.
272. Kokalj-Vokac N., Almeida A., Gerbault-Seureau M., Malfoy B. And Durtillaux B Two-color FISH characterization of i(1q) and der(1;16) in human breast cancer cells *Genes Chromos Cancer* 1993;7:8-14.
273. Micale MA., Visscher DW., Gulino SE., Wolman SR Chromosomal aneuploidy in proliferative breast disease *Hum Pathol* 1994;25 :29-35.
274. Pandis N., Heim S., Bardi G., Idvall I., Mandahl N., and Mittelman F. Whole-arm t(1;16) and i(1q) as sole anomalies identify gain of 1q as a primary chromosomal abnormality in breast cancer. *Genes Chromos Cancer* 1992;5:235-238.
275. Chen LC., Dolbaum C., and Smith H., Loss of heterozygosity on chromosome 1q in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sc USA* 1989; 86:7204-7207.
276. Borg A., Zhang QX., Olsson H., and Wenggren E. Chromosome 1 alterations in breast cancer : allelic loss on 1p and 1q is related to lymphogenic metastases and poor prognosis. *Genes Chromos Cancer* 1992;5: 311-320.
277. Devilee P., van Vliet M., Bardoel A., Kievits T., Kuipers-Dijkshoorn N., Pearson PL., and Cornelisse CJ. Frequent somatic imbalance of marker alleles for chromosome 1 in human primary breast carcinoma *Cancer Res* 1991;51:1020-1025.
278. Muleris M., Almeida A., Gerbault-Seureau M., Malfoy B., And Durtillaux B. Detection of DNA amplification in 17 primary breast carcinomas with homogeneously staining regions by a modified genomic hybridization technique. *Genes Chromosome and Cancer* 1994;10: 160-170.
279. Nass S.J., and Dickson RB., Defining a role for c-Myc in breast tumorigenesis. *Breast Cancer Res Treat* 1997;44: 1-22.



280. Escot C., Theillet C., Lidereau R., Spyrtos F., Champeme MH., Gest J., and Callahan R., Genetic alteration of the c-myc proto-oncogene (MYC) in human primary breast carcinomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986; 83:4834-4838.
281. Varley JM., Wainwright AM., and Brammar WJ., An unusual alteration in c-myc in tissue from a primary breast carcinomas. Oncogene 1987; 1: 431-438.
282. Visscher D., Wallis T., Awussah S., Mohamed A., and Crissman J., Evaluation of myc and chromosome 8 copy number in breast carcinoma by interphase cytogenetics. Genes Chrom Cancer 1997;18: 1-7.
283. Solomon E. and Ledbetter DH. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 17. Cytogenet Cell Genet. 1990;55:198-215.
284. Cornelis RS., Devilee P., van Vliet M., Kuipers-Dijkshoorn N., Kersenmaeker A., Bardoel A., Khan PM., and Cornelisse CJ Allele loss patterns on chromosome 17q in 109 breast carcinomas indicate at least two distinct target regions. Oncogene 1993;8:781-785.
285. Cropp CS., Champeme MH., Lidereau R. and Callahan R., Identification of three regions on chromosome 17q in primary breast carcinomas which are frequently deleted. Cancer Res 1993;53: 5617-5619.
286. Kirchweger R., Zeillinger R., Schneeberger C., Speiser P., Louason G., and Theillet C. Patterns of allele loss suggest the existence of five distinct regions of LOH on chromosome 17 in breast cancer. Int J Cancer 1994; 56: 193-199.
287. Ichikawa H., Shimizu K., Hayashi Y., and Ohki M. An RNA-binding protein gene, TLS/FUS, is fused to ERG in human myeloid leukemia with t(16;21) chromosomal translocation. Cancer Res., 1994 ;54: 2865-2868.
288. Panagopoulos I., Aman P., Fioretos T., Hoglund M., Johansson B., Mandahl N., Heim S., Behrendtz M., and Mittelman F. Fusion of the FUS gene with ERG in acute myeloid leukemia with t(16;21)(p11;q22). Genes Chromosome Cancer 1994; 11:256-262.
289. Prasad D., Ouchida M., Lee L., Rao V., and Reddy E. TLS/FUS fusion domain of TLS/FUS-erg chimeric protein resulting from the t(16;21) chromosomal translocation in human myeloid leukemia functions as a transcriptional activation domain. Oncogene 1994; 9:3717-3729.

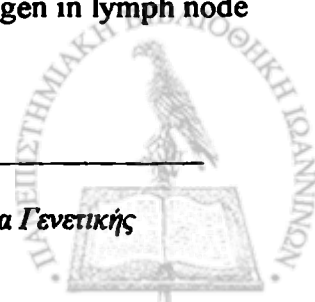




290. Rabbitts T., Forster A., Larson R., and Nahan P. Fusion of the dominant negative transcription regulator CHOP with a novel gene FUS by translocation t(12;16) in malignant liposarcoma. *Nat gent* 1993; 4: 175-180.
291. Adelaide J., Chaffanet M., Imbert A., Allione F., Geneix J., Popovici C., van Alewijk D., Trapman J., Zeillinger R., Borresen-Dale A.L., Lidereaux R., Birnbaum D., Pebusque M.J. Chromosome region 8p11p21: refined mapping and molecular alterations in breast cancer. *Genes Chromosome Cancer* 1998; 3: 186-99.
292. Weissenbach J., Human Genome Database, Johns Hopkins University Medical School.
293. Savelieva E. Belair C.D. Newton M.A., DeVries S., Gray J.W., Waldan F., Reznikoff C.A. 20q gain associates with immortalization: 20q13.2 amplification correlates with genome instability in human papillomavirus 16E7 transformed human uroepithelial cell lines. *Oncogene* 1997; 14:551-60.
294. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991; 64:235-248.
295. Trent J., Yang J.M., Emerson J., Dalton W., Megee D., Massey K., Thompson F., and Villar H., Clonal chromosome abnormalities in human breast carcinomas II. Thirty four cases with metastatic disease. *Genes Chromos Cancer* 1993; 7:194-203.
296. Knudson A.G. Antioncogenes and human cancer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1993; 90: 10914-10921.
297. Moinfar F., Man YG., Arnould L., Bratthauer GL., Ratshek M. Tavassoli FA. Concurrent and independent genetic alterations in the stromal and epithelial cells of mammary carcinoma: implications for tumorigenesis. *Cancer Res* 2000; 60:2562-2566.
298. Pandis N., Jin Y., Limon J., Bardi G., Idvall I., Mandhall N., Mittelman F., Heim S. Interstitial deletion of the short arm of chromosome 3 as a primary chromosome abnormality in carcinomas of the breast. *Genes Chromosome and cancer* 1993B; 6:151-155.



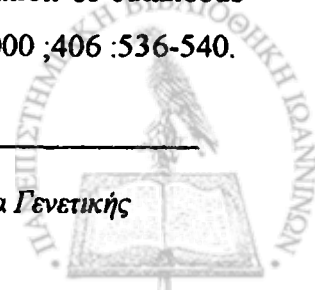
299. Buchhagen D. L., Qiu L., and Etkind P. Homozygous deletion, rearrangement and hypermethylation implicate chromosome region 3p14.3-3p21.3 in sporadic breast cancer development. *Int. J. Cancer* 1994; 57:473-479.
300. Chen L.C., Matsumura K., Deng G., Kurisu W., Ljung B.M., Lerman M.L., Waldman F.M. and Smith H.S. Deletion of two separate regions on chromosome 3p in breast cancers. *Cancer Res.* 1994; 54: 3021-3024.
301. Cohen A., Li J., Berg S., Marchetto D.J., Tsai S., Jacobs S.C., and Brown R.S. Hereditary renal-cell carcinoma associated with a chromosomal translocation N. *Engl. J. Med.* 1976; 301:592-595.
302. Glover T.W., Berger C., Coyle J., and Echo B., DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes. *Hum. Genet.* 1984; 67: 136-142.
303. Barnes L/D/, Garrison P.N., Siprashvill Z., Guranowski A., Robinson A.K., Ingram S.W., Croce C.M., Ohta M., and Huebner K. Fhit a putative tumor suppressor in human is a dinucleoside 5',5'''-P<sup>1</sup>,P<sup>2</sup>-triphosphate hydrolase. *Biochemistry.* 1996; 36:11529-11535.
304. Petersson C. Pandis N., Mertens E., Adeyinka A., Ingvar C., Ringberg A., Idvall I., Bondeson L., Borg A., Olsson H., Kristofferson U and Mittelman F. Chromosome aberrations in prophylactic mastectomies from women belonging to breast cancer families. *Genes Chromosome Cancer* 1996; 16:185-188.
305. Panagopoulos, I, Pandis N., Thelin S., Petersson C., Mertens F., Borg A., Kristoffersson U., Mitelman and Aman P. The *FHIT* and *PTPRG* genes are deleted in benign proliferative breast disease associates with familial breast cancer and cytogenetic rearrangements of chromosome band 3p14. *Cancer Res* 1996; 56: 4871-4875.
306. Loveday R, Greenman J, Drew P, Monson J, and Kerin M. Genetic changes associated with telomerase activity in breast cancer. *Int J Cancer Pred. Oncol.* 1999; 84: 516-520.
307. Bianchi S., Panglierani M., Zampi G., Cardona G., Cataliotti L., Bonardi R., Zappa M. Prognostic value of proliferating cells nuclear antigen in lymph node negative breast cancer patients. *Cancer.* 1993; 72:120-125.



308. Schonborn I, Zochiesche W., Minguillon C., Spizer E., Mohner M., Ebelin K., Grosse R. Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen and c-erbB2 compared with conventional histopathological factor in breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1995;121 :115-122.
309. Gullic W.J., Love S.B., Wright C., Barne D.M., Gusterson B.A., Harris A.L. and Altman D.G. c-erbB2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. *Br. J. Cancer* 1991; 63:434-438.
310. Vogel C.L., Colbeight M.A., Tripathy D. et al. Efficacy and safety of Herceptin as a single agent in 1<sup>st</sup> line treatment in Her-2 overexpressing metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1998; 50:2329.
311. Bell R. Ongoing trials with Herceptin in metastatic breast cancer. Her-2 state-of the Art Conference Montreux 21-23/11/1999.
312. Jonsson ZO and H.U. Proliferating cell nuclear antigen more than a clamp for DNA polymerases. *Bioessays.* 1997; 19: 967-75.
313. Nagy P., Jenei A., Damjanovič S., Jovim T.M., Szolosi J. Complexity of signal transduction mediated by c-erbB2: clues to the potential of receptor-targeted cancer therapy. *Pathol.Oncol Res* 1999; 5:255-271.
314. Carter W.B., Hoying J.B., Boswell C., Williams S.K. Her2/neu overexpression induces endothelial cell retraction 2001;91 :295-299.
315. Goussia A., Agnantis NJ., Athanassiadou S et al. Prognostic significance of c-erbB2 and hormone receptors status in human benign and malignant breast lesions. *Anticancer Re* 1995; 15: 2313-18.
316. Kurose K., Hoshaw-Woodard S., Adeyinka A., Lemeshow S., Watson P.H. and Eng C. Genetic model of multi step breast carcinogenesis involving the epithelium and stroma: clues to tumour-microenvironment interactions 2001; 10: 1907-1913.
317. Feichter, GE., Kaufmann M., Muller A., Haag D., Eckhardt R., Goerttler K DNA index and cell cycle analysis of primary breast cancer and synchronous axillary lymph node metastases. *Breast Cancer Res Treat* 1989; 13:17-22.



318. Daidone MG., Silvestrini R., Valentinis B., Persici P., Mezzanotte G., Squicciarini P., Orefice S., Salvadori B. Proliferative activity of primary breast cancer and of synchronous lymph node metastases evaluated by 3[H]-thymidine labeling index Cell tissue kinet, 1990; 23: 401-408.
319. Goodson W., Ljung BM., Moore D., Mayall B., Waldman FM., Chew K., Benz CC., Smith HS. Tumor labeling indices of primary breast cancers and their regional lymph node metastases. Cancer 1993; 3914-3919.
320. Moffet BF., Baban D., Bao L., Tarrin D. Fate of clonal lineages during neoplasia and metastasis studied with incorporated genetic marker. Cancer Res.1992; 52: 1737-1743.
321. Tommasi S., Giannella C., Paradiso A., Barletta A., Mangia A., Simone G., Primavera AT., Albarani V., Schittulli F., Longo S. et al., HER-2/neu in primary and local metastatic axillary lymph nodes in human breast tumors. Int J. Biol Markers 1992 ; 7 :107-113.
322. Mori T., Morimoto T., Komaki K., Monden Y. Comparison of estrogen receptor and epidermal growth factor receptor content of primary and involved in human breast cancer. Cancer 1991; 68:532-537.
323. Weiner TM., Liu ET., Craven RJ., Cance WG. Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. Lancet 1993 ; 342 :1024-1025.
324. Behrens J The role of cell adhesion molecules in cancer invasion and metastasis. Breast Cancer Res Treat. 1993; 24:175-184.
325. Okamoto A. Hussain SP., Hagiwara K., Spilare EA., Rusin MR., Demetrick DJ., Serrano M., Hannon GJ., Shiseki M., Zariwala M., Xiong Y., Beach DH., Yokota J., Harris C. Mutations in the p16INK4/MTS1/CDKN2, p15INK4B/MTS2 and p18 genes in primary and metastatic lung cancer. Cancer Res 1995; 55:1448-1451.
326. Peddruth U.R., Alok D., and Rao VM. Binding of factor VIIa to tissue factor induces alterations in gene expression in human fibroblast cells: Up-regulation of poly(A)polymerase Proc Natl Acad Sci. USA, 1997; 94:12598-12603.
327. Bittner M., Meltzer P., Chen Y., et al., Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. Nature 2000 ;406 :536-540.



328. Ramaswamy S., Ross KN., Lander E., Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors Nature 2003; 33: 1-6.
329. Ridley AJ. In GTPases: frontiers in molecular Biology (ed. Hall A.) Oxford Univ. Press) 2000 89-136.
330. Itoh K. Yoshioka K., Akedo H., Uehata M., Ishizaki T., Narumiya S. An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. Nature Med 1999 ; 5 :221-225.
331. Fritz G., Brchetti C., Bahlmann F., Schmidt M., Kaina B. Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. Br J Cancer 2002; 87: 635-44.



**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι**

**ΠΙΝΑΚΕΣ**



**ΠΙΝΑΚΑΣ I . ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΑ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ 147 ΟΓΚΩΝ ΜΑΣΤΟΥ**

| <b>Παράμετρος</b>                            | <b>Αριθμός δειγμάτων</b> | <b>Ποσοστό Συχνότητα %</b> |
|--|--------------------------|----------------------------|
| <b>Ηλικία</b>                                |                          |                            |
| <45  | 14                       | 9,8                        |
| 45-60  | 53                       | 37,1                       |
| >60  | 76                       | 53,1                       |
| <b>Βαθμός ιστολογικής κακοήθειας (Grade)</b> |                          |                            |
| I  | 22                       | 20,4                       |
| II   | 45                       | 41,7                       |
| III  | 41                       | 37,9                       |
| <b>Διηθημένοι λεμφαδένες (LMN)</b>           |                          |                            |
| Θετικοί                                      | 51                       | 42,5                       |
| Αρνητικοί                                    | 69                       | 57,5                       |
| <b>Υποδοχείς οιστρογόνων</b>                 |                          |                            |
| Θετικοί                                      | 36                       | 48,6                       |
| Αρνητικοί                                    | 38                       | 51,4                       |
| <b>Υποδοχείς προγεστερόνης</b>               |                          |                            |
| Θετικοί                                      | 25                       | 33,8                       |
| Αρνητικοί                                    | 49                       | 66,2                       |
| <b>Ιστολογικός τύπος</b>                     |                          |                            |
| DCIS   | 6                        | 4,1                        |
| Φαγεσωρικά                                   | 25                       | 17,0                       |
| Θηλλώδη                                      | 4                        | 2,7                        |
| Ηθμοειδή                                     | 3                        | 2,1                        |
| Πορ. διηθητικά μη ειδικού τύπου              | 60                       | 41,5                       |
| Πορ. διηθητικά σωληνώδη                      | 6                        | 4,1                        |
| Πορ. διηθητικά - DCIS                        | 11                       | 7,5                        |
| Βλενώδη                                      | 4                        | 2,7                        |
| Μυελογενές                                   | 1                        | 0,7                        |
| Λοβιακά                                      | 10                       | 6,8                        |
| Λοβιακά - LCIS                               | 4                        | 2,7                        |
| Λοβιακά - DCIS                               | 1                        | 0,7                        |
| Μικτά πορογενή - λοβιακά                     | 6                        | 4,1                        |
| Νευροενδοκρινικά                             | 2                        | 1,4                        |

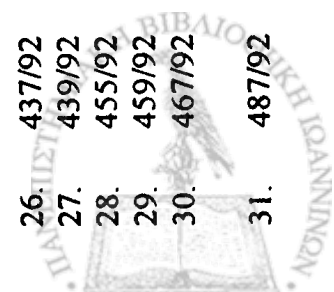


**ΠΙΝΑΚΑΣ 2Α. ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ CGH SE**  
**82 ΟΓΚΟΥΣ ΜΑΣΤΟΥ.**

| Κωδικός<br>δέρματος | Ιστοπαθολογικός<br>τύπος | Grade*<br>LMN" | Σύνολο<br>Γενετικών<br>Ανομαλιών | Γενετικές ανακατατάξεις |   |
|---------------------|--------------------------|----------------|----------------------------------|-------------------------|---|
|                     |                          |                |                                  | Αριθμός                 | Ανομαλίες   |
| 1. 183/92           | Πορογενές                | 1,1,2          | 0                                | 6                       | Rev ish enh(8q21q22, 14q11q21, 19p13 1), dim (2q32q33, 9p23pter, 18q23)   |
| 2. 194/92           | Πορογενές                | 3,1,2          | 0                                | 1                       | Rev ish enh (1q32qter)  |
| 3. 197/92           | Πορογενές                | --             | --                               | 2                       | Rev ish enh (1q23qter, 8p12qter, 9p13pter), dim (8p22pter, 9q22qter, 16q)   |
| 4. 198/92           | Πορογενές                | --             | --                               | 6                       | Rev ish enh (1q25q31, 1q41)   |
| 5. 305/92           | Πορογενές                | 2,1,2          | 0                                | 1                       | Rev ish enh (1q)  |
| 6. 307/92           | Πορογενές + DCIS         | 2,1,2          | 0                                | 11                      | Rev ish enh (1p31, 1q23q42, 8p12qter), dim (1p36, 8p21pter, 11q23qter, 13q, 16q, 17p13, 17q24qter, 18q22qter)   |
| 7. 308/92           | Λοβιακό + LCIS           | --             | 0*                               | 3                       | Rev ish enh (8p11p21), dim (16q21), amp (8p12)  |
| 8. 317/92           | Φαγεσωρικό               | 3,3,2          | 0                                | 6                       | Rev ish enh(1q21q22,3q24q28,6p,6q21q2,8q, 16q23qter)  |
| 9. 326/92           | Φαγεσωρικό (A)           | --             | --                               | 5                       | Rev ish enh (1p22pter, 1q23q24, 2p22q12, 3q11q13, 3q22qter, 8q13qter, 9pterq32, 18p11q11, 20p12p13), dim (Xp11pter, 4p16, 6p25, 10p15, 10q24qter, 11q13qter, 16q22qter) |
| 10. 326/92          | DCIS (B)                 | --             | --                               | 16                      | Rev ish enh (3q25q29, 8q21qter, 20p12p13), dim (10p15, 11q24qter)   |
| 11. 363/92          | Πορογενές                | 3,2,2          | 0                                | 4                       | Rev ish dim(1p13p31,4,9p13pter,13q14qter)   |
| 12. 368/92          | Πορογενές                | 2,1,2          | 0                                | 4                       | Rev ish enh (1p34pter, 8p23, 15q14qter, 16q22qter, 22q13)   |
| 13. 374/92          | Λοβιακό                  | --             | 0                                | 10                      | Rev ish enh (1q22qter, 4q28q32, 7, 8, 11p13pter), dim (6q21qter, 11q23qter, 13q12qter, 16q, 17p12pter)  |
| 14. 375/92          | Λοβιακό (A)              | --             | --                               | 2                       | Rev ish enh (8p12qter), dim (11q23qter)   |



|     |        |                  |       |       |    |  |
|-----|--------|------------------|-------|-------|----|--|
| 15. | 376/92 | Λοβιακό (B)      | --    | --    | 7  | Rev ish enh (1q, 7, 8), dim (5q43qter, 15q, 16q), amp(1q23qter)  |
| 16. | 382/92 | Πορογενές + DCIS | 2,1,2 | 1/17  | 5  | Rev ish enh (1q, 5p15q34, 7), dim (16q, 18q23)   |
| 17. | 383/92 | Πορογενές + DCIS | 2,1,2 | 5/13  | 5  | Rev ish enh (1q23q41), dim (6q24qter, 11q22qter, 16q, 22q12qter)   |
| 18. | 386/92 | Πορογενές        | --    | 0     | 13 | Rev ish enh(4q22qter, 8p12qter, 17q12q21, 20q12qter), dim(3p12p14, 5q15q33, 6q13q25, 7q31qter, 9p21pter, 9q21, 13q14qter, 16q), amp(8q)  |
| 19. | 394/92 | Πορογενές        | 2,2,2 | 18/18 | 13 | Rev ish enh(3q21q24, 3q27qter, 5pterq13, 5q34qter, 7q33qter, 8p21qter, 16p, 17q24qter), dim(Xpterq22, 11q23qter, 13q14qter, 16q, 22q13)  |
| 20. | 395/92 | Λοβιακό + IDC    | --    | 0     | 5  | Rev ish enh (8p12qter, 16p), dim (8p23, 16q12q21, 16q23q24)  |
| 21. | 418/92 | Πορογενές + IDC  | 3,1,2 | 0     | 5  | Rev ish enh (1q31q42, 17p11q21), dim (2q32, 5q14q23, 13q14q22)   |
| 22. | 419/92 | Φαγεσωρικό       | 3,3,3 | 6/14  | 6  | Rev ish enh (5p15q34, 8q21), dim (8p22pter, 8q24, 11q22qter, 16q)  |
| 23. | 423/92 | Φαγεσωρικό       | 3,2,2 | 0     | 9  | Rev ish enh (1q, 7, 14q11q32, 16p, 18p11q21), dim (1p22pter, 9, 13q, 16q)  |
| 24. | 431/92 | Φαγεσωρικό       | 3,3,3 | 0     | 23 | Rev ish enh(3p21p24, 3q, 4p16, 8p11qter, 11p14q14, 14q, 16p11p13, 16q23qter, 17q21qter, 19q, 20q, 22q11q12), dim(1p31, 4q23qter, 5q11q22, 6q16qter, 8p22pter, 9pterq33, 11q23qter, 20p12pter, 21q21), amp(8q24, 11q13) |
| 25. | 435/92 | Φαγεσωρικό       | 3,3,3 | 1/17  | 7  | Rev ish enh (2q31q33, 8q21q24, 10p14pter, 10p12q23), dim (8p23, 9p23pter), amp(10q21q22)   |
| 26. | 437/92 | Ενδοπορογενές    | 3,3,3 | 0     | 2  | Rev ish enh (8q, 11q21q23)   |
| 27. | 439/92 | Φαγεσωρικό       | 3,1,3 | 9/11  | 1  | Rev ish enh(10q21q22)  |
| 28. | 455/92 | Ενδοπορογενές    | 3,1,2 | 0     | 1  | Rev ish enh(8q21qter)  |
| 29. | 459/92 | Λοβιακό          | --    | 1/2   | 1  | Rev ish enh (1q32q41)  |
| 30. | 467/92 | Πορογενές        | 3,1,2 | 0     | 5  | Rev ish enh (16p11pter), dim (8p22pter, 8q24qter, 11q14qter, 16q23qter)  |
| 31. | 487/92 | Πορογενές        | 3,2,2 | 6/11  | 2  | Rev ish enh (17q21q23), dim (11q25)  |



|     |        |                  |       |       |    |   |
|-----|--------|------------------|-------|-------|----|---|
| 32. | 501/92 | Ηθμοειδές        | 2,1,2 | 0     | 3  | Rev ish enh(1q21q41),dim(6q16q22),amp(1q32)   |
| 33. | 503/92 | Πορογενές        | 3,1,3 | 4/20  | 6  | Rev ish enh(1q21qter,8q,10q21q22),<br>dim(8p22pter,10q25qter,16q)   |
| 34. | 509/92 | Πορογενές        | 3,2,3 | 0     | 6  | Rev ish enh(8p12qter,16p,19p,20q13),<br>dim(6q12q21,13q21q22)   |
| 35. | 512/92 | Πορογενές        | 3,3,3 | 19/19 | 22 | Rev ish enh(1q21q32,7p,8q,15q,<br>17q11q21,17q25,19,20q13,22q11q12),<br>dim(1p21pter,1q42qter,3p21pter,4q24q28,<br>4q34qter,7q21q31,8p12pter,10q24qter,11q22qter,<br>13q,18q12qter),amp(1q25q31,17q11q21) |
| 36. | 513/92 | Πορογενές        | 2,2,2 | 0     | 8  | Rev ish enh (1q, 5, 9q22qter, 16p), dim (6q12q21, 16q, 18p,<br>18q23)   |
| 37. | 515/92 | Θηλώδες          | --    | 1/8   | 21 | Rev ish enh(1q,4p16,4p14q24,8p12qter,12q24,<br>16p,17q,19,20q),dim(3p12p13,6p24pter,6q,<br>8p22pter,10q,11q14qter,13q,14q,16q,20p12pter),<br>amp(8q21qter,20q12qter)                                      |
| 38. | 526/92 | Πορογενές        | 3,1,2 | 0     | 0  |   |
| 39. | 529/92 | Πορογενές        | 1,1,2 | 2/14  | 3  | Rev ish enh (1q, 16p), dim (7q32qter)   |
| 40. | 25/93  | Πορογενές        | 3,1,2 | 0     | 4  | Rev ish enh (20q), dim (1q31q32, 16q21qter), amp(20q12qter)   |
| 41. | 26/93  | Πορογενές        | 3,2,2 | 0     | 6  | Rev ish enh (1q25, 1q32, 8q21qter, 20p11qter), dim<br>11q23qter, 21q22)   |
| 42. | 46/93  | Ηθμοειδές        | 2,1,2 | 0     | 2  | Rev ish enh(1q,16p)   |
| 43. | 50/93  | Πορογενές + DCIS | 3,2,2 | 0     | 7  | Rev ish enh (X, 1q21qter, 7pterq33, 14q11qter, 16p, 20), dim<br>(10q)   |
| 44. | 51/93  | Λοβιακό + LCIS   | --    | --    | 4  | Rev ish enh (8p11q24.1), dim(6q26qter, 16q24, 18q22qter)  |
| 45. | 59/93  | Φαγεσωρικό       | 2,2,3 | 7/15  | 3  | Rev ish enh (11q13q14, 16p12pter, 17q11q21)   |



|    |                  |       |      |    |   |
|----|------------------|-------|------|----|---|
| 3  | Φαγεσωρικό       | 3,3,3 | 0    | 31 | Rev ish enh(1p36qter,2p11p13,3p21pter,3p14qter,5q32qter,6pterq22,7,8p12qter,9p21pter,10p14p15,11p15q12,12p13,12q14q21,16p12,17p13,18pterq21,18q22qter,19p13q13.1,21q21,22q11q12),dim(X,2p21pter,2q21q32,2q35qter,4p15qter,5p14q23,6q24qter,8p23pter,13q,14q21q22),amp(6p23pter) |
| 3  | Πορογενές + DCIS | 3,1,2 | 0    | 1  | Rev ish enh(12q23qter)  |
| 3  | Βλενώδες         | --    | 0    | 5  | Rev ish enh (16p), dim (6q21qter, 9p21pter, 11q21qter,  |
| 93 | Φαγεσωρικό       | 3,3,3 | 0    | 18 | Rev ish enh(Xq26qter,1q31q32,3p24pter,8p12qter,12q14q22,17q21q25,20q11q13),dim(Xp21pter,2p24pter,3p13p21,4q33qter,11p15,11q21qter,13q12q21,14q,16q,20p12pter,21q21-   |
| 93 | Πορογενές        | 2,1,1 | 0    | 4  | Rev ish enh(1q21q42,16p),dim(12p,13q21q31)  |
| 93 | Φαγεσωρικό       | 3,1,2 | 4/5  | 2  | Rev ish enh (8q21qter, 17p11p13)  |
| 93 | Πορογενές        | 3,1,2 | 0    | 6  | Rev ish enh(1q22qter,6p24,9p13),dim(11q21qter,13q13qter,16q,21q)  |
| 93 | Πορογενές        | 3,2,3 | 0    | 0  | 0   |
| 93 | Πορογενές        | 2,2,3 | 5/5  | 9  | Rev ish enh(3q25qter,6p21,8q21q22,8q24,11p11p14,12p13,17q24qter,18p,22q13)  |
| 93 | Λοβιακό          | --    | 0    | 9  | Rev ish enh (8p11p21, 11p12q22, 16p11p13, 19p, 20p1 dim (11q24qter, 13q12qter), amp(8p11p21, 11q12q21)  |
| 93 | Φαγεσωρικό       | 3,3,3 | 0    | 5  | Rev ish enh (1q23q32, 8p12q24, 17q21q25), dim (13q3   |
| 93 | Μυελλογενές      | --    | 0    | 2  | Rev ish enh (3q23q26, 8q21qter)   |
| 93 | Φαγεσωρικό       | 3,2,3 | 9/14 | 3  | Rev ish enh(8q21qter),dim(11p13pter,17p13)  |
| 93 | Φαγεσωρικό       | --    | 0    | 14 | Rev ish enh(1q24q31,7p,13q,14q12q21),dim(3p13p22,6p22pter,8p12pter,10q25qter,11p15,11q,14q24qter,15q21qter,17p12pter,18p11.3)   |
| 93 | Φαγεσωρικό       | 3,3,3 | 0    | 25 | Rev ish enh(Xp22,1q32,2q32q33,4q12q31,6q22q24,7p14pter,8q,10p,11p14p15,12q13q22,20q12qter),dim(3p14p21,7q32qter,9p23pter,10q21qter,11q23qter,13q,14q,15q26,17p12pter,18p11.3,19q13),amp(7p21p22,8q23,10p12p14)  |



|     |        |                      |       |      |    |   |
|-----|--------|----------------------|-------|------|----|---|
| 61. | 236/93 | Μικτό                | 1,1,1 | 4/14 | 3  | Rev ish enh(16p13),dim(16q,22q13)   |
| 62. | 244/93 | Βλεννώδες            | -     | 0    | 0  | 0   |
| 63. | 248/93 | Φαγεσωρικό           | 3,3,2 | 0    | 32 | Rev ish enh(1p31p34,1p13p21,1q21q31,2p24pter,2p12p13,2q22q32,3q13qter,5p13p15,6p21qter,7p15qter,8q21qter,10p,10q11q21,11q13q22,12p,13q12q31,16p13,20q),dim(Xp11pter,1p36,3p24pter,4p11p15,4q21qter,5q11q34,8p21pter,10q23q25,11p11pter,15q22qter,18q22qter),amp(7p11p14,7q11q21,8q24) |
| 64. | 281/93 | Φαγεσωρικό - DCIS    | 3,2,3 | 0    | 7  | Rev ish enh (1q23q32, 5p14p15, 6q22, 8q21q24.1, 20q11qter), dim (8p23, 18q23)   |
| 65. | 327/93 | Πορογενές            | 2,2,2 | 7    | 2  | Rev ish enh (1q23q42), dim (16q)  |
| 66. | 335/93 | Πορογενές            | 3,3,2 | 7/18 | 8  | Rev ish enh(1p21qter,5p12p15,7pterq21,8q21qter,12,13q,17q,20)   |
| 67. | 361/93 | Φαγεσωρικό           | 3,2,2 | 4/24 | 16 | Rev ish enh(Xq27qter,1q31q32,2q23q32,4q32q34,6q21q22,6q23q24,8q11q24.1,11q13q14,12q14q22,14q12q22,20q11q13),dim(6p21.3,9p12,17p11pter,17q25,19p13)  |
| 68. | 392/93 | Φαγεσωρικό           | 3,1,2 | 0    | 11 | Rev ish enh(1q24q41,3p24pter,5p13q34,6q16q22,8p11q24.1,9q13q21,9q31q34,18q12q21),dim(2q36qter,13q,17p)  |
| 69. | 397/93 | Νευροενδοκρινικό (A) | --    | 0    | 3  | Rev ish enh (4p15, 9p23, 9p24)  |
| 70. | 397/93 | Νευροενδοκρινικό (B) | --    | 0    | 22 | Rev ish enh (2q1, 2p16, 4p15, 6p22, 9q12q21, 9q22, 9q23, 12q22)   |
| 71. | 401/93 | Φαγεσωρικό           | 3,1,3 | 9    | 9  | Rev ish enh (1q23q42, 19q13.1), dim 11q23qter, 12q24, 13q33qter, 16q, 17, 18p11, 20p13)   |
| 72. | 467/93 | Πορογενές            | 3,1,2 | 0    | 5  | Rev ish enh(1q,11p14p15,11q12q14), dim(11q22qter,16q)   |
| 73. | 495/93 | Πορογενές            | --    | 0    | 2  | Rev ish enh(1q23q32,1q43qter)   |
| 74. | 507/93 | Πορογενές            | 2,3,3 | 0    | 16 | Rev ish enh(1q24qter,3p24pter,3q25qter,6q15q22,7q31q32,8q22qter,9q31q33,10p13pter,11p11p15,17q23,18q12),dim(1p36,5q34qter,10q25qter,16pterq21,17p12pter)  |

|     |        |           |       |   |    |  |
|-----|--------|-----------|-------|---|----|--|
| 75. | 535/93 | Λοβιακό   | --    | 0 | 3  | Rev ish enh(1q31,5q23q31,12q15q21)   |
| 76. | 557/93 | Πορογενές | 3,3,3 | 0 | 16 | Rev ish enh(Xq25q27,1q31q32,2p24pter,4q13q21,5p,6q15q16,6q22,8q22qter,9p13pter,10p13pter,10q22,12p11p12,20q11qter),dim(8p21pter,14q24qter,15q26)   |
| 77. | 566/93 | Πορογενές | 2,2,1 | 0 | 15 | Rev ish enh(1p13p31,1q23q32,3p22p24,3p12p14,3q24q26,4q12q33,5p13,8p12qter,12p11p12,12q21,16p11pter),dim(6p21pter,16q22qter,17p11p12),amp(8q)   |
| 78. | 574/93 | Πορογενές | 2,1,2 | 0 | 5  | Rev ish enh(1q24q32),dim(6p12p21.1,6q23qter,16q,17pterq21)   |
| 79. | 2/94   | Πορογενές | 3,2,3 | 0 | 17 | rev ish enh(1q,5p,7p21p22,10q21q23,15q21qter,16p13,17q21qter),dim(8p,10q25qter,11q22qter,13q,16q22qter,17p12pter,18,22q),amp(1q32qter,17q22q24)  |
| 80. | 7/94   | Θηλώδες   | --    | 0 | 28 | Rev ish enh(1p32qter,2p16pter,3q,5p,6p22q16,6q22q25,7p14pter,7q21,8q13qter,10p,11pterq14,12q22,13q13q32,18),dim(1p34pter,2q11q35,3p12pter,5q13q14,7q31qter,10q21q22,11q23qter,12q14q15,14q,15q11q25,17pterq12,17q24qter,20q),amp(7p21) |
| 81. | K001   | Πορογενές | 2     | 3 | 0  |  |
| 82. | K002   | Πορογενές | 1     | 2 | 0  |  |

\*: ο βαθμός ιστολογικής κακοήθειας αναλύεται στους παράγοντες που τον χαρακτηρίζουν (σχηματισμός σκληνίσκων, μιτωτικός δείκτης και πυρηνικός πλειομορφισμός)

": αριθμός διηθημένων λεμφαδένων

\*: αναφέρεται διήθηση στους λεμφαδένες χωρίς να είναι γνωστός ο αριθμός αυτών (Θ=θετικός)



**ΠΙΝΑΚΑΣ 2B. ΕΥΡΟΣ ΤΙΜΩΝ ΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΠΟΥ ΕΞΕΤΑΣΤΗΚΑΝ ΣΕ 147 ΟΓΚΟΥΣ ΜΑΣΤΟΥ**

|  | <i>Βιολογικές παράμετροι που εξετάστηκαν</i> |              |                                |                   |
|--|--|--------------|--------------------------------|-------------------|
|  | <i>PCNA</i>                                  | <i>ErbB2</i> | <i>Πολυ(A)-<br/>πολυμεράση</i> | <i>τέλομεράση</i> |
| <i>Αριθμός δειγμάτων που εξετάστηκαν</i> | 138  | 35           | 143                            | 146               |
| <i>Μέσοι όροι τιμών ± SD</i>             | 3,25 ± 2,4                                   | 9,3 ± 4,15   | 19,5 ± 14,9                    | 1092,4 ± 1021,1   |
| <i>Ελάχιστη τιμή</i>                     | 0,1  | 0,8          | 0                              | 0                 |
| <i>Μέγιστη τιμή</i>                      | 13,4   | 13           | 122,8                          | 4248,0            |



**ΠΙΝΑΚΑΣ 3 . ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΟΛΥΠΛΟΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ (ΜΕΣΟΙ ΟΡΟΙ ΤΙΜΩΝ)**

| <b>Παράμετρος</b>              | <b>Αριθμός δερμάτων</b> | <b>Μέση τιμή γενετικής πολυπλοκότητας</b> | <b>P*</b> |
|--------------------------------|-------------------------|---|-----------|
| <b>Ηλικία</b>                  |                         |   |           |
| <60                            | 39                      | 8,9                                       | 0,072     |
| >60                            | 43                      | 6,72                                      |           |
| <b>Grade</b>                   |                         |   |           |
| I                              | 12                      | 5,08                                      |           |
| II                             | 27                      | 5,41                                      | 0,002     |
| III                            | 19                      | 13,41                                     |           |
| <b>Λεμφαδένες</b>              |                         |   |           |
| Θετικοί                        | 26                      | 6,77                                      | 0,142     |
| Αρνητικοί                      | 47                      | 8,74                                      |           |
| <b>Υποδοχείς οιστρογόνων</b>   |                         |   |           |
| Θετικοί                        | 28                      | 6,54                                      | 0,013     |
| Αρνητικοί                      | 21                      | 10,24                                     |           |
| <b>Υποδοχείς προγεστερόνης</b> |                         |   |           |
| Θετικοί                        | 22                      | 7,41                                      | 0,184     |
| Αρνητικοί                      | 27                      | 8,7                                       |           |

\* : υπολογίστηκε με στατιστική ανάλυση μέσου όρου τιμών (t-test)



**ΠΙΝΑΚΑΣ 4. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΡΙΘΜΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΑΚΑΤΑΤΑΞΕΩΝ ΚΑΤΑ CGH**

| Παράγοντες του βαθμού κακοήθειας   | Αριθμός ανακατατάξεων κατά CGH |    | P <sup>1</sup> |
|------------------------------------|--------------------------------|----|----------------|
|                                    | 0-8                            | >8 |                |
| <b>Σχηματισμός σωληνίσκων</b>      |                                |    |                |
| 1-2                                | 15                             | 5  | 0,561          |
| 3                                  | 24                             | 12 |                |
| <b>Μιτωτικός δείκτης</b>           |                                |    |                |
| 1-2                                | 34                             | 9  | 0,013          |
| 3                                  | 5                              | 8  |                |
| <b>Πυρηνικός πλειομορφισμός</b>    |                                |    |                |
| 1-2                                | 29                             | 7  | 0,016          |
| 3                                  | 9                              | 10 |                |
| <b>Συνολικός βαθμός κακοήθειας</b> |                                |    |                |
| I-II                               | 31                             | 8  | 0,063          |
| III                                | 11                             | 9  |                |

<sup>1</sup>: υπολογίστηκε με μη παραμετρική στατιστική ανάλυση  $\chi^2$

58





**ΠΙΝΑΚΑΣ 5. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΩΜΑΛΙΩΝ**

|                     | <b>ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗ</b>                | <b>Πολυ(A)<br/>ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ</b>    | <b>PCNA</b>                     | <b>C-ERBB2</b>                   |
|---------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Συνολικός πληθυσμός | Coef.=0,201<br>P= 0,072<br>N=81  | Coef.=0,082<br>P= 0,470<br>N=80  | Coef.=0,122<br>P= 0,292<br>N=77 | Coef.=-0,391<br>P= 0,150<br>N=15 |
| <8                  | Coef.=0,295<br>P= 0,027<br>N=56  | Coef.=-0,104<br>P= 0,629<br>N=24 | Coef.=0,206<br>P= 0,144<br>N=52 | Coef.=-0,399<br>P= 0,199<br>N=12 |
| >8                  | Coef.=-0,056<br>P= 0,789<br>N=25 | Coef.=0,113<br>P= 0,409<br>N=56  | Coef.=0,390<br>P= 0,054<br>N=25 | Coef.=0<br>P= 1,000<br>N=3       |

<sup>^</sup>: Spearman correlation

**ΠΙΝΑΚΑΣ 6. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΟΛΥΠΛΟΚΟΤΗΤΑΣ (ΜΕΣΟΙ ΟΡΟΙ ΤΙΜΩΝ)**

| Παράμετρος | Μέσοι όροι τιμών έκφρασης βιολογικών παραγόντων |                            | P <sup>*</sup> |
|------------|---|----------------------------|----------------|
|            | <8 γενετικές ανακατατάξεις                      | >8 γενετικές ανακατατάξεις |                |
| Τελομεράση | 1066,17<br>N=56                                 | 1199,21<br>N=25            | 0,560          |
| PCNA       | 3,67<br>N=52                                    | 3,57<br>N=25               | 0,924          |
| ErbB2      | 10,58<br>N=12                                   | 8,33<br>N=3                | 0,922          |
| Πολυμεράση | 23,67<br>N=56                                   | 15,79<br>N=24              | 0,535          |

<sup>\*</sup>: υπολογίστηκε με στατιστική ανάλυση μέσου όρου τιμών (t-test)



**ΠΙΝΑΚΑΣ 7. ΣΥΧΟΤΗΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΑΚΑΤΑΤΑΞΕΩΝ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΟΛΥΠΛΟΚΟΤΗΤΑ**

| Χρωμοσωμικές θέσεις με μεγαλύτερη συχνότητα γενετικών ανωμαλιών | Αριθμός δειγμάτων που παρουσιάζουν τις συγκεκριμένες γενετικές ανωμαλίες |           | P*     |
|---|--|-----------|--------|
|   | Αντικατάσταση  | Απλοσωμία |        |
| 1q  | 26   | 8         | 0,151  |
| +1q   | 26   | 17        |        |
| 8p  | 46   | 16        | 0,016  |
| -8p   | 6  | 9         |        |
| 8p  | 43   | 14        | 0,011  |
| +8p   | 8  | 11        |        |
| 8q  | 37   | 11        | 0,026  |
| +8q   | 15   | 14        |        |
| 11q   | 43   | 13        | 0,007  |
| -11q  | 9  | 12        |        |
| 13q   | 46   | 11        | <0,001 |
| -13q  | 6  | 14        |        |
| 14q   | 51   | 18        | <0,001 |
| -14q  | 0  | 7         |        |
| 15q   | 49   | 20        | 0,035  |
| -15q  | 2  | 5         |        |
| 16q   | 34   | 13        | 0,321  |
| -16q  | 18   | 12        |        |
| 16p   | 41   | 15        | 0,104  |
| +16p  | 11   | 10        |        |
| 17p   | 49   | 14        | <0,001 |
| -17p  | 2  | 11        |        |
| 17q   | 48   | 15        | <0,001 |
| +17q  | 4  | 10        |        |
| 20q   | 46   | 15        | 0,007  |
| +20q  | 6  | 5         |        |
| 20p   | 51   | 20        | 0,003  |
| -20p  | 0  | 5         |        |

\*: υπολογίστηκε με μη παραμετρική στατιστική ανάλυση  $\chi^2$



**ΠΙΝΑΚΑΣ 8. ΣΥΧΟΤΗΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΑΚΑΤΑΤΑΞΕΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ**

| Χρωμοσωμικές θέσεις με μεγαλύτερη συχνότητα γενετικών ανωμαλιών | Αριθμός δειγμάτων που παρουσιάζουν τις συγκεκριμένες γενετικές ανωμαλίες |            | P <sup>1</sup> |
|---|--|------------|----------------|
|   | Υπερπλοπεία  | Υποπλοπεία |                |
| 1q  | 12   | 13         | 0,573          |
| +1q   | 9  | 14         |                |
| 2q  | 19   | 26         | 0,574          |
| -2q   | 2  | 1          |                |
| 3p  | 18   | 26         | 0,306          |
| +3p   | 3  | 1          |                |
| 3p  | 17   | 26         | 0,153          |
| -3p   | 4  | 1          |                |
| 8p  | 15   | 23         | 0,297          |
| -8p   | 6  | 4          |                |
| 8p  | 18   | 18         | 0,185          |
| +8p   | 3  | 9          |                |
| 8q  | 9  | 19         | 0,079          |
| +8q   | 12   | 8          |                |
| 10p   | 16   | 27         | 0,012          |
| +10p  | 5  | 0          |                |
| 11q   | 16   | 17         | 0,366          |
| -11q  | 5  | 10         |                |
| 13q   | 15   | 19         | 1,000          |
| -13q  | 6  | 8          |                |
| 14q   | 18   | 26         | 0,306          |
| -14q  | 3  | 1          |                |
| 15q   | 18   | 25         | 0,641          |
| -15q  | 3  | 2          |                |
| 16q   | 17   | 16         | 0,129          |
| -16q  | 4  | 11         |                |
| 16p   | 15   | 17         | 0,758          |
| +16p  | 6  | 10         |                |
| 17p   | 16   | 24         | 0,272          |
| -17p  | 5  | 3          |                |
| 17q   | 16   | 22         | 0,729          |
| +17q  | 5  | 5          |                |
| 20q   | 16   | 21         | 1,000          |
| +20q  | 5  | 6          |                |
| 20p   | 21   | 24         | 0,246          |
| -20p  | 0  | 3          |                |

<sup>1</sup>: υπολογίστηκε με μη παραμετρική στατιστική ανάλυση χ<sup>2</sup>



**ΠΙΝΑΚΑΣ 9. ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΩΜΑΛΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ ΣΕ ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ**

| Χρωμοσωμικές<br>Θέσεις με μεγαλύτερη<br>συχνότητα γενετικών<br>ανωμαλιών | Αριθμός δειγμάτων<br>που παρουσιάζουν τις συγκεκριμένες<br>γενετικές ανωμαλίες |                       | P*    |
|--|--|-----------------------|-------|
|  | Ιστορικό<br>παθολογίας   | Θετικά<br>καταστάσεις |       |
| 1q   | 17   | 13                    | 0,320 |
| +1q  | 27   | 12                    |       |
| 2q   | 39   | 24                    | 0,085 |
| -2q  | 6  | 0                     |       |
| 3p   | 38   | 24                    | 0,087 |
| +3p  | 7  | 0                     |       |
| 3p   | 39   | 22                    | 0,704 |
| -3p  | 6  | 2                     |       |
| 8p   | 34   | 21                    | 0,756 |
| -8p  | 10   | 4                     |       |
| 8p   | 31   | 22                    | 0,224 |
| +8p  | 12   | 3                     |       |
| 8q   | 28   | 14                    | 0,611 |
| +8q  | 16   | 11                    |       |
| 11q  | 33   | 17                    | 0,582 |
| -11q   | 11   | 8                     |       |
| 13q  | 28   | 21                    | 0,100 |
| -13q   | 16   | 4                     |       |
| 14q  | 37   | 24                    | 0,248 |
| -14q   | 6  | 1                     |       |
| 15q  | 37   | 25                    | 0,078 |
| -15q   | 6  | 0                     |       |
| 16q  | 29   | 14                    | 0,448 |
| -16q   | 15   | 11                    |       |
| 16p  | 30   | 19                    | 0,587 |
| +16p   | 14   | 6                     |       |
| 17p  | 33   | 22                    | 0,345 |
| -17p   | 10   | 3                     |       |
| 17q  | 38   | 18                    | 0,201 |
| +17q   | 6  | 7                     |       |
| 20q  | 34   | 20                    | 1,000 |
| +20q   | 10   | 5                     |       |
| 20p  | 40   | 23                    | 1,000 |
| -20p   | 3  | 2                     |       |

\*: υπολογίστηκε με μη παραμετρική στατιστική ανάλυση  $\chi^2$



**ΠΙΝΑΚΑΣ 10. ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΑΚΑΤΑΤΑΞΕΩΝ ΚΑΙ ΒΑΘΜΟΣ  
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ**

| <b>Χρωμοσωμικές<br/>θέσεις με μεγαλύτερη<br/>συχνότητα γενετικών<br/>ανωμαλιών</b> | <b>Αριθμός δειγμάτων<br/>που παρουσιάζουν τις συγκεκριμένες<br/>γενετικές ανωμαλίες</b> |    | <b>p<sup>4</sup></b> |
|--|---|----|----------------------|
| 1q   | 16  | 10 | 0,574                |
| +1q  | 23  | 9  |                      |
| 2q   | 36  | 17 | 1,000                |
| -2q  | 3   | 2  |                      |
| 3p   | 37  | 15 | 0,083                |
| +3p  | 2   | 4  |                      |
| 3p   | 39  | 15 | 0,009                |
| -3p  | 0   | 4  |                      |
| 8p   | 34  | 12 | 0,045                |
| -8p  | 5   | 7  |                      |
| 8p   | 35  | 15 | 0,418                |
| +8p  | 4   | 4  |                      |
| 8q   | 31  | 6  | 0,001                |
| +8q  | 8   | 13 |                      |
| 10p  | 39  | 13 | 0,001                |
| +10p   | 0   | 6  |                      |
| 11q  | 31  | 15 | 1,000                |
| -11q   | 8   | 4  |                      |
| 13q  | 32  | 12 | 0,189                |
| -13q   | 7   | 7  |                      |
| 14q  | 39  | 15 | 0,009                |
| -14q   | 0   | 4  |                      |
| 15q  | 38  | 16 | 0,098                |
| -15q   | 1   | 3  |                      |
| 16q  | 23  | 15 | 0,155                |
| -16q   | 16  | 4  |                      |
| 16p  | 28  | 14 | 1,000                |
| +16p   | 11  | 5  |                      |
| 17p  | 32  | 16 | 1,000                |
| -17p   | 7   | 3  |                      |
| 17q  | 34  | 14 | 0,270                |
| +17q   | 5   | 5  |                      |
| 20q  | 36  | 10 | 0,001                |
| +20q   | 3   | 9  |                      |
| 20p  | 38  | 17 | 0,248                |
| -20p   | 1   | 2  |                      |

<sup>4</sup>: υπολογίστηκε με μη παραμετρική στατιστική ανάλυση  $\chi^2$



**ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙ. ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΑΚΑΤΑΤΑΞΕΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΜΕΡΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΟΥ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ**

| Χρωμ. θέσεις με<br>μεγαλ. συχνότητα<br>γενετ. ανωμαλιών | Αριθμός δειγμάτων<br>που παρουσιάζουν τις συγκεκριμένες γενετικές ανωμαλίες |    |       |                      |    |       |                             |    |       |
|---|---|----|-------|----------------------|----|-------|-----------------------------|----|-------|
|   | Σχηματισμός<br>σωληνίσκων   |    |       | Μιτωτικός<br>δείκτης |    |       | Πυρηνικός<br>πλειομορφισμός |    |       |
|   | 1-2   | 3  | 1*    | 1-2                  | 3  | 1*    | 1-2                         | 3  | 1*    |
| 1q  | 6   | 18 | 0,171 | 18                   | 6  | 1,000 | 14                          | 9  | 0,397 |
| +1q   | 14  | 18 |       | 25                   | 7  |       | 22                          | 10 |       |
| 3p  | 18  | 32 | 0,100 | 41                   | 9  | 0,022 | 34                          | 15 | 0,167 |
| +3p   | 2   | 4  |       | 2                    | 4  |       | 2                           | 4  |       |
| 3p  | 20  | 32 | 0,285 | 43                   | 9  | 0,002 | 35                          | 16 | 0,114 |
| -3p   | 0   | 4  |       | 0                    | 4  |       | 1                           | 3  |       |
| 8p  | 18  | 26 | 0,178 | 37                   | 7  | 0,022 | 32                          | 11 | 0,015 |
| -8p   | 2   | 10 |       | 6                    | 6  |       | 4                           | 8  |       |
| 8p  | 17  | 31 | 1,000 | 38                   | 10 | 0,370 | 32                          | 15 | 0,426 |
| +8p   | 3   | 5  |       | 5                    | 3  |       | 4                           | 4  |       |
| 8q  | 16  | 19 | 0,051 | 33                   | 2  | 0,001 | 26                          | 8  | 0,042 |
| +8q   | 4   | 17 |       | 10                   | 11 |       | 10                          | 11 |       |
| 10p   | 19  | 31 | 0,405 | 43                   | 7  | 0,001 | 34                          | 15 | 0,167 |
| +10p  | 1   | 5  |       | 0                    | 6  |       | 2                           | 4  |       |
| 14q   | 20  | 32 | 0,285 | 43                   | 9  | 0,002 | 36                          | 15 | 0,011 |
| -14q  | 0   | 4  |       | 0                    | 4  |       | 0                           | 4  |       |
| 15q   | 19  | 33 | 1,000 | 42                   | 10 | 0,035 | 34                          | 17 | 0,602 |
| -15q  | 1   | 3  |       | 1                    | 3  |       | 2                           | 2  |       |
| 17q   | 16  | 30 | 0,733 | 38                   | 8  | 0,041 | 33                          | 12 | 0,014 |
| +17q  | 4   | 6  |       | 5                    | 5  |       | 3                           | 7  |       |
| 20q   | 20  | 24 | 0,005 | 38                   | 6  | 0,003 | 31                          | 12 | 0,084 |
| +20q  | 0   | 12 |       | 5                    | 7  |       | 5                           | 7  |       |

\*: υπολογίστηκε με μη παραμετρική στατιστική ανάλυση  $\chi^2$



**ΠΙΝΑΚΑΣ 12. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΟΥ ΣΕ ΔΥΟ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ (ΠΟΡΟΓΕΝΗ ΔΙΗΘΗΤΙΚΑ ΜΗ ΕΙΔΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ ΚΑΙ ΦΑΓΕΣΩΡΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ)**

| Παράγοντες του βαθμού κακοήθειας   | Ιστολογικός τύπος                   |             | P <sup>*</sup> |
|------------------------------------|-------------------------------------|-------------|----------------|
|                                    | Πορογενή διηθητικά μη ειδικού τύπου | Φαγέσσωρικά |                |
| <b>Σχηματισμός σωληνίσκων</b>      |                                     |             |                |
| 1-2                                | 24                                  | 1           | 0,007          |
| 3                                  | 32                                  | 20          |                |
| <b>Μιτωτικός δείκτης</b>           |                                     |             |                |
| 1-2                                | 48                                  | 14          | 0,058          |
| 3                                  | 8                                   | 8           |                |
| <b>Πυρηνικός πλειομορφισμός</b>    |                                     |             |                |
| 1-2                                | 39                                  | 9           | 0,020          |
| 3                                  | 16                                  | 13          |                |
| <b>Συνολικός βαθμός κακοήθειας</b> |                                     |             |                |
| I-II                               | 45                                  | 8           | 0,013          |
| III                                | 22                                  | 15          |                |

\*: υπολογίστηκε με μη παραμετρική στατιστική ανάλυση  $\chi^2$



**ΠΙΝΑΚΑΣ 13 ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΝΑΚΑΤΑΤΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΣΕΣ ΤΙΜΕΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ  
ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΟ ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ**

| Συχνότερες<br>γενετικές<br>ανακατατάξεις | Βιολογικοί παράγοντες |         |                 |         |               |         |               |         |
|--|-----------------------|---------|-----------------|---------|---------------|---------|---------------|---------|
|  | PCNA                  |         | Τελομεράση      |         | Πολυμεράση +  |         | ErbB2         |         |
| 1q                                       | 3,83<br>N=37          | P=0,136 | 1100,54<br>N=38 | P=0,804 | 31,91<br>N=22 | P=0,001 | 10,03<br>N=8  | P=0,460 |
| +1q                                      | 3,46<br>N=40          |         | 1113,25<br>N=43 |         | 16,69<br>N=31 |         | 10,24<br>N=7  |         |
| 2q                                       | 3,49<br>N=70          | P=0,616 | 1151,2<br>N=73  | P=0,068 | 22,07<br>N=48 | P=0,417 | 9,92<br>N=14  | P=---   |
| -2q                                      | 5,11<br>N=5           |         | 896,16<br>N=6   |         | 19,05<br>N=4  |         | 13<br>N=1     |         |
| 3p                                       | 3,47<br>N=68          | P=0,729 | 1133,62<br>N=72 | P=0,227 | 22,73<br>N=46 | P=0,070 | 9,92<br>N=14  | P=---   |
| +3p                                      | 4,86<br>N=7           |         | 1113,7<br>N=7   |         | 14,98<br>N=6  |         | 13<br>N=1     |         |
| 3p                                       | 3,68<br>N=67          | P=0,314 | 1127,83<br>N=71 | P=0,343 | 22,59<br>N=46 | P=0,079 | 9,92<br>N=14  | P=---   |
| -3p                                      | 2,91<br>N=8           |         | 1167,58<br>N=8  |         | 16,05<br>N=6  |         | 13<br>N=1     |         |
| 8p                                       | 3,67<br>N=62          | P=0,776 | 1076,59<br>N=66 | P=0,907 | 23,79<br>N=42 | P=0,129 | 9,83<br>N=12  | P=0,095 |
| -8p                                      | 3,49<br>N=15          |         | 1242,33<br>N=15 |         | 20,02<br>N=11 |         | 11,33<br>N=3  |         |
| 8p                                       | 3,51<br>N=57          | P=0,001 | 1066,42<br>N=61 | P=0,962 | 23,18<br>N=40 | P=0,400 | 10,09<br>N=13 | P=---   |
| +8p                                      | 4,06<br>N=19          |         | 1281,52<br>N=19 |         | 22,81<br>N=12 |         | 7,80<br>N=1   |         |
| 8q                                       | 3,49<br>N=50          | P=0,279 | 1111,32<br>N=52 | P=0,461 | 21,96<br>N=34 | P=0,900 | 9,54<br>N=11  | P=0,022 |
| +8q                                      | 3,91<br>N=27          |         | 1110,05<br>N=29 |         | 24,88<br>N=19 |         | 11,75<br>N=4  |         |
| 11q                                      | 3,78<br>N=57          | P=0,963 | 1130,07<br>N=60 | P=0,288 | 23,27<br>N=39 | P=0,696 | 9,69<br>N=13  | P=---   |
| -11q                                     | 3,23<br>N=20          |         | 1042,18<br>N=21 |         | 22,28<br>N=14 |         | 13<br>N=2     |         |





|      |              |           |                 |           |               |           |               |           |
|------|--------------|-----------|-----------------|-----------|---------------|-----------|---------------|-----------|
| 13q  | 3,68<br>N=57 | $P=0,737$ | 1076,34<br>N=61 | $P=0,293$ | 23,42<br>N=41 | $P=0,160$ | 9,69<br>N=13  | $P=0,003$ |
| -13q | 3,51<br>N=20 |           | 1201,67<br>N=20 |           | 21,59<br>N=12 |           | 13<br>N=2     |           |
| 14q  | 3,52<br>N=69 | $P=0,678$ | 1109,35<br>N=73 | $P=0,822$ | 23,98<br>N=47 | $P=0,093$ | 10,07<br>N=13 | $P=---$   |
| -14q | 4,87<br>N=7  |           | 1202,5<br>N=7   |           | 14,81<br>N=5  |           | 8<br>N=1      |           |
| 15q  | 3,65<br>N=69 | $P=0,759$ | 1151,45<br>N=73 | $P=0,165$ | 23,84<br>N=47 | $P=0,101$ | 10,07<br>N=13 | $P=---$   |
| -15q | 3,58<br>N=7  |           | 763,45<br>N=7   |           | 16,15<br>N=5  |           | 8<br>N=1      |           |
| 16q  | 3,89<br>N=49 | $P=0,910$ | 1024,96<br>N=51 | $P=0,608$ | 25,79<br>N=31 | $P=0,025$ | 10,26<br>N=12 | $P=0,177$ |
| -16q | 3,19<br>N=28 |           | 1247,24<br>N=30 |           | 19,08<br>N=22 |           | 9,6<br>N=3    |           |
| -16p | 3,51<br>N=56 | $P=0,501$ | 1027,24<br>N=60 | $P=0,554$ | 23,66<br>N=40 | $P=0,350$ | 11,21<br>N=11 | $P=0,790$ |
| +16p | 3,98<br>N=21 |           | 1335,99<br>N=21 |           | 24,07<br>N=13 |           | 7,17<br>N=4   |           |
| 17p  | 3,61<br>N=64 | $P=0,432$ | 1157,15<br>N=67 | $P=0,273$ | 24,35<br>N=44 | $P=0,098$ | 9,92<br>N=14  | $P=---$   |
| -17p | 3,83<br>N=12 |           | 913,18<br>N=13  |           | 16,20<br>N=8  |           | -<br>N=0      |           |
| 17q  | 3,59<br>N=63 | $P=0,157$ | 1016,01<br>N=67 | $P=0,403$ | 21,77<br>N=42 | $P=0,098$ | 10,16<br>N=12 | $P=0,458$ |
| +17q | 3,85<br>N=14 |           | 1544,09<br>N=14 |           | 27,71<br>N=11 |           | 10,00<br>N=3  |           |
| 20q  | 3,60<br>N=61 | $P=0,449$ | 1018,1<br>N=65  | $P=0,495$ | 22,03<br>N=42 | $P=0,082$ | 11,11<br>N=11 | $P=0,760$ |
| +20q | 3,78<br>N=16 |           | 1469,62<br>N=16 |           | 26,73<br>N=11 |           | 7,42<br>N=4   |           |
| 20p  | 3,70<br>N=71 | $P=0,485$ | 1070,4<br>N=75  | $P=0,643$ | 23,5<br>N=48  | $P=0,205$ | 9,92<br>N=14  | $P=---$   |
| -20p | 2,82<br>N=5  |           | 1824,12<br>N=5  |           | 17,75<br>N=4  |           | -<br>N=0      |           |



**ΠΙΝΑΚΑΣ 14. ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΝΑΚΑΤΑΤΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΣΕΣ ΤΙΜΕΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΑ ΠΟΡΟΓΕΝΗ ΔΙΗΘΗΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΜΗ ΕΙΔΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ**

| Συχνότερες<br>γενετικές<br>ανακατατάξεις | Βιολογικοί παράγοντες που μελετήθηκαν |         |                |         |               |         |
|--|---------------------------------------|---------|----------------|---------|---------------|---------|
|  | PCNA                                  |         | Τελομεράση     |         | Πολυμεράση +  |         |
| 1q                                       | 3,10<br>N=20                          | P=0,525 | 767,01<br>N=20 | P=0,010 | 24,31<br>N=11 | P=0,068 |
| +1q                                      | 3,39<br>N=20                          |         | 1089,7<br>N=23 |         | 14,76<br>N=16 |         |
| 2q                                       | 3,23<br>N=39                          | P=---   | 933,08<br>N=41 | P=---   | 18,12<br>N=26 | P=---   |
| -2q                                      | 3,6<br>N=1                            |         | 1073,45<br>N=1 |         | 32<br>N=1     |         |
| 3p                                       | 3,11<br>N=38                          | P=0,118 | 936,50<br>N=41 | P=0,336 | 19,24<br>N=25 | P=0,196 |
| +3p                                      | 5,75<br>N=2                           |         | 1003,35<br>N=2 |         | 11,25<br>N=2  |         |
| 3p                                       | 3,34<br>N=38                          | P=0,068 | 922,22<br>N=41 | P=0,427 | 18,75<br>N=25 | P=0,059 |
| -3p                                      | 1,45<br>N=2                           |         | 1296,25<br>N=2 |         | 17,33<br>N=2  |         |
| 8p                                       | 3,27<br>N=32                          | P=0,425 | 991,83<br>N=35 | P=0,067 | 17,99<br>N=21 | P=0,845 |
| -8p                                      | 3,12<br>N=8                           |         | 711,17<br>N=8  |         | 20,97<br>N=6  |         |
| 8p                                       | 3,42<br>N=34                          | P=0,762 | 922,13<br>N=37 | P=0,305 | 19,17<br>N=25 | P=0,238 |
| +8p                                      | 2,25<br>N=6                           |         | 1047,45<br>N=6 |         | 12,07<br>N=2  |         |
| 8q                                       | 2,78<br>N=28                          | P=0,175 | 939,95<br>N=30 | P=0,103 | 14,25<br>N=18 | P=0,040 |
| +8q                                      | 4,32<br>N=12                          |         | 938,82<br>N=13 |         | 27,45<br>N=9  |         |
| 11q                                      | 3,26<br>N=32                          | P=0,098 | 914,23<br>N=34 | P=0,550 | 19,65<br>N=21 | P=0,515 |
| -11q                                     | 3,18<br>N=8                           |         | 1035,5<br>N=9  |         | 15,13<br>N=6  |         |



|             |  |           |                 |           |               |           |
|-------------|--|-----------|-----------------|-----------|---------------|-----------|
| 13q         | 3,46<br>N=31                               | $P=0,056$ | 867,44<br>N=34  | $P=0,371$ | 18,84<br>N=22 | $P=0,098$ |
| -13q        | 2,48<br>N=9                                |           | 1212,25<br>N=9  |           | 17,78<br>N=5  |           |
| 14q         | 3,18<br>N=39                               | $P=---$   | 914,16<br>N=42  | $P=---$   | 18,89<br>N=16 | $P=---$   |
| -14q        | 5,8<br>N=1                                 |           | 2008,6<br>N=1   |           | 12,42<br>N=1  |           |
| 15q         | 3,21<br>N=38                               | $P=0,569$ | 930,62<br>N=41  | $P=0,710$ | 19,12<br>N=25 | $P=0,066$ |
| -15q        | 3,85<br>N=2                                |           | 1123,95<br>N=2  |           | 12,71<br>N=2  |           |
| 16q         | 3,44<br>N=23                               | $P=0,870$ | 815,76<br>N=24  | $P=0,519$ | 21,31<br>N=13 | $P=0,176$ |
| -16q        | 2,98<br>N=17                               |           | 1096,07<br>N=19 |           | 16,17<br>N=14 |           |
| 16p         | 2,96<br>N=30                               | $P=0,223$ | 986,99<br>N=10  | $P=0,211$ | 18,64<br>N=21 | $P=0,457$ |
| +16p        | 4,09<br>N=10                               |           | 783,28<br>N=33  |           | 18,68<br>N=6  |           |
| 17p         | 3,15<br>N=36                               | $P=0,773$ | 967,77<br>N=38  | $P=0,091$ | 19,72<br>N=24 | $P=0,121$ |
| -17p        | 4,1<br>N=4                                 |           | 725,84<br>N=5   |           | 10,03<br>N=3  |           |
| 17q         | 3,37<br>N=32                               | $P=0,338$ | 905,63<br>N=35  | $P=0,030$ | 19,89<br>N=22 | $P=0,018$ |
| +17q        | 2,72<br>N=8                                |           | 1088,31<br>N=8  |           | 13,18<br>N=4  |           |
| 20q         | 3,22<br>N=33                               | $P=0,236$ | 881,62<br>N=36  | $P=0,301$ | 19,49<br>N=23 | $P=0,031$ |
| +20q        | 3,37<br>N=7                                |           | 1237,88<br>N=7  |           | 13,81<br>N=4  |           |
| 20p<br>-20p | <i>Δεν υπάρχουν ελλείψεις στα πορογενή</i> |           |                 |           |               |           |



**ΠΙΝΑΚΑΣ 15. ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΝΑΚΑΤΑΤΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΣΕΣ ΤΙΜΕΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΑ ΦΑΓΕΣΩΡΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ**

| Συχνότερες<br>γενετικές<br>ανακατατάξεις |              |                |                 |                |              |                |
|--|--------------|----------------|-----------------|----------------|--------------|----------------|
| Βιολογικοί παράγοντες που μελετήθηκαν    |              |                |                 |                |              |                |
|  | PCNA         |                | Τελομεράση      |                | Πολυμεράση + |                |
| 1q                                       | 4,39<br>N=7  | <i>P=0,894</i> | 1558,7<br>N=8   | <i>P=0,366</i> | 17,2<br>N=4  | <i>P=0,480</i> |
| +1q                                      | 3,98<br>N=11 |                | 762,88<br>N=11  |                | 22,72<br>N=7 |                |
| 2q                                       | 3,82<br>N=14 | <i>P=0,329</i> | 1205,98<br>N=15 | <i>P=0,219</i> | 21,53<br>N=9 | <i>P=0,500</i> |
| -2q                                      | 5,48<br>N=3  |                | 923,83<br>N=3   |                | 17,03<br>N=2 |                |
| 3p                                       | 3,88<br>N=13 | <i>P=0,565</i> | 1097,27<br>N=14 | <i>P=0,761</i> | 22,34<br>N=8 | <i>P=0,246</i> |
| +3p                                      | 4,88<br>N=4  |                | 1374,85<br>N=4  |                | 16,39<br>N=3 |                |
| 3p                                       | 4,4<br>N=13  | <i>P=0,240</i> | 1251,17<br>N=14 | <i>P=0,358</i> | 21,19<br>N=9 | <i>P=0,659</i> |
| -3p                                      | 3,2<br>N=4   |                | 836,22<br>N=4   |                | 18,55<br>N=2 |                |
| 8p                                       | 3,96<br>N=13 | <i>P=0,542</i> | 962,35<br>N=14  | <i>P=0,549</i> | 19,16<br>N=8 | <i>P=0,481</i> |
| -8p                                      | 4,59<br>N=5  |                | 1477,68<br>N=5  |                | 20,97<br>N=6 |                |
| 8p                                       | 3,29<br>N=13 | <i>P=0,001</i> | 1046,25<br>N=14 | <i>P=0,463</i> | 16,55<br>N=7 | <i>P=0,122</i> |
| +8p                                      | 6,35<br>N=5  |                | 1242,74<br>N=5  |                | 28,00<br>N=4 |                |
| 8q                                       | 4,88<br>N=9  | <i>P=0,016</i> | 1129,92<br>N=7  | <i>P=0,051</i> | 26,60<br>N=5 | <i>P=0,612</i> |
| +8q                                      | 3,40<br>N=9  |                | 1069,20<br>N=11 |                | 15,66<br>N=6 |                |
| 11q                                      | 4,73<br>N=12 | <i>P=0,236</i> | 196,70<br>N=13  | <i>P=0,038</i> | 19,16<br>N=8 | <i>P=0,481</i> |
| -11q                                     | 3,0<br>N=6   |                | 1100,68<br>N=6  |                | 24,85<br>N=3 |                |



|      |              |                |                 |                |               |                |
|------|--------------|----------------|-----------------|----------------|---------------|----------------|
| 13q  | 3,72<br>N=11 | <i>P=0,002</i> | 1267,12<br>N=12 | <i>P=0,513</i> | 15,81<br>N=7  | <i>P=0,131</i> |
| -13q | 4,79<br>N=7  |                | 807,97<br>N=7   |                | 29,29<br>N=4  |                |
| 14q  | 3,84<br>N=14 | <i>P=0,533</i> | 1190,38<br>N=15 | <i>P=0,488</i> | 21,19<br>N=9  | <i>P=0,659</i> |
| -14q | 5,18<br>N=4  |                | 751,4<br>N=4    |                | 18,55<br>N=2  |                |
| 15q  | 4,30<br>N=15 | <i>P=0,490</i> | 1169,85<br>N=16 | <i>P=0,485</i> | 20,10<br>N=10 | <i>P=--</i>    |
| -15q | 3,33<br>N=3  |                | 714,56<br>N=3   |                | 26,89<br>N=1  |                |
| 16q  | 4,81<br>N=13 | <i>P=0,237</i> | 1085,89<br>N=14 | <i>P=0,491</i> | 20,60<br>N=8  | <i>P=0,511</i> |
| -16q | 2,38<br>N=5  |                | 1128,96<br>N=5  |                | 21,02<br>N=3  |                |
| 16p  | 3,97<br>N=13 | <i>P=0,466</i> | 992,71<br>N=14  | <i>P=0,706</i> | 22,38<br>N=8  | <i>P=0,138</i> |
| +16p | 4,57<br>N=5  |                | 1392,66<br>N=5  |                | 16,26<br>N=3  |                |
| 17p  | 4,68<br>N=12 | <i>P=0,171</i> | 1176,79<br>N=13 | <i>P=0,351</i> | 21,15<br>N=8  | <i>P=0,475</i> |
| -17p | 3,05<br>N=6  |                | 927,16<br>N=6   |                | 19,56<br>N=3  |                |
| 17q  | 3,64<br>N=14 | <i>P=0,138</i> | 995,78<br>N=15  | <i>P=0,434</i> | 10,45<br>N=7  | <i>N=0,083</i> |
| +17q | 5,87<br>N=4  |                | 1481,12<br>N=4  |                | 25,04<br>N=4  |                |
| 20q  | 4,04<br>N=12 | <i>P=0,390</i> | 1200,87<br>N=13 | <i>P=0,999</i> | 18,83<br>N=7  | <i>P=0,061</i> |
| +20q | 4,33<br>N=6  |                | 874,98<br>N=6   |                | 24,02<br>N=4  |                |
| 20p  | 4,55<br>N=15 | <i>P=0,466</i> | 1056,00<br>N=16 | <i>P=0,489</i> | 22,50<br>N=9  | <i>P=0,277</i> |
| -20p | 2,06<br>N=3  |                | 1318,10<br>N=3  |                | 12,66<br>N=2  |                |



**ΠΙΝΑΚΑΣ 16. ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΝΑΚΑΤΑΤΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΣΕΣ ΤΙΜΕΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΑ ΛΟΒΙΑΚΑ ΔΙΗΘΗΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ**

| Συχνότερες<br>γενετικές<br>ανακατατάξεις |                                 |         |                |         |              |         |
|--|---------------------------------|---------|----------------|---------|--------------|---------|
| Βιολογικοί παράγοντες που μελετήθηκαν    |                                 |         |                |         |              |         |
|  | PCNA                            |         | Τελομεράση     |         | Πολυμεράση + |         |
| 1q                                       | 4,42<br>N=5                     | P=0,343 | 1238,06<br>N=5 | P=0,129 | 24,46<br>N=3 | P=0,180 |
| +1q                                      | 3,37<br>N=4                     |         | 839,75<br>N=4  |         | 18,69<br>N=3 |         |
| 2q<br>-2q                                | Δεν υπάρχει έλλειψη στα λοβιακά |         |                |         |              |         |
| 3p<br>+3p                                | Δεν υπάρχει έλλειψη στα λοβιακά |         |                |         |              |         |
| 3p<br>-3p                                | Δεν υπάρχει έλλειψη στα λοβιακά |         |                |         |              |         |
| 8p<br>-8p                                | Δεν υπάρχει έλλειψη στα λοβιακά |         |                |         |              |         |
| 8p                                       | 2,90<br>N=2                     | P=0,621 | 321,7<br>N=2   | P=0,051 | 6,5<br>N=1   | P=---   |
| +8p                                      | 3,98<br>N=7                     |         | 1272,27<br>N=7 |         | 24,51<br>N=1 |         |
| 8q                                       | 3,85<br>N=2                     | P=0,587 | 976,24<br>N=7  | P=0,666 | 19,97<br>N=4 | P=0,301 |
| +8q                                      | 4,32<br>N=12                    |         | 1357,80<br>N=2 |         | 24,78<br>N=2 |         |
| 11q                                      | 4,58<br>N=6                     | P=0,299 | 1210,63<br>N=6 | P=0,146 | 22,8<br>N=4  | P=0,128 |
| -11q                                     | 2,7<br>N=3                      |         | 761,83<br>N=3  |         | 19,13<br>N=2 |         |
| 13q                                      | 3,90<br>N=6                     | P=0,323 | 837,76<br>N=6  | P=0,938 | 22,8<br>N=4  | P=0,739 |
| -13q                                     | 4,06<br>N=3                     |         | 1507,56<br>N=3 |         | 19,13<br>N=2 |         |
| 14q<br>-14q                              | Δεν υπάρχει έλλειψη στα λοβιακά |         |                |         |              |         |
| 15q                                      | 4,21<br>N=8                     | P=---   | 1131,91<br>N=8 | P=---   | 22,17<br>N=8 | P=---   |
| -15q                                     | 1,9<br>N=1                      |         | 494,00<br>N=1  |         | 18,61<br>N=1 |         |



|             |                                 |           |                |           |              |           |
|-------------|---------------------------------|-----------|----------------|-----------|--------------|-----------|
| 16q         | 2,56<br>N=5                     | $P=0,182$ | 588,90<br>N=5  | $P=0,183$ | 6,9<br>N=2   | $P=0,140$ |
| -16q        | 5,70<br>N=4                     |           | 1651,20<br>N=4 |           | 28,92<br>N=4 |           |
| 16p         | 4,17<br>N=7                     | $P=0,400$ | 1035,45<br>N=7 | $P=0,972$ | 24,43<br>N=5 | $P=---$   |
| +16p        | 3,2<br>N=2                      |           | 1150,55<br>N=2 |           | 7,3<br>N=1   |           |
| 17p         | 3,72<br>N=8                     | $P=---$   | 915,96<br>N=8  | $P=---$   | 19,7<br>N=5  | $P=---$   |
| -17p        | 5,80<br>N=1                     |           | 2221,6<br>N=1  |           | 30,97<br>N=1 |           |
| 17q<br>+17q | Δεν υπάρχει έλλειψη στα λοβιακά |           |                |           |              |           |
| 20q<br>+20q | Δεν υπάρχει έλλειψη στα λοβιακά |           |                |           |              |           |
| 20p         | 3,72<br>N=8                     | $P=---$   | 9154,96<br>N=8 | $P=---$   | 19,70<br>N=5 | $P=---$   |
| -20p        | 5,8<br>N=1                      |           | 2221,6<br>N=1  |           | 30,97<br>N=1 |           |



**ΠΙΝΑΚΑΣ 17. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ FHT ΚΑΙ ΑΛΛΟΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ**

**A. Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του FHT με τα επίπεδα έκφρασης βιολογικών παραμέτρων**

| FHT | PCNA        | ErbB2       | Πολυμεράση  | Τελομεράση  |
|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|
|     | Coef. 0,128 | Coef. 0,135 | Coef. 0,376 | Coef. 0,470 |
|     | P=0,369     | P=0,709     | P=0,006     | P=0,001     |
|     | N=51        | N=10        | N=52        | N=53        |

**B. Σύγκριση ακραίων τιμών έκφρασης του FHT με τις μέσες τιμές έκφρασης βιολογικών παραμέτρων**

| Παράμετροι | Μειωμένη έκφραση FHT | Υπεραυξημένη έκφραση FHT | P     |
|------------|----------------------|--------------------------|-------|
| PCNA       | 2,72<br>N=7          | 3,73<br>N=30             | 0,951 |
| ErbB2      | 13<br>N=2            | 12,16<br>N=6             | 0,220 |
| Πολυμεράση | 2,07<br>N=7          | 15,76<br>N=31            | 0,028 |
| Τελομεράση | 194,71<br>N=7        | 1420,79<br>N=31          | 0,005 |





**ΠΙΝΑΚΑΣ 18. ΚΛΙΝΙΚΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΚΑΙ ΜΕΣΕΣ ΤΙΜΕΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΕ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ ΟΓΚΟΥΣ ΜΑΣΤΟΥ**

| Κλινικοπαθολογικοί παράμετροι   | Παράγοντες που μελετήθηκαν          |         |                 |         |               |         |               |         |
|---------------------------------|-------------------------------------|---------|-----------------|---------|---------------|---------|---------------|---------|
|                                 | PCNA                                |         | Τελ.ομεράση     |         | Πολυμεράση +  |         | ErbB2         |         |
|                                 | Συνολικός πληθυσμός                 |         |                 |         |               |         |               |         |
| Ηλικία <60                      | 3,50<br>N=64                        | P=0,859 | 1185,56<br>N=67 | P=0,027 | 22,91<br>N=50 | P=0,266 | 9,70<br>N=19  | P=0,042 |
| Ηλικία >60                      | 3,13<br>N=70                        |         | 1029,73<br>N=75 |         | 20,41<br>N=44 |         | 9,99<br>N=13  |         |
| Θετικοί λεμφαδένες              | 2,93<br>N=46                        | P=0,907 | 1048,64<br>N=50 | P=0,056 | 21,78<br>N=29 | P=0,307 | 9,29<br>N=15  | P=0,001 |
| Αρνητικοί λεμφαδένες            | 3,50<br>N=67                        |         | 1152,03<br>N=69 |         | 19,60<br>N=48 |         | 12,07<br>N=10 |         |
| Grade I-II                      | 2,83<br>N=62                        | P=0,170 | 1016,70<br>N=66 | P=0,897 | 17,25<br>N=40 | P=0,169 | 10,29<br>N=12 | P=0,800 |
| Grade III                       | 3,64<br>N=38                        |         | 1287,99<br>N=41 |         | 21,45<br>N=27 |         | 10,64<br>N=11 |         |
| Θετικοί υποδοχείς οιστρογόνων   | 3,31<br>N=35                        | P=0,041 | 1321,63<br>N=36 | P=0,004 | 14,69<br>N=35 | P=0,790 | 10,00<br>N=5  | P=0,822 |
| Αρνητικοί υποδοχείς οιστρογόνων | 3,89<br>N=36                        |         | 1141,42<br>N=38 |         | 17,32<br>N=38 |         | 10,54<br>N=13 |         |
|                                 | Διηθητικά πορογενή μη ειδικού τύπου |         |                 |         |               |         |               |         |
| Ηλικία <60                      | 3,54<br>N=35                        | P=0,192 | 987,46<br>N=37  | P=0,006 | 18,65<br>N=29 | P=0,098 | 10,34<br>N=9  | P=0,529 |
| Ηλικία >60                      | 2,57<br>N=42                        |         | 932,49<br>N=46  |         | 20,64<br>N=24 |         | 10,38<br>N=7  |         |
| Θετικοί λεμφαδένες              | 2,86<br>N=26                        | P=0,547 | 924,02<br>N=29  | P=0,724 | 21,59<br>N=19 | P=0,217 | 8,85<br>N=8   | P=0,002 |
| Αρνητικοί λεμφαδένες            | 3,21<br>N=42                        |         | 1022,42<br>N=44 |         | 19,14<br>N=28 |         | 12,16<br>N=6  |         |
| Grade I-II                      | 2,87<br>N=46                        | P=0,654 | 876,36<br>N=50  | P=0,644 | 18,78<br>N=29 | P=0,983 | 9,67<br>N=8   | P=0,885 |
| Grade III                       | 3,30<br>N=23                        |         | 1129,37<br>N=25 |         | 19,75<br>N=18 |         | 10,77<br>N=7  |         |
| Θετικοί υποδοχείς οιστρογόνων   | 3,43<br>N=24                        | P=0,144 | 1314,88<br>N=25 | P=0,051 | 22,12<br>N=17 | P=0,887 | 11,50<br>N=4  | P=0,212 |



|                                    |                                   |                |                 |                |               |                |              |                |
|------------------------------------|-----------------------------------|----------------|-----------------|----------------|---------------|----------------|--------------|----------------|
| Αρνητικοί υποδοχείς<br>οιστρογόνων | 3,73<br>N=17                      |                | 991,31<br>N=17  |                | 26,95<br>N=14 |                | 10,30<br>N=7 |                |
| <i>Διηθητικά λοβιακά</i>           |                                   |                |                 |                |               |                |              |                |
| Ηλικία <60                         | 1,47<br>N=4                       | <i>P=0,185</i> | 853,4<br>N=4    | <i>P=0,032</i> | 10,03<br>N=4  | <i>P=0,070</i> | 9,50<br>N=2  | <i>P=---</i>   |
| Ηλικία >60                         | 4,05<br>N=9                       |                | 1111,62<br>N=10 |                | 22,52<br>N=6  |                | 7,8<br>N=1   |                |
| Θετικοί λεμφαδένες                 | 2,15<br>N=4                       | <i>P=0,528</i> | 752,77<br>N=4   | <i>P=0,193</i> | 11,50<br>N=2  | <i>P=0,205</i> | 6,00<br>N=1  | <i>P=---</i>   |
| Αρνητικοί λεμφαδένες               | 2,96<br>N=5                       |                | 1060,52<br>N=5  |                | 12,89<br>N=4  |                | 13,00<br>N=1 |                |
| Grade I-II                         | Δεν υπάρχουν λοβιακά με grade III |                |                 |                |               |                |              |                |
| Grade III                          |                                   |                |                 |                |               |                |              |                |
| Θετικοί υποδοχείς<br>οιστρογόνων   | 3,28<br>N=6                       | <i>P=0,037</i> | 836,11<br>N=6   | <i>P=0,035</i> | 18,95<br>N=3  | <i>P=0,487</i> | -<br>N=0     | <i>P=---</i>   |
| Αρνητικοί υποδοχείς<br>οιστρογόνων | 1,05<br>N=2                       |                | 535,4<br>N=3    |                | 11,71<br>N=3  |                | 6,00<br>N=1  |                |
| <i>Φαγεσωρικά</i>                  |                                   |                |                 |                |               |                |              |                |
| Ηλικία <60                         | 3,76<br>N=12                      | <i>P=0,013</i> | 1611,40<br>N=13 | <i>P=0,905</i> | 17,51<br>N=7  | <i>P=0,350</i> | 13<br>N=3    | <i>P=0,016</i> |
| Ηλικία >60                         | 4,56<br>N=12                      |                | 997,61<br>N=12  |                | 23,24<br>N=8  |                | 11<br>N=3    |                |
| Θετικοί λεμφαδένες                 | 3,4<br>N=11                       | <i>P=0,151</i> | 1135,08<br>N=12 | <i>P=0,830</i> | 18,72<br>N=5  | <i>P=0,948</i> | 13<br>N=4    | <i>P=---</i>   |
| Αρνητικοί λεμφαδένες               | 4,72<br>N=12                      |                | 1435,95<br>N=12 |                | 22,16<br>N=9  |                | 13<br>N=1    |                |
| Grade I-II                         | 3,25<br>N=8                       | <i>P=0,163</i> | 1301,96<br>N=8  | <i>P=0,862</i> | 14,36<br>N=6  | <i>P=0,222</i> | 13,00<br>N=3 | <i>P=0,016</i> |
| Grade III                          | 4,00<br>N=13                      |                | 1446,04<br>N=14 |                | 18,95<br>N=7  |                | 11<br>N=3    |                |
| Θετικοί υποδοχείς<br>οιστρογόνων   | 3,10<br>N=2                       | <i>P=0,162</i> | 1367,85<br>N=2  | <i>P=0,040</i> | 11,53<br>N=2  | <i>P=0,418</i> | -<br>N=0     | <i>P=---</i>   |
| Αρνητικοί υποδοχείς<br>οιστρογόνων | 4,70<br>N=15                      |                | 1306,59<br>N=16 |                | 24,69<br>N=9  |                | 11,80<br>N=5 |                |



**ΠΙΝΑΚΑΣ 19. ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΤΟ  
ΣΥΝΟΛΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ ΥΩΝ ΠΡΩΤΟΓΕΝΩΝ ΟΓΚΩΝ**

|                   | Βιολογικοί παράγοντες                      |   |  |
|-------------------|--|---|--|
|                   | PCNA                                       | ErbB2                                       | Πολυμεράση                                 |
| <b>ErbB2</b>      | Coef.=0,038<br><i>P</i> = 0,829<br>N= 35   | <b>Συνολικός πληθυσμός</b>                  |  |
| <b>Πολυμεράση</b> | Coef.=0,460<br><i>P</i> <0,001<br>N= 136   | Coef.= -0,194<br><i>P</i> = 0,281<br>N= 34  |  |
| <b>Τελομεράση</b> | Coef.= 0,208<br><i>P</i> = 0,015<br>N= 137 | Coef.= - 0,043<br><i>P</i> = 0,506<br>N= 35 | Coef.= 0,334<br><i>P</i> <0,001<br>N= 142  |
| <b>ErbB2</b>      | Coef.=0,068<br><i>P</i> = 0,803<br>N= 16   | <b>Πορ. διηθ. μη ειδικού τύπου</b>          |  |
| <b>Πολυμεράση</b> | Coef.=0,175<br><i>P</i> = 0,219<br>N= 51   | Coef.= 0,404<br><i>P</i> = 0,171<br>N= 13   |  |
| <b>Τελομεράση</b> | Coef.= 0,165<br><i>P</i> = 0,151<br>N= 77  | Coef.= 0,150<br><i>P</i> = 0,580<br>N= 16   | Coef.= 0,143<br><i>P</i> = 0,308<br>N= 53  |
| <b>ErbB2</b>      | Coef.=0,237<br><i>P</i> = 0,847<br>N= 3    | <b>Λοβιακά διηθητικά</b>                    |  |
| <b>Πολυμεράση</b> | Coef.=0,957<br><i>P</i> < 0,001<br>N= 9    | Coef.= -0,322<br><i>P</i> = 0,771<br>N= 3   |  |
| <b>Τελομεράση</b> | Coef.= 0,767<br><i>P</i> = 0,002<br>N= 13  | Coef.= -0,345<br><i>P</i> = 0,776<br>N= 3   | Coef.= 0,884<br><i>P</i> = 0,001<br>N= 10  |
| <b>ErbB2</b>      | Coef.=0,537<br><i>P</i> = 0,271<br>N= 6    | <b>Φαγεσωρικά</b>                           |  |
| <b>Πολυμεράση</b> | Coef.=0,612<br><i>P</i> = 0,015<br>N= 15   | Coef.= 0,366<br><i>P</i> = 0,634<br>N= 4    |  |
| <b>Τελομεράση</b> | Coef.= -0,220<br><i>P</i> = 0,302<br>N= 24 | Coef.= -0,419<br><i>P</i> = 0,408<br>N= 6   | Coef.= -0,028<br><i>P</i> = 0,921<br>N= 15 |



**ΠΙΝΑΚΑΣ 20. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΛΥΕΣΤΙΑΚΩΝ ΟΓΚΩΝ**

| Ασθενείς<br>Α/Α | Κωδικός Δείγματος | Ιστολογικός τύπος    | PCNA  | Τελομερίση | Πολύ(Α)-<br>πολυμερίση | c-erbB2 |
|-----------------|-------------------|----------------------|-------|------------|------------------------|---------|
| 1.              | 197/92            | Πορογνές (L)         | --    | 41,80      | 6,89                   | --      |
|                 | 198/92            | Πορογνές (R)         | --    | 505,50     | 4,80                   | --      |
| 2.              | 307/92            | Πορογνές + DCIS (L)  | --    | 413,60     | 4,80                   | --      |
|                 | 308/92            | Λοβιακό + LCIS (R)   | --    | 305,02     | 13,70                  | --      |
| 3.              | 326/92            | Φαγεσωφικό (A)       | 4,5   | 0          | --                     | --      |
|                 | 326/92            | DCIS (B)             | 5,4   | 273,50     | 83,80                  | --      |
| 4.              | 375/92            | Λοβιακό (A)          | --    | 0          | 3,40                   | --      |
|                 | 376/92            | Λοβιακό (B)          | --    | 494,00     | 18,60                  | --      |
| 5.              | 382/92            | Πορογνές + DCIS (L)  | --    | 0          | 15,70                  | --      |
|                 | 383/92            | Πορογνές + DCIS (R)  | --    | 1834,70    | 5,11                   | --      |
| 6.              | 426/92            | DCIS (B)             | 2,00  | 0          | 7,70                   | --      |
|                 | 426/92            | Φαγεσωφικό (A)       | 4,40  | 2433,3     | 45,92                  | --      |
| 7.              | 529/92            | Πορογνές (A)         | 3,60  | 321,4      | 3,44                   | 7,0     |
|                 | 529/92            | Πορογνές (B)         | 5,50  | 2327,60    | 24,23                  | 9,3     |
| 8.              | 50/93             | Πορογνές + DCIS (L)  | 5,40  | 33,30      | 8,20                   | 4,70    |
|                 | 51/93             | Λοβιακό + LCIS       | 13,40 | 3584,20    | 52,40                  | 7,8     |
| 9.              | 236/93            | Μικτό (R)            | 1,8   | 1397,70    | 0,18                   | 3,10    |
|                 | 236/93            | Μικτό (L)            | 0,8   | 0          | 0,8                    | 0,80    |
| 10.             | 384/93            | Λοβιακό (LA)         | 2,10  | 260,00     | 8,80                   | 2,40    |
|                 | 384/93            | Λοβιακό (LB)         | 1,10  | 1996,90    | 22,00                  | 4,70    |
|                 | 386/93            | Πορογνές (A)         | 4,3   | 2330,40    | 74,01                  | 13      |
|                 | 386/93            | Πορογνές (B)         | 1,2   | 2730,35    | 0                      | 13      |
| 11.             | 397/93            | Νευροενδοκρινικό (R) | 7,70  | 1649,00    | 76,10                  | 3,50    |
| 12.             | 397/93            | Νευροενδοκρινικό (L) | 6,50  | 4041,67    | 122,78                 | 4,00    |
|                 | 468/93            | Θηλώδες (A)          | 1,50  | 0          | 6,55                   | --      |
| 13.             | 468/92            | Θηλώδες (B)          | 8,00  | 1716,30    | 86,00                  | 8,70    |

**ΠΙΝΑΚΑΣ 21. ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΟΙ ΟΓΚΟΙ - ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΝΑΚΑΤΑΞΕΙΣ**

| Α/Α | Κωδικός Δείγματος | Ιστολογικός τύπος | Grade | I.MN | Γενετικές ανακατατάξεις   |
|-----|-------------------|-------------------|-------|------|---|
| 1.  | 327/93            | Πορογενές         | 2,2,2 | 7    | Rev ish enh (1q23q42), dim (16q)  |
|     | 328/92            |                   | --    | --   | Rev ish enh (1q22q42), dim (16q)  |
| 2.  | 401/93            | Φαγεσωρικό        | 3,1,3 | 9    | Rev ish enh (1q23q42, 19q13.1), dim 11q23qter, 12q24, 13q33qter, 16q, 17, 18p11, 20p13)                     |
|     | 402/93            |                   | --    | --   | Rev ish enh (1q23q42, 3p24p25, 19q13.1), dim (11q23qter, 12q24, 13q11q14, 13q32qter, 16q, 17, 18p11, 20p13) |
| 3.  | 281/93            | Φαγεσωρικό + DCIS | 3,2,3 | 0    | Rev ish enh (1q23q32, 5p14p15, 6q22, 8q21q24.1, 20q11qter) dim(8p23, 18q23)                                 |
|     | 282/93            |                   | --    | --   | Rev ish enh (20q11qter) dim(18q23)  |
| 4.  | K001<br>Λ001      | Πορογενές         | 2     | 3    | 0   |
| 5.  | K002<br>Λ002      | Πορογενές         | 1     | 2    | Rev ish enh (22q13)   |
|     |                   |                   |       | 0    | 0   |

**ΠΙΝΑΚΑΣ 22. ΕΚΦΡΑΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΕ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ  
ΟΓΚΟΥΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΙΣ**

A.

| Παράμετρος        | Πρωτογενής όγκος | Μεταστατικός όγκος - λεμφαδένας | P συνολικού πληθυσμού | P / ζεύγος |
|-------------------|------------------|---------------------------------|-----------------------|------------|
| <i>PCNA</i>       | 2,64<br>N=15     | 3,96<br>N=15                    | 0,422                 | 0,109      |
| <i>Τελομεράση</i> | 1072,50<br>N=15  | 1183,66<br>N=15                 | 0,613                 | 0,797      |
| <i>Πολυμεράση</i> | 5,37<br>N=15     | 13,72<br>N=15                   | 0,137                 | 0,012      |
| <i>c-erbB2</i>    | 6,16<br>N=11     | 7,11<br>N=11                    | 0,170                 | 0,564      |

B. Έκφραση του *FHIT*

|                          | Αριθμός δειγμάτων |                                 | P     |
|--------------------------|-------------------|---------------------------------|-------|
|                          | Πρωτογενής όγκος  | Μεταστατικός όγκος - λεμφαδένας |       |
| <i>FHIT</i> μειωμένο     | 4                 | -                               | 0,015 |
| <i>FHIT</i> αυξημένο     | 4                 | 1                               |       |
| <i>FHIT</i> οπεραοξημένο | -                 | 3                               |       |



**ΠΙΝΑΚΑΣ 23. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *RhoC***

**Α. Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *RhoC* στο συνολικό πληθυσμό και σύγκριση ανάμεσα σε πορογενή διηθητικά μη ειδικού τύπου και φαγεσωρικά καρκινώματα**

| <b>Πληθυσμός</b>                    | <b>Απουσία <i>RhoC</i></b> | <b>Υπερέκφραση <i>RhoC</i></b> | <b>P</b> |
|-------------------------------------|----------------------------|--------------------------------|----------|
| Συνολικός πληθυσμός                 | 19                         | 22                             |          |
| Πορογενή διηθητικά μη ειδικού τύπου | 2                          | 8                              | 0,050    |
| Φαγεσωρικά καρκινώματα              | 14                         | 7                              |          |

**Β. Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *RhoC* σε σχέση με άλλες βιολογικές παραμέτρους**

| <b>Παράμετρος</b> | <b>Απουσία <i>RhoC</i></b> | <b>Υπερέκφραση <i>RhoC</i></b> | <b>P</b> |
|-------------------|----------------------------|--------------------------------|----------|
| <i>PCNA</i>       | 3,67<br>N=18               | 4,32<br>N=14                   | 0,548    |
| <i>ErbB2</i>      | 12,2<br>N=5                | 8,3<br>N=6                     | 0,042    |
| Πολυμεράση        | 9,4<br>N=19                | 21,43<br>N=14                  | 0,029    |
| Τελομεράση        | 1153,45<br>N=19            | 1220,96<br>N=14                | 0,743    |

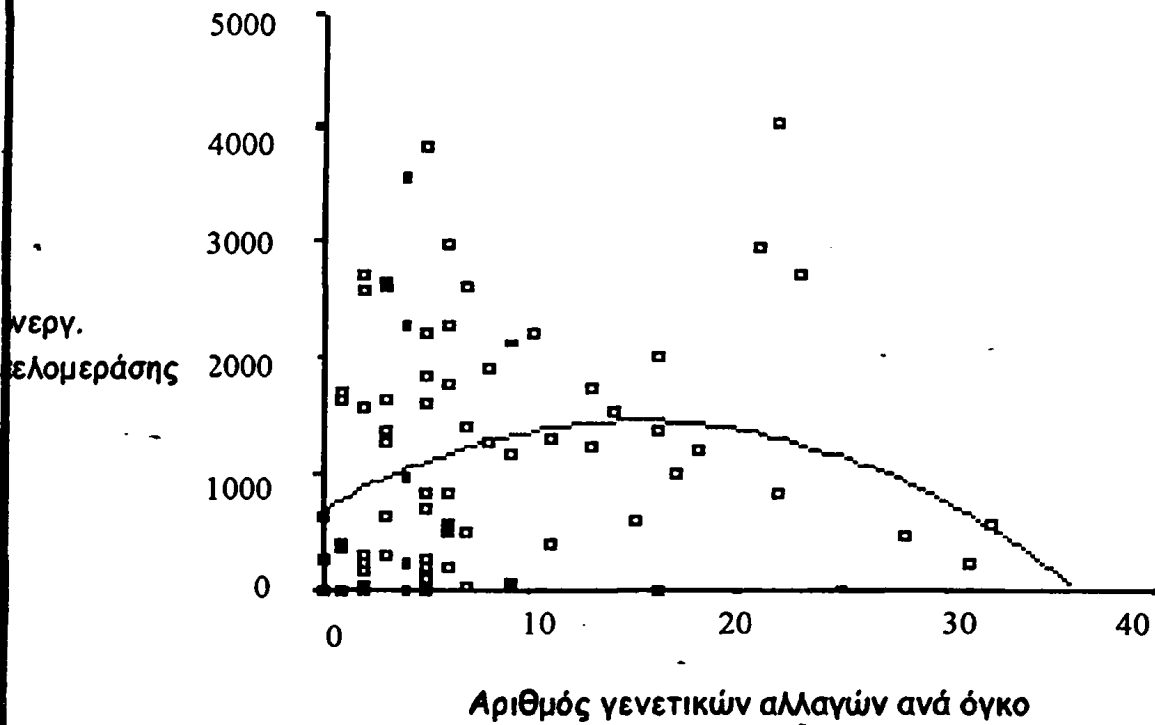


**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ**  
**ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ**





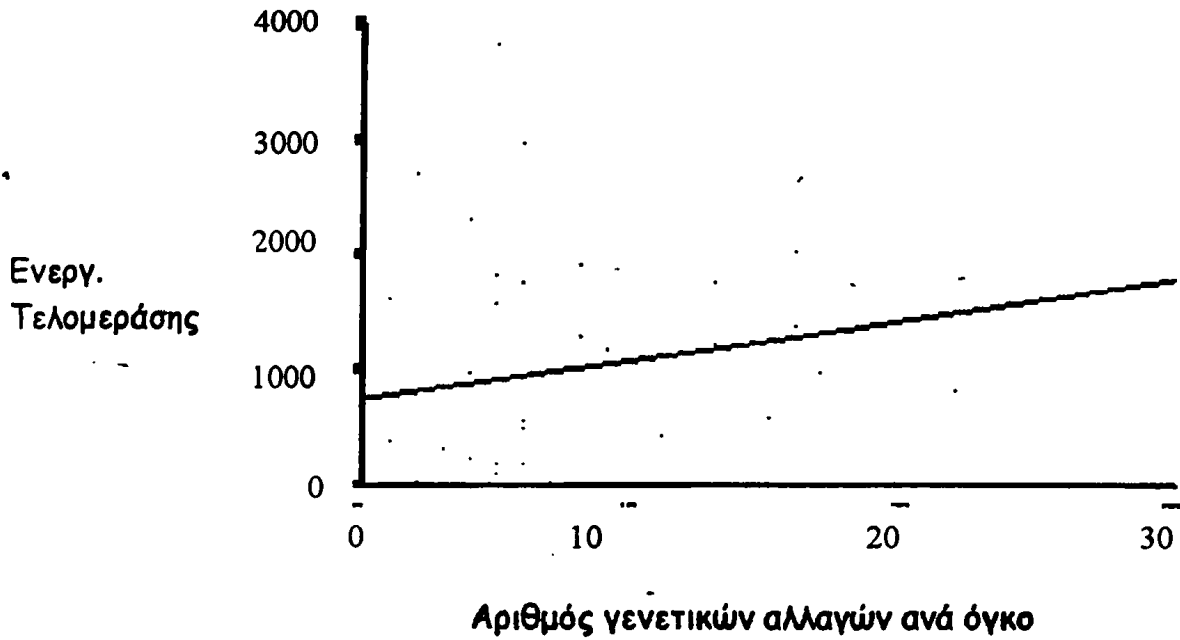
**ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1Α: ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΩΜΑΛΙΩΝ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ ΣΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΤΩΝ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΕΞΕΤΑΣΤΗΚΑΝ**



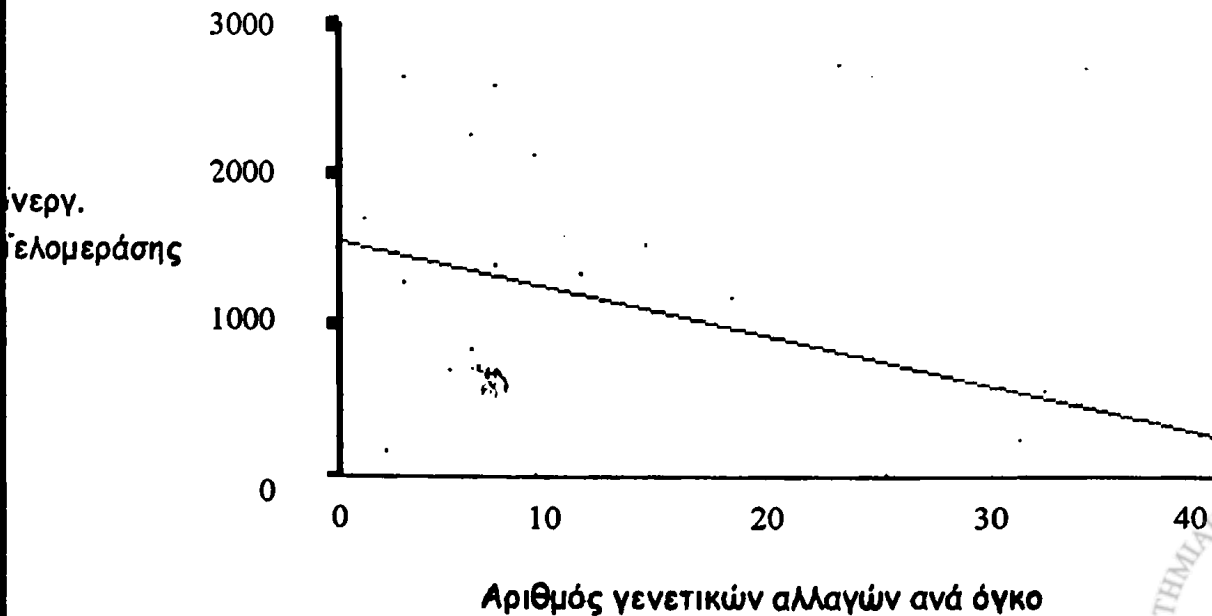
**ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1Β: ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΑΝΩΜΑΛΙΩΝ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΠΟΥ ΣΗΜΕΙΩΘΗΚΑΝ ΛΙΓΕΣ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ (<8)**



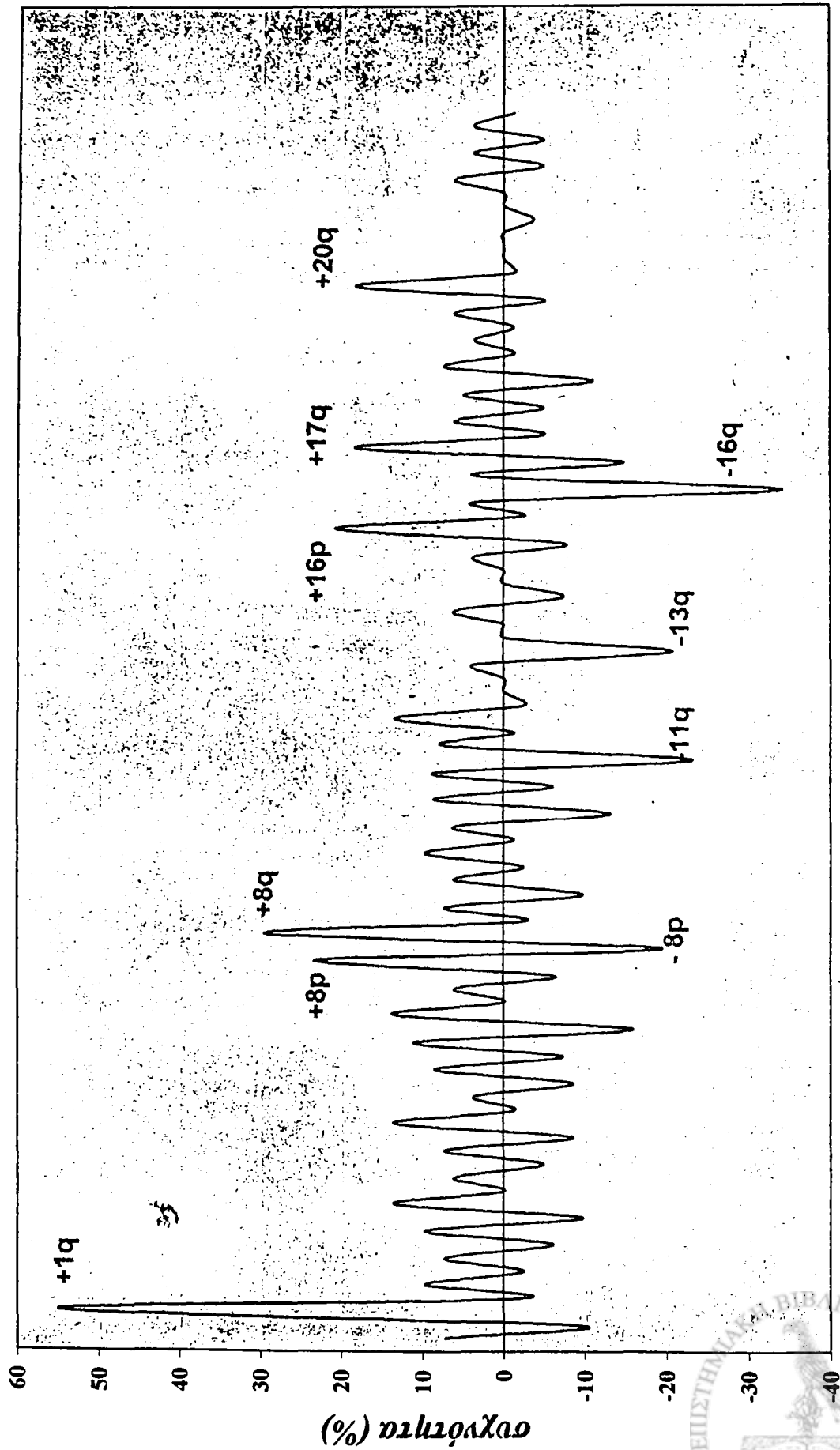
**Διάγρ. 2α: ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΟΛΥΠΛΟΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΠΟΡΟΓΕΝΗ ΔΙΗΘΗΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΜΗ ΕΙΔΙΚΟΥ ΤΥΠΟΥ**



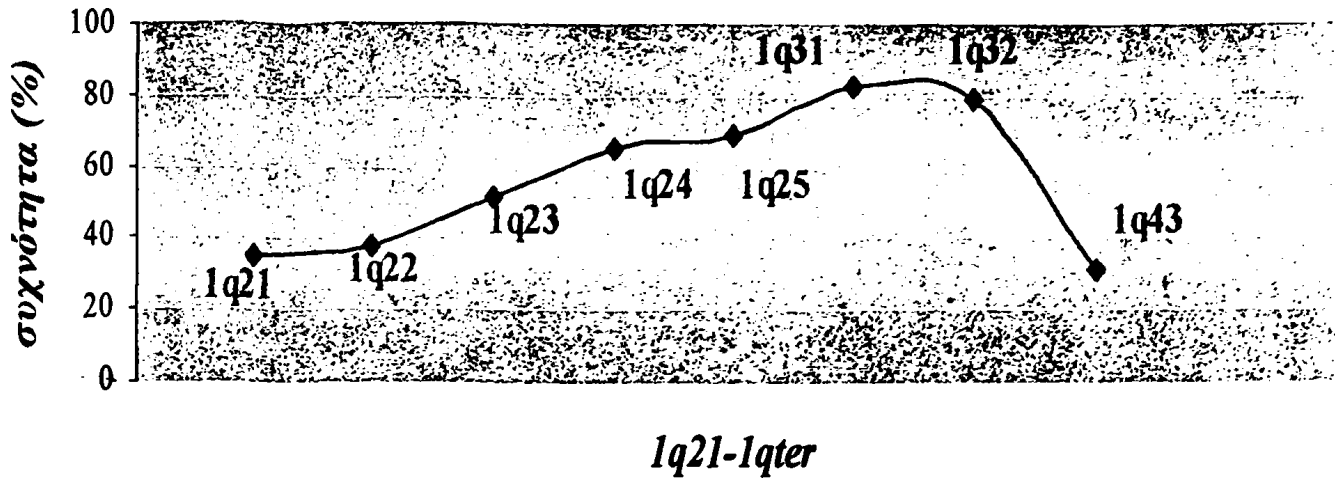
**Διάγρ. 2β: ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΟΛΥΠΛΟΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΦΑΓΕΣΩΡΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ**



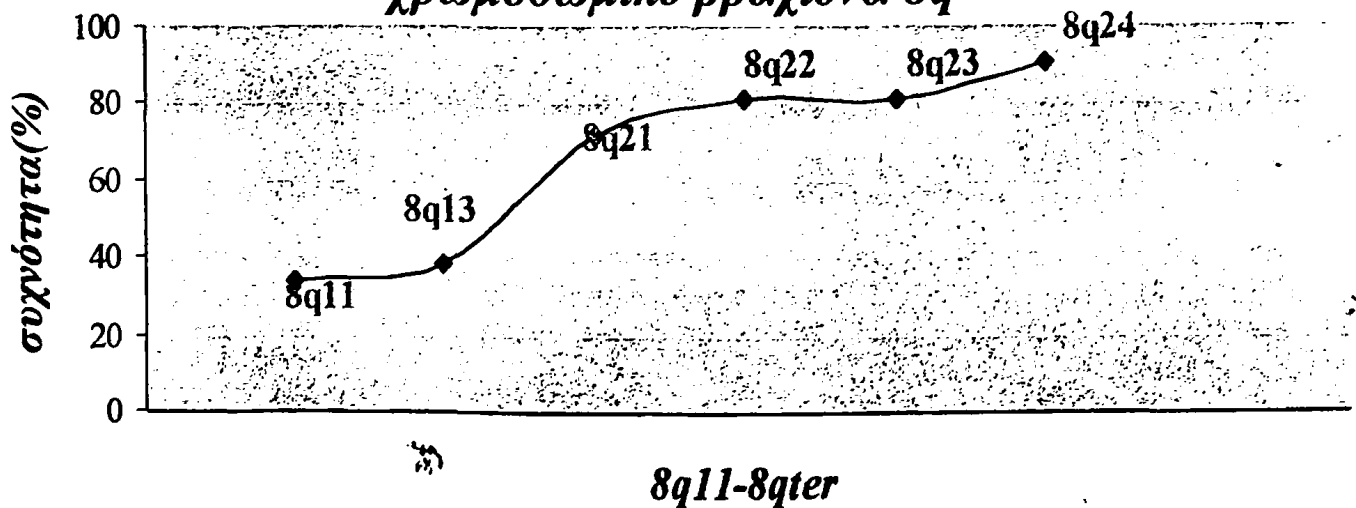
Διαγρ.3: Γενετικές ανακατατάξεις στο σύνολο των δειγμάτων που εξετάστηκαν



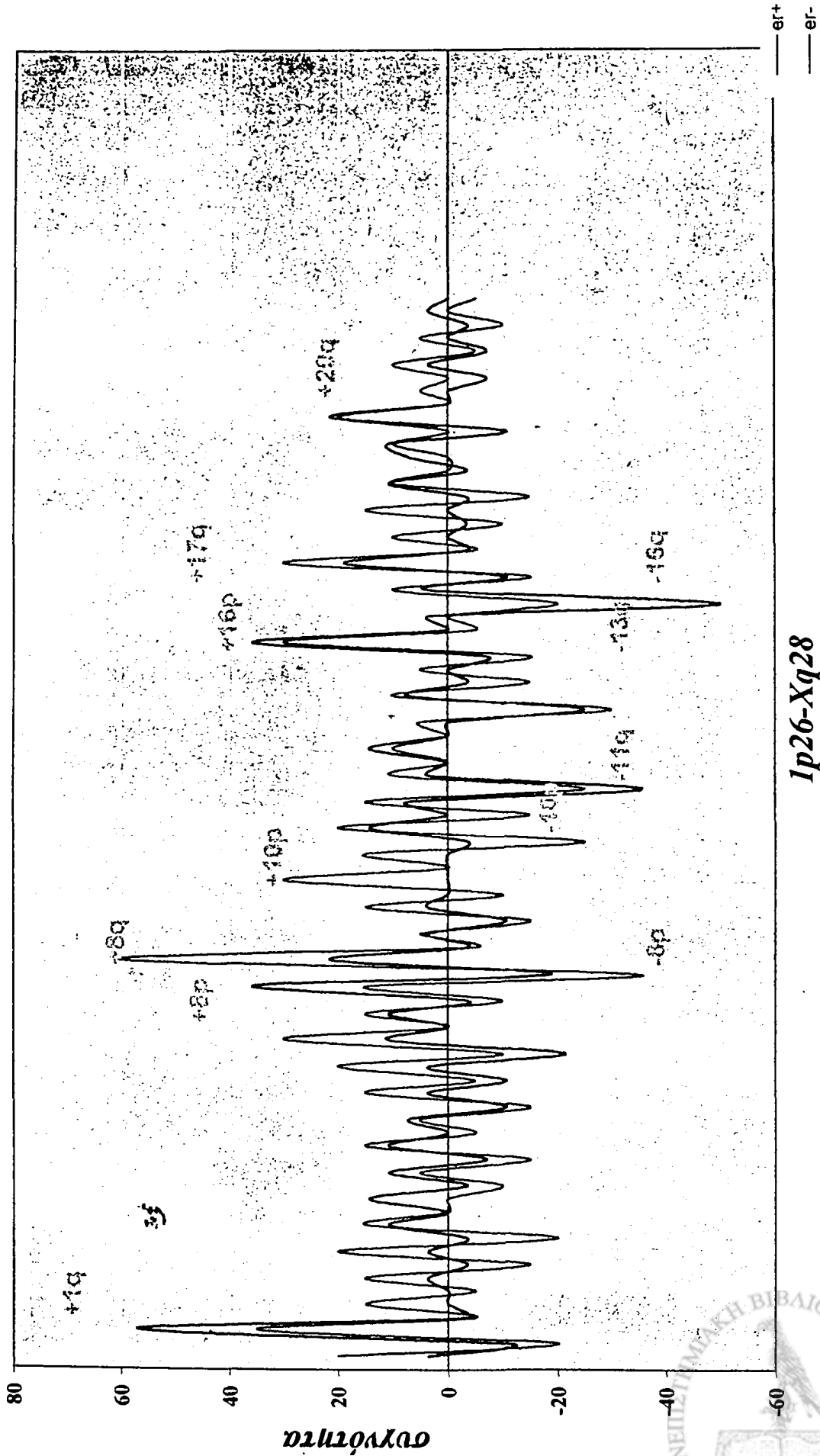
Διαγρ.4α: Συχνότερες θέσεις γονιδιακής ενίσχυσης στο  
χρωμοσωμικό βραχίονα 1q



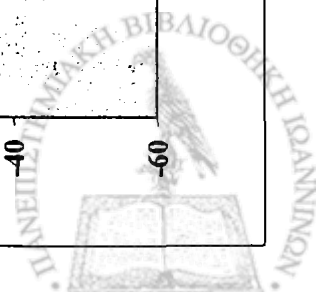
Διάγρ.4β: Συχνότερες θέσεις γονιδιακής ενίσχυσης στο  
χρωμοσωμικό βραχίονα 8q



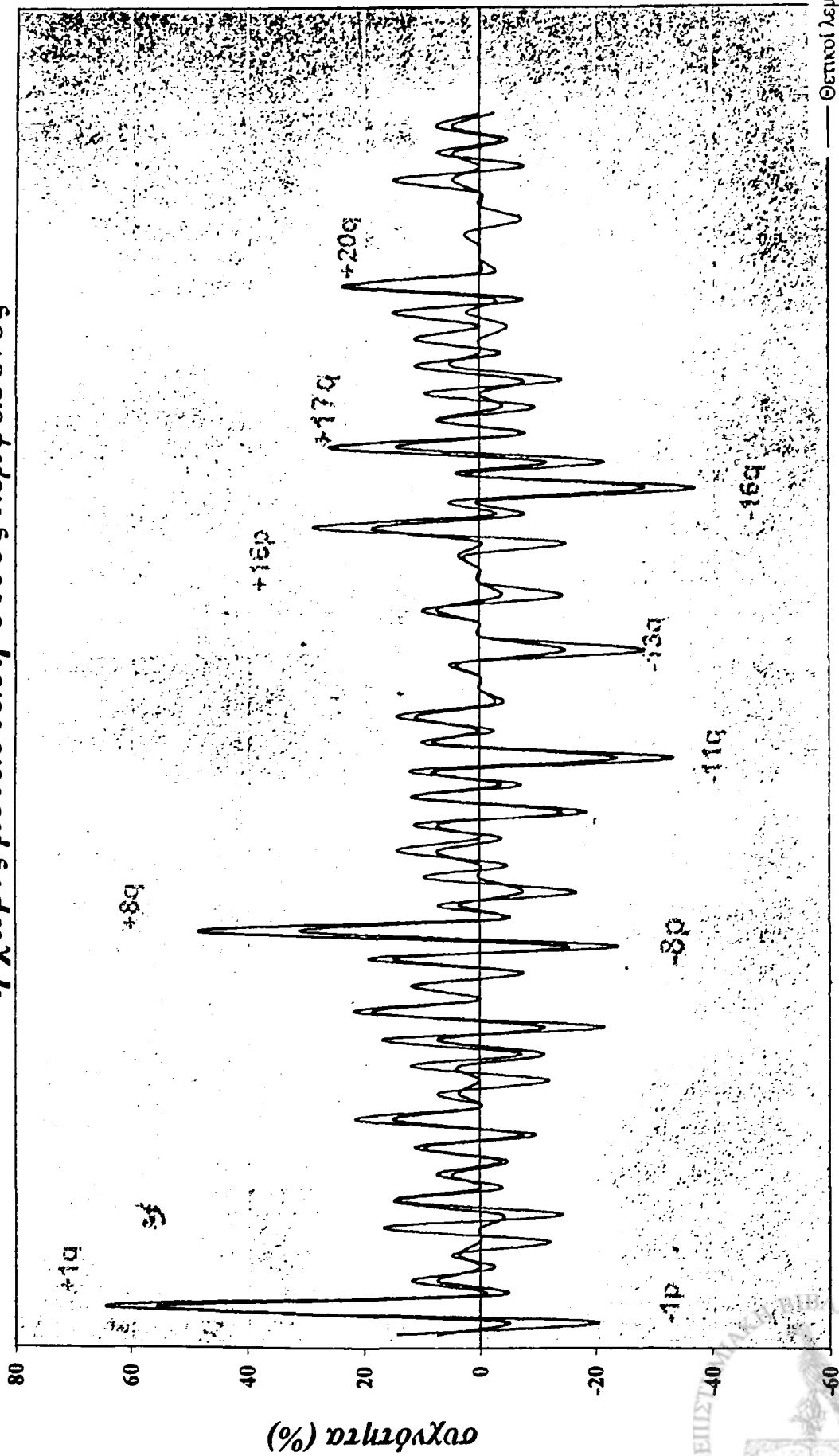
Διαγρ. 5: Γενετικές ανακατατάξεις και υποδοχείς οιστρογόνων σε πρωτογενείς όγκους μαστού



1p26-Xq28



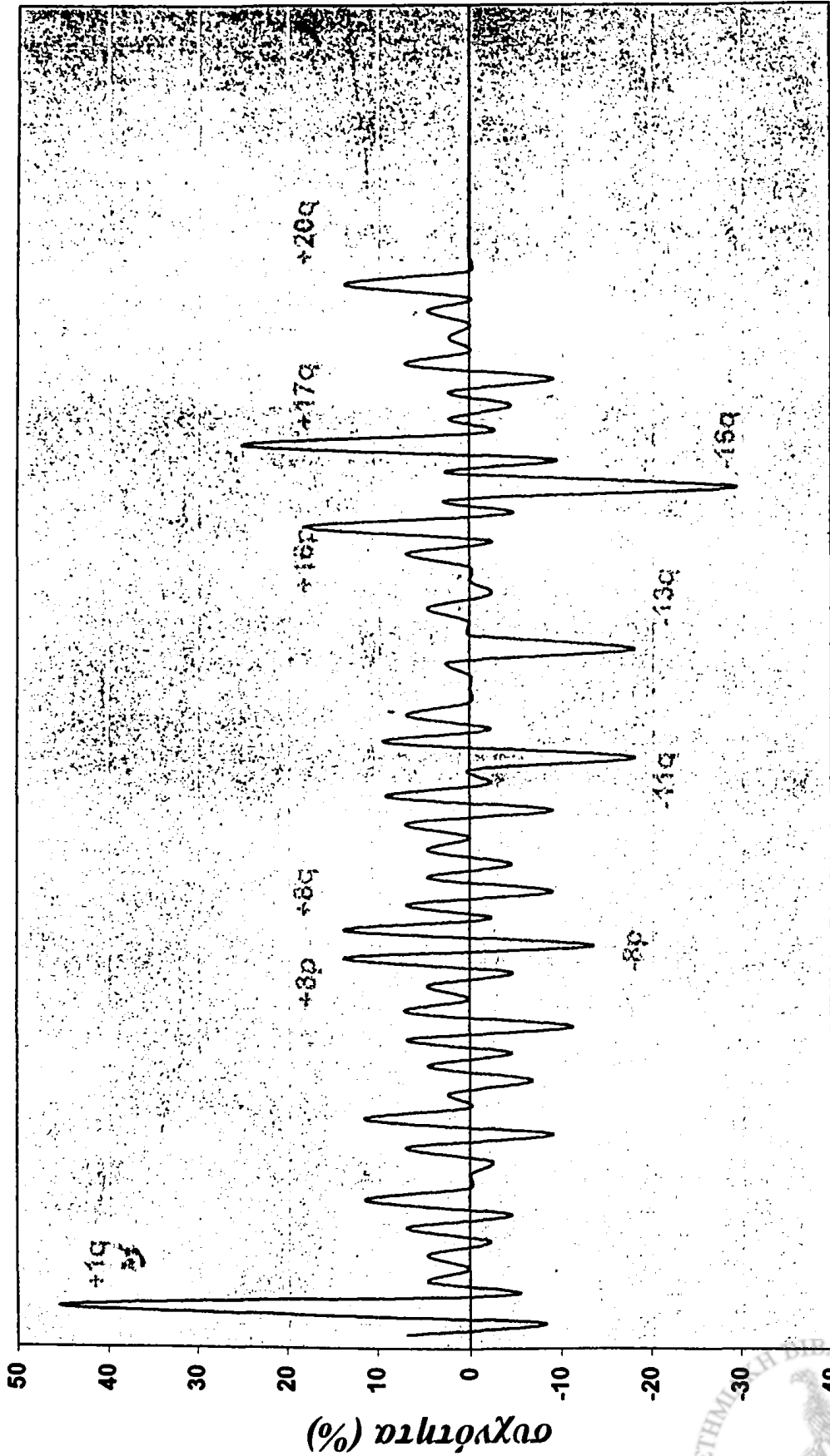
Διαγρ. 6: Γενετικές ανακατατάξεις σε πρωτογενείς όγκους μαστού με ή χωρίς μετάσταση στους λεμφαδένες



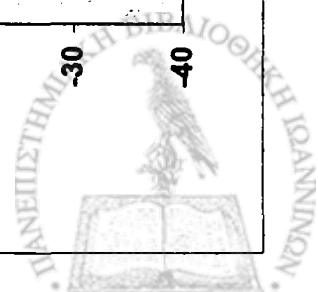
Ip36-Xq28



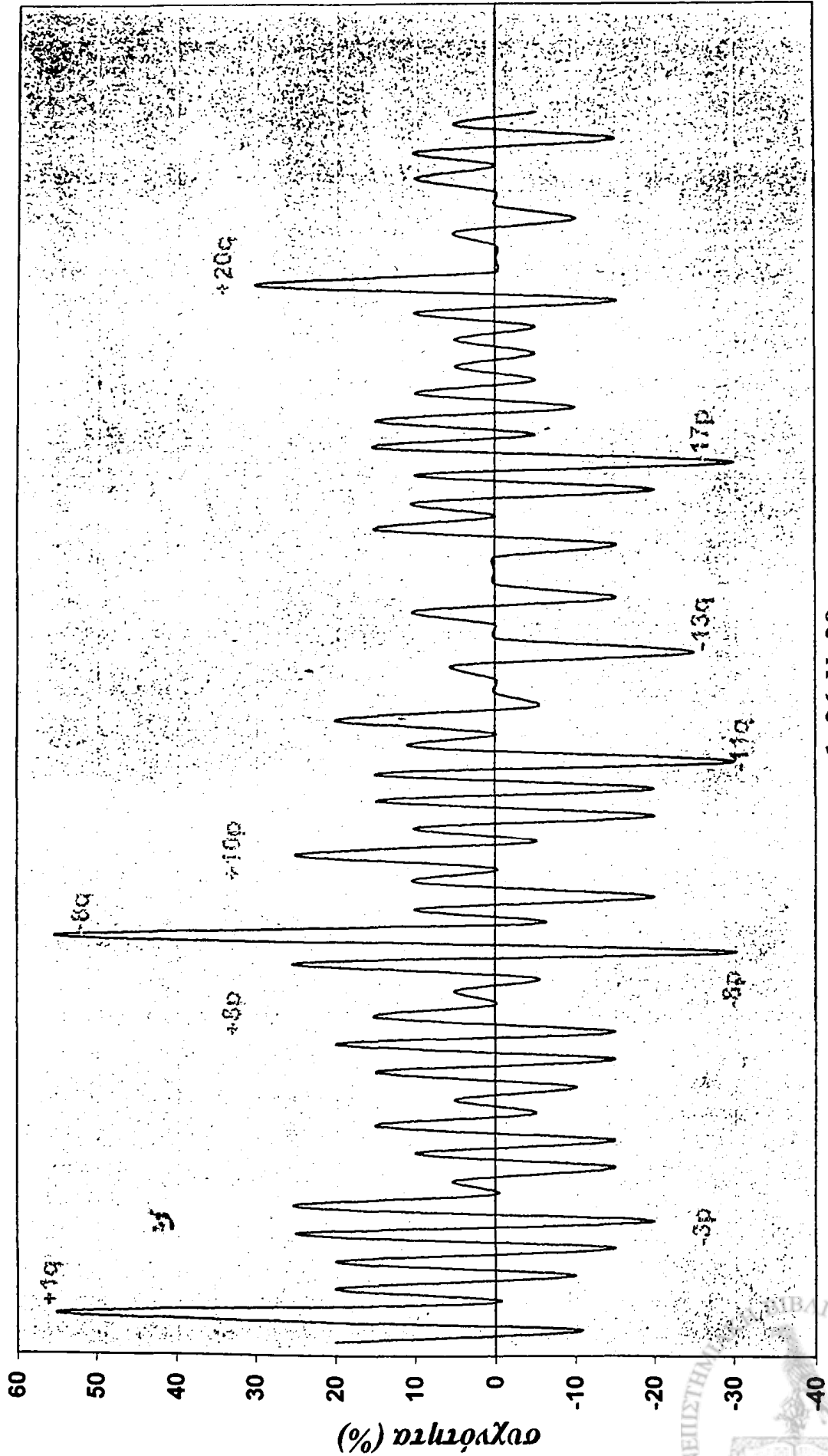
Διάγρ. 7: Γενετικές ανακατατάξεις στα πορογενή διηθητικά καρκινώματα μη ειδικού τύπου



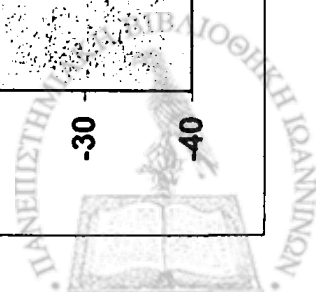
Ip26-Xq28



Διάγρ. 8: Γενετικές ανακατατάξεις σε φαρεσωρικά καρκινώματα του μαστού

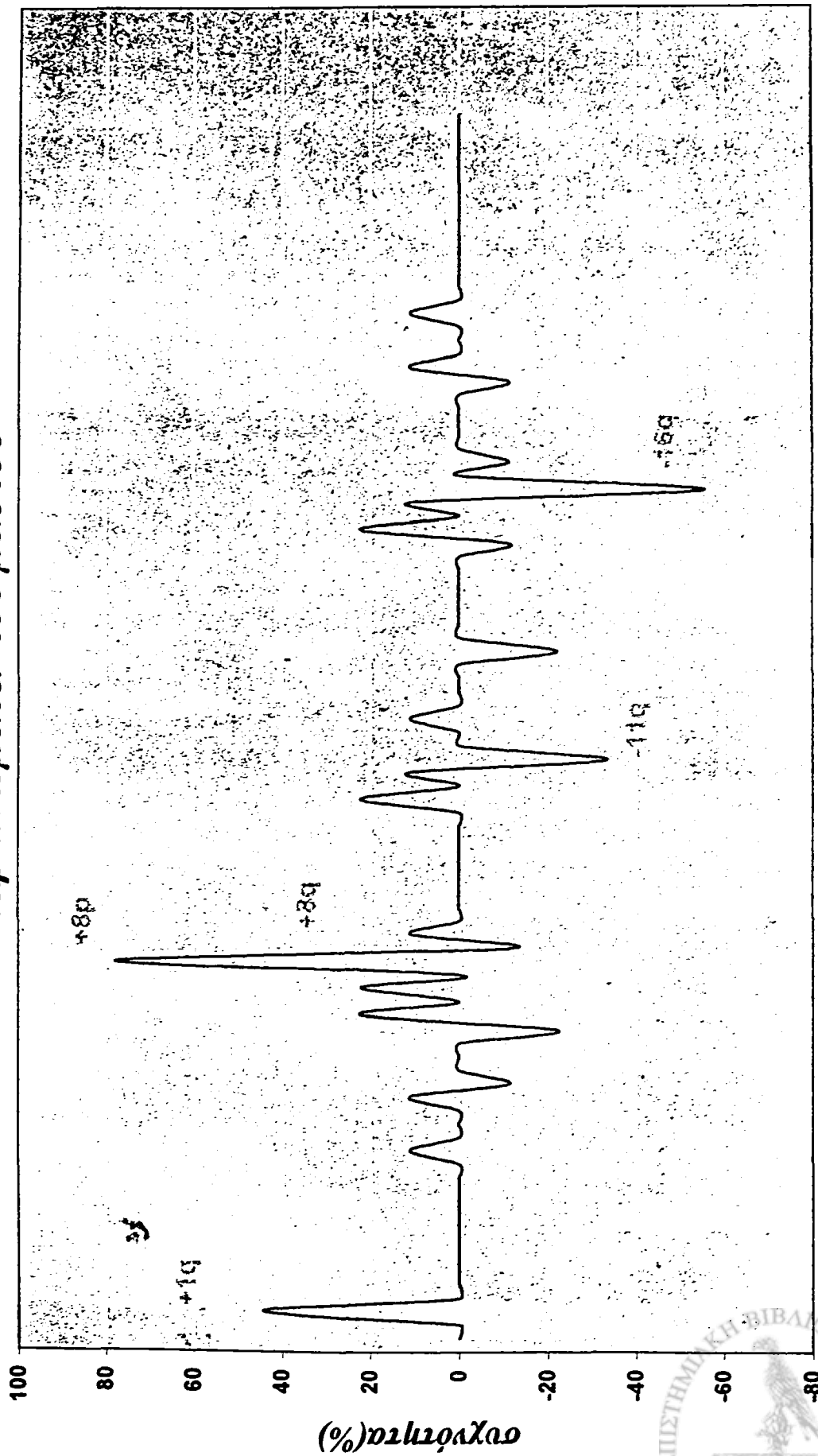


Ip26-Xq28

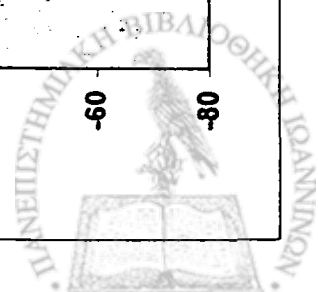




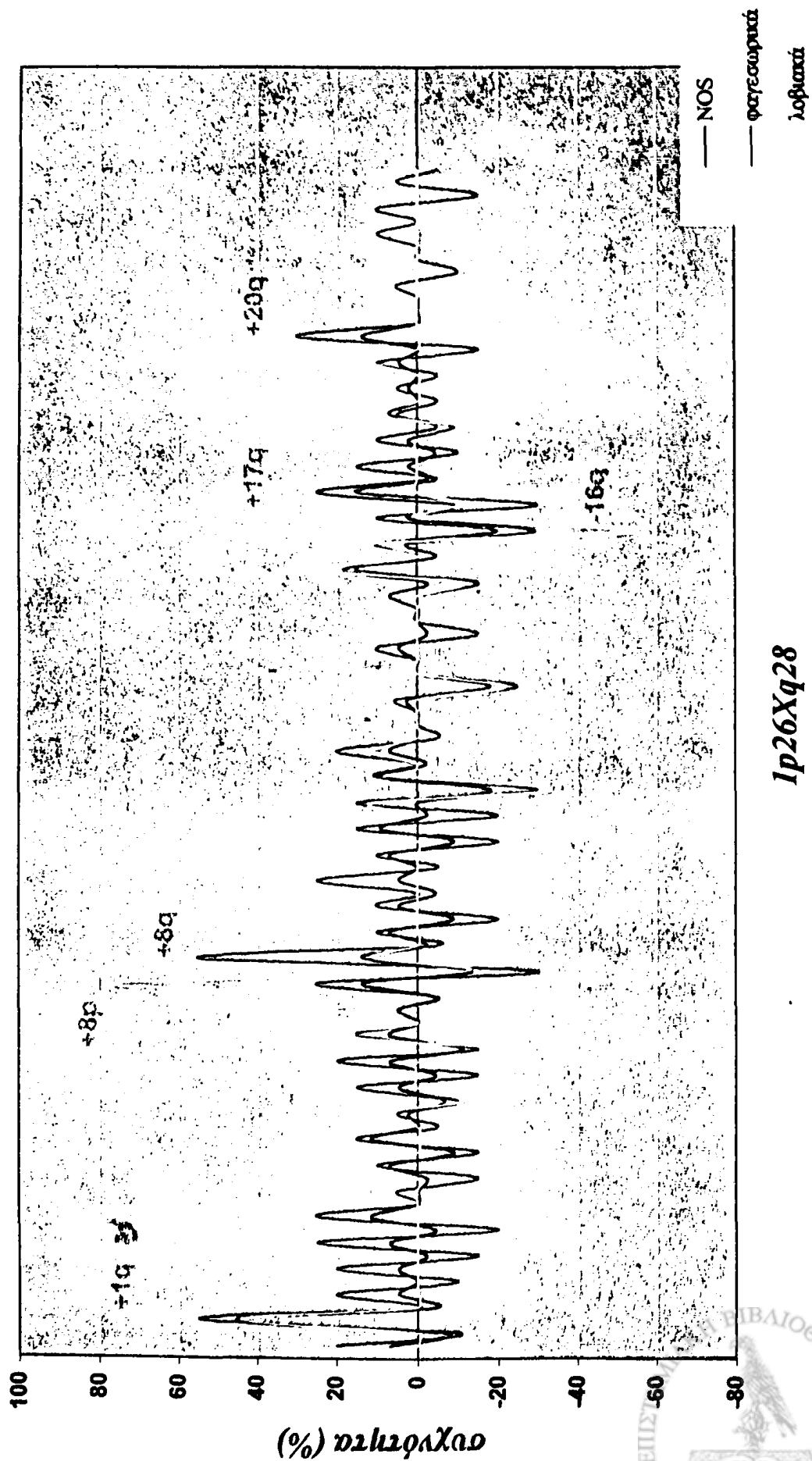
Διαγρ.9: Γενετικές ανακατατάξεις σε λοβιακά διηθητικά  
καρκινώματα του μαστού



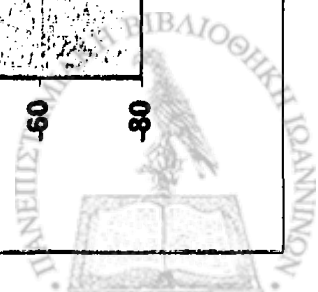
Ip26-Xq28



Διάγρ. 10: Γενετικές ανακατατάξεις στους διάφορους ιστολογικούς τύπους



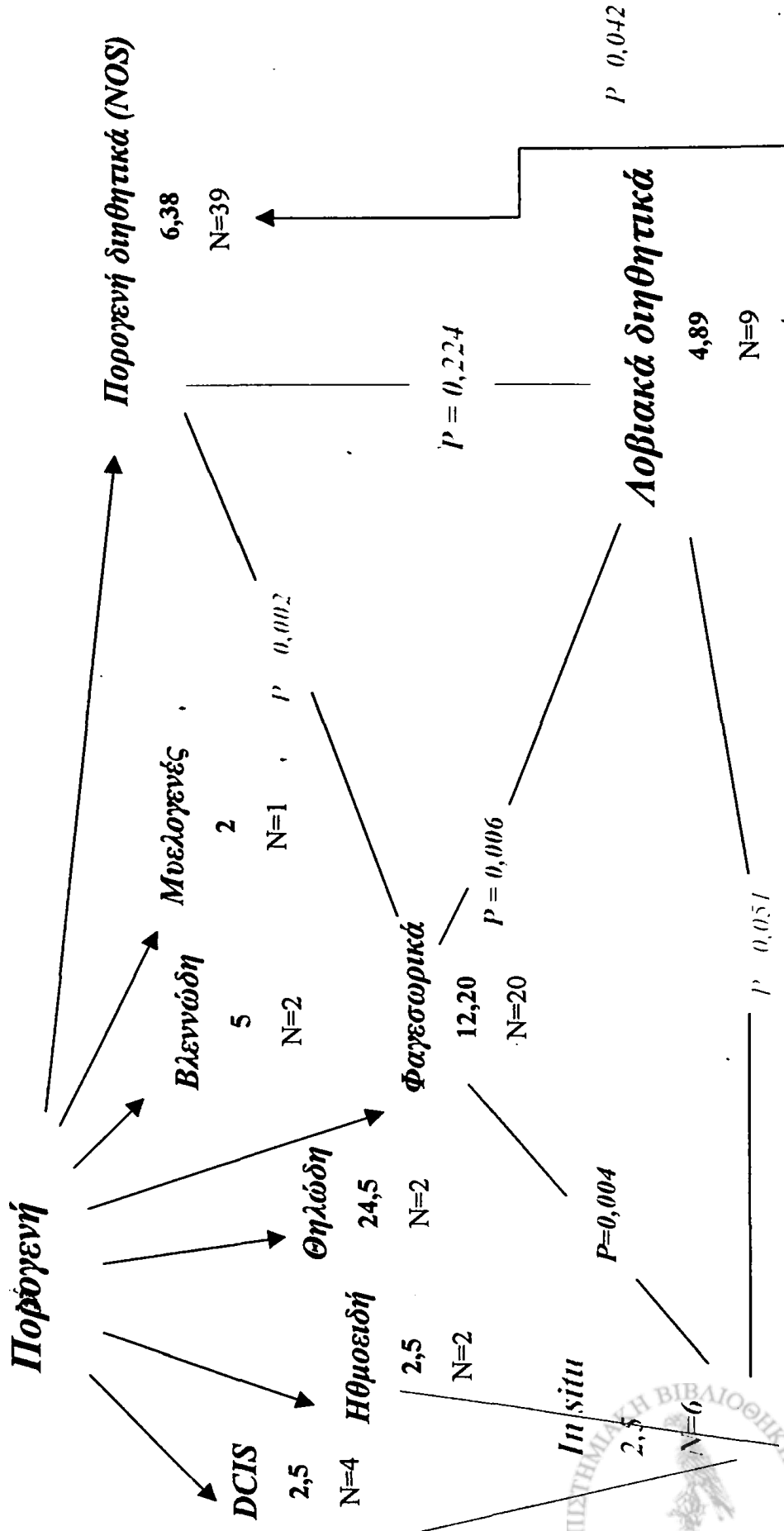
Ip26Xq28



**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ**  
**ΕΙΚΟΝΕΣ & ΣΧΗΜΑΤΑ**



**Σχήμα 1: ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΟΛΥΠΛΑΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΤΥΠΟΙ ΟΓΚΩΝ ΜΑΣΤΟΥ**



**ΕΙΚΟΝΑ 3 . ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΟΣΟΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ  
FHIT**



K1    Π1    Φ2    K2    Π2    Φ3    K3    Λ3

1,2,3: δείγματα που εξετάστηκαν  
Κ: κακοήθης όγκος  
Π: παρακείμενος ιστός  
Φ: φυσιολογικός ιστός  
Λ: λεμφαδένας

