



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**«Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ OCT-4 ΚΑΙ DAZL ΣΤΙΣ
ΚΑΛΟΗΘΕΙΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΣΕ
ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ»**

**ΠΛΑΚΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΜΑΙΕΥΤΗΡΑΣ-ΧΕΙΡΟΥΡΓΟΣ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2023

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Ημερομηνία αίτησης του κ. Πλάκα Γεώργιου: 30-11-2011

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 725α/06-12-2011

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Ναυρόζογλου Ιορδάνης, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στη Γυναικολογική Ογκολογία

Μέλη:

Στέφος Θεόδωρος, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Εμβρυομητρική Ιατρική
Στεφανίδης Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του ΕΚΠΑ

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 20-12-2011

«Η έκφραση του OCT-4 και DAZL στις καλοήθειες παθήσεις του μαστού και σε καρκίνο του μαστού»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 1033^α/15-11-2022

1. Ναυρόζογλου Ιορδάνης, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στη Γυναικολογική Ογκολογία και Παθολογία του Μαστού του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Στέφος Θεόδωρος, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στη Εμβρυομητρική Ιατρική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Στεφανίδης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας-Αναπαραγωγικής-Αναγεννητικής Ιατρικής του Τμήματος Ιατρικής του ΕΚΠΑ
4. Πασχόπουλος Μηνάς, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Παρασκευαΐδης Ευάγγελος, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Μπαλτογιάννης Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Ουρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 25-04-2023

Ιωάννινα 06-06-2023

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Σπυρίδων Κονιτσιώτης

Καθηγητής Νευρολογίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΣΟΠΟΥΛΟΥ

Στη Μιχαέλα

Στους γιους μας, Νικόλα και Θεμιστοκλή

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση μιας διδακτορικής διατριβής αποτελεί ένα απαιτητικό έργο, το οποίο βέβαια προσφέρει πολλά νέα δεδομένα προς τη γνώση και την έρευνα. Η ενασχόληση με τις καλοήθειες παθήσεις και τον καρκίνο του μαστού είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς καταγράφονται συνεχώς νέα περιστατικά παγκοσμίως και είναι αναγκαίο να βρεθούν νέοι τρόποι πρόγνωσης και πιο έγκαιρης διάγνωσης με απώτερο στόχο την καλύτερη αντιμετώπιση και κλινική πορεία της νόσου στις γυναίκες.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Παθολογοανατομικό εργαστήριο του Μητροπολίτικου Θεραπευτηρίου ΠΕΡΣΕΥΣ, Metropolitan Hospital και στο εργαστήριο Αναπαραγωγικής Βιολογίας και Αναγεννητικής Ιατρικής του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΣ», σε συνεργασία με το διαγνωστικό εργαστήριο "IATRORAMA" στην Αθήνα.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	7
<u>1.1 Μαστός</u>	9
1.1.1 Εμβρυολογία του μαστού	11
1.1.2 Εφηβεία και φυσιολογική ανάπτυξη μαστού	13
1.1.2.1 Ανατομία του μαστού	15
1.1.2.2 Ιστολογία του μαστού	16
1.1.2.3 Φυσιολογία του μαστού – Ορμόνες	17
1.1.2.4 Αιμάτωση του μαστού	19
1.1.2.5 Νεύρωση του μαστού	20
1.1.2.6 Μύες του μαστού	21
1.1.3 Αναπαραγωγικά χρόνια και μαστός	21
1.1.4 Αύξηση του μαστού κατά την κύηση και την γαλουχία	22
1.1.5 Μετεμμηνοπαυσιακός μαστός	24
<u>1.2 Καλοήθειες παθήσεις του μαστού</u>	25
1.2.1 Επιδημιολογικά στοιχεία	27
1.2.2 Διάγνωση	27
1.2.3 Ταξινόμηση	28
1.2.4 Διάκριση καλοηθών και κακοηθών παθήσεων του μαστού	31
<u>1.3 Καρκίνος του μαστού</u>	33
1.3.1. Επιδημιολογικά στοιχεία	35
1.3.2 Παράγοντες κινδύνου	37
1.3.3 Μηχανισμοί καρκινογένεσης στο μαστό	40
1.3.4 Διάγνωση	41
1.3.5 Ιστολογική ταξινόμηση	45
1.3.6 Σταδιοποίηση	46
1.3.7 Προγνωστικοί παράγοντες	48
1.3.8 Θεραπεία	50
1.3.9 Καρκίνος μαστού στους άνδρες	52
<u>1.4 Oct-4</u>	55
1.4.1 Η οικογένεια POU	57
1.4.2 Η δομή του γονιδίου Oct-4	58
1.4.3 Ο ρόλος και η έκφραση της πρωτεΐνης Oct-4	60
1.4.4 Oct-4 και καρκίνος	65

<u>1.5 Dazl</u>	69
1.5.1 Η οικογένεια DAZ και η εξέλιξη των γονιδίων της	71
1.5.2 Η δομή του γονιδίου Dazl	73
1.5.3 Ο ρόλος και η έκφραση της πρωτεΐνης Dazl	75
1.5.4 DAZL και καρκίνος	81
<u>1.6 Amh</u>	85
1.6.1 Η οικογένεια TGF-β	87
1.6.2 Η δομή του γονιδίου Amh	89
1.6.3 Ο ρόλος και η έκφραση της πρωτεΐνης Amh	91
1.6.4 AMH και καρκίνος	97
2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	101
<u>2.1 Σκοπός της εργασίας</u>	103
<u>2.2 Βιολογικό υλικό</u>	107
<u>2.3 Ανοσοϊστοχημεία</u>	111
2.3.1 Αρχή μεθόδου	113
2.3.2 Οργανολογία	117
2.3.3 Πειραματική πορεία	118
<u>2.4 Απομόνωση ολικού RNA με τη χρήση ειδικών στηλών</u>	121
2.4.1 Αρχή μεθόδου	123
2.4.2 Αντιδραστήρια – Διαλύματα - Αναλώσιμα	123
2.4.3 Πειραματική πορεία	124
<u>2.5 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA</u>	125
2.5.1 Αρχή μεθόδου	127
2.5.2 Αντιδραστήρια – Διαλύματα - Αναλώσιμα	127
2.5.3 Πειραματική πορεία	127
<u>2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-time PCR)</u>	129
2.6.1 Ιστορική αναδρομή της Αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης PCR και αρχή μεθόδου	131
2.6.2 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-time qPCR), Αρχή της μεθόδου	133
2.6.3 Οργανολογία	137
2.6.4 Αντιδραστήρια - Διαλύματα - Αναλώσιμα	138
2.6.5 Πειραματική πορεία	138

<u>2.7 Ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA</u>	141
2.7.1 Αρχή μεθόδου	143
2.7.2 Οργανολογία	146
2.7.3 Αντιδραστήρια - Διαλύματα - Αναλώσιμα	148
2.7.4 Πειραματική πορεία	148
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	151
<u>3.1 Ανοσοϊστοχημείας</u>	153
<u>3.2 Ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο</u>	161
<u>3.3 Ανοσοδοκιμασίας ELISA</u>	167
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	171
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	187
6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	191
7. SUMMARY	195
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	199

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. ΜΑΣΤΟΣ

1.1.1 Εμβρυολογία του μαστού

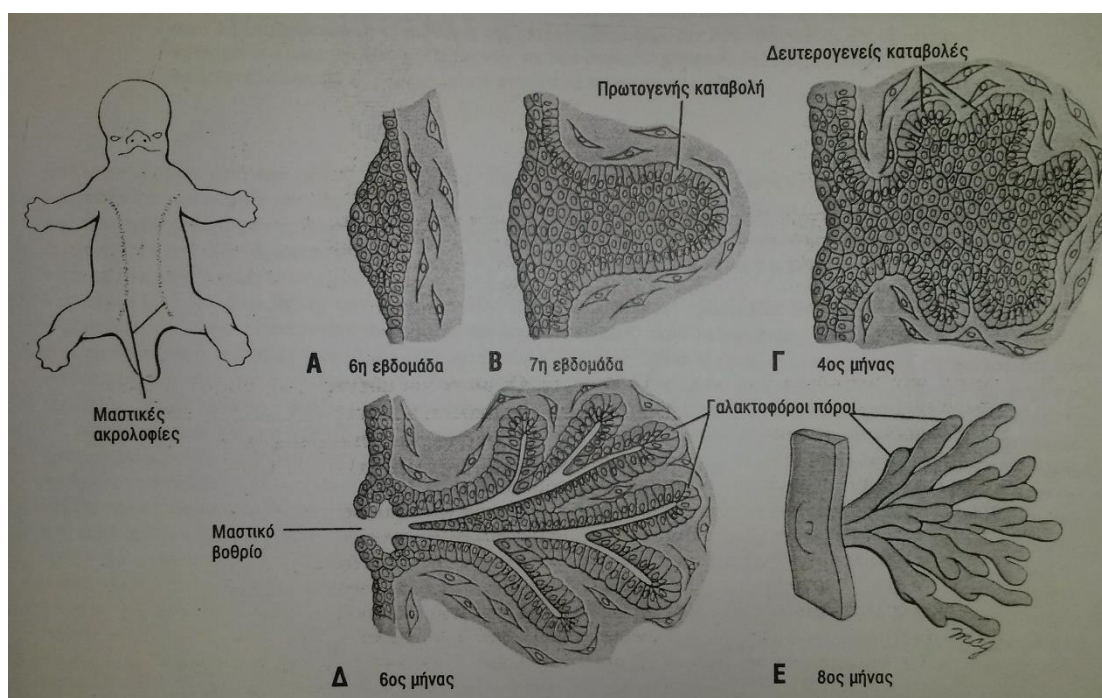
Ο μαστικοί αδένες είναι τροποποιημένοι αποκρινείς αδένες που προέρχονται από το εκτόδερμα και εμφανίζονται ήδη από την 4^η εβδομάδα της εμβρυϊκής ζωής με τη μορφή των γαλακτικών γραμμών ή ταινιών. Οι γαλακτικές γραμμές αναπτύσσονται κατά μήκος των αμφοτέρων πλευρών του σώματος, από την περιοχή της μελλοντικής μασχαλιαίας χώρας μέχρι τη μελλοντική βουβωνική χώρα και την έσω επιφάνεια του μηρού. Στον άνθρωπο, οι γαλακτικές γραμμές, στην περιοχή του θώρακα, παχύνουν και σχηματίζουν ένα ζεύγος επιδερμικών επαρμάτων, που ονομάζονται μαστικές ακρολοφίες, ενώ στην υπόλοιπη περιοχή εξαφανίζονται (7^η-8^η εβδομάδα).

Τις επόμενες εβδομάδες της εμβρυϊκής ζωής, οι μαστικές ακρολοφίες καταδύονται στο μεσέγχυμα του θωρακικού τοιχώματος και ατροφούν τα δυο τρίτα αυτών. Κατά την 15^η εβδομάδα υπό την επίδραση της τεστοστερόνης, το μεσέγχυμα του θωρακικού τοιχώματος συμπυκνώνεται γύρω από τον καταδύόμενο επιθηλιακό άξονα, με συνέπεια την υποδόρια απομόνωση του και την παρεμπόδιση ανάπτυξης πόρων και κυψελίδων. Στη συνέχεια, δημιουργούνται συμπαγείς επιθηλιακές χορδές εντός του μεσεγγύματος, οι οποίες διακλαδίζονται και σχηματίζουν 15 με 25 επιθηλιακές νησίδες, τους μελλοντικούς γαλακτοφόρους εκφορητικούς πόρους. Αυτοί περιβάλλονται από δύο επίπεδα κυβοειδών κυττάρων, ένα έσω εκκριτικό επίπεδο και ένα εξωτερικό που παρουσιάζει το μυοεπιθήλιο. Υπό την επίδραση ενός τοπικού ανασταλτικού παράγοντα παρεμποδίζεται η ανάπτυξη του ενός πόρου κοντά στον άλλο, εξασφαλίζοντας ικανό χώρο για την μετέπειτα ανάπτυξη των κυψελίδων. Στο χρονικό διάστημα 20^{ης} με 32^{ης} εβδομάδας εμβρυϊκής ζωής το μεσέγχυμα στο γύρω στρώμα διαφοροποιείται προς λιπώδη και συνδετικό ιστό και στην 31^η με 32^η εβδομάδα οι πόροι αποκτούν αυλό.

Παράλληλα με την ανάπτυξη των γαλακτικών πόρων κατά την όψιμη εμβρυϊκή περίοδο συμβαίνει και η διαφοροποίηση της θηλής και θηλαίας άλω. Ήδη από την 12^η εβδομάδα εμβρυϊκής ζωής, η επιδερμίδα από το σημείο δημιουργίας του μαστικού αδένος καταδύεται σχηματίζοντας ένα αβαθές μαστικό βοθρίο, από το οποίο αργότερα δημιουργείται το σύμπλεγμα θηλής-θηλαίας άλως. Η θηλαία άλως διακρίνεται την 20^η με 24^η εβδομάδα, ενώ οι θηλές είναι ελλειπώς σχηματισμένες στα νεογέννητα και εμφανίζονται στην περιγεννητική περίοδο. Τότε, ανυψώνονται από τα μαστικά βοθρία λόγω του πολλαπλασιασμού του συνδετικού ιστού γύρω από την άλω.

Οι υποανάπτυκτοι μαστικοί αδένες των νεογνών είναι ίδιοι και στα δυο φύλα και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να παράγουν πύαρ, το αποκαλούμενο «γάλα μάγισσας». Αυτό εκκρίνεται κατά την 5^η με 6^η μέρα της ζωής και εκρέει από τη θηλή για διάστημα 4-7 ημερών. Η έκκριση αυτή υποστρέφει τις επόμενες 3-4 εβδομάδες μετά τη γέννηση και είναι συνέπεια των πλακουντιακών ορμονών του φύλου.

Γενικότερα, πιστεύεται ότι η εμβρυϊκή ανάπτυξη των μαστικών αδένων είναι προϊόν του μητρικού-πλακουντιακού ορμονικού περιβάλλοντος. Τοπικοί ορμονικοί παράγοντες επιδρούν στη μορφογένεση των μαστικών αδένων κυρίως τις τελευταίες εβδομάδες της εμβρυϊκής ζωής, ενώ μετά τον τοκετό επηρεάζονται από ορμόνες της υπόφυσης, των ωοθηκών και των επινεφριδίων. Στα τελειόμηνα νεογνά, φαίνεται ότι η έκκριση του γάλακτος ξεκινά κάποιες εβδομάδες μετά τον τοκετό, αρκετό χρόνο μετά την εξαφάνιση των μητρικών ορμονών. Αυτή την χρονική περίοδο, τα επίπεδα της προλακτίνης αυξάνουν, υποδηλώνοντας ότι η πρόωμη ανάπτυξη των μαστικών αδένων επηρεάζεται περισσότερο από την νεογνική προλακτίνη, παρά από τη μητρική ενδοκρινική δραστηριότητα.



Εικόνα 1. Η εμβρυϊκή ανάπτυξη των μαστών.

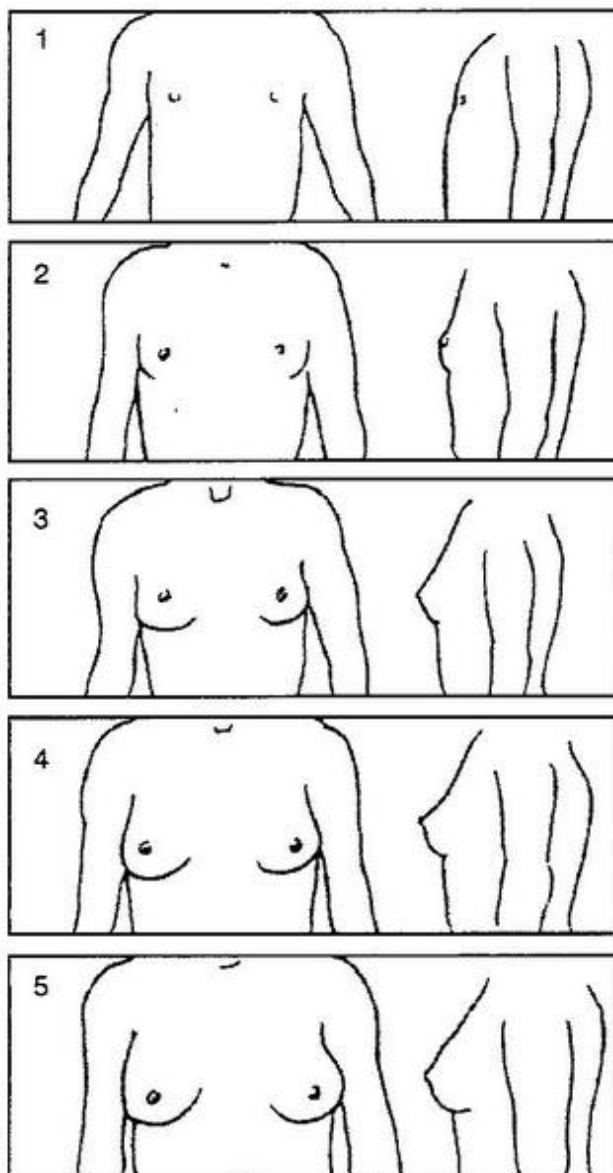
1.1.2 Εφηβεία και φυσιολογική ανάπτυξη μαστού

Καθώς πλησιάζει η εφηβεία, υπό την επίδραση των αυξανόμενων ποσών των ορμονών που εκκρίνονται από υποθάλαμο (GnRH), υπόφυση (γοναδοτροπίνες), ωοθήκες (φυλετικές ορμόνες) και επινεφρίδια, ο μαστός βγαίνει από την ανενεργό φάση και περνά σε μια νέα φάση ανάπτυξης παραμένοντας αδρανής και μη εκκρινόμενος. Η πρώτη ανάπτυξη του μαστού στα κορίτσια, η λεγόμενη θηλαρχή, εμφανίζεται στην αρχή της ήβης. Τελευταία, η έναρξη της χρονολογικά όλο και κατεβαίνει με μέσο όρο το 8^ο – 9^ο έτος ηλικίας. Στα αγόρια, οι γαλακτοφόροι πόροι παραμένουν υποανάπτυκτοι σε όλη τους τη ζωή.

Η πρώτη ένδειξη ανάπτυξης του μαστικού αδένα στην εφηβεία είναι μια πάχυνση των ιστών βαθιά της θηλής. Αυτή δεν παρατηρείται πάντα συγχρόνως και στους δυο μαστούς και κάποιες φορές συνοδεύεται από πόνο και σκλήρυνση του μαστού στα κορίτσια. Μέχρι την ηλικία των 15 ετών, έχει αναπτυχθεί το σύμπλεγμα θηλής-θηλαίας άλω, το οποίο διευρύνεται και χρωματίζεται, και ταυτόχρονα δημιουργείται κάτω από αυτό μια δισκοειδής μάζα από μαζικό ιστό. Από αυτόν τον μαζικό ιστό θα προκύψει ο προβαλλόμενος μαστός της ενήλικης γυναίκας. Όσο ο μαστός αυξάνεται γρήγορα, οι αρχικοί γαλακτικοί πόροι διακλαδίζονται και επιτελούν σωληνοποίηση των άκρων τους. Εν συνέπεια, το τέλος κάθε άκρου αποτελεί πλέον μια μικρή στερεά μάζα κυττάρων, η οποία στο μέλλον θα γίνει η ενεργής κυψελίδα του γαλουχούντα μαστού, σχηματίζοντας έτσι το σύστημα του μαζικού αδένα. Υπό την επιρροή της θυλακιοτρόπου και της ωχρινοτρόπου ορμόνης, η παραγωγή οιστρογόνων συμβάλλει στην περαιτέρω ανάπτυξη των πόρων, στην αύξηση του συνδετικού και λιπώδους ιστού και την αιμάτωση. Με την εναπόθεση του συνδετικού ιστού εντός των λοβίων δημιουργείται ο αυλός των κυψελίδων και έτσι σιγά σιγά διενεργείται η διαμερισματοποίηση του μαστού. Παρατηρείται ταυτόχρονα και συσσώρευση του ινώδους στρώματος και του λίπους που συνοδεύει τους μαστικούς αδένες. Εν τέλει με την παραγωγή της προγεστερόνης ολοκληρώνεται η ανάπτυξη των μαστικών λοβίων. Περίπου στην ηλικία των 20 ετών, εμφανίζεται η πλήρης ανάπτυξη του μαστού.

Η ανάπτυξη του μαστού ταξινομείται σε πέντε στάδια με βάση μια σταθερή μέθοδο ταξινόμησης που έχει περιγραφεί από τους Marshall & Tanner. Το στάδιο 1 είναι το προεφηβικό, όπου οι μαστοί είναι υποανάπτυκτοι. Το στάδιο 2 εμφανίζεται στα κορίτσια ηλικίας 10-11 ετών, όπου ο μαστός και η θηλή ανυψώνονται και η διάμετρος της θηλαίας άλω αυξάνει. Έπειτα, ο μαστός και η θηλαία άλως διογκώνονται (στάδιο 3) και με την προβολή της θηλαίας άλω σχηματίζεται ένας δεύτερος λοφίσκος κατά το 15^ο έτος της

ηλικίας και συμπληρώνεται το στάδιο 4. Το στάδιο 5 εμφανίζεται στα ενήλικα πλέον κορίτσια με τους ώριμους μαστούς, την προεξερχόμενη θηλή και την θηλαία άλω να αποτελεί τμήμα του γενικότερου περιγράμματος του μαστού. Το χρονικό διάστημα ολοκλήρωσης των σταδίων αυτών διαφέρει από κορίτσι σε κορίτσι και μπορεί να γίνεται μέσα σε λίγα χρόνια ή να μην έχει τελειώσει στην ηλικία των 29 ετών.



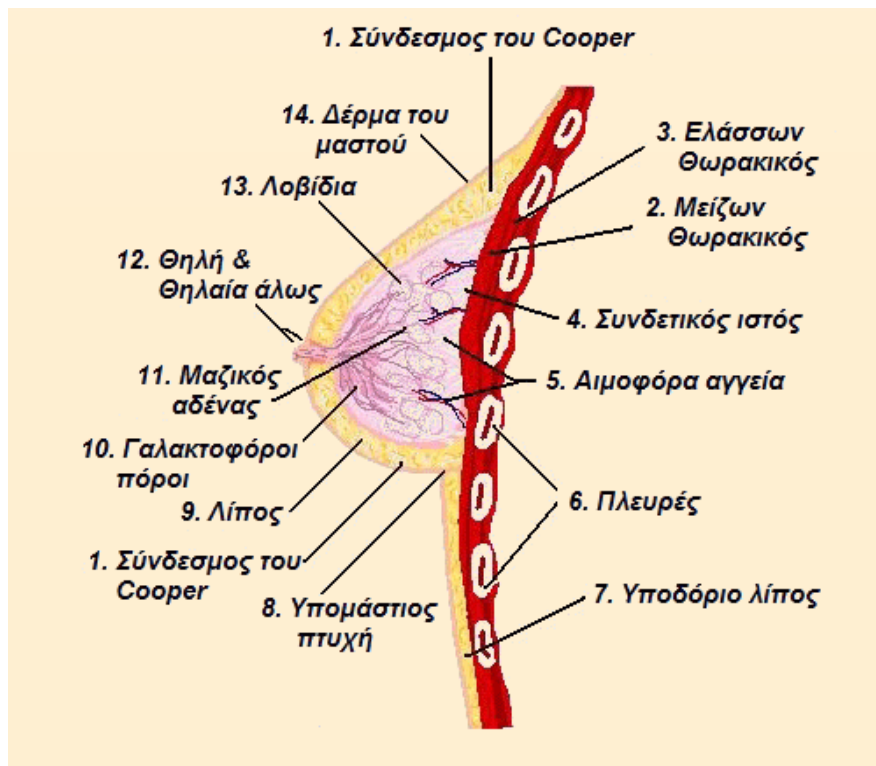
Εικόνα 2. Στάδια εφηβικής ανάπτυξης του μαστού κατά Tanner

1.1.2.1 Ανατομία του μαστού

Ο ώριμος μαστός αποτελεί μια κωνική ή ημισφαιρική προβολή στην υποδόρια περιτονία της πρόσθιας επιφάνειας του θωρακικού τοιχώματος. Εκτείνεται προς τα έξω μέχρι την πρόσθια μασχαλιαία γραμμή (ουρά του Spence) και προς τα έσω μέχρι το πλάγιο χείλος του στέρνου, από την 2^η έως της 7^η πλευρά. Το μέσο πάχος κεντρικά του μαστού ανέρχεται στα 5 με 7 εκατοστά, ενώ η μεγαλύτερη διάμετρος στα 10 με 12 εκατοστά.

Στο μαστό διακρίνονται τρεις περιοχές, η πρόσθια επιφάνεια, η οπίσθια επιφάνεια και η περιφέρεια. Η πρόσθια επιφάνεια του μαστού καλύπτεται από λείο και λεπτό δέρμα και περιλαμβάνει τη θηλή και θηλαία άλω. Η θηλή βρίσκεται συνήθως στο ύψος του 4^{ου} μεσοπλευρίου διαστήματος και περιέχει σμηγματογόνους αδένες και άφθονες αισθητικές νευρικές ίνες ενώ περιβάλλεται από την θηλαία άλω. Η θηλαία άλως είναι ένα δακτυλοειδές τμήμα δέρματος που περιέχει χρωστική-μελανίνη και εμφανίζει υποστρόγγυλα επάρματα, κάτω από τα οποία υπάρχουν τροποποιημένοι σμηγματογόνοι αδένες, οι αδένες του Montgomery. Το σύμπλεγμα θηλής-θηλαίας άλω βρίσκεται πάνω από τη γαλακτική γραμμή και έχει αφθονία ελαστικών και λείων μυϊκών ινών. Η οπίσθια επιφάνεια του μαστού είναι λίγο υπόκοιλη και έρχεται σε επαφή με την περιτονία του μείζονος θωρακικού μυός. Η περιφέρεια του μαστού μεταβαίνει σταδιακά στο γύρω δέρμα και περιλαμβάνει το μεγαλύτερο ποσοστό του λιπώδους ιστού.

Κοιτάζοντας από έξω προς τα μέσα, ο μαστός αποτελείται από το δέρμα, το περιμαστικό λίπος και το μαζικό αδέν. Το δέρμα του μαστού είναι κυρίως λείο και λεπτό και έχει ιδρωτοποιούς και σμηγματογόνους αδένες. Το περιμαστικό λίπος αποτελεί συνέχεια του υποδόριου λίπους και περιβάλλει το μαζικό αδέν. Διακρίνεται σε δύο στιβάδες, την πρόσθια όπου περνούν οι σύνδεσμοι του Cooper και την οπίσθια. Ο μαζικός αδένας είναι ένας σύνθετος σωληνοκυψελοειδής αδένας, ελαστικός, υπόσκληρος και έχει σχήμα δισκοειδές. Κάθε μαζικός αδένας αποτελείται από 15-20 λοβούς, οι οποίοι διαχωρίζονται και διαιρούνται σε λοβία με δεσμίδες ινώδους συνδετικού ιστού, που ονομάζονται σύνδεσμοι του Cooper και μέσω αυτών προσφύονται το δέρμα και η θηλή στο μαστό. Κάθε λοβός με ένα γαλακτοφόρο πόρο εκβάλλει στην κορυφή της θηλής, σχηματίζοντας κάτω από αυτήν ένα ανεύρυσμα, τον γαλακτοφόρο κόλπο. Κάθε λοβός αποτελείται από 20-40 λόβια και καθένα από αυτά περιλαμβάνει 20-200 αδενοκυψέλες. Ο γαλακτοφόρος πόρος που αντιστοιχεί σε κάθε λοβό διακλαδίζεται σε μικρότερους πόρους, καθένας από τους οποίους καταλήγει σε μια αδενοκυψέλη.



Εικόνα 3. Απεικόνιση τομής του μαστού

1.1.2.2 Ιστολογία του μαστού

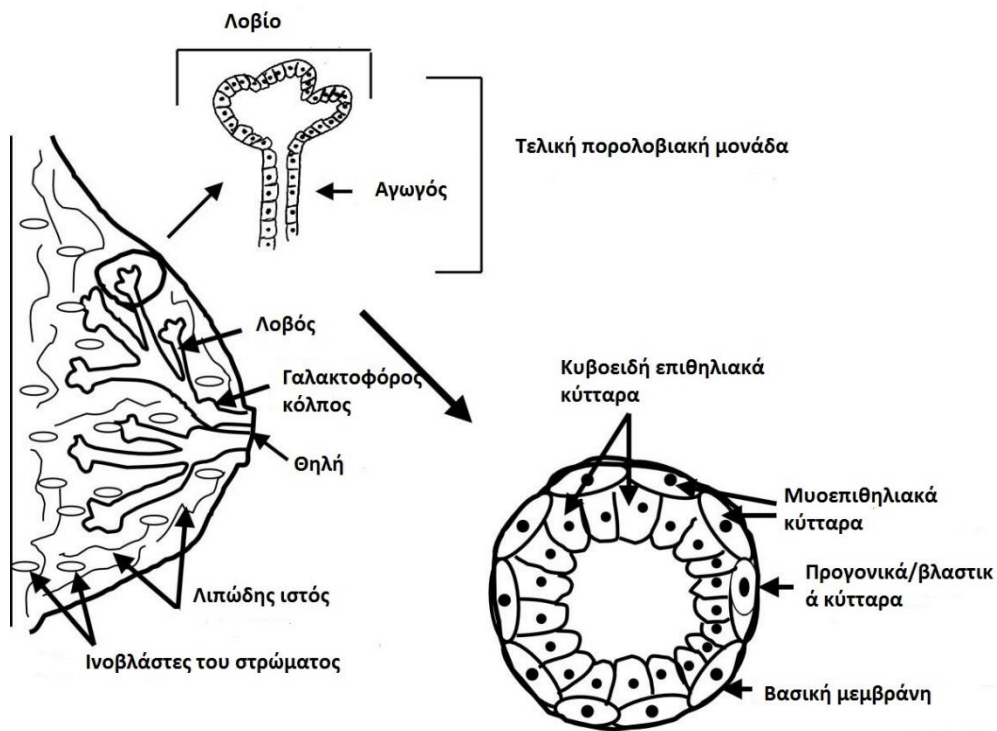
Μικροσκοπικά, ο ώριμος φυσιολογικός μαζικός αδένας αποτελεί ένα σύμπλεγμα διακλαδιζόμενης δομής η οποία αποτελείται από το σύστημα των μεγάλων πόρων και την τελική πορολοβιακή μονάδα (TDLU-terminal duct lobular unit).

Η τελική πορολοβιακή μονάδα περιλαμβάνει το λοβίο που συνδέεται με τους ενδολοβιακούς πόρους και καταλήγει στους γαλακτικούς λοβιακούς πόρους. Αναπαριστά το εκκριτικό τμήμα του μαζικού αδένου. Η μονάδα αυτή ξεχωρίζει ιστολογικά λόγω της χαρακτηριστικής λοβιοδής αρχιτεκτονικής της, την παρουσία δηλαδή ενός εξειδικευμένου, χαλαρού, ορμονο-ανταποκινόμενου συνδετικού ιστού και την απουσία ελαστικών ινών. Στον εν ηρεμία μαστό, η τελική πορολοβιακή μονάδα επενδύεται από μια στιβάδα κυβοειδών επιθηλιακών κυττάρων, κάτω από την οποία εντοπίζονται χαλαρά διατεταγμένα μυοεπιθηλιακά κύτταρα περιβαλλόμενα από βασική μεμβράνη.

Οι γαλακτικοί λοβιακοί πόροι εκβάλλουν στο εξωλοβιακό σύστημα των μεγάλων πόρων, το οποίο περιλαμβάνει τους υποτμηματικούς, τμηματικούς και μεγάλους γαλακτοφόρους πόρους οι οποίοι καταλήγουν στη θηλή. Οι μεγάλοι πόροι εμφανίζουν μικρότερη ποσότητα

εξειδικευμένου στρώματος και περιβάλλονται από καλά διαφοροποιημένο ελαστικό ιστό. Επενδύονται από μια έσω στιβάδα κυλινδρικού επιθηλίου και μια έξω συνεχής στιβάδα μυοεπιθηλίου, η οποία επικάθεται στη βασική μεμβράνη. Οι μεγάλοι γαλακτοφόροι πόροι στην απόληξη τους στην θηλή επενδύονται από πλακώδες επιθήλιο στην περιοχή του γαλακτοφόρου κόλπου. Η θηλή καλύπτεται από πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο, το οποίο χρωματίζεται με εναπόθεση μελανίνης στη βασική στιβάδα μετά την έναρξη της έμμηνου ρύσεως.

Τέλος, υπάρχει ένας διάσπαρτος πληθυσμός ενδοκρινών κυττάρων στο φυσιολογικό μαζικό αδένια και ένας πληθυσμός ενδιάμεσων ή βασικών κυττάρων εντός του επιθηλίου, τα οποία έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιούνται σε κυλινδρικά / κυβοειδή ή μυοεπιθηλιακά κύτταρα.



Εικόνα 4. Ιστολογική απεικόνιση του μαστού

1.1.2.3 Φυσιολογία του μαστού – Ορμόνες

Για την ανάπτυξη και λειτουργία του, ο μαστός εξαρτάται αποκλειστικά από την επίδραση διαφόρων ορμονών, η ενδοκρινική δραστηριότητα των οποίων εμφανίζει καθορισμένες χρονικά μεταβολές. Οι ορμόνες αυτές είναι:

- 1) Τα οιστρογόνα. Έχουν ιδιαίτερο ρόλο καθώς συμβάλλουν στην ανάπτυξη και λειτουργία των γαλακτικών πόρων και ρυθμίζουν την γαλουχία. Σε υψηλά επίπεδα παρεμποδίζουν την έκκριση προλακτίνης, ενώ σε χαμηλά μετά τον τοκετό επιτρέπουν την έκκριση της. Στο μαστό υπάρχουν όλα τα απαραίτητα ένζυμα για το σχηματισμό των οιστρογόνων και όλοι οι ειδικοί υποδοχείς τους στο κυτταρόπλασμα.
- 2) Η προγεστερόνη. Συμβάλλει στη διαφοροποίηση του επιθηλίου, εμποδίζοντας την άθροιση συγκεκριμένων ενζύμων, και στην ανάπτυξη των λοβίων.
- 3) Η προλακτίνη. Εκκρίνεται ως απάντηση στο ερέθισμα της λακτογένεσης στην εγκυμοσύνη και την γαλουχία, διεγείροντας την παραγωγή γάλακτος. Ευνοεί την ανάπτυξη και διαφοροποίηση του μαστού. Η δράση της εξαρτάται άμεσα από τον αριθμό των επιφανειακών υποδοχέων της.
- 4) Η ωκυτοκίνη. Εκκρίνεται ως απάντηση στο μηχανικό ερέθισμα της θηλής κατά τη γαλουχία και δρα στις λείες μυϊκές ίνες των αδενοκυψελίδων του μαστού με στόχο τη σύσπαση τους και κατά συνέπεια την έκκριση γάλακτος.
- 5) Η αυξητική ορμόνη. Προάγει την αύξηση του αριθμού και μεγέθους των κυττάρων του μαστού.
- 6) Το πλακουντιακό γαλακτογόνο. Σε συνεργασία με την προλακτίνη και την αυξητική ορμόνη παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση του μαστού κατά τη διάρκεια της κύησης, ενώ μετά τον τοκετό μειώνεται και δρα παρόμοια με την προλακτίνη.
- 7) Τα κορτικοστεροειδή. Συμβάλλουν στη συσσώρευση καζεΐνης στα κύτταρα του μαστού κατά τη γαλουχία, και συνεπώς είναι απαραίτητα για την έναρξη της.
- 8) Η θυροξίνη. Αυξάνει την παραγωγή γάλακτος, καθώς αυξάνει την έκκριση της προλακτίνης.
- 9) Η ινσουλίνη. Ελέγχει τη μεταφορά γλυκόζης στα κύτταρα του μαστού και έτσι συμβάλλει στη σύνθεση των λιπιδίων σε αυτά.
- 10) Οι προσταγλανδίνες. Παίζουν ανασταλτικό ρόλο στη γαλουχία πριν από τον τοκετό.

1.1.2.4 Αιμάτωση του μαστού

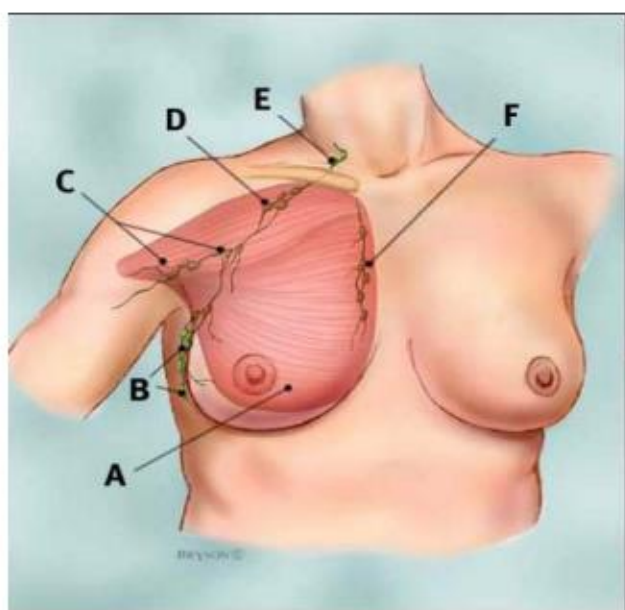
Οι αρτηρίες του μαστού προέρχονται από την έσω μαστική αρτηρία, την έξω μαστική αρτηρία, τις μεσοπλεύριες αρτηρίες και κλάδους της μασχαλιαίας αρτηρίας. Την κύρια πηγή αιμάτωσης του μαστού αποτελεί η έσω θωρακική αρτηρία, η οποία αιματώνει το 60% περίπου. Το 30% περίπου του μαστού, αιματώνεται από την πλάγια θωρακική αρτηρία που είναι ο πιο σημαντικός από τους έξι κλάδους της μασχαλιαίας. Η πλάγια θωρακική αρτηρία διαιρείται σε τρεις περαιτέρω πλάγιους μαστικούς κλάδους οι οποίοι πλαισιώνουν την εξω-πλάγια επιφάνεια του μαστού. Οι μεσοπλεύριες αρτηρίες έχουν περιορισμένη σημασία στην αιμάτωση του μαστού.

Οι φλέβες ακολουθούν τις αρτηρίες αλλά παρουσιάζουν περισσότερες παραλλαγές. Είναι μεμονωμένες και ορισμένες πορεύονται πολύ κοντά στις αρτηρίες με συνέπεια να αποκαλούνται συνοδές φλέβες. Οι συνοδές φλέβες είναι ζευγάρι για κάθε αρτηρία με πολλές αναστομώσεις μεταξύ τους, που ονομάζονται συνοδά φλεβίδια. Οι φλέβες του μαστού κατηγοριοποιούνται σε 3 ομάδες, οι οποίες είναι της έσω μαστικής, της μασχαλιαίας και των μεσοπλεύριων φλεβών. Οι μεσοπλεύριες φλέβες έχουν ιδιαίτερη σημασία διότι έχουν άμεση πρόσβαση στις σπονδυλικές φλέβες και το σπονδυλικό πλέγμα. Γύρω από τη θηλή, οι φλέβες σχηματίζουν ένα δίκτυο με κυκλικό ή τύπου U μοτίβο, το οποίο εκβάλλει στην έσω μαστική και μασχαλιαία φλέβα. Οι μασχαλιαίες και έσω μαστικές φλέβες οδηγούν αίμα και προς το πνευμονικό δίκτυο των τριχοειδών. Τέλος, αν και το μαζικό φλεβικό δίκτυο παροχετεύει κυρίως προς τα έσω στις έσω μαστικές φλέβες και προς τα έξω στην μασχαλιαία φλέβα, έχει αναστομώσεις και με τις υποδόριες φλέβες του κοιλιακού τοιχώματος και σχηματίζει δίκτυο με τη μηριαία φλέβα και τη θωρακοκοιλιακή φλέβα στην περιοχή του ομφαλού.

Τα λεμφαγγεία του μαστού σχηματίζουν δύο πλούσια πλέγματα, το επιφανειακό, το οποίο παροχετεύει το δέρμα και το σύμπλεγμα θηλής-θηλαίας άλω, και το βαθύτερο, που παροχετεύει το μαζικό αδένια και καταλήγει στα μασχαλιαία και στα της έσω μαστικής λεμφαγγεία. Τα δερματικά λεμφαγγεία του επιφανειακού πλέγματος αποχετεύουν στην πλειοψηφία τους λέμφο προς τη μασχάλη. Υπάρχουν όμως και μεμονωμένα λεμφαγγεία τα οποία πορεύονται κατά μήκος των μεσοπλεύριων αγγείων προς την σπονδυλική στήλη.

Οι λεμφαδένες του μαστού διακρίνονται σε τρεις ομάδες τους υπερκλειδίους, τους μασχαλιαίους και τους αδένες της έσω μαστικής αρτηρίας. Οι μασχαλιαίοι λεμφαδένες συγκροτούν το μεγαλύτερο μέρος της λεμφικής ροής του μαστού (75-97%) και χωρίζονται

σε τρία επίπεδα. Στο επίπεδο I συμπεριλαμβάνονται όσοι λεμφαδένες βρίσκονται πλαγίως του έξω χείλους του ελάσσοнос θωρακικού μυός. Στο επίπεδο II έχουμε τους κάτωθεν του ελάσσοнос μυός λεμφαδένες και στο επίπεδο III όσους λεμφαδένες βρίσκονται πάνω από το έσω χείλος του ελάσσοнос θωρακικού μυός. Μεταξύ του ελάσσοнос και του μείζονος θωρακικού μυός υπάρχει μια ειδική μικρή ομάδα λεμφαδένων που καλούνται λεμφαδένες του Rotter. Ο μείζον θωρακικός μύς και οι μεσοπλεύριοι μύες διοχετεύονται από τα λεμφαγγεία της έσω θωρακικής λεμφικής οδού, η οποία διοχετεύει το υπόλοιπο 3-25% της λεμφικής ροής του μαστού και καταλήγει στους λεμφαδένες της έσω μαστικής.



- A. Μείζων θωρακικός μύς
- B. Μασχαλιαίοι λεμφαδένες επίπεδο I
- C. Μασχαλιαίοι λεμφαδένες επίπεδο II
- D. Μασχαλιαίοι λεμφαδένες επίπεδο III
- E. Υπερκλειδίοι λεμφαδένες
- F. Έσω μαστικοί λεμφαδένες

Εικόνα 5. Απεικόνιση του λεμφικού συστήματος του μαστού.

1.1.2.5 Νεύρωση του μαστού

Ο μαστός νευρώνεται κυρίως από τους έσω μαστικούς κλάδους των 2-4 μεσοπλεύριων νεύρων και τους έξω μαστικούς κλάδους των 2-6 μεσοπλεύριων νεύρων. Το σύμπλεγμα θηλής-θηλαία άλωσ νευρώνεται από σωματικές αισθητικές απολήξεις ενώ το παρέγχυμα, το δέρμα και τα αγγεία του μαστού από το αυτόνομο συμπαθητικό σύστημα. Αισθητικές ίνες πόνου πορεύονται με το 2^ο-6^ο μεσοπλεύριο νεύρο, ωστόσο υπάρχουν και αναστομώσεις με τη 2^η-3^η αυχενική ρίζα και το βραχιόνιο πλέγμα.

1.1.2.6 Μύες του μαστού

Οι μύες που βρίσκονται στην περιοχή του μαστού είναι οι εξής:

- 1) Μείζων θωρακικός. Εμφανίζει κλειδική, στερνοπλευρική και κοιλιακή μοίρα και καταφύεται στην ακρολοφία του μείζονος βραχιονίου ογκώματος.
- 2) Ελάσσων θωρακικός. Εντοπίζεται κάτω από τον μείζων μυ και εκφύεται με οδοντώματα από την κορακοειδή απόφυση της ωμοπλάτης.
- 3) Πρόσθιος οδοντωτός. Εκφύεται με οδοντώματα από τις 9 πρώτες πλευρές και καταφύεται στο σπονδυλικό χείλος της ωμοπλάτης. Έχει κεντρικό ρόλο στη σταθεροποίηση της ωμοπλάτης στον κορμό.
- 4) Πλατύς ραχιαίος. Παρουσιάζει πλευρική, λαγόνια και σπονδυλική μοίρα και καταφύεται στον πυθμένα της αύλακας του δικέφαλου βραχιονίου μυός.
- 5) Υποπλάτιος. Εκφύεται από τον υποπλάτιο βόθρο και καταφύεται στο έλασσον βραχιόνιο όγκωμα.
- 6) Έξω λοξός και ορθός κοιλιακός. Καθορίζει τα κάτω όρια της μαστεκτομής και έτσι παίζει κεντρικό ρόλο στην πλαστική αποκατάσταση.

1.1.3 Αναπαραγωγικά χρόνια και μαστός

Η χρονική περίοδος μεταξύ της ενηλικίωσης και της εγκυμοσύνης θεωρείται μια περίοδος ηρεμίας ως προς την ανάπτυξη του μαστού. Ωστόσο, κάποιες αλλαγές εμφανίζονται στον ιστό των μαζικών αδένων, καθώς ανταποκρίνονται σε ορμονικά και άλλα ερεθίσματα.

Γενικά, έχουμε την παρουσία διαφόρων «φυσιολογικών» εικόνων του μαστού:

- Την ανώριμη περίοδο πριν την ήβη
- Τον ανεπτυγμένο μαστό της αναπαραγωγικής ηλικίας
- Τον γαλαχούντα μαστό κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και
- Τον εκφυλισμένο μετεμμηνοπαυσιακό μαστό

Ο ανεπτυγμένος μαστός εμφανίζει ορισμένες περαιτέρω μικρές αλλαγές σε σχέση με τον εμμηνορρυσιακό κύκλο. Οι αλλαγές αυτές έχουν περιοδική μορφή με μια ελάχιστη οπισθοχώρηση στην αρχή και το τέλος του κύκλου. Παρατηρείται περιοδική αύξηση του

μαστού η οποία αρχίζει την 8^η μέρα του κύκλου και αντιστοιχεί σε αύξηση του πάχους, αδένος και του μεγέθους και σε κάποιες γυναίκες συνοδεύεται και από ευαισθησία των μαστών λίγο πριν την έμμηνο ρύση. Ο όγκος του μαστού μπορεί να αυξηθεί ως 50%. Με το πέρας της έμμηνου ρύσεως υποστρέφει η αύξηση στον αδένα και μαστό και υποχωρεί το οίδημα και η αγγειακή συμφόρηση. Ειδικότερα, στην ωοθυλακική φάση του εμμηνορρυσιακού κύκλου ο πολλαπλασιασμός του επιθηλιακού στρώματος του μαστού συνοδεύεται από αύξηση της μιτωτικής δραστηριότητας, ενώ στην ωχρινική φάση, οι μαστικοί αγωγοί και τα λοβία διαστέλλονται και εκκριτικές αλλαγές λαμβάνουν χώρα στα λοβιωδή κύτταρα, με εναποθέτηση λιπιδίων στους αυλούς. Γενικά, η περιοδική αυτή αύξηση των μαστών εμφανίζεται κυρίως στις άτοκες γυναίκες και σε εκείνες που δεν γαλούχησαν ποτέ, ελαχιστοποιείται στα μέσα των αναπαραγωγικών ετών ενώ πλησιάζει στην κορυφή της πριν την εμμηνοπαυσιακή περίοδο και έπειτα οπισθοχωρεί φυσιολογικά.

1.1.4 Αύξηση του μαστού κατά την κύηση και την γαλουχία

Εντυπωσιακές αλλαγές συμβαίνουν στο μαστό κατά τη διάρκεια της κύησης και της γαλουχίας κάτω από την επιρροή των οιστρογόνων, της προγεστερόνης, του πλακουντιακού γαλακτογόνου και της προλακτίνης. Αυτές οι ορμόνες κύησης διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων, των πόρων και του λοβώδους επιθηλίου στα πρώτα στάδια της κύησης. Τον πέμπτο με έκτο μήνα παρατηρείται μια αξιοσημείωτη αύξηση στον αριθμό και τη δραστηριότητα των λοβίων με ταυτόχρονη αύξηση της αιμάτωσης και τη δημιουργία νέων αγγείων γύρω από αυτούς. Καθένας από τους 15 με 20 γαλακτοφόρους πόρους με όλες τις διακλαδώσεις τους συνθέτει ένα λοβό, καθώς οι τερματικοί κλάδοι και οι τελικές κυψελίδες των εκκριτικών κυττάρων συνθέτουν ένα λοβίο. Το συνολικό σύστημα των λοβίων περιβάλλεται από ινώδη συνδετικό ιστό και λείες μυϊκές ίνες, τα οποία βέβαια μπροστά στην επέκταση των λοβίων φαίνονται ασήμαντα στο μαστό. Η εκκριτική δραστηριότητα αποκτά κύρια θέση εντός των λοβιωδών εκκριτικών κυττάρων από τα μέσα της εγκυμοσύνης και στο τελευταίο τρίτο της κύησης εμφανίζεται πυάρ με λιπιδικά σταγονίδια, λευκά αιμοσφαίρια, νερό, ιχνοστοιχεία και απολεπισμένα κυψελιδικά κύτταρα στους λοβιωδείς αυλούς. Κάθε γαλακτοφόρος πόρος πλησιάζοντας τη θηλή εμφανίζει μια διάχυτη διάταση του αυλού του, τον γαλακτοφόρο κόλπο και έπειτα στενεύει ξανά και προχωράει ώστε να διαταθεί πάλι λίγο όσο πλησιάζει προς την επιφάνεια. Μικρές αλλαγές συμβαίνουν πλέον μέχρι τον τοκετό όπου η ανεμπόδιστη δράση της προλακτίνης

και ο ερεθισμός του θηλασμού γρήγορα οδηγούν στην καθιέρωση της γαλουχίας. Καθώς η γαλουχία ξεκινάει τα λοβία διαστέλλονται και τα εκκριτικά κύτταρα αρχίζουν να δρουν. Οι ενεργές πια αδενοκυψέλες του γαλαχούντος μαστού αποτελούνται από κυβικά κύτταρα, τα οποία περιβάλλονται από μυοεπιθηλιακά κύτταρα. Το κυτταρόπλασμα τους είναι γεμάτο από ενδοπλασματικά δίκτυα, δίκτυα Golgi, κενοτόπια, λιποσταγονίδια και κυστίδια που περιέχουν καζεΐνες και γαλακτόζη. Είναι αναγκαίο να αναφερθεί ότι, όπως και σε άλλα εκκριτικά όργανα έτσι και εδώ, δεν βρίσκονται όλα τα λοβία ακόμη και αυτά του ίδιου λοβού σε όμοιο στάδιο εκκριτικής δραστηριότητας την ίδια χρονική στιγμή. Οι αδενοκυψέλες εμφανίζουν πολλά στάδια προετοιμασίας για τη σύνθεση των ουσιών του γάλακτος (λιπίδια και πρωτεΐνες).

Κοιτάζοντας την αύξηση του μαστού κατά την κύηση από μια κλινική άποψη, βλέπουμε ότι με τη διόγκωση των γαλακτοφόρων πόρων, την κατακράτηση νερού, την αύξηση του συνδετικού ιστού και την αποθήκευση του γαλακτικού υλικού, ο κάθε μαστός κερδίζει τουλάχιστον από 0,5kg στο τέλος της κύησης. Επίσης, το δέρμα γίνεται πιο σκούρο, η θηλαία άλωσ προεξέχει πιο πολύ και οι θηλές μεγαλώνουν και γίνονται πιο όρθιες.

Η εκκριτική δραστηριότητα στους μαστούς είναι κυκλική, αλλά δεν είναι γνωστός ακόμη ο υπεύθυνος μηχανισμός. Η έκκριση του γάλακτος από τη θηλή πραγματοποιείται μετά από διέγερση των αισθητήριων νεύρων από το βρέφος με συνέπεια να απελευθερώνεται ωκυτοκίνη σε παλμούς η οποία μέσω των νευροεκκριτικών ινών φθάνει στην υποθαλαμονευρική οδό. Η ωκυτοκίνη προκαλεί τη συρρίκνωση των μυοεπιθηλιακών κυττάρων των μαστικών λοβών και προωθεί το γάλα εντός του αγωγού συστήματος και έπειτα στους γαλακτοφόρους κόλπους.

Όταν η περίοδος της γαλουχίας ολοκληρωθεί, ο μαστός σταδιακά επανέρχεται σε μια φάση ηρεμίας. Οι αλλαγές αυτές εκτιμάται ότι διαρκούν κατά μέσο όρο 3 μήνες και δεν είναι γνωστό αν οι υπεύθυνοι μηχανισμοί είναι ορμονικοί, αγγειακοί ή μηχανικοί. Ωστόσο, υποψιάζεται πως κύριο ρόλο παίζει η μείωση των επιπέδων της προλακτίνης στους μαστικούς αδένες. Οι επιθηλιακοί ιστοί υποστρέφουν και δημιουργείται μια ισορροπημένη αναλογία συνδετικού ιστού – λοβίων. Ο μαστός ποτέ δεν επιστρέφει απόλυτα στην αρχική του μορφή και παρατηρούνται ποικίλες βαθμίδες υποστροφής από τη μια περιοχή στην άλλη. Μάλιστα, διαταραχές κατά τη διαδικασία αυτή μπορούν να οδηγήσουν σε εμφανή παθολογικές αλλαγές, οι οποίες θα εντοπιστούν αργότερα σε βιοψίες μαστού και συμπεριλαμβάνουν το σχηματισμό κύστεων.

1.1.5 Μετεμμηνοπαυσιακός μαστός

Μετά την ολοκλήρωση της εμμηνόπαυσης, παρατηρείται μια νέα σειρά αλλαγών στο μαστό, καθώς μειώνεται σημαντικά η δράση των ωοθηκικών ορμονών. Εμφανίζεται μια προοδευτική ατροφία των επιθηλιακών κυττάρων του μαστού και αυξάνεται ο λιπώδης και ελαστικός ιστός, ενώ υαλοποιείται ο συνδετικός ιστός στο στρώμα του μαστού. Το κυρίως σύστημα αγωγών διατηρείται και κυριαρχεί μέσα από ένα μεγάλο υποκυτταρικό στρώμα, αλλά ένας μεγάλος αριθμός των μαστικών λοβίων χάνεται. Οι λοβοί που παραμένουν γίνονται πολύ μικροί και ασαφείς και πρέπει να μη συγχέονται με παθολογικές καταστάσεις του μαστού. Το παρέγχυμα και το ινώδες υπόστρωμα του μαστού μεταπίπτουν σταδιακά σε μια ομοιογενή μάζα. Περιστασιακά, σε κάποιες γυναίκες παρατηρούνται φυσιολογικοί λοβοί σε φάση ηρεμίας εντός των μαστών και μετά την εμμηνόπαυση, οι οποίοι εμφανίζουν εκκριτικά χαρακτηριστικά. Το φαινόμενο αυτό έχει παρατηρηθεί κυρίως σε άτοκες γυναίκες. Τέλος, να σημειωθεί ότι γυναίκες που λαμβάνουν οιστρογόνα μετά την εμμηνόπαυση δεν εμφανίζουν τις παραπάνω αλλαγές στο μαστό και συνεχίζουν να έχουν το αίσθημα της μαστικής δυσφορίας.

1.2. ΚΑΛΟΗΘΕΙΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

1.2.1 Επιδημιολογικά στοιχεία

Οι καλοήθεις παθήσεις του μαστού είναι αρκετά κοινές παγκοσμίως, και η πλειοψηφία των γυναικών εκδηλώνουν κάποιο είδος κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Τα ινοαδενώματα αποτελούν τον πιο συχνό τύπο και διαγιγνώσκονται στο 25% των ασυμπτωματικών γυναικών (El-Wakeel & Umpleby, 2003). Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής καταγράφονται περίπου ένα εκατομμύριο νέα περιστατικά κάθε χρόνο (Figueroa JD et al., 2016). Στις χώρες της Ευρώπης οι περιπτώσεις καλοηθών όγκων πλησιάζουν το 60% των συνολικών κρουσμάτων. Ωστόσο, τις περισσότερες φορές ανιχνεύονται όταν ο όγκος βρίσκεται σε πρώιμη φάση με αποτέλεσμα να ακολουθείται μια επιτυχής θεραπεία.

Υπολογίζεται ότι ετησίως προσβάλλονται περίπου 4.500 γυναίκες από καλοήθεις όγκους και ότι το μεγαλύτερο ποσοστό δεν έχει επίγνωση της κατάστασης. Ιατρικά δεδομένα προβλέπουν πως 1 στις 12 γυναίκες νοσούν από νεοπλασμάτα του μαστού και ο κύριος λόγος της μεγάλης αυτής συχνότητας είναι η μη πραγματοποίηση προληπτικών εξετάσεων. Το συμπέρασμα αυτό εξάγεται από το γεγονός ότι τα περισσότερα κρούσματα των πασχόντων διαγιγνώσκονται όταν η καλοήθεια έχει ξεπεράσει τα αρχικά στάδια ανάπτυξης της. Το 30% μάλιστα διαθέτουν κληρονομικό ιστορικό για εκδήλωση καλοήθους όγκου. Λόγω μειωμένης ενημέρωσης γύρω από την πρόληψη και τη σύγχρονη πλέον αντιμετώπιση μόνο περίπου το 5% των συνολικών κρουσμάτων εμφανίζουν ολική ίαση σε πρώιμη φάση της ασθένειας. Κρίνεται απαραίτητο η ήδη υπάρχουσα προσπάθεια ενημέρωσης να επεκταθεί, ώστε να εγκατασταθεί ο λειτουργικός ρόλος της διάγνωσης στη συνείδηση των Ελλήνων και να μειωθεί η συχνότητα εμφάνισης.

1.2.2 Διάγνωση

Η διάγνωση των καλοηθών παθήσεων του μαστού δε διαφέρει από αυτήν των κακοηθών όγκων. Συμπεριλαμβάνει την κλασσική ψηλάφηση του στήθους, το υπερηχογράφημα με στόχο την ανίχνευση κυστών στο εσωτερικό του μαστού που είναι λιγότερο συμπαγής, τη μαστογραφία με τα υψηλά επίπεδα απεικονιστικής ικανότητας και τη μαγνητική τομογραφία στήθους, που αποτελεί την πιο εξειδικευμένη μέθοδο ανίχνευσης και διαφοροδιάγνωσης (Moller, 2000).

Η διαφορετικότητα έγκειται σε δυο επιπλέον στοιχεία που εξετάζει ο ιατρός με σκοπό να αντλήσει περισσότερες πληροφορίες για τη διάγνωση της φάσης της ασθένειας κι αυτά είναι οι ορμονικοί υποδοχείς και η ποσότητα του υποδοχέα HER.

1. Ορμονικοί υποδοχείς: Οι ορμόνες είναι πρωτεϊνικές ουσίες που εκκρίνονται από τον οργανισμό και συνδέονται σε ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των κυττάρων για να ενεργοποιήσουν κάποιο μηχανισμό σε αυτά. Ο ιατρός εξετάζει αν και σε τι ποσοστό υπάρχουν ορμονικοί υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερονών στα κύτταρα του όγκου. Αν το ποσοστό είναι μεγάλο, αυτό υποδηλώνει ότι ο όγκος αναπτύσσεται ραγδαία και χρήζεται ιδιαίτερο χειρισμό η ασθενής.
2. Υποδοχέας HER2: Η πρωτεΐνη-υποδοχέας HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) εμφανίζεται φυσιολογικά στα κύτταρα του μαστού. Όταν προσδένεται σε αυτήν ο επιδερμικός παράγοντας τύπου 2 προτρέπει το κύτταρο να διαιρεθεί και να αυξηθεί. Έχει βρεθεί πως κάποια καρκινικά κύτταρα μπορεί να έχουν έως και 100 φορές μεγαλύτερη ποσότητα HER2 από τα φυσιολογικά κύτταρα. Συνεπώς, από την ποσότητα της στην μαστική περιοχή ο ιατρός είναι δυνατόν να διακρίνει αν υπάρχει ανάπτυξη καλοήθους όγκου ή όχι και αν ναι πόσο γρήγορη είναι η ανάπτυξη του.

Η έγκαιρη διάγνωση οποιασδήποτε καλοήθειας του μαστού έχει ιδιαίτερη σημασία όχι μόνο γιατί απλοποιείται η πορεία της θεραπευτικής αντιμετώπισης αλλά και επειδή διατηρείται η καλή αισθητική εικόνα του μαστού.

1.2.3 Ταξινόμηση

Σε ποσοστό που υπερβαίνει το 90% στις γυναίκες ηλικίας 20-40 ετών και ειδικότερα στις νεότερες, τα ογκίδια που ανιχνεύονται είναι σχεδόν πάντα καλοήθη. Πέρα από τα ψηλαφητά ογκίδια, εκκρίματα από τις θηλές, πόνος στο μαστό και δερματικές αλλοιώσεις είναι συμπτώματα καλοήθων παθήσεων. Η ακριβής διάγνωση πρέπει να γίνει από ειδικό μαστολόγο, ο οποίος μετά την εξέταση θα καταλάβει αν πρόκειται για καλοήθη όγκο ή όχι και θα ταξινομήσει την πάθηση σε μια από τις εξής κατηγορίες:

- Ινοαδένωμα: Ο συνηθέστερος καλοήθους όγκος σε γυναίκες νεαρής, αναπαραγωγικής ηλικίας, μεταξύ 20 – 40 ετών. Πρόκειται για μια υπερπλασία των λοβίων του μαστού και αποτελείται από ινώδη και αδενικό ιστό. Πιθανολογείται πως προκύπτει λόγω των διεγερτικών ορμονών που λαμβάνει μια γυναίκα για θεραπευτικούς ή προληπτικούς λόγους (Creagan, 2006). Το μέγεθος ενός ινοαδενώματος δεν ξεπερνά συνήθως τα 3 εκατοστά και μπορεί να αυξηθεί κατά την κύηση, τη γαλουχία και πριν

από την εμμηνόπαυση. Κρίνεται απαραίτητο να γίνει άμεσα έλεγχος με τη λήψη δείγματος μέσω βελόνας, ώστε να εξετασθεί η βιοψία καθώς η πιθανότητα εξέλιξης του σε κακοήθεια εξαρτάται από τα ιστολογικά του χαρακτηριστικά. Εάν το εξεταζόμενο ινοαδένωμα είναι μικρότερο του ενός εκατοστού και δεν προκαλεί συμπτώματα και δεν μεγαλώνει, δε χρειάζεται να αφαιρεθεί. Εάν όμως πρόκειται για μεγάλο ινοαδένωμα που προκαλεί πόνο στο μαστό ή μεγαλώνει ή η βιοψία εμφανίζει άτυπη υπερπλασία, σκληρυντική αδένωση, αποτιτανώσεις και άλλα, τότε πρέπει να αφαιρεθεί. Επίσης, είναι επιθυμητό να αφαιρούνται πριν από οποιαδήποτε εγκυμοσύνη. Η χειρουργική είναι απλή και συνήθως γίνεται χωρίς να υπάρξει εισαγωγή στο νοσοκομείο. Η αφαίρεση ενός ινοαδενώματος δεν επηρεάζει το μαστό και την ικανότητα θηλασμού και δεν υπάρχει πιθανότητα επανεμφάνισης του αργότερα. Ωστόσο, είναι πιθανό μελλοντικά να αναπτυχθεί κάποιο άλλο ινοαδένωμα σε οποιονδήποτε από τους μαστούς.

- Κύστη: Μονήριες ή πολλαπλές, οι κύστεις εντοπίζονται πιο συχνά σε προεμμηνόπαυσιες γυναίκες ηλικίας από 30 έως 40 ετών και πολύ σπάνια προ των 25 ετών. Πρόκειται για μια τοπική συλλογή υγρού με ομαλή υφή, η οποία μετακινείται εύκολα και μπορεί να είναι μαλακή. Η διάμετρος μιας κύστης κυμαίνεται από 2-3 εκατοστά και μπορεί να φθάσει μέχρι 10-15 εκατοστά. Μπορεί να εντοπιστούν περισσότερες κύστεις και στους δυο μαστούς και μπορούν να αναπτυχθούν σε οποιοδήποτε σημείο. Φαίνεται πως σχετίζονται με το κάπνισμα καθώς και με τραυματισμούς ή έκθεση σε ακτινοβολίες και οποιαδήποτε θεραπεία με οιστρογόνα αυξάνει το ποσοστό εμφάνισης στην εμμηνόπαυση. Η εντόπιση τους μπορεί να γίνει με απλό υπερηχογραφικό έλεγχο και η αντιμετώπιση τους ποικίλλει αναλόγως το μέγεθος και το περιεχόμενό τους. Όταν είναι μεγάλες και προκαλούν πόνο ή λόγω μεγέθους δεν επιτρέπουν τον έλεγχο ενός μεγάλου μέρους του στήθους που κρύβεται από πίσω, τότε αντιμετωπίζονται με μια απλή παρακέντηση και αναρρόφηση υγρού στο ιατρείο. Εάν όμως μια κύστη υποτροπιάζει συνεχώς και ξαναγεμίζει, τότε απαιτείται χειρουργική αφαίρεση. Σε περίπτωση που η κύστη είναι γεμάτη με αίμα, υποβάλλεται σε κυτταρολογική εξέταση, ενώ εάν κατά το υπερηχογράφημα εμφανιστούν και συμπαγή στοιχεία απαιτείται και μαστογραφία. 20 με 45% των περιπτώσεων όπου υπάρχουν μεικτά χαρακτηριστικά κύστης και συμπαγούς μάζας αφορούν κακοήθειες.

- **Θηλώματα:** Υπάρχουν δυο κατηγορίες ενδοπορικών θηλωμάτων, τα μονήρη – κεντρικά και τα πολλαπλά – περιφερικά. Τα μονήρη αναπτύσσονται σε μεγάλους πόρους κοντά στη θηλή και όσο μεγαλώνουν αποφράζουν τον πόρο. Η απόφραξη αυτή σε συνδυασμό με αυξημένη έκκριση δημιουργεί κύστη. Αντιθέτως, τα πολλαπλά θηλώματα εντοπίζονται περιφερικά στο μαστό σε μικρότερους πόρους και δε συνοδεύονται συνήθως από έκκριση. Συναντώνται σε νεότερες γυναίκες και προκαλούν μια ψηλαφητή μάζα η οποία μπορεί να οδηγήσει και σε κακοήθη όγκο. Τα θηλώματα προκαλούν συνήθως έκκριση από τη θηλή αιματηρού ή κιτρινωπού υγρού είτε αυτόματα είτε με πίεση της θηλής. Το μέγεθος τους είναι κυρίως μικρό και σπανίως γίνονται αντιληπτά με ψηλάφηση κάτω από τη θηλή. Πέρα του υπερηχογραφικού ελέγχου, βοηθητική είναι η γαλακτογραφία και η κυτταρολογική εξέταση του εκκρίματος. Συστήνεται παρακολούθηση των θηλωμάτων σε τακτά χρονικά διαστήματα και σε περίπτωση που χρειαστεί θεραπεία, αφαιρείται χειρουργικά ο πόρος σε σχήμα πυραμίδας από τη θηλή προς την περιφέρεια ή καθετηριάζεται ο πόρος.
- **Ινοκυστική μαστοπάθεια:** Γνωστή και ως ινοκυστική νόσος των μαστών ή ινοαδένωση. Αποτελεί την πιο συχνή αιτία ανησυχίας στις γυναίκες ηλικίας 40 με 50 ετών και χαρακτηρίζει κυρίως την πυκνή σύσταση των μαστών παρά αποτελεί μια παθολογική κατάσταση. Προκαλείται από αλλαγές στα επίπεδα των θηλυκών ορμονών, δηλαδή των οιστρογόνων και της προγεστερόνης κατά τη διάρκεια της έμμηνου ρύσεως. Οι ορμόνες αυτές προκαλούν διαστολή των αιμοφόρων αγγείων, διόγκωση των γαλακτικών αδένων και διήθηση των πόρων εξαιτίας της κατακράτησης υγρών στο μαστό. Οι ινοκυστικές αλλοιώσεις είναι πιθανόν να εμφανιστούν και στους δυο μαστούς, συχνότερα στο άνω και έξω τεταρτημόριο, όπου εντοπίζεται ο περισσότερος μαστικός αδένας ή στην κάτω πλευρά του μαστού. Συνοδεύεται από πόνο στο μαστό και έκκριση από τη θηλή. Ο ήπιος πόνος αντιμετωπίζεται με αποχή από το κάπνισμα, την κατανάλωση καφέ ή σοκολάτας και την αντιμετώπιση του άγχους. Εάν ο πόνος είναι πιο έντονος τότε συνιστάται η χορήγηση απλών αναλγητικών φαρμάκων με δραστική ουσία την παρακεταμόλη, μη στεροειδή αντιφλεγμονώση σκευάσματα και ένζυμα που συμβάλουν στη μείωση του οιδήματος και της φλεγμονής. Συχνά η νόσος συνυπάρχει με επιθηλιακή υπερπλασία των μεγάλων πόρων σε γυναίκες ηλικίας γύρω από την εμμηνόπαυση.

- Λίπωμα: Μια καλοήθης μάζα λιπώδους σύστασης που εντοπίζεται κυρίως υποδόρια αλλά κάποιες φορές και σε βαθύτερα μυϊκά στρώματα. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου σχετίζεται με αδένες και τότε καλείται αδενολίπωμα. Η καλοήθης μάζα είναι ευκίνητη, έχει σφαιρικό σχήμα και ομαλό περίγραμμα, εμφανίζει αργή ανάπτυξη και δε συνοδεύεται από έντονους πόνους. Φαίνεται πως υπάρχει κληρονομική προδιάθεση και παρατηρείται συχνότερα σε ευμεγέθεις μαστούς. Το λίπωμα μπορεί να αφαιρεθεί χειρουργικά εύκολα μέσω τοπικής αναισθησίας και δείγμα αποστέλλεται για ιστολογική εξέταση.
- Φλεγμονή ή Απόστημα: Ως φλεγμονή θεωρείται η μαστίτιδα η οποία εμφανίζεται κυρίως σε γυναίκες που θηλάζουν όπως ακριβώς και το απόστημα. Και τα δυο είδη φλεγμονών προκαλούνται λόγω απόφραξης κάποιων πόρων που οδηγούν σε συσσώρευση του μητρικού γάλακτος και στην ανάπτυξη μικροβίων. Τα μικρόβια που εντοπίζονται κυρίως είναι ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος και ο στρεπτόκοκκος. Η μαστίτιδα εμφανίζεται συχνότερα στις καπνίστριες και σε γυναίκες που πάσχουν από διαβήτη και καταπολεμάται με αντιβιοτικά. Στο απόστημα εμφανίζεται συχνά συγκέντρωση πύου η οποία πρέπει να αντιμετωπιστεί με παροχέτευση μέσω παρακέντησης και υπερηχογραφικής καθοδήγησης. Σπάνια σχετίζονται με καρκίνο του μαστού.
- Εισολκή θηλής: Γυρισμένη προς τα μέσα θηλή. Εμφανίζεται φυσιολογικά περίπου στο 2% των γυναικών είτε μόνο στον έναν είτε και στους δυο μαστούς ως συνέπεια κληρονομικότητας, διαταραχών ανάπτυξης κατά την εμβρυϊκή ζωή, φλεγμονής ή σπάνιων παθήσεων. Σε περίπτωση που η εισολκή εμφανιστεί αργότερα σε κάποια στιγμή της ζωής μιας γυναίκας αποτελεί ένδειξη πάθησης, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου και πρέπει άμεσα να εξετασθεί από μαστολόγο.

1.2.4 Διάκριση καλοηθών και κακοηθών παθήσεων του μαστού

Οι καλοήθεις παθήσεις του μαστού χαρακτηρίζονται από μειωμένη ικανότητα επιθετικής συμπεριφοράς, δηλαδή δεν έχουν την ικανότητα να εξαπλώνονται και να διηθούν σε γειτονικούς ιστούς πέραν της μαστικής περιοχής. Κατά συνέπεια ελαχιστοποιείται σημαντικά ο κίνδυνος της μετάστασης και δε θεωρούνται απειλητικές για τη ζωή του ανθρώπου. Η έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία τις προφυλάσσει από μελλοντικούς

κινδύνους. Παρατηρούνται ως μια ψηλαφητή μάζα, ένα αψηλάφητο εύρημα κατά το υπερηχογράφημα ή τη μαστογραφία, ως σύμπτωμα έκκρισης από τις θηλές ή ευρίσκονται τυχαία κατά την ιστολογική διάγνωση άλλης αιτίας.

Οι κακοήθεις παθήσεις του μαστού χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να προκαλούν ανωμαλίες και ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ο καρκίνος του μαστού σχηματίζει όζους, όγκους ή μάζες καρκινικών κυττάρων τα οποία μπορούν να μεταναστεύουν και να εγκαθίστανται σε άλλα μέρη του οργανισμού με σκοπό να πολλαπλασιαστούν εκεί. Κατά αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται νέοι καρκίνοι οι οποίοι καλούνται μεταστάσεις και επιδεινώνουν την υγεία του οργανισμού.

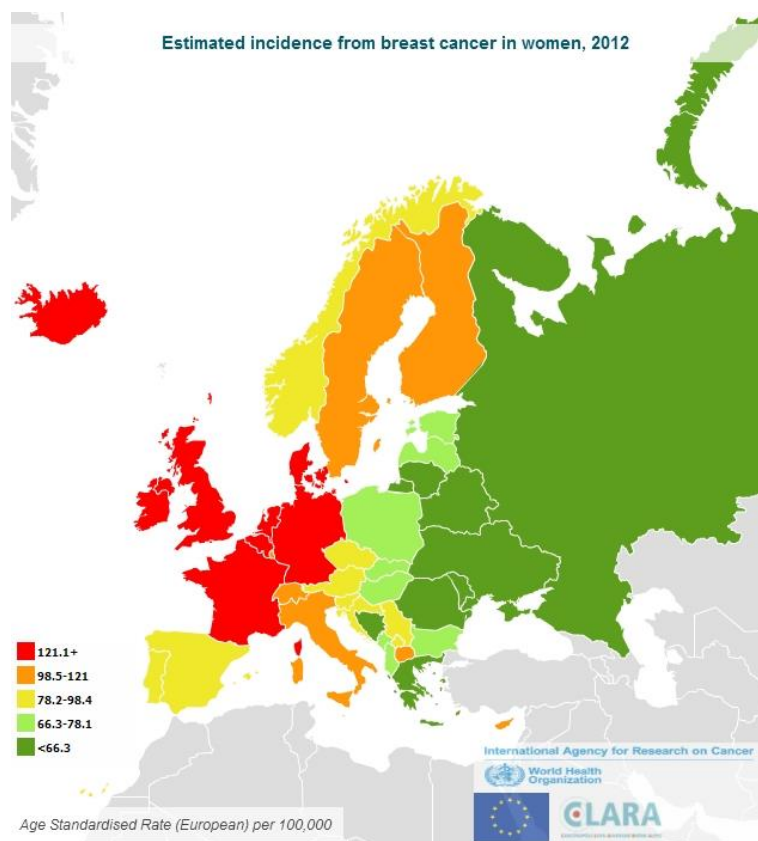
1.3. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

1.3.1. Επιδημιολογικά στοιχεία

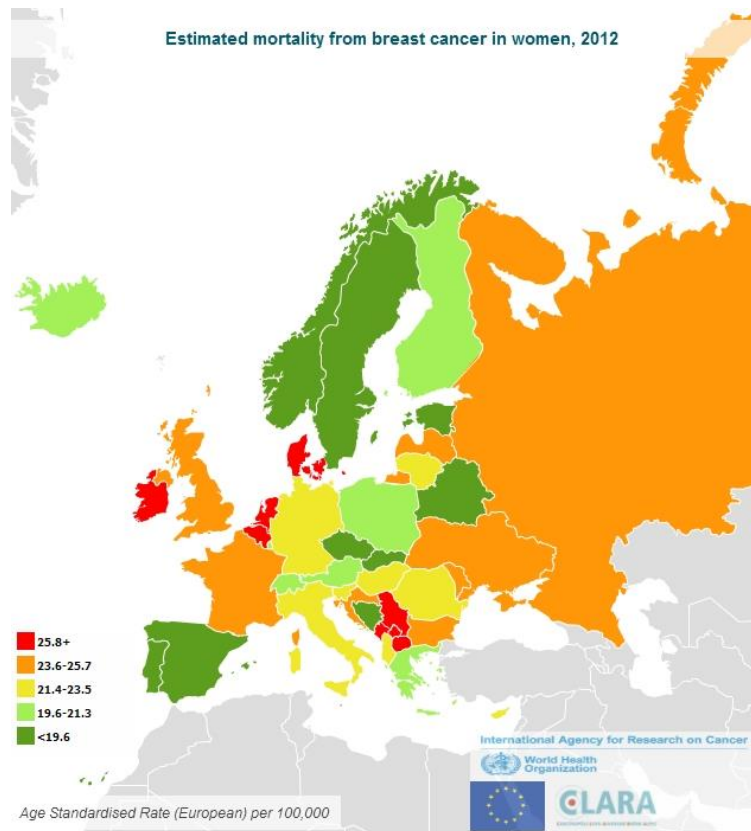
Ο καρκίνος του μαστού είναι η πιο κοινή μορφή καρκίνου στις γυναίκες και αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου σε αυτές μετά τον καρκίνο του πνεύμονα. Εκτιμάται ότι, στις Η.Π.Α και τον Καναδά, 1 στις 8 γυναίκες κινδυνεύει να εμφανίσει καρκίνο του μαστού στη ζωή της (Feuer,1993) και το 30% των γυναικών αυτών θα πεθάνει τελικά από αυτήν (Harris,1992). Τα ίδια ποσοστά παρατηρούνται και σε αρκετές Ευρωπαϊκές χώρες.

Σύμφωνα με υπολογισμούς το 2002, διαγνώστηκαν 1.151.298 νέες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού, 410.712 θάνατοι προκλήθηκαν από αυτόν και περισσότερες από 4.400.000 γυναίκες ζουν με καρκίνο του μαστού παγκοσμίως (Ferlay et al., 2004).

Η χαμηλότερη συχνότητα παρατηρείται στην Ιαπωνία και την Ταϊβάν γύρω στις 15 περιπτώσεις ανά 100.000 γυναίκες κάθε χρόνο. Στην Ευρώπη, το 2004 υπολογίστηκε πως διαγνώστηκαν 371.000 νέες περιπτώσεις και 129.900 θάνατοι που σχετίστηκαν με καρκίνο του μαστού (Boyle and Ferlay, 2005). Μια πρόσφατη μελέτη το 2012 για τις χώρες της Ευρώπης αναδεικνύει το Βέλγιο πρώτη χώρα με τις μεγαλύτερες επιπτώσεις καρκίνου του μαστού και μάλιστα με συχνότητα διπλάσια από αυτή της Ελλάδος (Ferlay et al., & Bray F. Et al., 2013).



Εικόνα 6. Αναμενόμενη συχνότητα του καρκίνου του μαστού σε γυναίκες της Ευρώπης



Εικόνα 7. Αναμενόμενη θνησιμότητα γυναικών που σχετίζεται με τον καρκίνο του μαστού

Στην Ελλάδα, σύμφωνα με στοιχεία του Υπουργείου Υγείας, εμφανίζονται περίπου 4.000 νέες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού κάθε χρόνο ενώ στην Κύπρο, οι περιπτώσεις καρκίνου του μαστού για τα έτη 2003-2007, υπολογίστηκαν στις 2.065, ενώ η Europan Donna σημειώνει ότι το 2013 διαγνώστηκαν 586 νέα περιστατικά.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι μέσα στην ίδια χώρα ή σε γειτονικές χώρες παρατηρείται σοβαρή μεταβλητότητα στην συχνότητα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η Φινλανδία, όπου η επίπτωση του καρκίνου του μαστού είναι χαμηλή σε αντίθεση με τις γειτονικές χώρες της Σουηδίας και Νορβηγίας. Επιπρόσθετα, στη Γερμανία έχει παρατηρηθεί διπλάσια συχνότητα στο Αμβούργο από ότι στο Σάαρ.

Μεταβλητότητα στη συχνότητα του καρκίνου του μαστού παρατηρείται και στις διάφορες φυλές της ίδιας χώρας. Για παράδειγμα στις Η.Π.Α ο καρκίνος του μαστού εμφανίζεται περισσότερο στα άτομα της λευκής φυλής, μέτρια στα άτομα της μαύρης φυλής και ελάχιστα στα άτομα της κίτρινης φυλής που μένουν εκεί.

Ο καρκίνος του μαστού εμφανίζεται και στους άνδρες αλλά πολύ σπανιότερα με συχνότητα 1 στις 100 περιπτώσεις καρκίνων στις γυναίκες. Παρά το γεγονός αυτό βέβαια, υπολογίζεται ότι 2.150 άντρες θα διαγνωστούν με καρκίνο του μαστού και 410 θα πεθάνουν κάθε χρόνο παγκοσμίως.

Γενικότερα, οι ρυθμοί θνησιμότητας από τον καρκίνο του μαστού εμφάνιζαν αύξηση το 1951 έως περίπου το 1990 και μειώθηκαν μετά στις περισσότερες Ευρωπαϊκές χώρες, την Αυστραλία και την Αμερική. Αυτό οφείλεται στο διαδεδομένο μαστογραφικό έλεγχο, την ακριβή διάγνωση και τη σημερινή εξελιγμένη θεραπεία.

1.3.2 Παράγοντες κινδύνου

Η αιτιολογία ανάπτυξης καρκίνου του μαστού παραμένει έως σήμερα άγνωστη, αλλά έχει διαπιστωθεί πως σε αυτήν εμπλέκονται πολλοί περιβαλλοντικοί, διατροφικοί και κληρονομικοί παράγοντες καθώς και περισσότερα του ενός γονίδια. Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί πολλοί παράγοντες με μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό σχετικού κινδύνου.

- ❖ **Ηλικία.** Η εμφάνιση καρκίνου του μαστού σε γυναίκες ηλικίας κάτω των 30 ετών είναι σπάνια με συχνότητα 25 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα. Μετά από αυτήν την ηλικία ο κίνδυνος εμφάνισης αυξάνεται δραματικά μέχρι την ηλικία των 50 ετών όπου αρχίζει συνήθως η εμμηνόπαυση και η καμπύλη του ρυθμού αύξησης σταθεροποιείται και αποκτά ένα πλατώ, αριθμώντας 500 περιπτώσεις στα 100.000 άτομα (Ιωαννίδου Λ., 2007 & Ries et al, 2000).
- ❖ **Ηλικία έναρξης της έμμηνου ρύσεως και της εμμηνόπαυσης.** Η πρόωπη εμμηναρχία (<12 έτη) θεωρείται γενικά παράγοντας κινδύνου, ενώ φαίνεται να μειώνεται 10-20% για κάθε έτος καθυστέρησης έναρξης (Bernstein, 2002). Αντιθέτως, η καθυστέρηση της εμμηνόπαυσης (>50 έτη) σχετίζεται με μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού και μάλιστα γυναίκες με τελευταία έμμηνου ρύση σε ηλικία άνω των 55 ετών είχαν στατιστικά διπλάσιο ποσοστό εμφάνισης της νόσου σε σχέση με εκείνες που την είχαν σε ηλικία μικρότερη των 45 (Trichopoulos et al., 1972).
- ❖ **Ηλικία πρώτης κύησης.** Γενικότερα, η κύηση θεωρείται προστατευτικός παράγοντας για την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού αλλά επηρεάζεται από την ηλικία της πρώτης τελειόμηνης κύησης. Γυναίκες που δεν έχουν καθόλου παιδιά ή που

γέννησαν παιδί σε ηλικία μεγαλύτερη των 35 ετών εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο λόγω παρατεταμένης έκθεσης της γυναίκας σε οιστρογόνα. Μάλιστα έχει δειχθεί ότι γυναίκες που γέννησαν σε ηλικία μικρότερη των 20 ετών παρουσιάζουν 50% μικρότερες πιθανότητες εμφάνισης του καρκίνου του μαστού σε σχέση με εκείνες που είχαν την πρώτη κύηση σε ηλικία μετά τα 30 έτη (MacMahon et al., 1970).

- ❖ Γεωγραφική κατανομή. Όπως παρατηρήθηκε και από τα επιδημιολογικά δεδομένα, ο καρκίνος του μαστού εμφανίζεται περισσότερο στις βιομηχανικές περιοχές από ότι στις υποανάπτυκτες. Αφορά έναν περιβαλλοντικό παράγοντα κινδύνου καθώς σε άτομα που μεταναστεύουν από περιοχές χαμηλής επίπτωσης σε περιοχές υψηλής επίπτωσης αυξάνεται ο κίνδυνος εμφάνισης.
- ❖ Οικογενειακό ιστορικό. Αποτελεί πολύ σημαντικό παράγοντα κινδύνου και ιδιαίτερα αν υπάρχουν περισσότεροι του ενός συγγενείς πρώτου βαθμού με καρκίνο του μαστού. Συγκεκριμένα, όταν υπάρχει μόνο ένας συγγενής πρώτου βαθμού (μητέρα, αδελφή, κόρη) ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού διπλασιάζεται, ενώ αν υπάρχουν δυο συγγενείς ο κίνδυνος σχεδόν πενταπλασιάζεται.
- ❖ Γενετικοί παράγοντες. Εδώ αναφέρονται οι κληρονομούμενες περιπτώσεις καρκίνου του μαστού που αφορούν το 5% με 10% των καρκινωμάτων. Συνήθως μιλάμε για κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού όταν υπάρχουν συγγενείς που ανέπτυξαν καρκίνο πριν την εμμηνόπαυση, έχουν παράλληλα ιστορικό καρκίνου ωοθηκών ή αμφοτερόπλευρο καρκίνο του μαστού. Όσον αφορά το γενετικό υλικό έχουν προσδιοριστεί γονίδια του καρκίνου του μαστού (p53, BRCA1, BRCA2) και γονίδια εξέλιξης του καρκίνου (erb B2, myc, cyclin D, Rb-1). Περίπου οι μισές ασθενείς με κληρονομικό καρκίνο έχουν μεταλλάξεις στο γονίδιο BRCA1 και το 30% των ασθενών στο γονίδιο BRCA2. Το γονίδιο BRCA1 χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 17q21 και μεταλλάξεις του αυξάνουν το ποσοστό εμφάνισης καρκίνου του μαστού αλλά και ωοθηκών στο 60% μέχρι την ηλικία των 50 ετών. Το γονίδιο BRCA2 εδράζεται στο χρωμόσωμα 13q12-13 και μεταλλάξεις του εντοπίζονται στο 90% των φορέων για καρκίνο του μαστού, ενώ αυξάνει και το βαθμό επικινδυνότητας στους άνδρες. Λιγότερο συχνά κληρονομούμενα σύνδρομα που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού είναι το σύνδρομο Li-Fraumeni, που αφορά μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 και η νόσος του Cowden που προκαλείται από μεταλλάξεις του γονιδίου PTEN.

- ❖ Ορμονικά σκευάσματα. Συγκεκριμένα, το πλεόνασμα οιστρογόνων ή η έλλειψη ορμονικής ισορροπίας σχετίζεται με τον καρκίνο του μαστού. Μελέτες έχουν δείξει πως η μακροχρόνια από του στόματος λήψη αντισυλληπτικών αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σε γυναίκες μικρότερης ηλικίας. Επίσης, η μακροχρόνια θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης (>5 έτη) αυξάνει ελαφρώς τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού (Ross et al., 2000).
- ❖ Ύψος και βάρος. Τα αποτελέσματα επτά πληθυσμιακών μελετών (333.819 γυναίκες και 4.385 περιπτώσεις διηθητικού καρκίνου του μαστού συνολικά) μετά από προσαρμογή για αναπαραγωγικούς, διατροφικούς και άλλους παράγοντες κινδύνου, έδειξαν πως ο σχετικός κίνδυνος για καρκίνο του μαστού με αύξηση ύψους κατά 5 εκατοστά ήταν 1,02 (95% CI 0,96-1,10) σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και 1,07 (1,03-1,12) σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Όσον αφορά το βάρος, η παχυσαρκία αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.
- ❖ Άσκηση. Η τακτική φυσική δραστηριότητα σχετίζεται αντίστροφα με τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού (IARC Handbook on Cancer Prevention, vol. 6, 2002) καθώς καθυστερεί την εμμηναρχή και την έκθεση της γυναίκας στα οιστρογόνα και ρυθμίζει το σωματικό βάρος.
- ❖ Διατροφή, αλκοόλ και κάπνισμα. Έχουν πραγματοποιηθεί ποικίλες μελέτες που προσπαθούν να συσχετίσουν διάφορες τροφές με το σχετικό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Έχει βρεθεί ότι η λήψη ζωικού λίπους κυρίως από κόκκινο κρέας και γαλακτοκομικές τροφές με υψηλό ποσοστό λίπους πριν την εμμηνόπαυση σχετίζεται με ένα αυξημένο κίνδυνο (Cho et al., 2003). Μέχρι σήμερα δεν έχουν βρεθεί σημαντικές διαφορές μεταξύ χορτοφάγων και μη-χορτοφάγων με παρόμοιους τρόπους ζωής (Key et al., 1999). Η πρόσληψη αλκοόλ από γυναίκες αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού καθώς αυξάνουν τη συσσώρευση οιστρογόνων στο αίμα. Τέλος, το κάπνισμα δε φαίνεται να σχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου του μαστού.
- ❖ Έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία. Γυναίκες που εκτίθενται σε ιονίζουσα ακτινοβολία και ιδιαίτερα κατά την εφηβεία εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού ακόμη και με έκθεση σε χαμηλή δόση (Boice and Stone, 1978 & Modan et al., 1989).

1.3.3 Μηχανισμοί καρκινογένεσης στο μαστό

Όπως φαίνεται, ο καρκίνος του μαστού συνιστά αποτέλεσμα αρκετών γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων μαζί. Το 29% μόνο των περιστατικών διαθέτουν οικογενειακό ιστορικό και περίπου το ένα τέταρτο αυτών παρουσιάζει συγκεκριμένο πρότυπο κληρονομής που δηλώνει ότι ο καρκίνος του μαστού μεταβιβάζεται ως αυτοσωμικό επικρατές χαρακτηριστικό με υψηλή διεισδυτικότητα (Evan, 1994 & Ford and Easton, 1995). Επιπρόσθετα, μελέτες σε μονοζυγωτικά δίδυμα επιβεβαιώνουν τη βασική σημασία των περιβαλλοντικών και επίκτητων γενετικών αλλαγών στην αιτιολογία του καρκίνου, καθώς δείχνουν ότι μόνο το 25% του κινδύνου εμφάνισης οφείλεται σε κληρονομικούς γενετικούς παράγοντες (Lichtenstein et al., 2000).

Μέχρι σήμερα, δεν είναι ακόμη γνωστή η ακριβή σειρά αλληλουχίας γεγονότων που οδηγούν εν τέλει στην εμφάνιση του καρκίνου του μαστού. Ωστόσο, γνωρίζουμε ότι πρόκειται για μετασχηματισμό των φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων του μαστικού ιστού σε καρκινικά κύτταρα μέσω ιστολογικών αλλαγών που περιλαμβάνουν τυπικές και μη τυπικές υπερπλασίες, *in situ* καρκινώματα και διηθητικούς καρκίνους. Έχει παρατηρηθεί ότι το καρκίνωμα *in situ* προκύπτει μέσα ή στην ακτίνα των εστιών της άτυπης επιθηλιακής υπερπλασίας (Lennington, 1994) και ότι ο διηθητικός καρκίνος του μαστού εμφανίζεται στην ίδια περιοχή όπου είχε διαγνωσθεί με βιοψία το καρκίνωμα *in situ* (Page, 1995).

Λαμβάνουν χώρα αλλαγές τόσο σε κυτταρικό επίπεδο όσο και σε γενετικό με τη συσσώρευση γενετικών μεταλλάξεων, οι οποίες αφορούν συγκεκριμένα στάδια της καρκινογένεσης ή είναι φαινομενικά άσχετες. Οι μεταλλάξεις αυτές συμβαίνουν λόγω έλλειψης ή προσθήκης γενετικού υλικού κατά την αντιγραφή του DNA ή των σταδίων επιδιόρθωσης του. Οι μεταλλάξεις αυτές εντοπίζονται πολλές φορές και στα στρωματικά κύτταρα που γεινιάζουν με τα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Αυτά μέσω τροποποιήσεων της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας οδηγούν σε δομικές και λειτουργικές αλλαγές των επιθηλιακών κυττάρων, συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη του καρκινικού όγκου εφόσον τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν το φυσιολογικό έλεγχο του πολλαπλασιασμού τους.

Διάφοροι καρκινογόνοι παράγοντες όπως είναι η ιονίζουσα ακτινοβολία, το κάπνισμα και οι οιστρογονικοί μεταβολίτες έχουν επίσης τη δυνατότητα να διεισδύουν στα κύτταρα και να δεσμεύονται ομοιοπολικά στο DNA με συνέπεια να διαταράσσουν την ισορροπία του και να αυξάνουν τις πιθανότητες καρκινογένεσης. Οι παράγοντες αυτοί προσεγγίζουν το

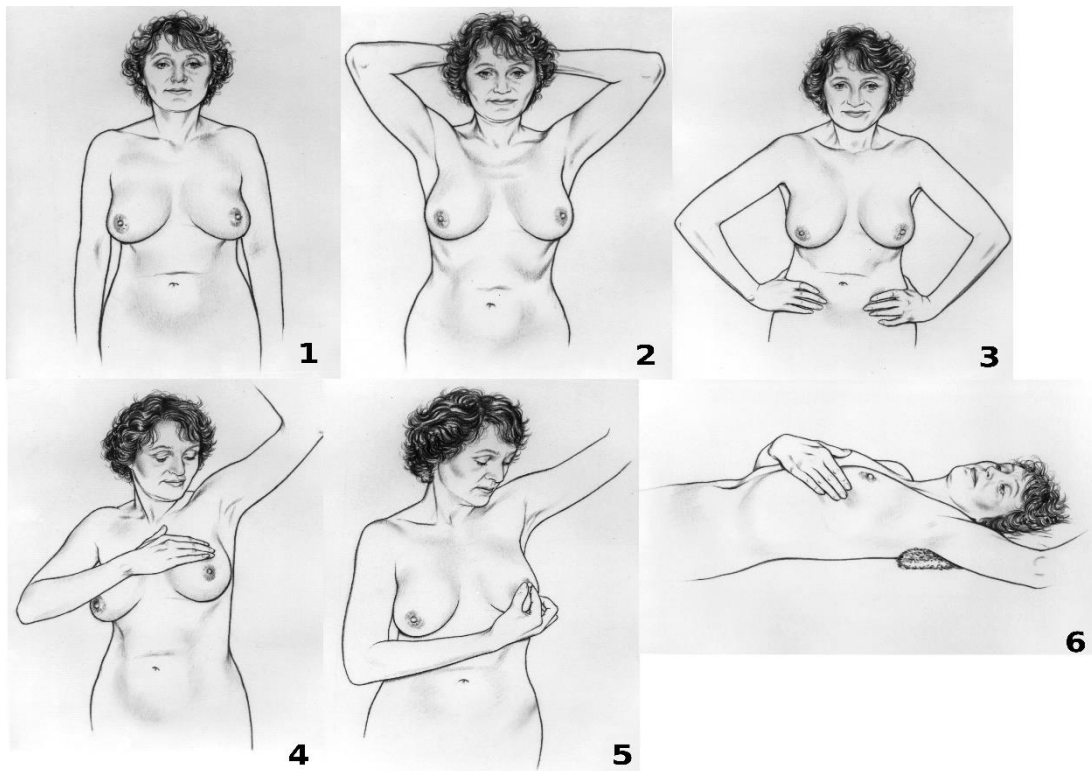
μαστό είτε μέσω απορρόφησης από το δέρμα είτε μέσω του λεμφικού συστήματος και μεταφέρονται με το τελευταίο αρχικά στους λεμφαδένες-φρουρούς και τους επιχώριους λεμφαδένες και έπειτα σε διάφορες θέσεις του σώματος (Ellsworth et al., 2004).

Όσον αφορά τα μεταστατικά στάδια της καρκινογένεσης του μαστού, τα δεδομένα είναι αντιφατικά. Υπάρχουν ενδείξεις πως οι μεταστάσεις πραγματοποιούνται στα πρώιμα στάδια της πορείας του καρκίνου υποδηλώνοντας ότι ο καρκίνος του μαστού είναι μια νόσος με συστηματική εξέλιξη μετά την εμφάνιση της και άλλα δεδομένα από τη μείωση της θνησιμότητας που δείχνουν ότι ο καρκίνος του μαστού μεθίσταται αργότερα.

Τελικά, σύμφωνα και με τα αποτελέσματα μιας μελέτης 3.000 ασθενών από τους Tubiana & Koscielnly το 1991, διατυπώθηκε πως ο καρκίνος του μαστού είναι μια ασθένεια με διαδοχικά στάδια ποικίλης χρονικής διάρκειας, η οποία μπορεί να ποικίλει από την αργή αύξηση μεγέθους του όγκου και την καθυστερημένη μετάσταση μέχρι την ταχύτατη ανάπτυξη στα πιο επιθετικά καρκινώματα του μαστού.

1.3.4 Διάγνωση

Η διαδικασία διάγνωσης του καρκίνου του μαστού ξεκινάει από την ίδια τη γυναίκα η οποία αυτοεξετάζεται. Παρόλο που τα πρώτα στάδια της νόσου είναι ασυμπτωματικά, η ανίχνευση μάζας αποτελεί τη πιο συχνή εκδήλωση (76% των περιπτώσεων) και σύμφωνα με έρευνα του Αμερικάνικου Κολλεγίου των Χειρουργών, το 42% των καρκίνων του μαστού ανακαλύπτεται από τις ίδιες με την αυτοεξέταση και μόνο το 24% από τους γιατρούς. Η αυτοεξέταση πρέπει να γίνεται μια φορά το μήνα και συγκεκριμένα μεταξύ 7ης-10ης μέρας του περιοδικού της κύκλου, όταν οι μαστοί είναι λιγότερο ευαίσθητοι και μαλακοί. Σε εμμηνοπαυσιακές γυναίκες ή σε γυναίκες που έχει αφαιρεθεί η μήτρα, η αυτοεξέταση μπορεί να γίνεται πάντα την ίδια μέρα. Μετά από σωστή ενημέρωση της γυναίκας από ειδικούς, θα μπορεί με ενωμένα τα δάκτυλα να εξετάζει όλη την επιφάνεια του μαστικού αδένου, συμπεριλαμβανομένου της θηλής καθώς και τη μασχάλη.



Εικόνα 8. Ένα απεικονιστικό παράδειγμα των σταδίων αυτοεξέτασης μαστών.

Πέρα από τη ψηλαφητή μάζα, μια γυναίκα μπορεί να υποψιαστεί την εκδήλωση πρώιμων σταδίων ή καρκίνου του μαστού από εκκρίσεις του μαστού (2% των περιπτώσεων) που εξορμούν από τη θηλή του ενός μαστού, έλξη ή αλλοιώσεις του δέρματος, αλλοιώσεις της θηλής (εισολική ή νόσος του Paget), μασχαλιαία «λεμφαδενοπάθεια» (διόγκωση των λεμφογαγγλίων της μασχάλης) ή ερυθρότητα-θερμότητα-ευαισθησία-οίδημα του δέρματος των μαστών που φανερώνουν το φλεγμονώδες καρκίνωμα.

Σε όλες τις ανωτέρω περιπτώσεις, η γυναίκα θα πρέπει να επισκεφτεί έναν γυναικολόγο, ο οποίος θα ακολουθήσει τη κλασική μέθοδο διάγνωσης όγκου του μαστού που περιλαμβάνει:

1. Ιστορικό. Η γυναίκα καλείται από το γυναικολόγο της να δώσει διάφορα στοιχεία όπως είναι η ηλικία της, η ηλικία εμμηναρχής, αν έχει κάνει λήψη αντισυλληπτικών και η ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού καρκίνου του μαστού καθώς και να αναφέρει την εμφάνιση κάθε προαναφερόμενου συμπτώματος, ώστε να υπολογισθεί ο σχετικός κίνδυνος και να χαρακτηριστεί ως άτομο χαμηλού ή υψηλού κινδύνου προς συστηματική παρακολούθηση.

2. Κλινική εξέταση. Περιλαμβάνει την επισκόπηση και ψηλάφηση των μαστών από το γυναικολόγο. Ο γυναικολόγος ψάχνει τυχόν ασυμμετρία, εμφανείς μάζες, οίδημα, εισολκή ή εξέλκωση θηλής ή δέρματος. Αφότου ξαπλώσει η γυναίκα ξεκινάει η ψηλάφηση η οποία έχει ως στόχο τον έλεγχο της θερμοκρασίας, της ευαισθησίας και της σύστασης του μαστικού αδένα. Σε περίπτωση που υπάρχει όγκος, μετρίεται το μέγεθος και η σκλήρυνση του, το αν είναι περιγεγραμμένος ή όχι και αν συνέχεται με το γύρω μαστικό αδένα, το υπερκείμενο δέρμα, τους υποκείμενους μύες ή το θωρακικό τοίχωμα (Μαρκόπουλος Ι. Χ., 2007).
3. Μαστογραφία-Υπερηχογράφημα. Η μαστογραφία είναι μια ακτινολογική μέθοδος που χρησιμοποιεί πλέον χαμηλές δόσεις ακτινοβολίας με στόχο να αναδείξει καρκινικούς ψηλαφητούς ή μη όγκους μικρού μεγέθους (<5χιλιοστών) και άλλες εστίες καρκίνου και αλλοιώσεις. Χρησιμοποιείται πάντα συγκριτικά με παλαιότερες μαστογραφίες και προτείνεται να γίνεται μια μαστογραφία κάθε ένα ή δυο χρόνια μετά την ηλικία των 50 ετών. Υπάρχει το σύστημα BI-RADS™ (Breast Imaging Reporting and Database System) για την κωδικοποίηση της διάγνωσης του καρκίνου του μαστού από τους ακτινοδιαγνώστες.

Κατηγορία	Εκτίμηση και αξιολόγηση
0	Απαραίτητη πρόσθετη απεικονιστική εκτίμηση
1	Αρνητική, σύσταση ετήσιας μαστογραφίας άνω των 40 ετών
2	Καλοήγη ευρήματα, σύσταση ετήσιας μαστογραφίας άνω των 40 ετών
3	Πιθανόν καλοήθες εύρημα με πιθανότητα καρκίνου <2%, συστήνεται νέα μαστογραφία μετά από 6 μήνες
4	Ύποπτη ανωμαλία, πιθανότητα κακοήθειας 25-50%, προτείνεται λήψη βιοψίας
5	Ισχυρές ενδείξεις καρκίνου, πιθανότητα 75-99%, απαραίτητη εξέταση βιοψίας

Το υπερηχογράφημα χρησιμοποιείται κυρίως στις νεαρές κοπέλες λόγω μικρής πιθανότητας κακοήθειας, μεγάλης πυκνότητας μαστού και για την αποφυγή ακτινοβολίας. Οι μοντέρνοι υπερηχογράφοι έχουν υψηλή διαγνωστική δυνατότητα και ακρίβεια και χαμηλό κόστος.

4. Κυτταρολογική εξέταση υλικού παρακέντησης με λεπτή βελόνα (FNAC). Αποτελεί μαζί με την κλινική εξέταση και τη μαστογραφία, τη βασική διαγνωστική τριάδα η οποία σε περιπτώσεις καρκίνου ανιχνεύει το 98-99% των ασθενών. Πρόκειται για μια απλή, γρήγορη και οικονομική τεχνική που πραγματοποιείται για κάθε ψηλαφητή διόγκωση με βασικό μειονέκτημα το ποσοστό «ψευδώς» αποτελεσμάτων σε αλλοιώσεις. Τα αποτελέσματα της παρουσιάζονται με την εξής κωδικοποίηση.

Κατηγορία	Εκτίμηση και αξιολόγηση
C0	Απουσία κυττάρων/ Ανεπιτυχής παρακέντηση
C1	Ανεπαρκές υλικό για διάγνωση
C2	Κύτταρα ενδεικτικά καλοήθους αλλοίωσης
C3	Άτυπα κύτταρα- Πιθανή καλοήθεια
C4	Ύποπτη κακοήθεια
C5	Κακοήθεια

5. Ιστολογική εξέταση υλικού βιοψίας με κόπτουσα βελόνα (core biopsy). Αποτελεί τη σφραγίδα στην τελική διάγνωση του διηθητικού καρκίνου του μαστού. Αποτελεί μια μικρή, επεμβατική τεχνική με στόχο την ιστολογική προεγχειρητική επιβεβαίωση. Τα αποτελέσματα του εξεταστέου υλικού της βιοψίας παρουσιάζονται με την παρακάτω κωδικοποίηση:

Κατηγορία	Εκτίμηση και αξιολόγηση
B1	Ανεπαρκής- Παρουσία φυσιολογικού ιστού
B2	Καλοήθης αλλοίωση
B3	Καλοήθης αλλοίωση με ακαθόριστη πιθανότητα λανθάνουσας κακοήθειας
B4	Ύποπτη κακοήθεια
B5a	Μη διηθητικός καρκίνος
B5b	Διηθητικός καρκίνος
B5c	Καρκίνος χωρίς δυνατότητα εκτίμησης διήθησης

1.3.5 Ιστολογική ταξινόμηση

Μας βοηθάει στην ιστολογική ονομασία των νεοπλασματικών και μη αλλοιώσεων του μαστού και διευκολύνει τη συνεννόηση παγκοσμίως με μια ενιαία ταξινόμηση. Γενικότερα, σύμφωνα με την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (WHO, 2003) υπάρχουν οι παρακάτω κατηγορίες όγκων του μαστού:

- Επιθηλιακοί όγκοι
- Μικτά νεοπλάσματα
- Καρκινώματα ασυνήθους κλινικής εμφάνισης
- Μεσεγχυματικοί, δερματικοί, μυοεπιθηλιακοί όγκοι, ινοκυστικές αλλοιώσεις
- Ογκοειδείς αλλοιώσεις
- Όγκοι ανδρικού μαστού
- Μεταστατικοί όγκοι

Περαιτέρω, τα καρκινώματα του μαστού ταξινομούνται με βάση τον τύπο των κυττάρων που τα αποτελούν και τον τρόπο ανάπτυξης τους σε διηθητικά και μη. Έτσι, έχουμε τα μη διηθητικά καρκινώματα μαστού (in situ), τα οποία δε διασπούν τη βασική μεμβράνη που περιβάλλει τους πόρους ή τα λόβια, και τα διηθητικά καρκινώματα, τα οποία επεκτείνονται στο περιβάλλον στρώμα.

Τα διηθητικά καρκινώματα μαστού διακρίνονται σε δυο κύριες κατηγορίες, των πορογενών και λοβιακών καρκινωμάτων, αλλά παρουσιάζουν και τις εξής υποκατηγορίες:

- ο Πορογενείς διηθητικά καρκινώματα (85% περίπου των καρκινωμάτων):

-Χωρίς ειδικούς χαρακτήρες (NOS)

-Μυελοειδές

-Θηλώδες

-Σωληνώδες

-Βλεννώδες ή Κολλοειδές

-Φλεγμονώδες

-Νόσος Paget

- ο Λοβιακά διηθητικά καρκινώματα

Τα μη διηθητικά καρκινώματα μαστού χωρίζονται επίσης σε λοβιακά και πορογενείς καθώς και σε ενδοπορικά/ενδοκυστικά θηλώδεις. Στα πορογενείς μη διηθητικά διακρίνουμε κάποιες υποκατηγορίες:

-Φαγεσωρικό

-Μικροθηλώδεις

-Ηθμοειδές

-Συμπαγές

-Θηλώδεις

1.3.6 Σταδιοποίηση

Εάν σε μια γυναίκα με όλες τις προαναφερόμενες εξετάσεις ευρεθεί καρκίνος του μαστού θα ακολουθήσει η σταδιοποίηση του με σκοπό την συνεκτίμηση όλων των αποτελεσμάτων για μια σαφή τελική διάγνωση που θα βοηθήσει στην επιλογή θεραπείας και τη μετέπειτα παρακολούθηση. Επιπρόσθετα η ασθενής υποβάλλεται σε γενικό αιματολογικό έλεγχο, λειτουργικές δοκιμασίες ήπατος, υπερηχογράφημα ήπατος, ακτινογραφία θώρακος και σπινθηρογράφημα οστών.

Σήμερα, το αναγνωρισμένο σύστημα σταδιοποίησης του καρκίνου του μαστού είναι το “tumor-node-metastasis” (TNM) σύστημα της American Joint Committee on Cancer (AJCC) και της Union International Contre le Cancer (UICC) που ισχύει από το 1992. Με βάση αυτό αξιολογούνται τρία στοιχεία, η έκταση του πρωτοπαθούς όγκου (T), η παρουσία ή απουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και η έκταση αυτών (N) και η παρουσία ή απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (M).

Πίνακας. Σταδιοποίηση καρκίνου του μαστού κατά TNM (WHO classification 2002)

Στάδιο	Ταξινόμηση κατά TNM	5ετής επιβίωση (%)
0	TisNoMo	92
I	T1NoMo	87
IIA	T0N1Mo T1N1Mo T2NoMo	78
IIB	T2N1Mo T3NoMo	68
IIIA	T0N2Mo T1N2Mo T2N2Mo T3N1Mo T3N2Mo	51
IIIB	T4 οποιοδήποτε N ₁ Mo Οποιοδήποτε TN3 Mo	42
IV	Οποιοδήποτε T _a Οποιοδήποτε N M1	13

Υπάρχει μια αναθεωρημένη έκδοση της AJCC από το 2006 η οποία επεξηγεί αναλυτικότερα τον παραπάνω πίνακα και τη σταδιοποίηση. Σύμφωνα με αυτή:

A. Ο πρωτοπαθής όγκος (Primary Tumor T) διακρίνεται σε:

- Tx, όταν δε μπορεί να προσδιοριστεί
- T₀, όταν δεν υπάρχει ένδειξη πρωτοπαθούς όγκου
- Tis, σε περίπτωση καρκινώματος in situ
- T₁, όταν ο όγκος είναι μέγιστης διαμέτρου <2 cm
- T₂, όταν ο όγκος είναι μέγιστης διαμέτρου 2<T<5 cm
- T₃, όταν ο όγκος είναι μέγιστης διαμέτρου > 5cm
- T₄, όταν ο όγκος είναι οποιουδήποτε μεγέθους με άμεση διήθηση – επέκταση στο θωρακικό τοίχωμα ή δέρμα

B. Επιχώριοι λεμφαδένες (Regional Lymph Node, N) θεωρούνται οι μασχαλιαίοι λεμφαδένες συμπεριλαμβανομένων των λεμφαδένων που βρίσκονται εντός του μαστικού αδένου, οι ομόπλευροι έσω μαστικοί λεμφαδένες και οι ομόπλευροι υπερκλείδιοι και υποκλείδιοι λεμφαδένες.

-Nx, δεν προσδιορίζονται επιχώριοι λεμφαδένες

-N0, δεν παρατηρούνται μεταστάσεις στους επιχώριους λεμφαδένες

-N1, παρατηρείται μετάσταση σε κινητούς ομόπλευρους μασχαλιαίους λεμφαδένες

-N2, παρατηρείται μετάσταση στους ομόπλευρους μασχαλιαίους λεμφαδένες που συμφύονται μεταξύ τους ή σε γειτονικά ανατομικά στοιχεία και διακρίνεται σε N2a και N2b

-N3, παρατηρείται μετάσταση στους ομόπλευρους έσω μαστικούς λεμφαδένες και διακρίνεται σε N3a, N3b και N3c.

C. Απομακρυσμένες μεταστάσεις (M) διακρίνονται σε:

-M_x, όταν είναι αδύνατο να εκτιμηθούν απομακρυσμένες μεταστάσεις

-M₀, όταν δεν προσδιορίζονται απομακρυσμένες μεταστάσεις

-M₁, όταν παρουσιάζονται απομακρυσμένες μεταστάσεις

1.3.7 Προγνωστικοί παράγοντες

Οι κλινικοπαθολογοανατομικές ταξινομήσεις και η σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού κατά TNM δεν έχουν απόλυτη προγνωστική αξία, καθώς συμβάλλουν στη διάγνωση της νόσου αλλά δε δίνουν πληροφορίες για την εξέλιξη και ανάπτυξη των όγκων και μεταστάσεων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο καρκίνος του μαστού είναι μια περίπλοκη ασθένεια στην οποία περιπλέκονται πολλοί μοριακοί μηχανισμοί. Για το σκοπό αυτό, προσδιορίστηκαν προγνωστικοί παράγοντες που υποδεικνύουν την επιβίωση ασθενών καθώς και το ποια θεραπεία θα τους επωφελήσει περισσότερο. Σύμφωνα με το Κολέγιο των Παθολογοανατόμων της Αμερικής (Fitzgibbons et al., 2000) έχουμε τις εξής κατηγορίες:

1. Παράγοντες με αποδεδειγμένη προγνωστική αξία στην αντιμετώπιση-θεραπεία των γυναικών ασθενών όπως είναι η TNM σταδιοποίηση, ο ιστολογικός τύπος
2. Παράγοντες που έχουν μελετηθεί, αλλά η αξία τους πρέπει να τεκμηριωθεί με στατιστικές μελέτες, όπως είναι οι δείκτες πολλαπλασιασμού και η βλάβη στο γονίδιο p53.
3. Παράγοντες που ακόμη χρειάζονται μελέτη, όπως είναι η πλοειδία του DNA, η καθεψίνη D και η μικροαγγειακή πυκνότητα.

Οι παραπάνω παράγοντες χωρίζονται περαιτέρω σε μορφολογικούς και σε βιολογικούς.

Στους βιολογικούς προγνωστικούς παράγοντες συμπεριλαμβάνονται οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών (ER & PR), οι δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Ki-67, PCNA/cyclin), οι αυξητικοί παράγοντες και οι υποδοχείς τους (EGF, Bfgf, IGF-I, erbB-2, CDK, TGF-β/PDGF-B), τα ρυθμιστικά γονίδια του κυτταρικού κύκλου (p53), τα γονίδια που σχετίζονται με την απόπτωση (Bcl-2), την αγγειογένεση (VEGF, PD-ECGF/TP) και τη διήθηση και μετάσταση (καθεψίνη D, uPa).

Στους μορφολογικούς προγνωστικούς παράγοντες έχουμε το μέγεθος του όγκου, τη διήθηση μασχαλιαίων λεμφαδένων, το βαθμό κακοήθειας, το συνυπάρχον *in situ* στοιχείο και άλλα μικρότερης σημασίας. Αξίζει να δούμε αναλυτικότερα κάποιους από αυτούς λόγω της σημαντικής τους προγνωστικής αξίας.

Το μέγεθος του καρκινικού όγκου προσδιορίζεται μακροσκοπικά και προτιμάται για μεγαλύτερα καρκινώματα. Έχει δείχθει ότι όσο αυξάνει το μέγεθος του όγκου τόσο μειώνεται η επιβίωση των ασθενών και αυξάνεται η συχνότητα λεμφαδενικών μεταστάσεων.

Η διήθηση των επιχωρίων μασχαλιαίων λεμφαδένων αποτελεί τον ισχυρότερο παθολογοανατομικό προγνωστικό παράγοντα, τόσο της ελεύθερας νόσου όσο και της ολικής επιβίωσης, όπως υποστηρίζεται από πολλούς ερευνητές (Fisher et al., 1993, Veronesi et al., 1995, Fitzgibbons et al., 2000). Η επιβίωση εξαρτάται γενικότερα από το επίπεδο των διηθημένων λεμφαδένων και το ποσό του μεταστατικού όγκου, αλλά έχει αποδειχθεί πως το 89% περίπου των ασθενών με λεμφαδενικές μεταστάσεις θα εμφανίσουν αργότερα και απομακρυσμένες μεταστάσεις. Ο Hellman έχει διαπιστώσει πως ασθενείς με T1 όγκους μαστού και λιγότερους από 4 διηθημένους λεμφαδένες έχουν εικοσαετές διάστημα ελεύθερου νόσου όμοιο με τις ασθενείς με T1 όγκους και αρνητικούς λεμφαδένες.

Συμπέρανε δηλαδή ότι η ύπαρξη περισσότερων των 4 διηθημένων λεμφαδένων είναι ένας δείκτης συστηματικής νόσου και ότι ο καρκίνος του μαστού με αρνητικούς λεμφαδένες είναι μια θεραπεύσιμη νόσος. (!) Η βιοψία του λεμφαδένα-φρουρού είναι μια ειδική, εναλλακτική τεχνική του καθαρισμού της μασχάλης που μειώνει τη νοσηρότητα.

Ο βαθμός κακοήθειας ενός καρκινώματος του μαστού αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα που διακρίνεται στον πυρηνικό και τον ιστολογικό. Ο πυρηνικός βαθμός κακοήθειας είναι μια κυτταρολογική αξιολόγηση των καρκινικών έναντι των φυσιολογικών πυρηνών και βασίζεται στο βαθμό της πυρηνικής ατυπίας. Για την κωδικοποίηση του χρησιμοποιείται το σύστημα των Black & Speer (1957) και Cutler et al.(1969) σύμφωνα με τον οποίο έχουμε τον φτωχά διαφοροποιημένο πυρηνικό βαθμό κακοήθειας, τον ενδιάμεσο και τον καλά διαφοροποιημένο. Αντιθέτως, έχουμε και τον ιστολογικό βαθμό κακοήθειας που βαθμολογείται αριθμητικά και περιγράφει το μικροσκοπικό πρότυπο αύξησης ενός διηθητικού όγκου και τα χαρακτηριστικά της κυτταρικής διαφοροποίησης του. Στην Αμερική χρησιμοποιείται το λεγόμενο Scarff-Bloom-Richardson (SBR) σύστημα για την κωδικοποίηση του, ενώ στην Ευρώπη, το εν λόγω σύστημα χρησιμοποιείται τροποποιημένο κατά Nottingham καθώς έχει αναπροσαρμοστεί από τους Elston-Ellis προσδίδοντας μεγαλύτερη αντικειμενικότητα στη διαδικασία αξιολόγησης (Bloom HJ and Richardson WW,1957). Σύμφωνα με το σύστημα οι ιστολογικοί βαθμοί κακοήθειας είναι οι εξής: 1) βαθμός κακοήθειας I, που χαρακτηρίζει νεοπλάσματα υψηλής διαφοροποίησης με καλή πρόγνωση, 2) βαθμός κακοήθειας II, που χαρακτηρίζει νεοπλάσματα μετρίου βαθμού διαφοροποίησης και ενδιάμεσης πρόγνωσης, 3) βαθμός κακοήθειας III, που χαρακτηρίζει νεοπλάσματα χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης με κακή πρόγνωση και 4) ο συνδυασμένος ιστολογικός βαθμός κακοήθειας (Elston CW and Ellis IO,1991).

1.3.8 Θεραπεία

Στις ημέρες μας, λόγω της πολυπλοκότητας του καρκίνου του μαστού και της έντονης μεταστατικής του ικανότητας διαλέγονται πολυπαραγοντικές θεραπείες, που περιλαμβάνουν τόσο τη χειρουργική όσο και την ακτινο-, χημειο-, ορμονοθεραπεία.

Οδηγός για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού όπως φαίνεται αποτελεί η ριζική μαστεκτομή κατά Halsted η οποία έχει αποδώσει δεκαετή επιβίωση 70% και 30% αντίστοιχα στα στάδια I και II. Η ριζική μαστεκτομή αφορά την αφαίρεση ολόκληρου του

μαστικού αδένα με το υπερκείμενο δέρμα, του συμπλέγματος θηλής-άλως και των μασχालιαίων λεμφαδένων. Είναι μια πολύ ασφαλής χειρουργική επέμβαση ρουτίνας πλέον με μικρή μετεγχειρητική νοσηρότητα.

Σταδιοποίηση του καρκίνου	Ογκεκτομή	Μαστεκτομή	Μασχालιαίοι λεμφαδένες	Ακτινο-θεραπεία	Χημειο-θεραπεία	Ορμονο-θεραπεία
0	+	+	-	+	-	-
I	+	+	+	+	-, +	-, +
II	+	+	+	+	-, +	-, +
IIIΑ	-	+	+	+	+	-
IIIΒ	Μόνο βιοψία	-	-	+	+	-
IV	Μόνο βιοψία	-	-	Για έλεγχο του T και M	Για έλεγχο του M	+

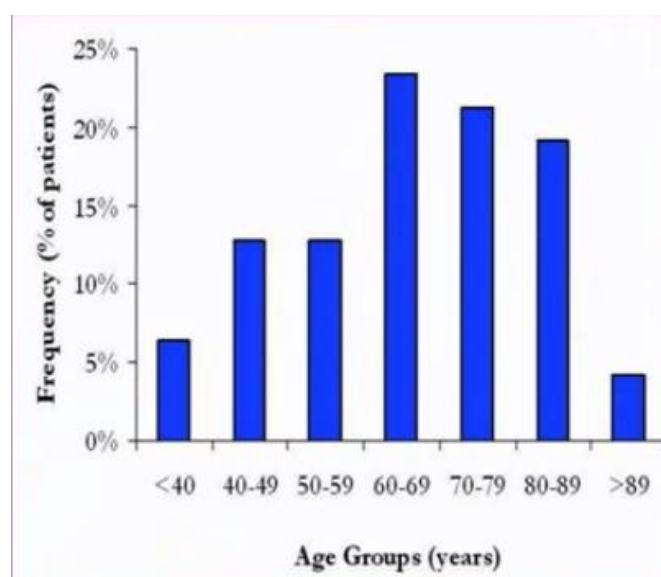
Τα τελευταία 50 χρόνια χρησιμοποιείται ευρέως και η ακτινοθεραπεία για την αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού. Η ακτινοθεραπεία γίνεται τμηματικά για 6 εβδομάδες συνήθως και αναλόγως το στάδιο του καρκίνου και τη χειρουργική του αντιμετώπιση διαλέγεται διαφορετικός κύκλος δόσεων. Σε όλες τις περιπτώσεις, η μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία έχει αποδειχθεί ότι ελαττώνει τις τοπικές υποτροπές αλλά δεν είναι βέβαιο εάν αυξάνει την επιβίωση των ασθενών. Εμφανίζει δυστυχώς παρενέργειες και επιπλοκές που διακρίνονται σε οξείες (φλεγμονή, υπέρχρωση, έγκαυμα του δέρματος και ήπιο άλγος στο μαστό) και σε απότερες (οίδημα & σκληρία μαστού, κατάγματα πλευρών, περικαρδίτιδα, πνευμονίτιδα, οίδημα άνω άκρου και άλλα).

Η προφυλακτική, συστηματική χορήγηση συνδυασμού-σχήματος φαρμάκων ελαττώνει τη πιθανότητα υποτροπής του καρκίνου του μαστού κατά την πρώτη δεκαετία και αυξάνει τη συνολική επιβίωση σε προεμμηνοπαυσιακές ασθενείς με διηθημένους μασχालιαίους λεμφαδένες (Davidson N. And Abeloff MD, 1994 & Lancet 1992). Ρυθμίζεται ανάλογα με τα χειρουργικά ευρήματα, την εμμηνοπαυσιακή κατάσταση της ασθενούς και τους ορμονικούς υποδοχείς του καρκινικού όγκου και ενδείκνυται πάντα σε γυναίκες με υψηλό κίνδυνο υποτροπής.

Η ορμονοθεραπεία αποτελεί μια ειδική αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού και αφορά συγκεκριμένες ασθενείς που έχουν όγκους θετικούς για τον οιστρογονικό (ER) και προγεστερονικό υποδοχέα (PgR). Αφορά τη χορήγηση ταμοξιφένης, αναστολών της αρωματάσης και συνδυασμό LH-RH αναλόγων με κύριο στόχο τη διακοπή σύνθεσης οιστρογόνων ή την παρεμπόδιση δράσης τους καθώς η εξέλιξη του καρκίνου του μαστού είναι ορμονοεξαρτώμενη.

1.3.9 Καρκίνος μαστού στους άνδρες

Ο καρκίνος του μαστού στους άνδρες είναι μια σπάνια νόσος η οποία ούτε έχει χαρακτηριστεί ούτε έχει κατανοηθεί πλήρως. Η πρώτη αναφορά σε καρκίνο του μαστού στους άνδρες έγινε από τον John of Ardennes τον 14^ο αιώνα και από τότε τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει ελάχιστες αναδρομικές μελέτες με μικρό αριθμό περιστατικών. Η επίπτωση του ανδρικού καρκίνου του μαστού έχει αυξηθεί κατά 26% τις τελευταίες δεκαετίες και η ηλικία εμφάνισης είναι μεγαλύτερη απ' ό τι στις γυναίκες, συνήθως άνω των 61 ετών με 71.



Εικόνα 9. Ηλικιακή κατανομή του καρκίνου του μαστού στους άνδρες.

Επιδημιολογικά, ο καρκίνος του μαστού αφορά το 0.5-1% των περιπτώσεων καρκίνων στον ανδρικό πληθυσμό και εμφανίζει μια συχνότητα 1/100.000 άνδρες ανά έτος παγκοσμίως, η οποία διαφέρει από την εθνότητα και τη γεωγραφική θέση.

Στην Αμερική καταγράφονται 1.600 νέες περιπτώσεις τον χρόνο, ενώ 400 άνδρες θα πεθάνουν από αυτή την αιτία. Στην Αφρική υπάρχουν χώρες με αυξημένη συχνότητα όπως η Ζάμπια και η Ουγκάντα (5-15%) και η μόνη λογική εξήγηση είναι η αυξημένη συχνότητα ηπατικών βλαβών οι οποίες συνοδεύονται με υψηλά επίπεδα οιστρογόνων. Ανεξήγητο αυξημένο ποσοστό εμφάνισης της νόσου παρουσιάζουν οι Εβραίοι, με 2-3/100.000 περιστατικά. (Ottini L et al., 2009).

Στην Ελλάδα, επί του παρόντος, σε αντίθεση με τις περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες δεν γίνεται καταγραφή των περιστατικών ανδρικού καρκίνου του μαστού (Λύπας Γ.Δ., Μπαρμπούνης Β., 2012).

Οι παράγοντες κινδύνου είναι παρόμοιοι με την εμφάνιση του καρκίνου του μαστού στις γυναίκες και περιλαμβάνουν τόσο γενετικούς και ορμονικούς όσο και εργασιακούς, περιβαλλοντικούς και διατροφικούς παράγοντες. Όσον αφορά τους γενετικούς παράγοντες, και εδώ κυρίαρχο ρόλο παίζουν τα γονίδια BRCA1 και BRCA2, καθώς και τα γονίδια CHEK2 και CYP17. Έναν ισχυρό γενετικό παράγοντα αποτελεί και το σύνδρομο Klinefelter που οφείλεται στην προσθήκη ενός επιπλέον χρωμοσώματος X στον φυσιολογικό καρυότυπο XY. Τα άτομα αυτά εμφανίζουν γυναικομαστία, ατροφία των όρχεων, χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης και αυξημένα επίπεδα γοναδοτροπινών. Στους πάσχοντες ο κίνδυνος για καρκίνο του μαστού είναι 20 με 50 φορές μεγαλύτερος σε σχέση με το γενικό ανδρικό πληθυσμό και τα ποσοστά θνητότητας είναι παρόμοια με εκείνα των γυναικών. Επίσης, άτομα με τα φαινοτυπικά συμπτώματα του συνδρόμου Cowden εμφανίζουν αυξημένο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού. Όσον αφορά τους ορμονικούς παράγοντες οποιαδήποτε κατάσταση οδηγεί σε διαταραχή της ισορροπίας ανδρογόνων-οιστρογόνων μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο, όπως είναι η γυναικομαστία. Μάλιστα, η προλακτιναιμία που συνοδεύεται από χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης σχετίζεται συχνά με τον αμφοτερόπλευρο καρκίνο μαστού στους άνδρες. Τέλος, η εργασία σε θερμό περιβάλλον, σε καυσαέρια και η λήψη αλκοόλ > 90gr ημερησίως αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης.

Οι άνδρες στο 75% των περιπτώσεων εμφανίζουν ένα ανώδυνο ογκίδιο στο μαστό και σπανιότερα κάποια εισολκή, εξέλκωση ή αιματηρό έκκριμα της θηλής. Η διήθηση των μασχαλιαίων λεμφαδένων φαίνεται να είναι συχνότερη στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες και στη βιβλιογραφία αναφέρονται περιπτώσεις αφανούς (occult) καρκίνου του μαστού (Onami S et al., 2010).

Η διαγνωστική εκτίμηση γίνεται με τη γνωστή τριπλή εξέταση (κλινική εξέταση, μαστογραφία-υπερηχογράφημα και βιοψία) και η ιστολογική σταδιοποίηση με το ίδιο σύστημα TNM. Η μόνη διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι ο ανδρικός μαστός είναι υποτυπώδης και δε σχηματίζει λοβία εκτός κι αν υπάρχει αυξημένη συγκέντρωση ενδογενών ή εξωγενών οιστρογόνων. Το 90% των περιπτώσεων αφορά πορογενείς διηθητικά καρκινώματα και μόνο το 1,5% είναι λοβιακά.

Η θεραπεία του καρκίνου του μαστού στους άνδρες ακολουθεί τα ίδια πρωτόκολλα με τις γυναίκες στην ακτινοθεραπεία και τη χημειοθεραπεία και η τροποποιημένη ριζική μαστεκτομή αποτελεί την καθιερωμένη χειρουργική αντιμετώπιση. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στην ορμονοθεραπεία, καθώς όλοι οι άνδρες με καρκίνο του μαστού θεωρείται ότι έχουν θετικούς ορμονοϋποδοχείς (tamoxifen, anastrozole)(Cutuli B et al.,1995).

1.4. OCT-4

1.4.1 Η οικογένεια POU

Η οικογένεια POU αποτελείται από πολλά γονίδια και οφείλει την ονομασία της στο συνδυασμό ονομάτων από τρεις διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες, τον Pit-1, τον Octamer transcription factor και τον Unc-86 από τον οργανισμό *C.elegans*. Όλες οι πρωτεΐνες της οικογένειας λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες και συνδέονται σε ένα οκταμερές μοτίβο ATGC(A/T)AAT το οποίο εντοπίζεται σε ρυθμιστικές αυτοτελείς περιοχές (*domains*) τυπο-ειδικών κυττάρων όπως και σε πανταχού παρών γονίδια.

Οι POU παράγοντες έχουν μια κοινώς συντηρημένη αυτοτελής περιοχή σύνδεσης με το DNA, που ονομάζεται POU domain και αποτελείται από δύο υψηλά συντηρημένες υποπεριοχές οι οποίες χωρίζονται με μία ευέλικτη αλληλουχία-συνδέτη, μήκους 14 έως 26 αμινοξέων. Αυτές περιλαμβάνουν την POU ομοπεριοχή (POU_H) και την POU-ειδική αυτοτελής περιοχή (POU_S), περιοχές οι οποίες εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών.

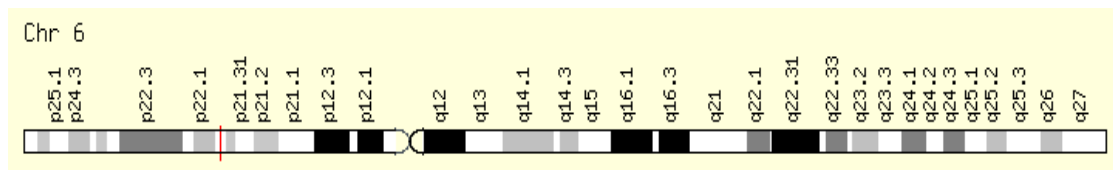
Η οικογένεια POU περιλαμβάνει πολλές πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν εντοπιστεί σε διάφορους οργανισμούς, όπως στο νηματώδες *C.elegans*, τη δροσόφιλα, τα αμφίβια *Xenopus*, τα ψάρια *Zebrafish*, τα ποντίκια και τον άνθρωπο, και δεν έχουν εντοπιστεί ακόμη σε μύκητες και φυτά. Παρουσιάζουν μια ευρεία ποικιλία λειτουργιών, που σχετίζεται όμως με τη λειτουργία του νευροενδοκρινικού συστήματος και την ανάπτυξη του οργανισμού. Για παράδειγμα, στα ποντίκια έχει βρεθεί ότι η οικογένεια POU αποτελείται από 10 μεταγραφικούς παράγοντες, Oct1-10. Ο Oct-1 ρυθμίζει πανταχού γονίδια, ο Oct-2 τα λεμφο-ειδικά γονίδια, ο Oct-3 μαζί με το Oct-7 εκφράζονται στα έμβρυα και σε κύτταρα του μυαλού, ενώ ο Oct-4 και Oct-5 εντοπίζονται στα αγονιμοποίητα ωοκύτταρα και στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα όπου εντοπίζεται και ο Oct-6 (Schoeler R. Hans et al, 1989).

Πίνακας. Ενδεικτικά γονίδια που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες της οικογένειας POU.

Γονίδιο	Πρωτεΐνη
POU1F1	Pit-1
POU2F1	Oct-1
POU2F2	Oct-2
POU2F3	Oct-11
POU3F1	Oct-6
POUEF2	Oct-7
POU3F4	Oct-9
POU4F1	BRN3A
POU4F2	BRN-3
POU4F3	BRN3C
POU5F1	Oct-3/Oct-4

1.4.2 Η δομή του γονιδίου Oct-4

Το γονίδιο του Oct-4 είναι γνωστό και με τις ονομασίες Oct-3, Oct-3/4 και POU5F1 και εδράζει στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 6. Εντοπίζεται στη θέση p21.31 και καλύπτει μια περιοχή 18.256 βάσεων του χρωμοσώματος. Η ονομασία POU5F1 προέρχεται από τα αρχικά POU domain, class 5, Factor 1 υποδηλώνοντας ότι είναι ο πρώτος μεταγραφικός παράγοντας στην τάξη 5 της οικογένειας των POU μεταγραφικών παραγόντων.



Εικόνα 10. Απεικόνιση του ανθρώπινου χρωμοσώματος 6 στο οποίο εδράζει το γονίδιο Oct-4 (κόκκινη γραμμή).

Το γονιδίωμα του αποτελείται από 5 εξώνια και με εναλλακτικό μάτισμα του mRNA μπορούν να προκύψουν δύο ισομορφές, η ισομορφή 1 που μας δίνει και την πρωτεΐνη Oct-4 ή Oct-4A και η ισομορφή 2 που μας δίνει την Oct-4B πρωτεΐνη. Οι δυο ισομορφές διαφέρουν ως προς το μέγεθος τους, διότι στην ισομορφή 2 έχουμε μικρότερη αμινο-τελική περιοχή, λόγω έλλειψης ενός κομματιού από την 5'- κωδική περιοχή. Ωστόσο, τα 225 αμινοξέα της καρβοξυ-τελικής περιοχής είναι πανομοιότυπα και στις δυο ισομορφές. Η ισομορφή 2 αποτελείται συνολικά από 265 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 30.085 Daltons ενώ η ισομορφή 1 έχει μήκος 360 αμινοξέων και μοριακό βάρος 38,6 kDaltons (Takeda Jun, Seino Susumu and Bell Graeme I., 1992).

Υπάρχουν τρία χαρακτηριστικά τα οποία μας οδηγούν στον αποκλεισμό της υπόθεσης πως η ισομορφή B του Oct-4 δρα ως μεταγραφικός παράγοντας. Πρώτον, όπως προαναφέρθηκε η κωδική περιοχή της ισομορφής B του Oct-4 διαφέρει από αυτή της A ως προς 2 αμινοξέα, τα οποία λείπουν από την αμινο-τελική περιοχή της. Δεύτερον, κάποιες αλληλουχίες που υπάρχουν στην ίδια περιοχή δεν επιτρέπουν στο Oct-4B να συνδέεται σε DNA και τρίτον πειράματα δείχνουν ότι η ισομορφή B εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα σε αντίθεση με την ισομορφή A που εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων.

```

1 maghlasdfa fspppggggd gpggpepgwn dprtwlsfqg ppggpgigpg vgggsewgi
61 ppcpppyefc ggmaycgpqv gvglvprqggl etsqpegeag vgvesnsdga spepctvtpg
121 avklekekke qnpeesqdik alqkeleqfa kllkqkritl gytqadvglg lgvlfqkvfs
181 qtticrfeal qlsfknmckl rpllkqkvee adnnenlqei ckaetlvqar krkrtsienr
241 vrgnlenlfl qcpkptlqqi shiaqqlgle kdvrvrwfcv rrqkgkrsss dyaqredfea
301 agspfsggpv sfplapgphf gtpgygsphf talyssvpfp egeafppvsv ttlgspmhsn

```

Εικόνα 11. Αμινοξική ακολουθία ισομορφής 1, πρωτεΐνης Oct-4

Η ειδική POU domain περιοχή του Oct-4 συνδέεται με το DNA, μέσω αλληλεπίδρασης της τρίτης έλικας “αναγνώρισης” της POU_H, σε βάσεις της μεγάλης αύλακας στην 3’/TTTA πλούσια περιοχή του οκταμερούς. Η POU_H αυτοτελής περιοχή είναι δομικά όμοια με άλλες ομοπεριοχές. Η POU_S domain περιοχή παρουσιάζει μια πλευρο-ειδική, υψηλής συγγένειας σύνδεση με το DNA και ικανότητα κάμψης. Και οι δυο, POU_H και POU_S αυτοτελείς υποπεριοχές, λειτουργούν ως ανεξάρτητες μονάδες με συνεργάσιμη ειδικότητα για υψηλής συγγένειας σύνδεση με το DNA. Λειτουργική συνεργασία μεταξύ των δυο υποπεριοχών μπορεί να εμφανίζεται έμμεσα μέσω του DNA από επικαλυπτόμενες συνδέσεις βάσεων των δύο αυτών περιοχών.

Πέρα από την ικανότητα τους να συνδέονται με το DNA, και οι δυο POU_H και POU_S αυτοτελείς υποπεριοχές, μπορούν να συμμετάσχουν σε αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης.

Δυο αυτοτελείς περιοχές που εκτείνονται στο N- και C-τελικό άκρο της Oct-4 πρωτεΐνης ορίζουν την ικανότητα ενεργοποίησης της ως POU μεταγραφικός παράγοντας. Η αμινο-τελική περιοχή (N-domain) είναι μια περιοχή πλούσια σε προλίνες και όξινα κατάλοιπα, ενώ η καρβοξυ-τελική περιοχή (C-domain) είναι πλούσια σε προλίνες, σερίνες και θρειονίνες. Η αμινο-τελική αυτοτελής περιοχή μπορεί να λειτουργήσει ως μια περιοχή δραστηριοποίησης σε ετερόλογα κυτταρικά συστήματα. Αντιθέτως, η καρβοξυ-τελική αυτοτελής περιοχή του Oct-4 παρουσιάζει μια POU αυτοτελής περιοχή με μεσολαβητική κυτταροειδική λειτουργία. Ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτής και της καρβοξυ-τελικής περιοχής άλλων πρωτεϊνών μπορούν να οδηγήσουν σε κυτταρο-ειδικές αλληλεπιδράσεις με διαφορετικές κινάσες ή συνεργάτες.

Δομικά και λειτουργικά λοιπόν, ο Oct-4 χωρίζεται σε τρεις περιοχές. Την αμινο-τελική αυτοτελής περιοχή μήκους 133 αμινοξέων που εμπεριέχει την αλληλουχία μεταγραφικής δράσης και ενεργοποιείται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Την ειδική POU αυτοτελής

περιοχή μεταξύ 134-289 αμινοξέων, που συνδέεται στο DNA και την περιοχή μεταξύ 290-360 αμινοξέων η οποία ελέγχει την τρανς ενεργοποίηση του Oct-4, η οποία είναι κυτταροειδική (Lee J. et al., 2006).



Εικόνα 12. Τρισδιάστατη απεικόνιση της δομής του Oct-4.

1.4.3 Ο ρόλος και η έκφραση της πρωτεΐνης Oct-4

Η πρωτεΐνη Oct-4 ή Oct3/4 ανακαλύφθηκε και δημοσιεύτηκε για πρώτη φορά στην επιστημονική κοινότητα το 1990 (Schoeler, H.R. et al., 1990). Δέκα χρόνια αργότερα, δημοσιεύτηκαν οι κύριοι ρόλοι του. Η πρωτεΐνη Oct-4 έχει δράση μεταγραφικού παράγοντα, ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, κυρίως κατά την εμβρυογένεση, και είναι απαραίτητος για την πολυδυναμικότητα των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, διότι συμμετέχει στις διαδικασίες αυτοανανέωσης και αδιαφοροποίησης τους. Γενικότερα, ο κύριος λειτουργικός του ρόλος είναι να μπλοκάρει τη διαφοροποίηση, επιτρέποντας παράλληλα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Niwa H. et al., 2000).

Η έκφραση του Oct-4 περιορίζεται στην ωογένεση, ως ενεργός μητρικός παράγοντας στο ωοκύτταρο, και στην προεμφυτευτική ανάπτυξη, όπου εκφράζεται στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα με σημαντικότερη λειτουργία να καταστέλλει την διαφοροποίηση τους. Εμφανίζεται σε όλα τα στάδια της αυλάκωσης με ποικίλα πρότυπα έκφρασης μέχρι και τη βλαστοκύστη, όπου είναι μεγαλύτερη στην εσωτερική μάζα κυττάρων σε σχέση με το τροφοεκτόδερμα. Έμβρυα που δεν εκφράζουν το Oct-4 πεθαίνουν στην εμφύτευση καθώς δε μπορούν να σχηματίσουν την εσωτερική μάζα κυττάρων. Συνεπώς, είναι απαραίτητο για την αναστολή της διαφοροποίησης των κυττάρων της έσω κυτταρικής μάζας σε σωματικά κύτταρα, ώστε να διατηρείται ένα αδιαφοροποίητο προφίλ κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Μη έκφραση του λοιπόν, οδηγεί στο σχηματισμό του τροφοεκτοδέρματος, ενώ αυξημένα επίπεδα οδηγούν στη διαφοροποίηση των κυττάρων σε ενδόδεσμα και μεσόδεσμα. Αργότερα η έκφραση εντοπίζεται στον επιβλάστη και σταδιακά υπορυθμίζεται μετά τη γαστριδίωση, με συνέπεια να εμφανίζεται μόνο στα πρόδρομα γεννητικά κύτταρα (Cauffman G. et al.,2005).

Ειδικότερα, παρατηρείται μια ποικίλη Oct-4 μητρική έκφραση στα ωκύτταρα, τα οποία είναι διαφοροποιημένα κύτταρα, και στα επακόλουθα στάδια αυλάκωσης. Κατά τη διάρκεια της «συμπύεσης», η οποία αρχίζει από το στάδιο των 10 κυττάρων, η μεταβλητότητα της έκφρασης μειώνεται και ο Oct-4 αρχίζει να εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα, υποδεικνύοντας εμβρυϊκή έκφραση. Αυτό το ασυνήθιστο πρότυπο έκφρασης μπορεί να συνεπάγεται ότι η ανθρώπινη εμβρυϊκή έκφραση του Oct-4 ξεκινάει, όπως και στα άλλα θηλαστικά, ένα με δυο κύκλους μετά τη γενική εμβρυϊκή γενωμική δραστηριότητα. Επειδή ο Oct-4 λειτουργεί ως μεταγραφικός παράγοντας, η κυτοπλασματική θέση του εικάζει πως δε σχετίζεται με βιολογικές λειτουργίες στα ωκύτταρα και στα στάδια αυλάκωσης των εμβρύων. Στα «συμπιεσμένα» έμβρυα, ο μεταγραφικός παράγοντας εμφανίζεται στους πυρήνες, προτείνοντας λειτουργικό ρόλο.

Η έκφραση του όπως φαίνεται σχετίζεται με έναν αδιαφοροποίητο κυτταρικό φαινότυπο και έχει αναφερθεί ότι εκμηδένιση της οδηγεί σε διαφοροποίηση των κυττάρων, επιβεβαιώνοντας έτσι το ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα Oct-4 στη διαδικασία αυτοανανέωσης των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιείται ευρέως και ως δείκτης για τα αδιαφοροποίητα κύτταρα και την πολυδυναμικότητα των βλαστικών κυττάρων (Zangrossi S. Et al., 2007).

Με την τεχνική της RT-PCR ανιχνεύτηκε υψηλή έκφραση της Oct-4 πρωτεΐνης σε ανθρώπινα παγκρεατικά βλαστικά κύτταρα και στικτή σε μεσεγχυματικά, γαστρικά και βλαστικά κύτταρα των νεφρών. Επίσης, η ίδια έρευνα επιβεβαίωσε την έκφραση στη βασική στιβάδα κυττάρων της επιδερμίδας, όπου εδρεύουν τα επιδερμικά βλαστικά κύτταρα (Tai MH et al.,2005).

Έκφραση του έχει εντοπισθεί και σε κύτταρα του ενδομητρίου της γυναίκας και πιθανολογείται πως πρόκειται για αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα, τα οποία τελικά μπόρεσαν να διαφοροποιηθούν σε ενδομητριακά (Matthai C. et al, 2006). Επίσης, έρευνες που χρησιμοποίησαν σαν βιολογικό υλικό κύτταρα του αμνιακού υγρού, τα οποία χρησιμοποιούνται για την προγεννητική διάγνωση, έδειξαν ότι στο συνολικό κυτταρικό πληθυσμό εκφράζεται ο μεταγραφικός παράγοντας Oct-4 (Stefanidis K. et al, 2008).

Τέλος, έχουν διεξαχθεί και ποικίλα πειράματα για την ανίχνευση έκφρασης του Oct-4 σε ενήλικα διαφοροποιημένα κύτταρα. Αν και ήταν αναμενόμενο να μη βρεθεί έκφραση, η αναζήτηση του σε κύτταρα του περιφερειακού αίματος με την τεχνική της PCR-πραγματικού χρόνου μας διέψευσε. Ωστόσο, επιπλέον μελέτες έδειξαν ότι ο Oct-4 στα ενήλικα διαφοροποιημένα κύτταρα του περιφερειακού αίματος δε συνδέεται με το κλασικό οκταμερές μοτίβο στον πυρήνα και ότι οι συμπαράγοντες FGF-4 και Sox2 δεν εκφράζονται. Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η λειτουργία του Oct-4 είναι διαφορετική στα εμβρυϊκά και τα ενήλικα κύτταρα. Επίσης, η παρουσία έκφρασης του γονιδίου στα ενήλικα κύτταρα θα μπορούσε να εξηγηθεί από την πιθανότητα μόλυνσης των γονιδιωματικών αναλύσεων από ρετροψευδογονίδια. Η παρουσία τους έχει συσχετισθεί με υψηλά επίπεδα έκφρασης του Oct-4, που οδηγεί σε συχνά γεγονότα ρετρομετάθεσης σε πολυδύναμα και γεννητικά κύτταρα. Μέχρι σήμερα, έχουν εντοπιστεί 8 σχετικά ψευδογονίδια με μεγάλο βαθμό ομολογίας μεταξύ της κωδικής αλληλουχίας του Oct-4 στα χρωμοσώματα 1, 3, 8, 10 και 12, με άγνωστο προς στιγμή ρόλο.

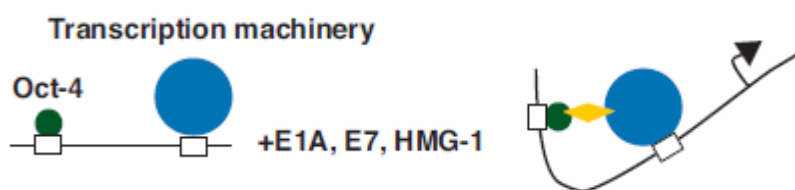
Όλη η προαναφερόμενη κύτταρο-ειδική έκφραση του Oct-4 ρυθμίζεται από τη δράση δυο ξεχωριστών ενισχυτών. Ο άπω ενισχυτής (*distal enhancer, DE*) περίπου 5Kb upstream του προαγωγέα, ρυθμίζει την έκφραση του Oct-4 στα προεμφυτευτικά έμβρυα (μορίδιο και εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης), στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα και στα εμβρυϊκά γεννητικά κύτταρα. Ωστόσο, είναι αδρανής στα κύτταρα του επιβλάστη. Ο εγγύς ενισχυτής (*proximal enhancer, PE*) βρίσκεται περίπου 1.2Kb upstream και κατευθύνει την έκφραση του Oct-4 στον επιβλάστη. Δυο όμοια ανεστραμμένα στοιχεία, το 2A του DE και το 1A του PE, είναι δεσμευμένα από μεταγραφικούς παράγοντες *in vivo* στα αδιαφοροποίητα εμβρυϊκά βλαστικά και γεννητικά κύτταρα. Αυτά τα στοιχεία πιθανόν να εμπλέκονται στη μεταγραφική έκφραση του Oct-4 μέσω τοπικών σινιάλων και/ή κυτταρο-ειδικών παραγόντων.

Η μεθυλίωση του άπω ή εγγύ ενισχυτή του Oct-4 μπορεί να παίζει ρόλο στη μείωση της έκφρασης του κατά τη γαστριδίωση. Στα προηγούμενα στάδια της εμβρυογένεσης, το στοιχείο 1A εντός του PE εμπλέκεται στην πρόληψη της μεθυλίωσης και συγκεκριμένα ένα τμήμα του μήκους 270 βάσεων, το οποίο θεωρείται πλέον και το εμβρυϊκό στοιχείο απομεθυλίωσης.

Επιπρόσθετα, η έκφραση του Oct-4 ρυθμίζεται και από άλλους μηχανισμούς πέρα της DNA μεθυλίωσης, όπως είναι η miRNAs ρύθμιση και η ρύθμιση του υποδοχέα στη μεταγραφή. Τέλος, έχει βρεθεί ότι καταστέλλεται στα εμβρυϊκά βλαστικά και γεννητικά κύτταρα κατά την έκθεσή τους σε ρετινοϊκό οξύ σε συγκεντρώσεις που επάγουν τη διαφοροποίηση.

Το γονίδιο του Oct-4 περιλαμβάνει άλλες τέσσερις αυτοτελείς περιοχές, τις CR1-CR4, οι οποίες είναι απαραίτητες στη βασική ρύθμιση της έκφρασης του Oct-4. Από αυτές, η μια έχει μια Sp-1 like αλληλουχία πλούσια σε GC και οι άλλες τρεις R1, R2 και R3 είναι ορμονο-ανταποκρινόμενες.

Όσον αφορά τη δράση του Oct-4 ως ενεργοποιητή ή αναστολέα έκφρασης άλλων γονιδίων, σημαντικό ρόλο παίζουν άλλοι παράγοντες, όπως είναι ο Sox2, E7 και E1A. Σε διαφοροποιημένα κύτταρα, η αδενοϊκή πρωτεΐνη E1A επιτρέπει την τρανσ ενεργοποίηση του Oct-4 μέσω σύνδεσης του POU domain με το μοτίβο δακτύλου ψευδαργύρου της που βρίσκεται στην CR3 περιοχή της αλληλουχίας της γεφυρώνοντας έτσι την απόσταση (Pesce M. & Schoeler HR., 2001). Ο Sox2 παράγοντας ενεργοποιεί το Oct-4 μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης που εξαρτάται από τις ελεύθερες περιοχές σύνδεσης τους.



Εικόνα 13. Μοντέλο τρανσ ενεργοποίησης του Oct-4 από την πρωτεΐνη E1A.

Ο Hif-2a είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής σε υποξικές συνθήκες και σε μελέτη του 2006 βρέθηκε ότι συνδέεται στον υποκινητή του Oct-4 και επάγει την έκφραση του στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (Covello KL et al., 2006).

Ο Oct-4 ενεργοποιεί τη μεταγραφή μέσω του οκταμερές μοτίβου που χαρτογραφείται εγγύς ή άπω των μεταγραφικών εκκινητών των γονιδίων-στόχων. Έχει βρεθεί ότι συνδέεται με ποικίλα γονίδια, όπως είναι για παράδειγμα η hCG, ο Rex1, ο PDGFaR, το fgf4, ο nanog, η οστεοποντίνη και η IFN-τ.

Η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) είναι απαραίτητη για την εμφύτευση και την υποστήριξη του εμβρύου και έχει βρεθεί ότι ο Oct-4 αποσιωπά την έκφραση των α και β υπομονάδων του γονιδίου της σε ανθρώπινα κύτταρα καρκινώματος του χορίου. Ο Oct-4 συνδεόμενος σε ένα μοναδικό οκταμερές μοτίβο (ACAATAATCA) στον hCGβ-305/-249 προαγωγέα μειώνει τα επίπεδα τόσο του hCG β mRNA όσο και της πρωτεΐνης στα

καρκινικά κύτταρα του χορίου. Παρόλο που ο Oct-4 είναι ένας ισχυρός αναστολέας και της hCGa έκφρασης, σε αυτή την περίπτωση δεν παρατηρείται τέτοιου είδους σύνδεση (Lanza R. et al., 2005).

Το Rex1 (Zfp-42) γονίδιο, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μορφής ζ δακτύλου, εκφράζεται σε πολύ υψηλά επίπεδα στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα και στα εμβρυϊκά καρκινικά κύτταρα. Η έκφραση του Oct-4 σχετίζεται με το οκταμερές μοτίβο της περιοχής του προαγωγέα του Rex1. Πειράματα σε συγκεκριμένες εμβρυϊκές καρκινικές σειρές έδειξαν ότι υψηλά επίπεδα του Oct-4 αναστέλλουν τη μεταγραφή του γονιδίου Rex1, ενώ πειράματα σε συγκεκριμένη σειρά εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων έδειξαν ότι χαμηλά επίπεδα του Oct-4 είναι επαρκή για να δραστηριοποιήσουν τον προαγωγέα του Rex1. Φαίνεται πως διακριτές αυτοτελείς περιοχές της Oct-4 πρωτεΐνης οδηγούν στα παραπάνω αποτελέσματα, προτείνοντας διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς για μεταγραφική ενεργοποίηση και καταστολή.

Σε αδιαφοροποίητα, ανθρώπινα εμβρυϊκά καρκινικά κύτταρα σειράς Tera2 έχει βρεθεί ότι η έκφραση του αυξητικού παράγοντα PDGFaR εξαρτάται από ένα κανονικότατο οκταμερές μοτίβο εντός του προαγωγέα του γονιδίου στο οποίο προσδένεται ο Oct-4. Μεταλλάξεις στο οκταμερές αυτό μοτίβο δείχνουν ότι μειώνουν τη δράση του προαγωγέα και την έκφραση του γονιδίου PDGFaR.

Σε συνεργασία με το μεταγραφικό παράγοντα Sox2, σχηματίζοντας τριμερή σύμπλοκο και με το DNA του γονιδίου στόχου, ο Oct-4 ρυθμίζει την έκφραση κι άλλων γονιδίων. Για παράδειγμα, ο Oct-4 μαζί με τον Sox2 συνδέονται στο οκταμερές μοτίβο που εντοπίζεται στην 3'-UTR περιοχή του άνω ενισχυτή του γονιδίου FGF-4 και σχηματίζουν ένα μοναδικό τριαδικό σύμπλοκο. Ο σχηματισμός του συμπλόκου αυτού εξαρτάται πολύ από τον τρόπο σύνδεσης των παρακείμενων περιοχών των παραγόντων Oct-4 και Sox2 στο DNA και στη λειτουργική δράση του συμβάλλουν οι καρβοξυ-τελικές περιοχές τους. Κατά το σχηματισμό προκαλούνται αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης οι οποίες οδηγούν σε διαμορφωτικές αλλαγές που καταλήγουν να ενεργοποιούν κρυμμένες αυτοτελείς περιοχές του γονιδίου FGF-4.

Τέλος, ο Oct-4 μεταγραφικός παράγοντας φαίνεται πως συνεργάζεται και με τον παράγοντα Nanog με στόχο τη διατήρηση της πολυδυναμικότητας των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Δημιουργεί ετεροδιμερή μαζί με τον παράγοντα Sox2 και αυτά προσδένονται ισχυρά στον υποκινητή του Nanog με στόχο την ενεργοποίησή του. Στη συνέχεια συνεργάζονται και ρυθμίζουν την έκφραση μιας σειράς άλλων γονιδίων-στόχων με σκοπό τη διατήρηση του πολυδύναμου φαινοτύπου των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων.

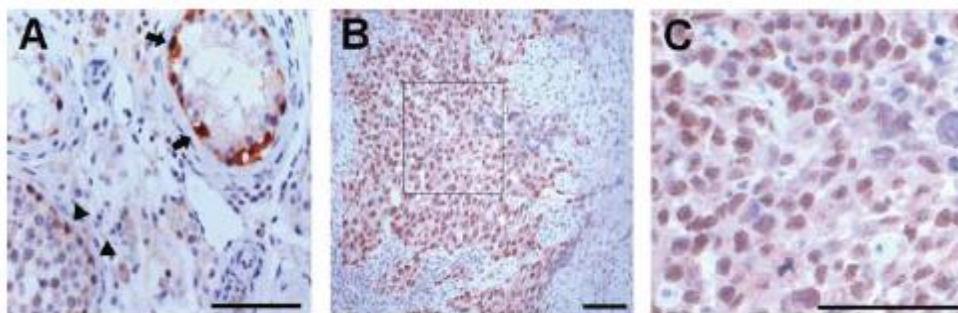
1.4.4 Oct-4 και καρκίνος

Έχει βρεθεί ότι το γονίδιο του Oct-4 καθώς και η αντίστοιχη πρωτεΐνη του εκφράζονται σε διάφορα ενήλικα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα όπως και σε διάφορα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα αλλά όχι στα θυγατρικά διαφοροποιημένα κύτταρα αυτών των βλαστικών κυττάρων. Το γονίδιο POU5F1 εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε έναν αριθμό από καρκινικούς ιστούς και προωθεί την ικανότητα σχηματισμού αποικίας των καρκινικών κυττάρων. Το εύρημα αυτό συσχετίζεται με την απενεργοποίηση εμβρυϊκών μοριακών μονοπατιών στην καρκινογένεση και τον καθορισμό του καρκίνου ως μια ασθένεια βλαστικών κυττάρων.

Πιστεύεται πλέον ότι ο Oct-4 είναι ένας ξεχωριστός ανοσοϊστοχημικός δείκτης για την αναγνώριση καρκινικών κυττάρων που μοιάζουν με εμβρυϊκά/αρχέγονα γεννητικά και εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (Looijenga LH et al., 2003). Κλινικές μελέτες έχουν δείξει πως η αυξημένη έκφραση του σχετίζεται με περαιτέρω εξέλιξη της καρκινογένεσης, μεγαλύτερες μεταστάσεις και μικρότερα χρονικά διαστήματα επιβίωσης για τους καρκινοπαθείς (Chang C.C et al., 2008).

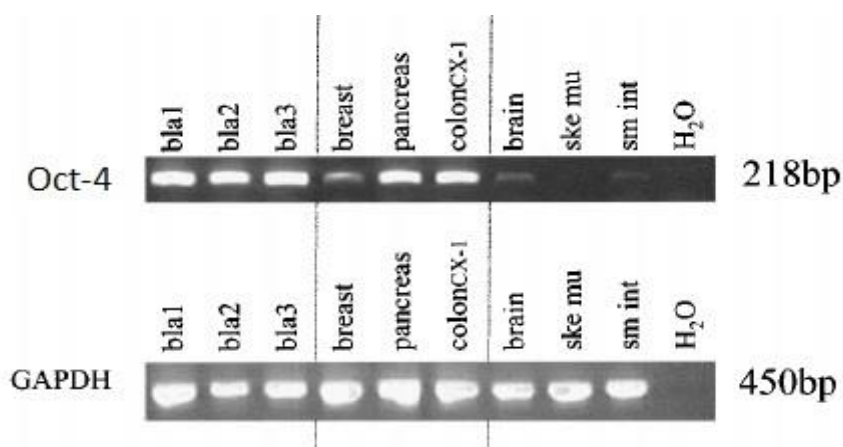
Ο Hochedlinger και οι συνεργάτες του ανέφεραν σε μελέτη τους ότι η εκτοπική έκφραση του Oct-4 σε σωματικά κύτταρα οδηγεί σε δυσπλασίες. Ο εντοπισμός του κυτταρικά παραμένει ο ίδιος, καθώς όπως και στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα έτσι και στα καρκινικά ανιχνεύεται κυρίως πυρηνικά. Ωστόσο, η πυρηνική του έκφραση έχει συσχετιστεί και με τη δράση ψευδογονιδίων και μάλιστα του Oct-4-pg4 που εκφράζεται συχνότερα στα σωματικά κύτταρα καρκίνων (Wang et al., 2013).

Έρευνα του Liang Cheng που δημοσιεύτηκε το 2004, επιβεβαιώνει την πυρηνική έκφραση του Oct-4 σε όλα τα εμβρυϊκά καρκινώματα και σεμινώματα μέσω της τεχνικής της ανοσοϊστοχημείας, ενώ δεν ανιχνεύει έκφραση σε καρκινώματα του λεκιθικού σάκου, στο χόριο και στο νευροεκτόδερμα του εμβρύου. Μάλιστα, σε πειράματα που έγιναν σε ποντίκια με ξενομοσχεύματα παρατηρήθηκε πως η δράση του Oct-4 ήταν ανάλογη των επιπέδων έκφρασης του. Χαμηλά επίπεδα έκφρασης του (<75%) εμπόδιζαν το σχηματισμό καρκινικών όγκων εντός του εμβρυϊκού σάκου, ενώ αυξημένα επίπεδα οδηγούσαν στο σχηματισμό όγκων εμβρυϊκών καρκινωμάτων ή καρκινωμάτων των πρωτόγονων νευρικών οδών.



Εικόνα 14. Ανίχνευση της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης Oct-4 σε καρκινικούς ιστούς με την τεχνική της ανοσοϊστοχημείας. Α) Νεοπλασία γεννητικών/γαμετικών σωληναρίων. Β-С) Εμβρυϊκά καρκινώματα (διαφορετικές μεγεθύνσεις). Πηγή: (Gidekel S. et al, 2003).

Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί έκφραση του Oct-4 και σε διάφορους μη εμβρυϊκούς/γεννητικούς καρκίνους. Αποδείχθηκε πως προάγει την καρκινογένεση στα καρκινικά κύτταρα του παχέους εντέρου μέσω τόσο αυτοκρινών όσο και παρακρινών μηχανισμών (Chang C.J et al., 2011), σε καρκινώματα του οισοφάγου (Zhou X et al., 2011) και του προστάτη (Luo F. et al., 2014). Επίσης, η έκφραση του συνδέεται με την επανεμφάνιση του καρκίνου του ορθού μετά από την χημειοραδιοθεραπεία (Saigusa S. et al., 2009).



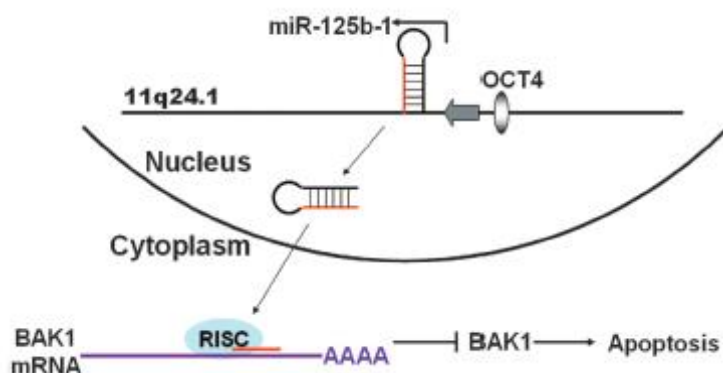
Εικόνα 15. Έκφραση του Oct-4 σε έμβρυα (bla 1,2 &3), σε καρκινικούς όγκους (breast, pancreas, coloncx-1) και σε τρεις φυσιολογικούς ιστούς (brain, ske mu, sm int). Παράλληλα, αναζητήθηκε η έκφραση του γονιδίου αναφοράς GAPDH για να εξασφαλιστεί ισοδύναμη φόρτιση στο gel αγαρόζης. Πηγή: Marilyn Monk and Cathy Holding, 2001.

Ο Oct-4 σε συνεργιστική έκφραση με το Nanog εμφανίζονται στα πρώτα στάδια καρκινογένεσης του παγκρέατος και σε προχωρημένες κακοήθειες του πνεύμονα. Συγκεκριμένα, πιστεύεται πως ο παράγοντας Smad3, που έχει ενεργοποιηθεί από τον TGF-

β, προσκολλάται στους υποκινητές των Oct-4 και Nanog οδηγώντας σε υπερέκφραση τους με στόχο τη διατήρηση του μεσεγχυματικού φαινοτύπου των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (Wen J et al., 2010 & Chiou SH et al., 2010).

Αυξημένα επίπεδα έκφρασης του mRNA Oct-4 μαζί με των γονιδίων Stellar, Nanog και GDF3 βρέθηκαν σε ιστούς καρκίνου του μαστού και της καρκινικής κυτταρικής σειράς μαστού MCF7. Η απουσία έκφρασης των γονιδίων Dazl και Vasa, που είναι δείκτες γεννητικών βλαστικών κυττάρων, στους ίδιους ιστούς μας προϋποθέτει πως οι καρκινικοί όγκοι του μαστού δεν έχουν προκύψει από μεταστατικά γεννητικά βλαστικά κύτταρα (Ezeh UI et al., 2005).

Τελευταία, έχουν δημοσιευτεί διάφορα άρθρα τα οποία προτείνουν τη συμμετοχή του Oct-4 σε μονοπάτια σηματοδότησης με στόχο την αναστολή της διαφοροποίησης και της απόπτωσης κυττάρων με συνέπεια το σχηματισμό καρκινικών όγκων.



Εικόνα 16. Μοντέλο απεικόνισης του Oct-4/mi-R-125b-1/BAK1 μονοπατιού σηματοδότησης σε καρκινώματα του τραχήλου της μήτρας. Εκτοπική έκφραση του Oct-4 ενεργοποιεί το mi-R-125b-1, που είναι ένας ογκογόνος παράγοντας και με τη σειρά του αναστέλλει τη μετάφραση του BAK1. Μειωμένη έκφραση του BAK1 αναστέλλει την απόπτωση και προάγει την εξέλιξη των όγκων. Πηγή: Wang YD et al., 2013.

Ένα άλλο μονοπάτι σηματοδότησης το οποίο επίσης στοχεύει στην αναστολή της απόπτωσης αλλά αυτή τη φορά στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα και περιλαμβάνει το Oct-4 είναι το Oct-4/Tcl1/Akt1. Ο Tcl1 παράγοντας ενισχύει τη δράση κινάσης του Akt1 η οποία οδηγεί σε κυτταρική αύξηση και αναστολή της απόπτωσης. Τελευταία όμως βρέθηκε πως το Tcl1 γονίδιο δρα και ως ογκογόνο και πως το ίδιο μονοπάτι ενεργοποιείται στα καρκινικά κύτταρα υποστηρίζοντας τη θεωρία των «καρκινικών βλαστικών κυττάρων»

εντός του κυτταρικού πληθυσμού των καρκινικών όγκων. Πιστεύετε πως ο Oct-4 αναγνωρίζει και προσδέεται σε ειδική αυτοτελής περιοχή του υποκινητή του Tc11 και το ενεργοποιεί. Η ίδια μελέτη έδειξε ότι ο Oct-4 εκφράζεται μόνο σε ένα μικρό ποσοστό (5%) των καρκινικών κυττάρων, υποδηλώνοντας πως σε κάθε καρκινικό όγκο ένα ποσοστό μεταξύ 0.01% και 5% αποτελείται από καρκινικά βλαστικά κύτταρα, τα οποία διαιρούνται ασύμμετρα (Hu T et al., 2008).

1.5 DAZL

1.5.1 Η οικογένεια DAZ και η εξέλιξη των γονιδίων της

Η οικογένεια DAZ (deleted in azoospermia-διαγραμμένο στην αζωοσπερμία) αποτελείται από τρία γονίδια: το BOULE, το DAZ και το DAZL (DAZ-like). Το γονίδιο BOULE εδράζεται στο χρωμόσωμα 2, το DAZ στο Y φυλετικό χρωμόσωμα και το DAZL στο 3 χρωμόσωμα. Και τα τρία γονίδια παρουσιάζουν μια ειδική έκφραση στα γεννητικά κύτταρα τόσο των θηλυκών όσο και των αρσενικών ατόμων, με εξαίρεση το DAZ που εκφράζεται μόνο στα αρσενικά και φαίνεται πως παίζουν καθοριστικό ρόλο στη σπερματογένεση. Κωδικοποιούν πρωτεΐνες με ένα ιδιαίτερα συντηρημένο μοτίβο δέσμησης RNA (RRM) και ένα διαφοροποιούμενο αριθμό επαναλήψεων ενός μοτίβου DAZ. Το DAZL και το BOULE έχουν ένα αντίγραφο αυτού του μοτίβου, ενώ το DAZ έχει 8 έως 24 (Reijo R et al., 1995).

Μέσω του μοτίβου δέσμησης RNA (RRM) αλληλεπιδρούν με RNA ομοπολυμερή, σχηματίζουν σύμπλοκα μεταξύ τους και ρυθμίζουν την έκφραση αγγελιοφόρων RNA σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Επίσης, αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μεταφορά και τοποθέτηση mRNA ή τη μετάφραση του RNA γονιδίων-στόχων. Πειράματα χαρτογράφησης και παρεμπόδισης λειτουργιών έδειξαν πως οι πρωτεΐνες DAZL ενεργοποιούν μεταφραστικά mRNAs κατά την ανάπτυξη των γεννητικών κυττάρων μέσω της στρατολόγησης των poly(A) δεσμευτικών πρωτεϊνών, PABP οι οποίες ξεκινούν τη διαδικασία της μετάφρασης (Collier B et al., 2005).

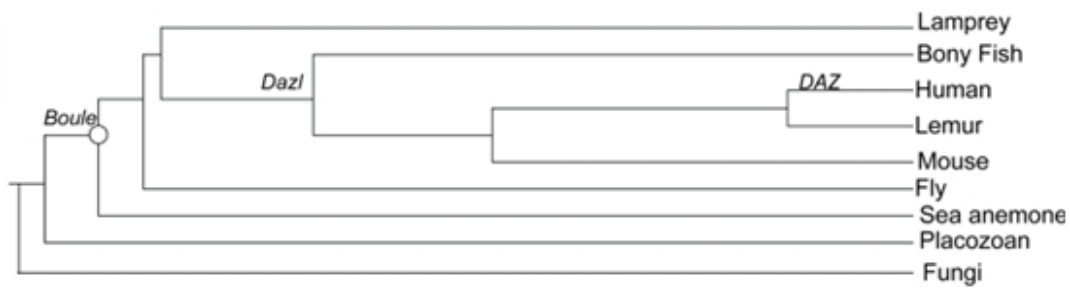
Διάφορες μελέτες προτείνουν ότι οι πρωτεΐνες της οικογένειας DAZ είναι λειτουργικά ομόλογες ακόμα και αν οι ακριβείς ρόλοι τους διαφέρουν. Έκφραση του Xdazl από το *Xenopus* στις μύγες που εκφράζουν το BOULE έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή των γεννητικών κυττάρων, ώστε να μην υπόκεινται μειωτική διαίρεση (Houston DW et al., 1998). Επιπρόσθετα, η λειτουργία του DAZL στα ποντίκια μπορεί μερικώς να αποκατασταθεί διαγονιδιακά από ανθρώπινο DAZL γονίδιο (Slee et al., 1999). Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι τα γονίδια της οικογένειας DAZ παίζουν πολύ καθοριστικούς ρόλους σε πολλά στάδια της ανάπτυξης των γεννητικών κυττάρων. Επίσης, στον άνθρωπο έχει βρεθεί ότι τα γονίδια της οικογένειας DAZ ευθύνονται για το 10-15% των περιπτώσεων αντρικής στειρότητας (Reynolds and Cooke, 2005 & VanGompel and Xu, 2011).

Και τα τρία γονίδια μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά και εξελικτικά πιστεύεται πως το BOULE ήταν το προγονικό γονίδιο που έδωσε γένεση στα άλλα δύο. Το γεγονός ότι μόνο το BOULE γονίδιο υπάρχει στα ασπόνδυλα επιβεβαιώνει τη θεωρία πως αποτελεί το

παλαιότερο μέλος της οικογένειας DAZ. Μάλιστα, φαίνεται πως η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί έχει διατηρήσει το λειτουργικό της μοτίβο και τη σπερματογεννητική έκφραση από τα έντομα έως τους ανθρώπους και είναι απαραίτητη αποκλειστικά για την εξέλιξη της μείωσης. Βρέθηκε ότι μεταλλάξεις στο BOULE οδηγούν σε μειωτική αναστολή στο στάδιο της παχυταινίας, πριν τη μετάφαση, στα αρσενικά άτομα του είδους *Drosophila* και τα θηλυκά άτομα του είδους *C.elegans* και ότι το ανθρώπινο BOULE γονίδιο μπορεί να επαναφέρει τη μείωση στους όρχεις της μύγας *Drosophila* (Shah C et al., 2010). Στον άνθρωπο, το γονίδιο BOULE δεν εκφράζεται στα σπερματογόνια αλλά ανιχνεύεται στο κυτταρόπλασμα των σπερματοκυττάρων, κατά το στάδιο της παχυταινίας. Η έκφραση του συνεχίζεται και στις στρογγυλές σπερματίδες και τα σπερματοζώαρια.

Στη συνέχεια δημιουργήθηκε το γονίδιο DAZL από την επικάλυψη του προγονικού γονιδίου BOULE στο χρωμόσωμα 2 (Xu EY et al., 2001). Μαζί με το BOULE εκφράζεται στα κύτταρα όλων των σπονδυλωτών εκτός των πρωτευόντων. Το γονίδιο DAZL έχει διατηρηθεί εξελικτικά από τις μύγες μέχρι τον άνθρωπο.

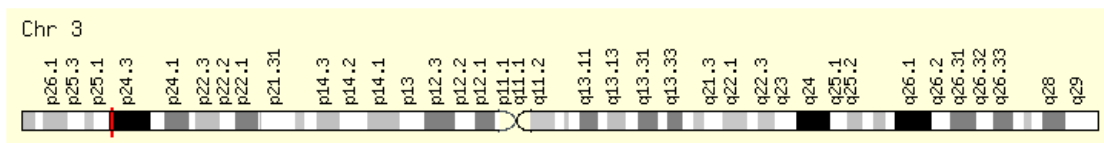
Το DAZ γονίδιο εμφανίζεται μαζί με τα άλλα δυο στα πρωτεύοντα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου των πιθήκων και του ανθρώπου (Kleene KC, 2013). Συνεπώς προέκυψε εξελικτικά πολύ αργότερα (Tung JY et al., 2006). Συγκεκριμένη μελέτη που δημοσιεύτηκε στο Nature το 1996 αναφέρει ότι το γονίδιο DAZ προέκυψε πριν από 60 εκατομμύρια χρόνια κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των πρωτευόντων θηλαστικών μέσω αρχικά της μεταφοράς του αυτοσωμικού γονιδίου στο Y χρωμόσωμα και των μετέπειτα επαναληπτικών διαδικασιών ενίσχυσης και «αφαίρεσης εξωνίων» του τροποποιημένου πλέον γονιδίου DAZL (Saxena et al., 1996). Μάλιστα, τα αποτελέσματα της μελέτης έρχονται σε αντίθεση με τις επικρατούσες απόψεις περί εξέλιξης των φυλετικών χρωμοσωμάτων, υποδηλώνοντας ότι η απόκτηση των αυτοσωμικών γονιδίων που σχετίζονται με τη γονιμότητα είναι μια σημαντική διαδικασία στην εξέλιξη του Y χρωμοσώματος. Αποτελεί το πρώτο γονίδιο που ανακαλύφθηκε στο Y χρωμόσωμα στην περιοχή AZFc και που του αποδόθηκε σχετικός ρόλος με τη σπερματογένεση (Yen PH, 2004).



Εικόνα 17. Διαγραμματική απεικόνιση της εξέλιξης των γονιδίων της οικογένειας DAZ

1.5.2 Η δομή του γονιδίου DAZL

Το γονίδιο DAZL (deleted in azoospermia-like) που ονομάζεται επίσης DAZH, DAZL1, DAZLA, MGC26406 και SPYGLA σύμφωνα με την HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) εδράζει στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 3 και συγκεκριμένα στη χρωμοσωμική θέση 3p24.3.



Εικόνα 18. Απεικόνιση του ανθρώπινου χρωμοσώματος 3 στο οποίο εδράζει το γονίδιο DAZL (κόκκινη γραμμή).

Το γονιδίωμα του αποτελείται από 12 εξόνια και με εναλλακτικό μάτισμα μπορούν να προκύψουν δυο ισομορφές, οι οποίες διαφέρουν ως προς το μέγεθος τους. Στην ισομορφή 1 έχουμε μικρότερη αμινο-τελική περιοχή, λόγω έλλειψης ενός κομματιού από την 5'-αμετάφραστη περιοχή. Η ισομορφή 2 αποτελείται συνολικά από 315 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 35.224 Daltons και η ισομορφή 1 έχει μήκος 295 αμινοξέων και μοριακό βάρος 33.178 Daltons. Από τις δυο ισομορφές, η 1 μας δίνει την πρωτεΐνη DAZL με τη μετα-μεταγραφική ρυθμιστική δράση και για αυτό σε πολλές μελέτες αναφέρεται ως DAZL1.

10	20	30	40	50	60
MSTANPETPN	STISREASTQ	SSSAATSQGY	ILPEGKIMPV	TVFVGGIDVR	MDETEIRSF
70	80	90	100	110	120
ARYGSVKEVK	IITDRTGVSK	GYGFVSFFND	VDVQKIVESQ	INFHGKRLKL	GPAIRKQNL
130	140	150	160	170	180
AYHVQPRPLV	FNHPPPPQFQ	NVWTNPNTET	YMQPTTMMN	ITQYVQAYPT	YPNSPVQVIT
190	200	210	220	230	240
GYQLPVYNYQ	MPPQWPVGEQ	RSYVVPAYS	AVNYHCNEVD	PGAEVVNEC	SVHEATPPSG
250	260	270	280	290	
NGPQKKSVD	SIQTVVSCLF	NPENRLRNSV	VTQDDYFKDK	RVHHFRSRA	MLKSV

Εικόνα 19. Αμινοξική ακολουθία της ισομορφής 1, πρωτεΐνη DAZL

Η ειδική RRM (RNA recognition motif) domain περιοχή του DAZL είναι απαραίτητη για την επίτευξη της μετα-μεταγραφικής ρύθμισης των επιθυμητών γονιδίων στα στάδια επεξεργασίας των mRNA και rRNA, τη μεταφορά του RNA προς το κυτταρόπλασμα και τη διαδικασία σταθεροποίησης του RNA. Είναι επίσης γνωστή με τις ονομασίες RBD (RNA binding protein – πρωτεΐνη πρόσδεσης στο RNA) ή RNP (Ribonucleoprotein domain – ριβονουκλεοπρωτεϊνική αυτοτελής περιοχή) και στο γονίδιο DAZL εντοπίζεται κατά μήκος των αμινοξέων 40 έως 115. Η RRM αυτοτελής περιοχή έχει μήκος 90 αμινοξέων και όσον αφορά την τεταρτοταγή δομή της αποτελείται από τέσσερα βήτα-φύλλα πακεταρισμένα έναντι δύο α-ελικών (βαββαββ). Δεσμεύεται σε ένα μεταβλητό αριθμό νουκλεοτιδίων στο γονίδιο-στόχο, που μπορεί να κυμαίνεται από δύο έως οχτώ. Η δραστική περιοχή της περιλαμβάνει τρεις αρωματικές πλευρικές αλυσίδες που βρίσκονται εντός των συντηρημένων RNP1 και RNP2 μοτίβων του RRM domain (Jenkins HT et al., 2011).

Η ειδική DAZ-like domain περιοχή του DAZL συμβάλλει στην αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας DAZ και είναι μοναδική για τα γονίδια αυτής της οικογένειας. Κύριος ρόλος της είναι να προκαλεί την αλληλεπίδραση με τα γονίδια DAZAP1 και DAZAP2. Έχει μήκος 24 αμινοξέων και εντοπίζεται στην περιοχή μεταξύ των 167 και 190 αμινοξέων της ακολουθίας.



Εικόνα 20. Τρισδιάστατη απεικόνιση του μοτίβου δέσμευσης RNA (RRM) από DAZL ποντικού καθώς σχηματίζει σύμπλοκο με RNA γονιδίου-στόχου (<http://www.ebi.ac.uk/thorntonsrv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=2xs2>)

Οι πρωτεΐνες DAZL μπορεί να υπάρχουν στα κύτταρα ως ομοδιμερή (homodimers) ή ετεροδιμερή (heterodimers). Ο διμερισμός (dimerization) του DAZL στα ποντίκια έχει βρεθεί ότι είναι RNA-ανεξάρτητος και ότι χρειάζεται μια συγκεκριμένη αλληλουχία μήκους 53 αμινοξέων από τη RRM περιοχή του DAZL ή το C-άκρο του (Ruggiu and Cooke, 2000).

Σε μια μελέτη ο Tsui και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι η πρωτεΐνη DAZL αλληλεπιδρά και με ριβοσώματα και μάλιστα μέσω σύνδεσης της σε poly(A) RNA. Συγκεκριμένα μπορεί να διευκολύνει τη μετάφραση των γονιδίων-στόχων του απομονώνοντας τα μετάγραφα του σε πολυσώματα και εκεί να ενισχύει τη μεταφραστική ικανότητα τους ή να τα προστατεύει από πιθανή αποικοδόμηση.

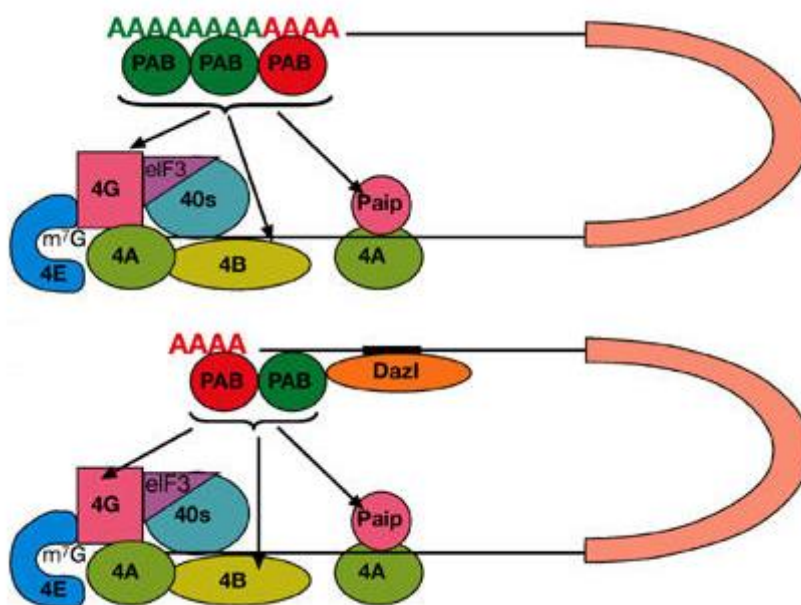
1.5.3 Ο ρόλος και η έκφραση της πρωτεΐνης DAZL

Τις τελευταίες δεκαετίες όλο και περισσότερες μελέτες επιβεβαιώνουν τον σημαντικό ρόλο του DAZL γονιδίου στην ανάπτυξη των αρχέγονων γαμετικών κυττάρων κατά τη σπερματογένεση και ωογένεση.

Η έκφραση του γονιδίου DAZL ανακαλύφθηκε πρώτη φορά σε όρχεις της *Drosophila* (Eberhart et al., 1996). Στο είδος *C. elegans*, η απενεργοποίηση του DAZL σταματά τη μείωση κατά την ωογένεση (Karashima T et al, 2000). Στο γένος *Xenopus*, είναι άμεσα

απαραίτητο για τη διαφοροποίηση των πρόδρομων γαμετικών κυττάρων και έμμεσα χρειάζεται για τη μετανάστευση τους μέσω του ενδοδέρματος (Houston DW et al., 1998 & 2000). Σε μοριακό επίπεδο, έχει δειχθεί πως σε αρχέγονα γεννητικά κύτταρα του Zebrafish η πρωτεΐνη DAZL προσδένεται στα mRNA του TDRD7 και μέσω πολυαδενυλίωσης απαλείφει την καταστολή που είχε προκληθεί μέσω miRNA. Τέτοιος έλεγχος στη βλαστική γονιδιακή έκφραση είναι πιθανό να συμβαίνει και σε άλλα ζώα (Takeda Y et al., 2009). Στα ποντίκια, καταστολή λειτουργίας του DAZL έχει ως συνέπεια την απώλεια γεννητικών κυττάρων και στα δυο φύλα (Ruggiu M et al., 1997).

Η πρωτεΐνη DAZL στοχεύει στην ενεργοποίηση της μετάφρασης των mRNAs πολλών διαφορετικών πρωτεϊνών, όπως είναι για παράδειγμα η πρωτεΐνη SYPC και η ελικάση DDX4/MVH (Kleene, 2013). Για την ενεργοποίηση αυτή είναι απαραίτητο να συνδεθεί η DAZL με την poly(A)-binding πρωτεΐνη, PABP η οποία προσδένεται εύκολα στις μικρές poly(A) ουρές των mRNAs-στόχων. Με αυτό τον τρόπο, οι ουρές υπόκεινται πολυαδενυλίωση κυτταροπλασματικά και αναποκρίνονται ευκολότερα σε περαιτέρω αλληλεπιδράσεις προς το σχηματισμό συμπλεγμάτων με τις ριβοσωμικές υπομονάδες (Collier et al., 2005).



Εικόνα 21. Η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης DAZL με περισσότερες PABP πρωτεΐνες με στόχο την ενεργοποίηση της μετάφρασης διάφορων mRNAs.

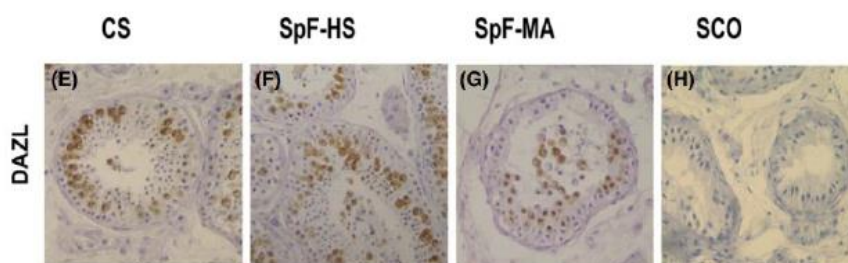
Στον άνθρωπο, η πρωτεΐνη DAZL εκφράζεται σε διάφορα διαμερίσματα των όρχεων από τα σπερματογόνια στα μειωτικά σπερματοκύτταρα και τα ώριμα σπερματοζωάρια (Lin YM et al., 2001 & 2002). Μάλιστα, σε μελέτη του 2002, που εξέταζαν την έκφραση του DAZL στα σπερματοζωάρια, είδαν πως εκφράζεται και στα τρία ανατομικά μέρη του και ιδιαίτερα στο αυχενικό / ενδιάμεσο τμήμα. Το ενδιάμεσο τμήμα αποτελείται κυρίως από ελικοειδώς διατεταγμένα μιτοχόνδρια τα οποία περιβάλλουν μια σειρά από πυκνές ίνες εξωτερικά του αξονήματος και αυτή είναι και η βασική διαφορά του με την ουρά. Επομένως, η έντονη ανοσοϊστοχημική χρώση σε αυτό προτείνει μια άμεση συσχέτιση της DAZL πρωτεΐνης με τα μιτοχόνδρια. Επίσης, η DAZL πρωτεΐνη εντοπίζεται στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου όπου υπάρχουν διάφορα εξειδικευμένα ένζυμα που είναι απαραίτητα για τη διείσδυση του στο ωάριο. Μένει ωστόσο αναπάντητο το ερώτημα για το εάν η DAZL πρωτεΐνη συμμετέχει στην ακροσωμική αντίδραση ή σχετίζεται με πρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης όπως είναι η ZP3 ή PH-30 πρωτεΐνες.

Στα εμβρυικά γονοκύτταρα και σπερματογόνια και τα δυο γονίδια DAZ και DAZL εκφράζονται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Κατά τη μείωση (στα σπερματοκύτταρα) πραγματοποιείται μαζική μεταφορά στο κυτταρόπλασμα. Μόνο η DAZL πρωτεΐνη εξακολουθεί να υπάρχει στις μετα-μειωτικές ώριμες σπερματίδες. Κι άλλες αναλύσεις με την τεχνική του Western-blot επιβεβαιώνουν ότι η DAZL πρωτεΐνη εκφράζεται σε δείγματα σπέρματος (Reijo RA et al., 2000). Επειδή εκφράζεται σε όλα τα στάδια ανάπτυξης των σπερματοζωαρίων είναι πιθανόν να έχει ξεχωριστές λειτουργίες στα εμβρυικά και ενήλικα γεννητικά κύτταρα και για αυτό να μη γνωρίζουμε ακόμη πλήρως τη βιολογική του δράση.

Επιπρόσθετα, ο κεντρικός ρόλος του γονιδίου DAZL στη γαμετογένεση επιβεβαιώνεται και με μια πληθυσμιακή μελέτη η οποία συσχέτισε τον αριθμό των σπερματοζωαρίων για τους άνδρες και την ηλικία εμμηνόπαυσης στις γυναίκες με μεταλλάξεις στο γονίδιο DAZL και έδειξε την ύπαρξη 12 μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs), όπου έχουμε αλλαγή μιας μόνο αζωτούχας βάσης και την ισχυρή σχέση μεταξύ μερικών από αυτών με τις παραπάνω παραμέτρους, πέραν εθνικοτήτων (Tung JY et al., 2006).

Στους υπογόνιμους άνδρες με ανεπάρκεια των όρχεων παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα mRNA μεταγράφων (Kuo PL et al., 2004) και ετεροζυγωτία σε πολυμορφισμούς του DAZL που ευθύνονται για την αποτυχία της σπερματογένεσης (Teng YN et al., 2002). Βρέθηκε ότι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί του ανθρώπινου DAZL γονιδίου συνδέονται με

το σύνδρομο Sertoli cell-only, την oligospermία και την πρόωρη ωθητική ανεπάρκεια. (Reynolds N. and Cooke H.J. 2005, Fassnacht W. et al 2006, Tung J. Yet al 2006). Μάλιστα, τον Απρίλιο του 2014 δημοσιεύτηκε μια έρευνα μετα-ανάλυσης και συστηματικής ανασκόπησης η οποία προσπάθησε να ξεκαθαρίσει την πιθανή σχέση μεταξύ των DAZL πολυμορφισμών και την ΥΠΟ γονιμότητα στους άνδρες. Υποστηρίζει πως πολλά ευρήματα θετικής συσχέτισης αφορούν μόνο συγκεκριμένους πληθυσμούς μελέτης και συνεπώς ότι η εθνικότητα παίζει καθοριστικό ρόλο καθώς και ότι πολλοί περιβαλλοντικοί παράγοντες εμπλέκονται στην υπογονιμότητα. Ωστόσο, αποδεικνύει ότι οι πολυμορφισμοί T12A και T54A του DAZL σχετίζονται με διάφορες μορφές υπογονιμότητας στους άνδρες και προτείνει την περαιτέρω μελέτη για να διευκρινιστούν οι αντίστοιχοι μοριακοί μηχανισμοί (Zhang S et al, 2014).



Εικόνα 22. Ανοσοϊστοχημική εντόπιση της πρωτεΐνης του DAZL σε τμήματα ανθρώπινων όρχεων με διαφορετικούς φαινότυπους. (E) Υπογόνιμοι άνδρες με αποφρακτική αζωοσπερμία και συντηρημένη σπερματογένεση, (F) Άνδρες με υποσπερματογένεση, (G), Υπογόνιμοι άνδρες με πρόβλημα στην μείωση των γαμετικών κυττάρων, (H) Άνδρες με το σύνδρομο Sertoli cell-only. (S. Bonache, F. Algaba, et al. 3/2014)

Το γονίδιο DAZL όπως και τα Oct-4 και VASA εκφράζονται στις ανθρώπινες εμβρυϊκές ωοθήκες και τα πρότυπα έκφρασης του είναι χρονικά και χωρικά διαχωρισμένα. Παράλληλα με την καταστολή έκφρασης του Oct-4 και την ενεργοποίηση του VASA, μετατοπίζεται η έκφραση του DAZL από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Στις ωοθήκες, εκφράζεται κατά το 1ο τρίμηνο της κύησης και παρατηρείται σημαντική αύξηση της έκφρασης του έως και 20 φορές παραπάνω στο 2ο τρίμηνο. Στους εμβρυϊκούς όρχεις, παρατηρείται η έκφραση τόσο στο 1ο όσο και στο 2ο τρίμηνο χωρίς καμία ιδιαίτερη στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό έκφρασης (Anderson RA et al., 2007).

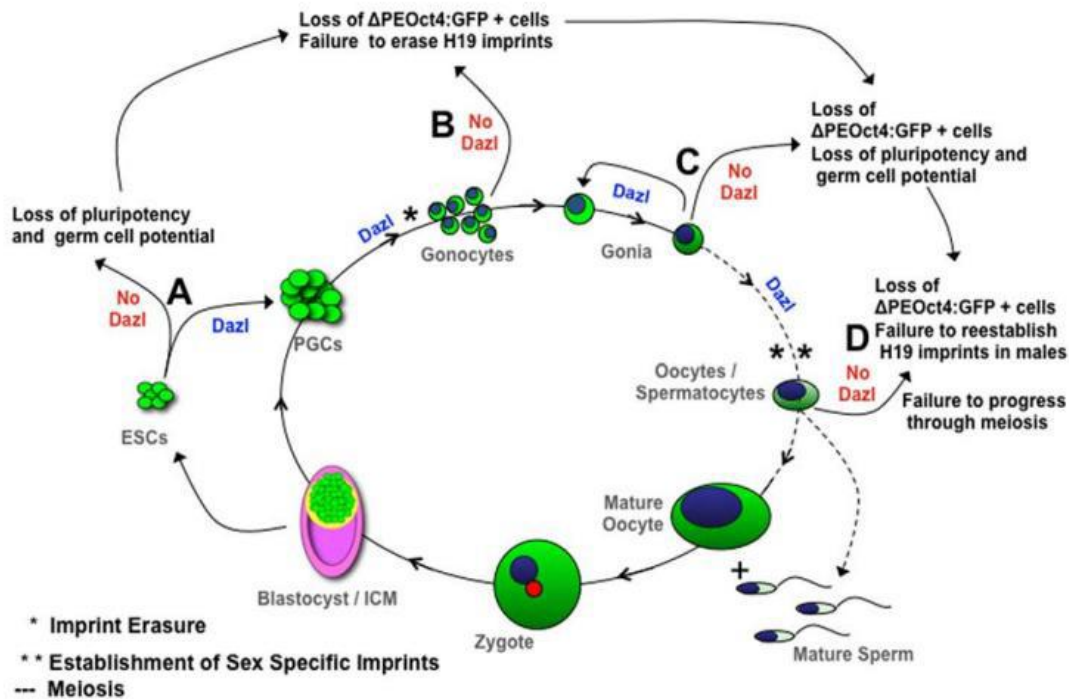
Κατά την ωογένεση, το DAZL εκφράζεται στο κυτταρόπλασμα των ωογονίων και των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων στις ωθήκες (Dorfman DM et al., 1999). Συγκεκριμένα, στα θηλυκά έμβρυα και τις προεφηβικές κοπέλες, το DAZL είναι κυτταροπλασματικό στα ωάρια και στα κύτταρα των ωοθυλακίων, αλλά στα ενήλικα ωοθυλάκια εντοπίζεται στη διάφανη ζώνη ή σε περιφερειακές κυτοπλασματικές θέσεις του ωαρίου (Pan HA et al., 2007). Επίσης, έκφραση του γονιδίου DAZL έχει εντοπιστεί στα κύτταρα της έσω θήκης των ώριμων ωοθυλακίων στις αναπαραγωγικές γυναίκες (Nishi S et al, 1999) και στα κοκκιώδη κύτταρα των πρωτογενών ωοθυλακίων (Brekhman V et al., 2000). Η έκφραση του στα κοκκιώδη κύτταρα ήταν αναμενόμενη αφού αυτά συνδέονται ισχυρά με τα ωοκύτταρα μέσω διασταυρούμενων χασμάτων που επιτρέπουν τη μεταφορά πρωτεϊνών και RNA μεταξύ τους. Επειδή τα κύτταρα Sertoli είναι εξελικτικά ομόλογα των κοκκιωδών κυττάρων είναι πολύ πιθανόν το DAZL να εκφράζεται και σε αυτά.

Το γονίδιο DAZL έχει δείχθει ότι εκφράζεται και στα ωχρά σωματίδια των ωοθηκών των αναπαραγωγικών γυναικών. Συγκεκριμένα, ο Pan HA και οι συνεργάτες του στη μελέτη τους το 2002 έδειξαν ότι η πρωτεΐνη DAZL εκφράζεται στα κοκκιώδη κύτταρα κατά την ωχρινική φάση και μάλιστα είναι άφθονη στα αρχικά στάδια της. Εφόσον δεν πραγματοποιηθεί γονιμοποίηση και ολοκληρώνεται η ωχρινική φάση του καταμήνιου κύκλου της γυναίκας τα επίπεδα του DAZL mRNA μειώνονται απότομα ως αποτέλεσμα ίσως δευτερευόντων παραγόντων της εκφύλισης του ωχρού σωματίου. Συνεπώς, υποθέτουν πως η πρωτεΐνη DAZL παίζει ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση των ωχρινικών κυττάρων, εφόσον δεν πολλαπλασιάζονται, αλλά τονίζουν και την ύπαρξη πολλαπλών ρόλων του DAZL στην ανάπτυξη των ωοκυττάρων.

Ο Cauffman και οι συνεργάτες του το 2005 έδειξαν την έκφραση του γονιδίου DAZL στα τελικά στάδια ωρίμανσης του ωαρίου, αφού έχει γίνει η γονιμοποίηση και ξεκινάει η προεμφυτευτική ανάπτυξη, στα αδιαφοροποίητα ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα. Βρήκαν κάποια μικρή έκφραση στα τελευταία στάδια της ωογένεσης και στις πρώτες δυο κυτταρικές διαιρέσεις του ζυγωτού (στάδιο τεσσάρων κυττάρων), κάτι που ήταν αναμενόμενο καθώς το DAZL είναι ως γνωστόν μάρτυρας των γεννητικών κυττάρων και τα μετάγραφα του γονιδίου που βρέθηκαν προέρχονταν από το μητρικό γονιδίωμα. Σε μελέτη που διεξήχθη κατά τον τρίτο κύκλο, παρατηρήθηκε μεταβολή στο πρότυπο έκφρασης του γονιδίου DAZL η οποία προφανώς υποδηλώνει τη μετάβαση από το μητρικό στο εμβρυϊκό έλεγχο έκφρασης. Στις μετέπειτα κυτταρικές διαιρέσεις παρατηρήθηκε

σταθερή έκφραση του γονιδίου που υποδηλώνει την εμβρυϊκή μεταγραφή του. Στο στάδιο της βλαστοκύστης, τα μετάγραφα του γονιδίου εντοπιζόνταν τόσο στο τροφοεκτόδεμα όσο και στα κύτταρα της εσωτερικής μάζας (μόνο σε καλής ποιότητας δείγματα). Η παρουσία τους στα κύτταρα της εσωτερικής μάζας και στα βλαστοκύτταρα ήταν αναμενόμενη, αφού και οι δυο ομάδες κυττάρων μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό γεννητικών κυττάρων σε αντίθεση με τα κύτταρα του τροφοεκτοδέρματος, κάτι που μας οδηγεί στο συμπέρασμα πιθανής ανάμιξης του γονιδίου και σε άλλες λειτουργίες εκτός της ανάπτυξης των γεννητικών κυττάρων (Cauffman G et al., 2005). Τα τελευταία αποτελέσματα περί έκφρασης του γονιδίου DAZL στα κύτταρα της εσωτερικής μάζας της βλαστοκύστης έρχονται σε αντίθεση με άλλες έρευνες, οι οποίες υποστηρίζουν πως δεν εκφράζεται στα κύτταρα αυτά αλλά μόνο στα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα που εντοπίζονται εκεί (Zwaka TP and Thomson JA, 2005). Ο Clark AT και οι συνεργάτες του εντόπισαν έκφραση του DAZL στα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα τόσο σε πρωτεϊνικό όσο και σε πρωτεομικό επίπεδο αλλά όχι στην έσω κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης. Σήμερα, πολλές έρευνες έχουν επιβεβαιώσει τον εντοπισμό μεταγράφων του γονιδίου DAZL σε αδιαφοροποίητες σειρές ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, συσχετίζοντας έτσι την έκφραση του με την ύπαρξη βλαστικών κυττάρων και θέτοντας το δείκτη των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Επίσης, εντοπίστηκε η έκφραση του σε εμβρυϊκά σώματα (embryoid bodies) τα οποία είχαν σχηματιστεί από εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα απομονωμένα από ποντικούς (Konstantinos Stefanidis et al., 2009)

Τέλος, ο Στεφανίδης και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι το ανθρώπινο αμνιακό υγρό είναι μια νέα πηγή για την απομόνωση DAZL θετικών βλαστικών κυττάρων χωρίς να εγείρονται τα ηθικά θέματα που έχουν να κάνουν με την έρευνα στα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (Stefanidis K et al,2008).

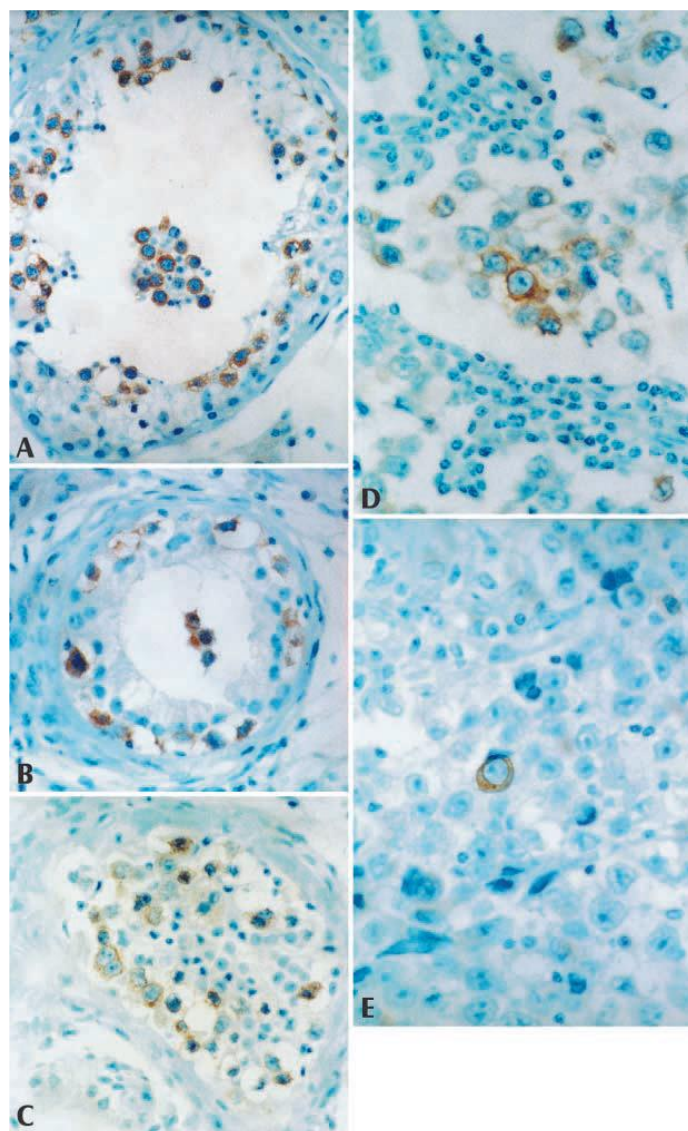


Εικόνα 23. Προτεινόμενο μοντέλο που προσδιορίζει το DAZL ως σύνδεσμο μεταξύ της πολυδυναμικότητας, του επαναπρογραμματισμού και της διαφοροποίησης των κυττάρων. Το πράσινο συμβολίζει την έκφραση του Oct-4 ΔPE:GFP κατά τον κυτταρικό κύκλο ανάπτυξης των γεννητικών κυττάρων. (A) Εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ESCs) απομονωμένα από DAZL $-/-$ βλαστοκύστες ποντικών επιδεικνύουν μια μείωση των δεικτών πολυδυναμικότητας και γεννητικών κυττάρων και δεν διαφοροποιούνται μετέπειτα σε γεννητικά κύτταρα όπως παρατηρείται στα φυσικού τύπου και DAZL ετερόζυγα ESCs. (B) Τα γονοκύτταρα και υποτιθέμενα γεννητικά κύτταρα *in vitro* παρουσιάζουν μια μείωση στην έκφραση του Oct-4 ΔPE:GFP και απουσία κάποιων σταδιο-ειδικών γεννητικών δεικτών της ανάπτυξης των γεννητικών κυττάρων ή διαγραφή των δεικτών αποτυπωμένης μεθυλίωσης του H19 γενετικού τόπου στα αρσενικά. (C) Ωογόνια και σπερματογόνια απομονωμένα από DAZL $-/-$ μεταλλαγμένες γονάδες ποντικών παρουσιάζουν σημαντική μείωση των ειδικών Oct-4 ΔPE:GFP θετικών έκφρασης κυττάρων και ανώμαλη γονιδιακή έκφραση, γεγονός που φανερώνει μείωση των ικανοτήτων πολυδυναμικότητας και αυτό-ανανέωσης και του δυναμικού των γεννητικών κυττάρων. (D) Σπερματοκύτταρα και ωοκύτταρα στα αρχικά στάδια διαφοροποίησης απομονωμένα από DAZL $-/-$ έμβρυα παρουσιάζουν σημαντική μείωση των ειδικών Oct-4 ΔPE:GFP θετικών έκφρασης κυττάρων, ανώμαλη γονιδιακή έκφραση, αποτυχία στην αποκατάσταση λειτουργίας των δεικτών αποτυπωμένης μεθυλίωσης 4του H19 γενετικού τόπου στα αρσενικά και αποτυγχάνουν να προχωρήσουν στη διαδικασία μείωσης.

1.5.4 DAZL και καρκίνος

Το 2001 βρέθηκε σταθερή έκφραση της πρωτεΐνης DAZL σε διάσπαρτα κύτταρα σε όλες τις ακαθόριστου τύπου νεοπλασίες γεννητικών κυττάρων των σωληναρίων των όρχεων (Intratubular germ cell neoplasias –IGCN- of the unclassified type) αλλά και σε κάποια

σεμινώματα των σπερματικών σωληναρίων. Εστίες έκφρασης παρατηρήθηκαν σε καθαρά σεμινώματα ενώ μονήρη ανασοθετικά κύτταρα σε περιοχές σεμινωμάτων μικτών νεοπλασιών γεννητικών κυττάρων. Όλα τα μη σεμινώματα ήταν αρνητικά στην έκφραση του DAZL (Lifschitz-Mercer B et al., 2001).



Εικόνα 24. Ανοσοϊστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης DAZL σε: A) σπερματικά σωληνάκια όπου τα σπερματοκύτταρα χρωματίζονται θετικά, B) ακαθόριστου τύπου νεοπλασία με θετική χρώση σε άτυπα κύτταρα, C) σεμίνωμα σπερματικών σωληναρίων με θετική χρώση σε άτυπα κύτταρα, D) Εστιακή χρώση σε καθαρά σεμινώματα, E) Ένα θετικά χρωματισμένο κύτταρο σε σεμίνωμα μικτών νεοπλασιών γεννητικών κυττάρων. Σε όλες τις περιπτώσεις φαίνεται ότι η πρωτεΐνη DAZL εκφράζεται κυτταροπλασματικά.

Το 2013 μια άλλη έρευνα από την Elise Ruark και τους συνεργάτες της προσδιόρισε την ύπαρξη εννέα νέων διαφορετικών γονιδιακών θέσεων που σχετίζονται με τον καρκίνο των όρχεων. Μια από τις γονιδιακές αυτές θέσεις αφορά το γονίδιο DAZL και συγκεκριμένα ένας πολυμορφισμός ενός μόνου νουκλεοτιδίου του φάνηκε πως εμφανίζεται σε νεαρούς άνδρες ασθενείς. Κατάφεραν έτσι με την έρευνα αυτή να αποδείξουν ότι η παραλλαγή αυτή του γονιδίου DAZL συμμετέχει στον καρκίνο των όρχεων και ότι μαζί με τους υπόλοιπους οχτώ πολυμορφισμούς των άλλων γονιδίων αντιπροσωπεύουν ένα επιπλέον 4-6% του οικογενούς κινδύνου για ανάπτυξη καρκίνου των όρχεων

Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί με την τεχνική του ανοσοφθορισμού με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης DAZL έκφραση του σε άλλους καρκινικούς τύπους (σε τουλάχιστον 10% των περιπτώσεων), ενώ δεν υπάρχει στους αντίστοιχους φυσιολογικούς ιστούς, με εξαίρεση τους όρχεις. Σε δείγματα καρκίνου παχέους εντέρου, ωοθηκών, ενδομητρίου, στομάχου και παγκρέατος το επίπεδο χρώσης είναι υψηλό ενώ σε δείγματα καρκίνου των πνευμόνων, του προστάτη, των νεφρών και στο κακοήθες μελάνωμα είναι μέτριο. (Uhlen M. et al., 2005).

Τέλος, το γονίδιο DAZL όπως και τα Oct-4, Sox2, Nanog, Stellar και GDF3 που αποτελούν γονίδια-μάρτυρες των ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων παρατηρήθηκε ότι εκφράζονται σε δείγματα από σεμινώματα και καρκίνο του μαστού. Αυτό το εύρημα υποδηλώνει ότι τα γονίδια των βλαστικών κυττάρων άρα και το DAZL μπορεί να παίζουν άμεσο ρόλο στην πρόοδο διαφόρων τύπων καρκινώματος ή να είναι σημαντικοί μάρτυρες ογκογένεσης (Ezeh UI et al.,2005).

1.6 AMH

1.6.1 Η οικογένεια TGF-β

Η υπερ-οικογένεια του αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης-β (transforming growth factor-β) αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό πολυπεπτιδίων που ρυθμίζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών λειτουργιών όπως πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση και απόπτωση κυττάρων, εμβρυϊκή ανάπτυξη ιστών, ρύθμιση ανοσολογικών μηχανισμών και καρκινογένεση. Πήρε την ονομασία της από την πρώτη πρωτεΐνη της υπερ-οικογένειας, την TGF-β1 που ανακαλύφθηκε το 1983 (Assoian RK et al.). Εντοπίζονται σε όλους τους οργανισμούς από το *C.Elegans* και τη δροσόφιλα, μέχρι και τον άνθρωπο, υποδεικνύοντας την ιδιαίτερη σημασία αυτής της οικογένειας πρωτεϊνών (Savage et al.1996, Raftery et al.,1999 & Schmierer et al.,2007).

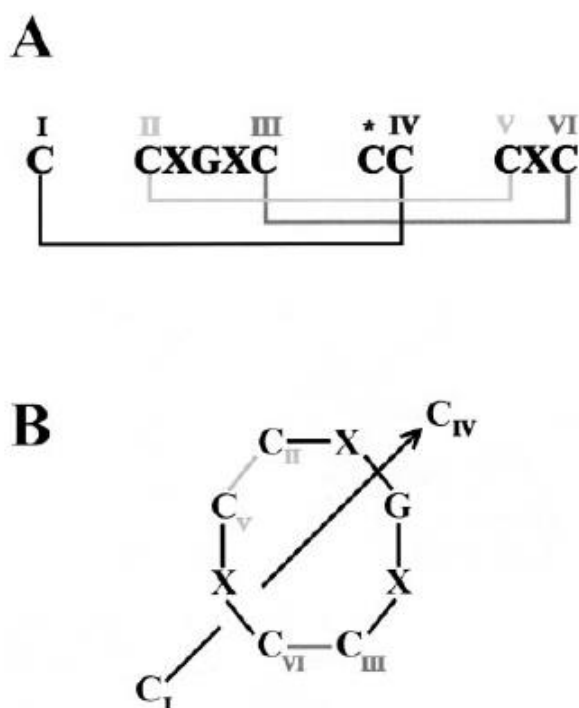
Η υπερ-οικογένεια περιλαμβάνει περισσότερα από 35 δομικά παρόμοια πεπτίδια που διακρίνονται στις εξής υποομάδες:

- Ισομορφές TGF-β
- Ακτιβίνες και ινχιπίνες
- Αυξητικούς παράγοντες και παράγοντες διαφοροποίησης (GDFs)
- Μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών (BMPs)
- Πρωτεΐνες καθορισμού ανάπτυξης οργάνων κατά την εμβρυογένεση
- Nodal πρωτεΐνες
- Αντιμυλλέριος ορμόνη (AMH)
- Νευροτροφικός παράγοντας των νευρογλοιακών κυττάρων (GDNF)

Πολλοί από τους παραπάνω παράγοντες εμπλέκονται στην αναπαραγωγική λειτουργία και των δύο φύλων (Itman et al. & Knight et al., 2006). Τα περισσότερα μέλη της οικογένειας TGF-β διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις τρεις βασικές διαδικασίες ανάπτυξης και επιλογής της δεξαμενής ωοθυλακίων: i. εγκατάσταση των ωοκυττάρων κατά την εμβρυογένεση, ii. συσσώρευση της δεξαμενής των ωοθυλακίων, iii. ενεργοποίηση του αρχέγονου ωοθυλακίου (Pangas, 2012).

Κάθε μόριο της οικογένειας TGF-β παράγεται αρχικά ως μια μεγάλη πρόδρομη πρωτεΐνη σε ανενεργή μορφή, η οποία αποτελείται από ένα αμινικό άκρο (20-30 αμινοξέων), μια κεντρική περιοχή, η οποία ονομάζεται pro-region ή latency associated peptide LAP, και ένα καρβοξυτελικό άκρο (112-114 αμινοξέων). Το αμινικό άκρο θεωρείται πως ορίζει τη σύνθεση κάθε είδους πρωτεΐνης από το κύτταρο παραγωγής της. Το καρβοξυτελικό άκρο αποσχίζεται

με πρωτεόλυση από το πρόδρομο μόριο και οδηγεί στην ώριμη, ενεργή μορφή της πρωτεΐνης. Ειδικότερα, η ώριμη περιοχή δομείται από 7 αμινοξέα κυστεΐνης ενωμένα μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Τα 6 μόρια κυστεΐνης συνδέονται μεταξύ τους με τρεις ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς (C II-C V C, III-C VI, C I- C IV) σχηματίζοντας μία σταθερή τρισδιάστατη μορφή σαν δακτύλιος γνωστή ως “cysteine knot”, η οποία χαρακτηρίζει τις πρωτεΐνες της οικογένειας του αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης-β (McDonald and Hendrickson, 1993) και στην οποία οφείλεται η δομική ακεραιότητα του κάθε πεπτιδίου ως μονομερές. Το έβδομο μόριο κυστεΐνης συνδέεται, επίσης, με δισουλφιδικό δεσμό με ένα άλλο μόριο κυστεΐνης δεύτερου μονομερούς σχηματίζοντας τελικά ένα διμερές που αποτελεί τελικά την ενεργή μορφή. Ο τελευταίος δισουλφιδικός δεσμός προσφέρει επιπλέον σταθεροποίηση των υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων, οι οποίες αποτελούν την κατευθυντήρια δύναμη για διμερισμό (Khan et al., 2007).



Εικόνα 25. Α. Αποτύπωση των 3 ενδομοριακών δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των μορίων κυστεΐνης. Β. Δακτύλιος “cysteine knot”

Όλες οι πρωτεΐνες της υπερ-οικογένειας TGF-β συνδέονται με κύτταρα-στόχους και επάγουν τη δράση τους μετά την πρόσδεση τους σε ειδικούς υποδοχείς. Οι υποδοχείς αυτοί υπάγονται σε 3 τύπους: τύπου I (TGFβR-I, μεγέθους: 50-60 kDa), τύπου II (TGFβR-II, 70-

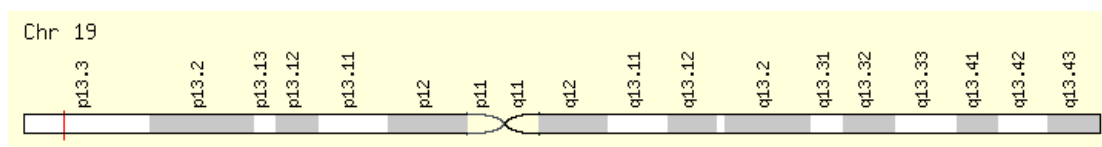
100 kDa) και τύπου III (TGFβR-III, 200-400 kDa). Πρόκειται για διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούνται από ένα εξωκυττάριο τμήμα πλούσιο σε κυστεΐνη και υπεύθυνο για τη σύνδεση με τον αυξητικό παράγοντα, μία διαμεμβρανική περιοχή και ένα ενδοκυττάριο τμήμα με δραστηριότητα σερίνης/θρεονίνης. Αρχικά, οι πρωτεΐνες της υπερ-οικογένειας δεσμεύονται στους υποδοχείς τύπου II (οι οποίοι είναι συνεχώς ενεργοποιημένοι) και στη συνέχεια το σύμπλεγμα προσδέτη-τύπου II υποδοχέα συνδέεται με τον υποδοχέα τύπου I. Κατόπιν, ο υποδοχέας τύπου II φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον υποδοχέα τύπου I. Έχουν περιγραφεί 7 τύπου I υποδοχείς και 5 τύπου II υποδοχείς στα θηλαστικά (Itoh et al.,2000). Ο υποδοχέας τύπου III δεν είναι υπεύθυνος για τη μεταβίβαση του σήματος ενδοκυττάρια, αλλά φαίνεται να βοηθάει τα μόρια του TGF-β να παρουσιαστούν στον υποδοχέα τύπου II.

Πίνακας. Τύποι TGF-β υποδοχέων και το είδος πρωτεϊνών που δεσμεύουν.

Τύπου I υποδοχείς	Κυτταροκίνες
ALK-1 (TSR-1, R3) ALK-2 (ActRi, Tsk7L, R1, SKR1) ALK-3 (BMPRIA, BKR1, TRII) ALK-4 (ActRIB, R2) ALK-5 (TβRI, R4) ALK-6 (BMPRII, BKR2) ALK-7	TGF-βs, ακτιβίνες TGF-βs, ακτιβίνες, BMP-2/4, BMP-7 BMP-2/4, BMP-7 Ακτιβίνες, Nodal TGF-βs BMP-2/4, BMP-7 Nodal, ακτιβίνες
Τύπου II υποδοχείς	Κυτταροκίνες
TβRII (Τύπου II TGF-β υποδοχέας) ActRIIA (Τύπου II υποδοχέας της ακτιβίνης) ActRIIB (Τύπου II υποδοχέας της ακτιβίνης) BMPRII (Type II BMP receptor) AMHRII	TGF-βs Ακτιβίνες, BMP-7 Ακτιβίνες, BMP-7, BMP-2 BMP-2/4, BMP-7 AMH

1.6.2 Η δομή του γονιδίου AMH

Το γονίδιο της αντιμυλλέριου ορμόνης ονομάζεται AMH και εδράζει στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 19. Εντοπίζεται στη θέση p.13.3 και καλύπτει μια περιοχή 2.750 βάσεων του χρωμοσώματος. Η αλληλούχιση του ανθρώπινου γονιδίου έγινε για πρώτη φορά το 1986 από τον Richard Cate στην Βοστώνη.



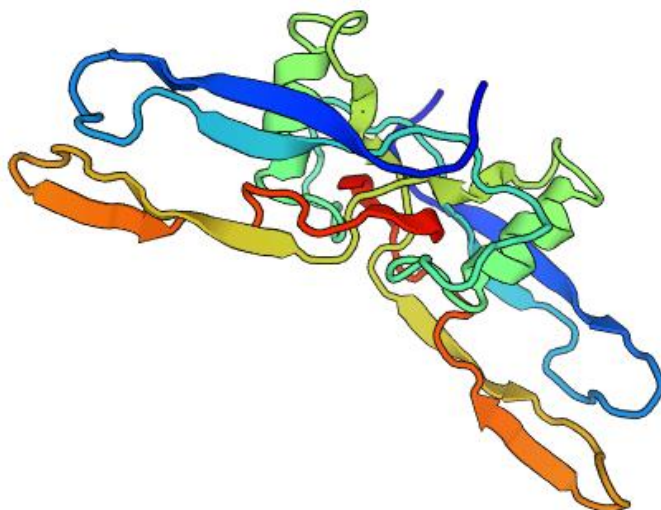
Εικόνα 26. Απεικόνιση του ανθρώπινου χρωμοσώματος 19 στο οποίο εδράζει το γονίδιο AMH (κόκκινη γραμμή)

Το γονιδίωμα της AMH μπορεί να οδηγήσει σε 3 διαφορετικά ώριμα mRNA μέσω εναλλακτικού ματίσματος κατά την ωρίμανση. Τα τρία αυτά μόρια διαφέρουν ως προς το μέγεθος τους: το 1^ο έχει μήκος 1.809 βάσεων, το 2^ο 1.686 βάσεων και το 3^ο 534 βάσεων. Τα δυο από αυτά δεν κωδικοποιούν κάποια λειτουργική πρωτεΐνη, ενώ το 1^ο ώριμο mRNA αποτελείται από 5 εξώνια και οδηγεί σε μια ομοδιμερή γλυκοπρωτεΐνη μήκους 560 αμινοξέων και μοριακού βάρους 140 kDa, τη γνωστή μας AMH (Cohen-Haguenaue O. Et al., 1987). Ο προσδιορισμός της δεν αποτέλεσε εύκολη υπόθεση. Το 1978 υπήρξαν οι πρώτες ενδείξεις της ομοδιμερικής φύσης της και το 1984 λήφθηκε για πρώτη φορά σε ομοιογένεια μέσω ανοσοχρωματογραφίας (Picard and Josso, 1984).

10	20	30	40	50
MRDLPLTSLA	LVLGALGALL	GTEALRAEEP	AVGTSGLIFR	EDLDWPPGSP
60	70	80	90	100
QEPLCLVALG	GDSNGSSSPL	RVVGALSAYE	QAFGLAVQRA	RWGPRDLATF
110	120	130	140	150
GVCNTGDRQA	ALPSLRRLGA	WLRDPGGQRL	VVLHLEEVTV	EPTPSLRFQE
160	170	180	190	200
PPPGGAGPPE	LALLVLYPGP	GPEVTVTRAG	LPGAQSLCPS	RDTRYLVAV
210	220	230	240	250
DRPAGAWRGS	GLALTLQPRG	EDSRLSTARL	QALLFGDDHR	CFTRMTPALL
260	270	280	290	300
LLPRSEAPPL	PAHQQLDTPV	FPPPRPSAEL	EESPPSADPF	LETLTRLVRA
310	320	330	340	350
LRVPPARASA	PRLALDPDAL	AGFPQGLVNL	SDPAALERLL	DGEEPLLLLL
360	370	380	390	400
RPTAATGDP	APLHDPTSAP	WATALARRVA	AELQAAAEL	RSLPGLPPAT
410	420	430	440	450
APLLARLLAL	CPGGPGGLGD	PLRALLLLKA	LQGLRVEWRG	RDPRGPGRAQ
460	470	480	490	500
RSAGATAADG	PCALRELSVD	LRAERSVLIP	ETYQANNCQG	VCGWPQSDRN
510	520	530	540	550
PRYGNHVLL	LKMQVRGAAL	ARPPCCVPTA	YAGKLLISLS	EERISAHVVP
560				
NMVATECGCR				

Εικόνα 27. Αμινοξική ακολουθία της AMH ορμόνης

Οι παράγοντες SF-1 και GATA-4 επάγουν τη μεταγραφή του γονιδίου και κωδικοποιείται μια πρόδρομη μορφή της ορμόνης (pro-AMH) και ειδικότερα το ένα μονομερές της μεγέθους 70 kDa. Με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις δυο ίδια μονομερή ενώνονται με δισουλφιδικό δεσμό και δημιουργούν την ομοδιμερή προ-ορμόνη. Η πρωτεόλυση της προ-ορμόνης AMH οδηγεί στο σχηματισμό της αμινοτελικής αυτοτελής περιοχής που ονομάζεται “pro-region” (115kDa, AMHN) και της καρβοξυτελικής αυτοτελής περιοχής, γνωστή ως “mature region” (25kDa, AMHC). Η καρβοξυτελική περιοχή ευθύνεται για τη σύνδεση της ορμόνης με τον υποδοχέα της και το βιολογικό της ρόλο, αλλά για να παραμένει ενεργή είναι απαραίτητη η αμινοτελική περιοχή σε αντίθεση με άλλες πρωτεΐνες της υπερ-οικογένειας TGF-β (Pepinsky RB et al., 1988).



Εικόνα 28. Τρισδιάστατη απεικόνιση της AMH ορμόνης

1.6.3 Ο ρόλος και η έκφραση της πρωτεΐνης AMH

Αρχικά, η Αντιμυλλέριος ορμόνη AMH αναφερόταν ως Μυλλέριος-ανασταλτική ουσία ή ουσία που αναστέλλει την ανάπτυξη των πόρων του Müller (Müllerian Inhibiting Substance – MIS), και ήταν γνωστή από το 1940 για το ρόλο της στην σεξουαλική διαφοροποίηση του αρρενος κατά την διάρκεια της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης, εξαιτίας της πρωτοποριακής εργασίας του Alfred Jost. Τα τελευταία 15 χρόνια η χρήση μοριακών τεχνικών έδωσε τη δυνατότητα στους ερευνητές να προσδιορίσουν τους υποδοχείς και τα σηματοδοτικά μονοπάτια της AMH, όπως και την κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στη

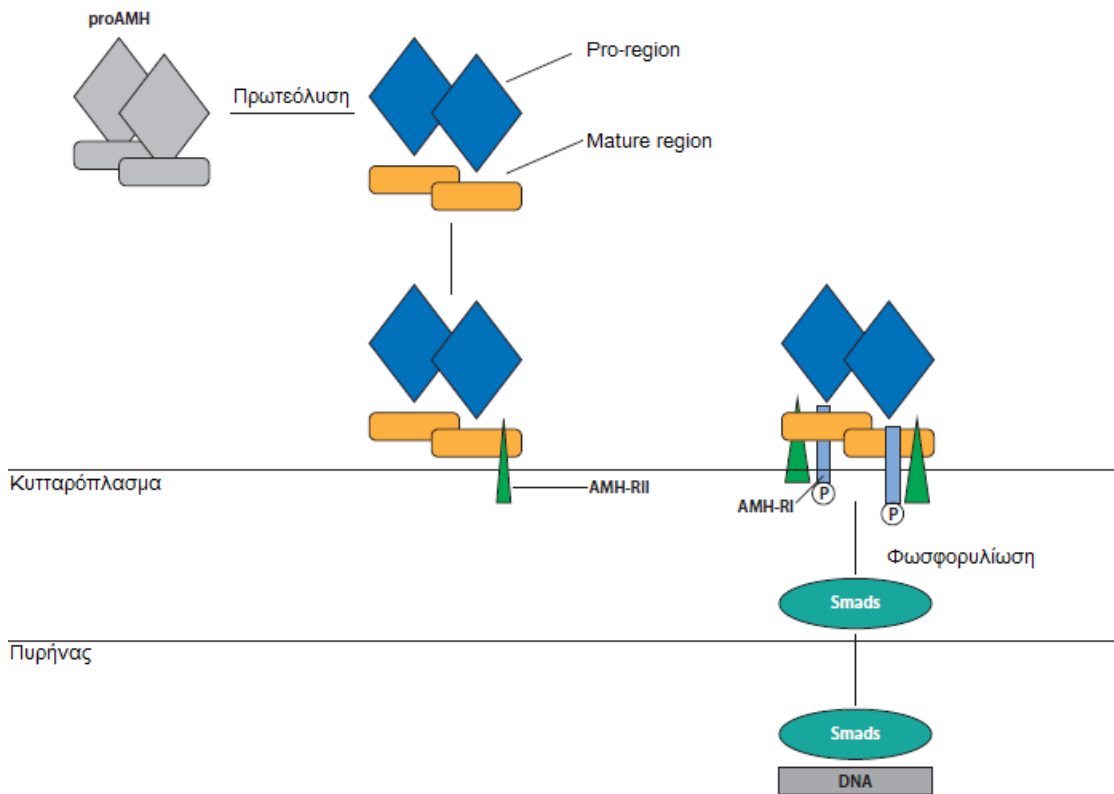
ρύθμιση της έκφρασης της. Ως μέλος της υπερ-οικογένειας αυξητικού παράγοντα μεταμόρφωσης-β για να δράσει προσδένεται στους προαναφερόμενους υποδοχείς τύπου I και II, γνωστοί ως AMHRI και AMHRII.

Το ανθρώπινο γονίδιο του υποδοχέα AMHRII απομονώθηκε το 1995 και εδράζεται στο χρωμόσωμα 12 στη θέση q12-13. Αποτελείται από 11 εξώνια εκτεινόμενα σε έκταση μεγαλύτερη των 8.000 βάσεων (Imbeaud et al., 1995). Το γονίδιο μεταγράφεται και παράγονται mRNA του υποδοχέα AMHRII στα όργανα-στόχους της αντιμυλλέριου ορμόνης, τους πόρους του Müller και τις γονάδες. Από μελέτες σε ποντίκια, έχει βρεθεί ότι ο υποδοχέας εντοπίζεται στο μεσέγγυμα γύρω από τους πόρους του Müller στην ουρογεννητική περιοχή και των δυο φύλων και ότι εκφράζεται τόσο στα κοκκιώδη όσο και στα κύτταρα της ωοθήκης (Ingraham et al., 2000). Στους ανθρώπους έχει αποδειχθεί πως το σύνδρομο παραμονής των πόρων του Müller (persistent müllerian duct syndrome, PMDS) που εμφανίζει αυτοσωμική υπολειπόμενη κληρονομικότητα, σχετίζεται με διάφορες μεταλλάξεις στο γονίδιο του υποδοχέα AMHRII που οδηγούν σε απώλεια λειτουργίας του (Imbeaud et al., 1994). Αποτελεί μια σπάνια μορφή άρρενος ψευδερμαφροδιτισμού στην οποία οι ασθενείς παρουσιάζουν γονότυπο και φαινότυπο άρρενος αλλά ανευρίσκονται σε αυτούς παράγωγα των πόρων του Müller (Guerrier et al., 1990).

Σε αντίθεση με τον υποδοχέα τύπου II, η ταυτοποίηση του υποδοχέα τύπου I, AMHRI, δεν έχει διευκρινιστεί. Οι πιο ευρέως επιστημονικά αποδεκτοί υποδοχείς είναι οι Alk2, Alk3 και Alk6, οι οποίοι αποτελούν υποδοχείς τύπου I και για τις μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών, BMPs (di Clemente et al., 2003). Πρώτος ταυτοποιήθηκε ο υποδοχέας Alk6, λόγω της ικανότητας του να αλληλεπιδρά με ένα συνδεσμο-εξαρτώμενο τρόπο με τον υποδοχέα AMHRII σε ωοθηκικά κύτταρα κινέζικων χάμστερ, τα οποία εκφράζουν μόνιμα ανθρώπινη AMHRII (Imbeaud et al., 1995). Οι Alk6 και Alk2 (Clarke et al., 2001 & Visser et al., 2001) μπορεί να μεσολαβούν στην δράση της αντιμυλλέριου ορμόνης, AMH σε άλλα όργανα στόχους, ενώ μόνο ο Alk3 έχει αποδειχθεί ότι μεσολαβεί στη δράση της στους πόρους του Müller (Jamin et al., 2002).

Η pro-AMH πρωτεολύεται και αλλάζει με τέτοιο τρόπο η καρβοξυτελική περιοχή της, ώστε να δεσμεύεται εξειδικευμένα με την εξωκυττάρια περιοχή του διαμεμβρανικού υποδοχέα τύπου II, AMHRII. Ο υποδοχέας AMHRII δεσμεύεται έπειτα στον υποδοχέα τύπου I, AMHRI, ο οποίος φωσφορυλιώνεται με δράση κινάσης. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται ένα μεγάλο σύμπλεγμα που ενεργοποιεί το μονοπάτι σηματοδότησης των Smad πρωτεϊνών

ενδοκυτταρικά μέσω φωσφορυλίωσης. Ειδικότερα, φωσφορυλιώνονται R-Smad πρωτεΐνες, οι οποίες σχηματίζουν ετερομερή συμπλέγματα με την κοινή Smad4 πρωτεΐνη και αυτά μεταφέρονται προς τον πυρήνα για να ρυθμίσουν τη μεταγραφή και μετάφραση συγκεκριμένων γονιδίων, όπως απεικονίζεται παρακάτω (Salhi et al., 2004 & Teixeira J. Et al., 2001).



Εικόνα 29. Ο μηχανισμός δράσης της AMH

Η αντιμυλλέριος ορμόνη, AMH εκφράζεται κυρίως στους όρχεις και στον εγκέφαλο και λιγότερο στο ενδομήτριο, στον πλακούντα και σε διάφορους άλλους ανθρώπινους ιστούς.

Η AMH παίζει καθοριστικό ρόλο στη διαφοροποίηση του αρρενος φύλου όταν εκφράζεται από τους εμβρυϊκούς όρχεις. Ειδικότερα, υπό τον έλεγχο του γονιδίου SRY, το οποίο εδράζει στο Y χρωμόσωμα, παρουσία του οποίου καθορίζεται το αρρεν φύλο, οι γονάδες του αρρενος διαφοροποιούνται σε όρχεις. Τα σωματικά κύτταρα του αναπτυσσόμενου όρχεος, τα κύτταρα Leydig και τα κύτταρα Sertoli, παράγουν τρία είδη ορμονών που ευθύνονται για την σωστή ανάπτυξη του αρρενος εμβρύου. Η τεστοστερόνη και ο

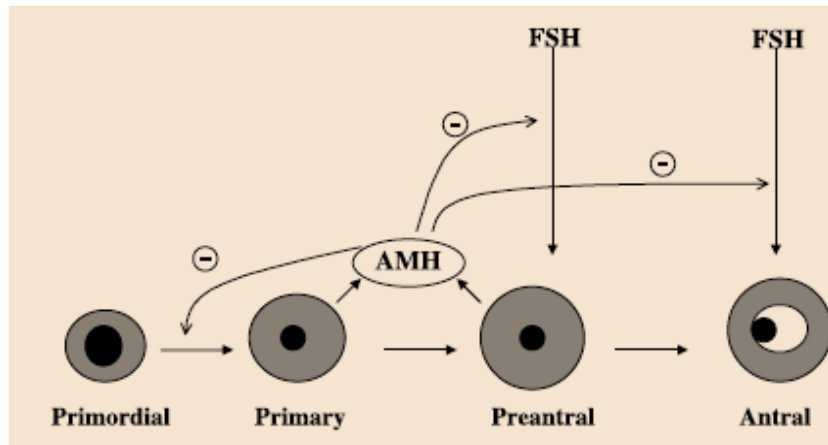
παράγοντας που προσομοιάζει την ινσουλίνη 3 (INSL3) παράγονται στα κύτταρα Leydig και καθορίζουν τα εξωτερικά δευτερογενή χαρακτηριστικά του φύλου και τη σωστή κατάβαση του όρχι στο όσχεο. Η AMH αρχίζει και παράγεται από τα εμβρυϊκά κύτταρα του Sertoli κατά την 8η εβδομάδα της κύησης, προκαλώντας την παλινδρόμηση του πόρου του Müller. Έτσι, είναι δυνατόν οι πόροι του Wolf να αναπτυχθούν στη γεννητική οδό του άρρενος, κάτω από τη δράση και της τεστοστερόνης (Wilson et al., 1981 & Lee et al., 1997).

Σε περίπτωση που δεν παραχθεί η AMH την κατάλληλη χρονική διάρκεια ή δυσλειτουργούν οι υποδοχείς της με συνέπεια να μη μπορέσει να δράσει, οι πόροι του Müller αναπτύσσονται σε σάλπιγγες, μήτρα και άνω τμήμα του κόλπου ανεξαρτήτως φύλου (Behringer et al., 1994). Ωστόσο, αργότερα κατά την εμβρυϊκή ζωή των θηλυκών εμβρύων, γύρω στην 36^η εβδομάδα κύησης, η AMH συντίθεται από τα κοκκιώδη κύτταρα των πρώιμων αρχέγονων ωοθυλακίων και φθάνει στα ανώτερα επίπεδα στα μικρά ωοθυλάκια του άντρου. Αργότερα, η παραγωγή της ελαττώνεται όσο αυξάνει το μέγεθος του ωοθυλακίου, ενώ σχεδόν εξαφανίζεται όταν το ωοθυλάκιο φθάσει στο μέγεθος όπου είναι κυρίαρχο υπό τη δράση της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης, FSH. Η εξαφάνιση αυτή είναι καθοριστική για την επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου και την εξέλιξη προς ωοθυλακιορρηξία.

Πιο συγκεκριμένα, η δράση της AMH εξαρτάται από τη φάση του κύκλου της γυναίκας. Στην αρχική φάση της επιστράτευσης, εμποδίζει την είσοδο των αρχέγονων ωοθυλακίων στη δεξαμενή των προς ανάπτυξη ωοθυλακίων, διατηρώντας τις αποθήκες πρωτογενών ωοθυλακίων της ωοθήκης. Στη συνέχεια ελαττώνει την ευαισθησία των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων προς την FSH μέσω της σύνδεσης των ειδικών αναστολέων της που οδηγούν σε μείωση της έκφρασης της εξαρτώμενης από την FSH αρωματάσης και μείωση των υποδοχέων της FSH (Pellatt et al., 2010). Η αναστολή της επιστράτευσης ωοθυλακίων επιτελείται παρεμποδίζοντας διάφορους παράγοντες διέγερσης της αύξησης όπως η πρωτεΐνη σύνδεσης KIT και ο αυξητικός παράγων των ινοβλαστών (Durlinger et al., 2002). Επιπρόσθετα, ελαττώνοντας την ευαισθησία στην FSH, μειώνει και την πιθανότητα κυκλικής επιστράτευσης των ωοθυλακίων (Kalich-Philosoph et al., 2013).

Η AMH αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών και ωχρινικών κυττάρων και την ωρίμανση του ωοκυττάρου, καθώς επιδρά στη μειωτική του διαίρεση. Η μείωση συνεχίζεται όταν η προωορρηκτική αιχμή της LH υπερνικήσει την αναστολή της AMH. Μετά την εφηβεία στις γυναίκες, η AMH παράγεται από μικρά αυξανόμενα ωοθυλάκια και δρα ως παρακρινής ανασταλτικός παράγοντας με στόχο να μην στρατολογηθούν πολλά

υπολειπόμενα αρχέγονα ωοθυλάκια, αλλά να αναπτυχθεί μόνο ένα κυρίαρχο ωοθυλάκιο ανά κύκλο. Μελέτες μέτρησης της έκφρασης της AMH στις διάφορες φάσεις της ωοθυλακιογένεσης έδειξαν ότι η υψηλότερη έκφραση της εντοπίζεται στα ωοθυλάκια προ του άντρου και στα μικρά ωοθυλάκια του άντρου, τα οποία μάλιστα εμπλέκονται στην εξαρτώμενη από την FSH στρατολόγηση, ενώ βρίσκεται σε πολύ χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα σε ωοθυλάκια διαμέτρου μεγαλύτερης των 10mm (Weenen et al., 2004).



Εικόνα 30. Η AMH εκκρίνεται από τα πρωτογενή και τα προ-άντρου ωοθυλάκια και αναστέλλει την επιστράτευση των ωοθυλακίων και τη διεγερμένη από την FSH ανάπτυξη τους.

Τα επίπεδα της μετρήσιμης AMH στο ορό του αίματος είναι χαμηλότερα στις γυναίκες από ότι στους άντρες κατά τη διάρκεια της ζωής. Η AMH είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμη κατά τη γέννηση των θηλέων νεογνών και παρουσιάζει αύξηση μέχρι την ηλικία των τεσσάρων ετών, ώστε να παραμείνει φυσιολογικά σταθερή στην ενήλικη ζωή καταλήγοντας ξανά μη ανιχνεύσιμη κατά την εμμηνόπαυση (Lee et al., 1996). Σε αντίθεση στους άντρες τα επίπεδα της AMH μειώνονται διαρκώς με την ηλικία, όμως οι τιμές της είναι και πάλι μεγαλύτερες σε σύγκριση με γυναίκες ίδιας ηλικίας.

Ακόμη πιο χαμηλά επίπεδα αντιμυλλέριου ορμόνης έχουμε σε γυναίκες με πρόιμη ωοθυλακική ανεπάρκεια, σε γυναίκες που έχουν υποβληθεί σε χημειοθεραπείες ή ακτινοθεραπείες και σε γυναίκες που έχουν χειρουργηθεί στην περιοχή των ωοθηκών έχοντας απωλέσει μεγάλο τμήμα του ωοθηκικού τους ιστού. Αντίθετα, σε περιπτώσεις μεγάλου αριθμού ωοθυλακίων, όπως σε γυναίκες με πολυκυστικές ωοθήκες ή πολύ-ωοθυλακικές ωοθήκες, τα επίπεδα της AMH είναι υπερβολικά αυξημένα.

Πίνακας. Τιμές αναφοράς της AMH (pmol/L) με τη μέθοδο ECLIA για άντρες

0 - 12 μηνών	228 – 4280
1 - 4 ετών	498 – 2352
4 – 8 ετών	388 - 1935
8 – 12 ετών	65 – 1584
12 – 16 ετών	17 – 516
> 16 ετών	1,83 – 121,3

Πίνακας. Τιμές αναφοράς της AMH(pmol/L) με τη μέθοδο ECLIA για γυναίκες

0 – 12 μηνών	5,1 – 51,5
1 – 4 ετών	6,5 – 67,2
4 – 16 ετών	4,5 – 103,5
16 – 30 ετών	6,1 – 82,1
30 – 40 ετών	3,4 – 66,7
40 – 50 ετών	0,12 – 40,7
> 50 ετών	<1,0

Με βάση τα αριθμητικά αυτά δεδομένα, η AMH χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερο ως δείκτης ωοθηκικής επάρκειας ωοθυλακίων σε γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών και ως προγνωστικός δείκτης στην ανταπόκριση της ωοθήκης σε γυναίκες που υποβάλλονται σε ωοθηκική διέγερση στα πλαίσια ενός προγράμματος εξωσωματικής γονιμοποίησης (Visser et al., 2006 & Dumesic et al., 2009). Επίσης, η AMH θεωρείται ένας υποσχόμενος δείκτης πρόβλεψης της εμμηνόπαυσης από πολλές έρευνες σε συνδυασμό με την ηλικία της γυναίκας, το BMI και το κάπνισμα, εφόσον η εμμηνόπαυση υποκινείται από την εξάντληση των ωοθυλακίων και η AMH αντικατοπτρίζει το μέγεθος των εναπομεινάντων ωοθυλακίων (Dolleman et al., 2013 & Freeman et al., 2012 & Tehrani et al., 2011). Τέλος, χρησιμοποιείται ως δείκτης της λειτουργίας των κυττάρων Sertoli στους άνδρες και μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με την σπερματογένεση σε υπογόνιμους άνδρες και την επιτυχή ανάκτηση σπέρματος σε αζωοσπερματικούς ασθενείς (Marca et al., 2010 & Duvilla et al., 2008).

1.6.4 AMH και καρκίνος

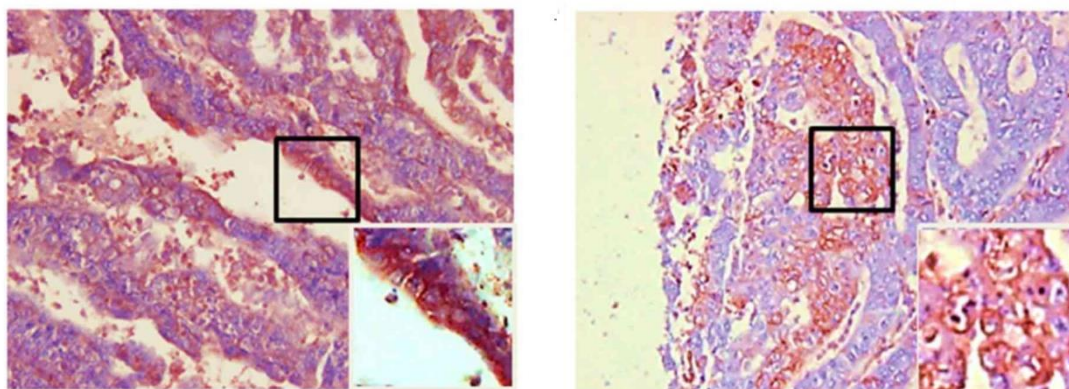
Τα τελευταία χρόνια πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν στρέψει το ενδιαφέρον τους στη μελέτη και τον προσδιορισμό της AMH σε γυναίκες με κακοήθεια. Έχει βρεθεί πως έχει θέση στους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες οι οποίοι είναι τοξικοί για τις ωοθήκες (Brougham et al., 2012 & van Beek et al., 2007). Επιπρόσθετα, η AMH μελετάται ως δείκτης προσδιορισμού του ωοθηκικού αποθέματος μετά την ολοκλήρωση της χημειοθεραπείας ή ακτινοθεραπείας, καθώς είναι εξαιρετικά επιβλαβείς για το ωοθηκικό απόθεμα και λειτουργία (Dillon et al., 2013). Ακόμη και πριν την έναρξη χημειοθεραπειών, οι τιμές της AMH είναι χαμηλότερες σε νέες γυναίκες με κακοήθεια από ότι σε φυσιολογικές γυναίκες (Palinska-Rudzka et al., 2019). Κατά την διάρκεια της χημειοθεραπείας τα επίπεδα της AMH πέφτουν, με μια μερική ανάκτηση έπειτα από 3-6 μήνες.

Πραγματική αξία θα έχει η μέτρηση των επιπέδων της AMH σε νέες γυναίκες που επιβίωσαν από καρκίνο εάν θα μπορούσε να προσδιόριζε το μακροπρόθεσμο αποτέλεσμα της γονιμότητας τους. Η πρώτη μελέτη που ασχολήθηκε με αυτό το θέμα αφορούσε μια 10χρονη παρακολούθηση επιζώντων γυναικών από παιδικό καρκίνο, που στα 30 τους έδειξαν μια ελάττωση των επιπέδων της AMH λόγω της γοναδοτοξικής επίδρασης της αντικαρκινικής θεραπείας τους. Σε γενικές γραμμές το ποσοστό των άτεκνων γυναικών αυτής της ομάδας ήταν υψηλότερο του φυσιολογικού του πληθυσμού της Δανίας, και ιδίως στην ομάδα των γυναικών που είχαν λάβει την μέγιστη γοναδοτοξική θεραπεία, τα ποσοστά των κυήσεων ήταν πολύ φτωγά (Nielsen et al., 2013).

Ειδικά για την περίπτωση ωοθηκικών όγκων εκ κοκκωδών κυττάρων, τα επίπεδα της AMH θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτης διάγνωσης και παρακολούθησης για την ανίχνευση υπολειπόμενης ή υποτροπιάζουσας νόσου, αφού η AMH παράγεται από τα κοκκώδη κύτταρα (La Marca et al., 2007). Το 1992 η AMH αναγνωρίστηκε ως δείκτης όγκων εκ κοκκωδών κυττάρων, με το 76-93% των ασθενών να εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα AMH στον ορό (Rey et al., 1996). Οι αυξημένες τιμές της AMH έχει παρατηρηθεί ότι προηγούνται έως και 16 μήνες της κλινικής εκδήλωσης της υποτροπής του όγκου, ύστερα από τη χειρουργική αφαίρεση (Long et al., 2000).

Έχει βρεθεί ότι οι υποδοχείς τύπου II, AMHRII εκφράζονται τόσο σε φυσιολογικούς όσο και σε καρκινικούς ιστούς (Seveg et al., 2000). Υπερεκφράζονται σε κακοήθεις όγκους του ωοθηκικού ιστού και σε καρκινικά κύτταρα επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών (Bakkum-Gamez et al., 2008 & Song et al., 2009). Μελέτες έχουν δείξει ότι η AMH αναστέλλει την

ανάπτυξη του επιθηλιακού καρκίνου των ωοθηκών τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*, τη μετάσταση των *in vivo* όγκων και επάγει την G1 φάση των βλαστικών/ωοθηκικών κυττάρων σε ωοθηκικούς καρκίνους (MacLaughlin / Donahoe, 2010, Chang et al., 2011 & Meirelles et al., 2012). Με βάση αυτά τα ευρήματα συν το πλεονέκτημα της ελάχιστης τοξικότητας, η AMH έχει προταθεί ως υποψήφια ορμόνη για την επικουρική θεραπεία των ασθενών με καρκίνο των ωοθηκών. Παρομοίως, έχει προταθεί και για την αποτελεσματική θεραπεία του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας, εφόσον μελέτη εντόπισε έκφραση υποδοχέων τύπου II, AMHRII σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας με ίδια ανασταλτική δράση, και για την θεραπεία καρκίνου του ενδομητρίου, όπου έχει βρεθεί ότι η AMH μπορεί να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων σε διάφορες ανθρώπινες καρκινικές σειρές ενδομητρίου (Barbie et al., 2003 & Renaud et al., 2005).



Εικόνα 31. Έκφραση της AMH σε καρκινικό ιστό ενδομητρίου με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημικής χρώσης

Οι φορείς μεταλλάξεων των γονιδίων BRCA1 και BRCA2 είναι σπάνιοι στο γενικό πληθυσμό, αλλά σε αυτούς αυξάνεται σημαντικά ο κίνδυνος εμφάνισης καρκίνου του μαστού, υψηλού βαθμού ορσών ωοθηκικών καρκίνων, καρκίνου των σαλπίγγων και πρωτογενών καρκίνων του περιτοναίου (Antoniou et al., 2003). Φορείς του γονιδίου BRCA1 έχει βρεθεί σε αρκετές μελέτες ότι εμφανίζουν ελαττωμένη γονιμότητα λόγω μικρών ωοθηκικών αποθεμάτων (Oktay et al., 2010 & Pavone et al., 2014). Ειδικότερα, ο Phillips και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν ότι οι μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού σχετίζονται με χαμηλότερα επίπεδα της AMH.

Το 2016 ο Eliassen και οι συνεργάτες του ανέφεραν πως υπάρχει συσχέτιση των υψηλών επιπέδων της AMH στον ορό με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Για το λόγο αυτό, υπέδειξαν την AMH ως δείκτη κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε νέες γυναίκες. Την ίδια χρονιά, ο Kim και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι σε γυναίκες με καρκίνο μαστού σταδίου III και θετικούς οιστρογονικούς υποδοχείς που έλαβαν χημειοθεραπεία, τα υψηλότερα επίπεδα AMH ($>1,00\text{pg/ml}$) συσχετιζόνταν με σημαντικά μικρότερο χρονικό διάστημα ελεύθερο νόσου.

Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ότι σε γυναίκες με καρκίνο του μαστού τα επίπεδα της AMH προ της θεραπείας αποτελούν έναν χρήσιμο δείκτη της μακροπρόθεσμης απώλειας της ωοθηκικής λειτουργίας συνεισφέροντας σημαντικά στην έως τώρα μοναδική επιμέρους πρόγνωση με βάση την ηλικία. Τα όρια για την τιμή της AMH κάτω από τα οποία προβλέπεται αμηνόρροια στα 2 χρόνια μετά την θεραπεία ήταν 0.90. Έτσι, οι προ της θεραπείας μετρήσεις της AMH μπορεί να συνεισφέρουν στην λήψη αποφάσεων που αφορούν τις θεραπευτικές επιλογές και την ανάγκη εφαρμογής διεργασιών διατήρησης της γονιμότητας (Anderson & Wallace, 2013).

Υπάρχουν περιορισμένα εργαστηριακά δεδομένα που προτείνουν τον προστατευτικό ρόλο της AMH στην καρκινογένεση του μαστού. In vitro, η AMH αυξάνει την απόπτωση και ελαττώνει την ανάπτυξη των φυσιολογικών μαστικών MCF10 κυττάρων, όπως επίσης και των κυτταρικών γραμμών των ER+ και ER- του καρκίνου του μαστού (Hoshiya et al., 2003 & Segev et al., 2000). Επιπρόσθετα, η in vivo χορήγηση της AMH σχετίστηκε με λιγότερους ψηλαφητούς όγκους στα ποντίκια, και με αυξημένη απόπτωση του επιθηλίου των μαστικών πόρων των ποντικών (Gupta et al., 2005). Ωστόσο, και στις τρεις αυτές πειραματικές μελέτες οι συγκεντρώσεις της AMH ξεπερνούσαν τα φυσιολογικά επίπεδα, και επομένως παραμένει ασαφής η δυνατότητα εφαρμογής της στην καρκινογένεση του μαστού στους ανθρώπους. Αντιθέτως, το γεγονός πως οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της AMH σχετίζονται με μεγαλύτερη ηλικία εμμηνόπαυσης, η οποία συνιστά παράγοντα κινδύνου για καρκίνο του μαστού, επιβεβαιώνει πως τα υψηλότερα επίπεδα της AMH μπορεί να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του μαστού (Broer et al., 2011 & Freeman et al., 2012).

Το 2012 το Ευρωπαϊκό Δίκτυο Γονιμότητας (European FertiPROTEKT Network) (Lawrenz et al., 2012), δημοσίευσε δεδομένα σύγκρισης των επιπέδων AMH μεταξύ 38 γυναικών με Hodgkin λέμφωμα (HL) και Non-Hodgkin λέμφωμα (NHL) προ θεραπείας και υγιών

γυναικών ελέγχου. Η μέση ηλικία όλων των γυναικών ήταν 25.5 έτη (διακύμανση 18-33), και τα χαμηλότερα επίπεδα AMH παρατηρήθηκαν στις ασθενείς με λέμφωμα ($2.1 \pm 1.5 \text{ ng/mL}$) παρά στην ομάδα ελέγχου ($3.2 \pm 2.2 \text{ ng/mL}$). Επίσης, ο αριθμός των ανακτηθέντων ωοκυττάρων ήταν υψηλότερος στον καρκίνο του μαστού παρά στις ασθενείς με λέμφωμα. Τα ευρήματα αυτά της βιοχημικής εκτίμησης των ωοθηκικών αποθεμάτων δείχνουν πως ο καρκίνος μπορεί να επηρεάζει τα ωοθηκικά αποθέματα, αλλά η επίδραση μπορεί να διαφέρει από τον τύπο του καρκίνου (Su et al., 2013).

Τέλος, η έκφραση και δράση της AMH έχει μελετηθεί και σε μη γυναικολογικούς καρκίνους. Έκφραση της AMH έχει βρεθεί σε καρκινικούς όγκους του προστάτη, όπου ενεργοποιεί τη δράση του συμπλέγματος NFκB, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί το γονίδιο IEX-1 που ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη και απόπτωση (Hoshiya et al., 2003). Ο Beck και οι συνεργάτες του το 2016 ανακάλυψαν ότι η AMH και ο υποδοχέας τύπου II, AMHRII εκφράζονται εκλεκτικά στα επιθηλιακά έναντι των μεσεγχυματικών κυττάρων και εμπλέκονται στη μετάβαση επιθηλίου-μεσεγχύματος στον καρκίνο του πνεύμονα. Η μετάβαση αυτή φάνηκε να συσχετίζεται με ανθεκτικότητα στη χημειοθεραπεία, αλλά και ευαισθητοποίηση των κυττάρων στον αναστολέα της πρωτεΐνης HSP90 ganetespib. Συνεπώς, οι συγγραφείς υποδεικνύουν ότι η AMH θα μπορούσε να συνεκτιμάται στη σχεδίαση νέων θεραπειών στον καρκίνο του πνεύμονα. Επιπρόσθετα, μια μελέτη του 2005 εντόπισε έκφραση των υποδοχέων τύπου II στους κινητικούς νευρώνες σε οφθαλμικό μελάνωμα (Wang et al.).

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα εργασία έχει ως σκοπό τη μελέτη των γονιδίων Oct-4 και Dazl, τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ως δείκτες των βλαστικών κυττάρων, σε καλοήθειες παθήσεις του μαστού και σε καρκίνο του μαστού σε Ελληνίδες ασθενείς. Η μελέτη της έκφρασης τους μπορεί να συσχετισθεί με την διάγνωση και την πρόγνωση των γυναικών που πάσχουν και να συμβάλλει στην επιβεβαίωση της θεωρίας των «καρκινικών βλαστικών κυττάρων». Σύμφωνα με αυτήν, πιστεύεται ότι οι καρκινικοί όγκοι προκύπτουν από εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα τα οποία αποκλίνουν από την κανονική εξέλιξη της διαφοροποίησης τους και μετασχηματίζονται σε κύτταρα όγκου.

Στα πλαίσια της εργασίας αυτής, για τη μελέτη των γονιδίων πραγματοποιήθηκε τόσο ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός της έκφρασης των γονιδίων όσο και ποσοτικός προσδιορισμός με την τεχνική της PCR πραγματικού χρόνου. Έτσι, έγινε ταυτόχρονα με την ανίχνευση έκφρασης ή όχι και συσχετισμός των αποτελεσμάτων ανάμεσα σε Oct-4 και Dazl, αλλά και ανάμεσα στις δυο τεχνικές με τις οποίες εξετάστηκαν τα δείγματα από τους ίδιους ασθενείς.

Μετά την παρέλευση πέντε ετών πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση της νόσου των γυναικών με στόχο τη μελέτη της 5ετης επιβίωσης χωρίς υποτροπές και μεταστάσεις μετά τη χειρουργική αφαίρεση.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε μέτρηση των επιπέδων της Αντιμυλλερίου ορμόνης, AMH με τη μέθοδο της ανοσοενζυμικής δοκιμασίας ELISA το 2019. Στόχος της ορμονολογικής αυτής μέτρησης ήταν η εύρεση επίδρασης ιστορικού παθήσεων του μαστού και η κλινική συσχέτιση των τιμών της με την πορεία της νόσου, καθώς έρευνες αναφέρουν πως τα υψηλότερα επίπεδα της AMH είναι δυνατόν να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του μαστού.

Συνεπώς, η εργασία αυτή εντάσσεται τόσο στα πλαίσια της ευρύτερης αναζήτησης και κλινικής αξιολόγησης μεθόδων για την ανίχνευση δεικτών σε καρκινικά κύτταρα όσο και στα πλαίσια της μακροπρόθεσμης αναζήτησης και διαγνωστικής αξιολόγησης νέων δεικτών για την ανίχνευση βλαστικών κυττάρων σε καρκινικούς όγκους. Επίσης, συμβάλλει στην έρευνα συσχέτισης ορμονικών δεικτών με την επιβίωση και καλύτερη ποιότητα ζωής των ασθενών.

2.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Στα πλαίσια της μελέτης μας, χρησιμοποιήσαμε ως βιολογικό υλικό τομές καλοθών παθήσεων και καρκινικών κυττάρων μαστού από βιοψίες. Οι βιοψίες είχαν προέλθει από γυναίκες ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση ριζικής τροποποιημένης ή απλής μαστεκτομής στο Μητροπολίτικο Θεραπευτήριο ΠΕΡΣΕΥΣ, Metropolitan Hospital στην Αθήνα και στάλθηκαν στο παθολογοανατομικό εργαστήριο για διάγνωση μεταξύ του 2007 με 2013. Τα χειρουργικά παρασκευάσματα αρχικά είχαν μονιμοποιηθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα 10% ουδέτερης φορμαλδεΐδης, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την αποστείρωση και προσωρινή συντήρηση ανθρώπινων ιστών. Στη συνέχεια, οι καρκινικοί όγκοι μαστού είχαν εγκλεισθεί σε κύβους παραφίνης και είχε πραγματοποιηθεί χρώση των τομών παραφίνης με αιματοξυλίνη-ηωσίνη και παρατήρηση σε μικροσκόπιο. Έτσι, μπορέσαμε να έχουμε τώρα στη διάθεση μας δείγματα των όγκων και των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών τους σε κύβους παραφίνης και αναζητώντας το ιατρικό ιστορικό και διαβάζοντας τις υπάρχουσες ιστολογικές εκθέσεις (μέγεθος του όγκου, βαθμός κακοήθειας, κατάσταση χειρουργικών ορίων) καταφέραμε να επανεξετάσουμε τις αντιπροσωπευτικές ιστολογικές τομές και επιλέξαμε τις κατάλληλες για τη διεξαγωγή πειραμάτων προσδιορισμού έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων.

Μετά την παρέλευση μιας πενταετίας, ήρθαμε σε επικοινωνία με τις γυναίκες για να συλλέξουμε πληροφορίες σχετικά με την πορεία της νόσου. Επίσης, ζητήθηκε από τις γυναίκες να παρερευθούν σε μικροβιολογικό εργαστήριο για δειγματοληψία αίματος. Χρησιμοποιήσαμε ως βιολογικό υλικό ορό του αίματος ο οποίος συλλέχτηκε σε ειδικά φιαλίδια αιμοληψίας χωρίς αντιπηκτικό για τον προσδιορισμό ορμονικού δείκτη με τη μέθοδο της ανοσοενζυμικής ανοσοδοκιμασίας ELISA.

Η τεχνική της ανοσοϊστοχημείας πραγματοποιήθηκε στο Παθολογοανατομικό εργαστήριο του Μητροπολίτικου Θεραπευτηρίου ΠΕΡΣΕΥΣ, Metropolitan Hospital ενώ η τεχνική της Real-time qPCR στο εργαστήριο Αναπαραγωγικής Βιολογίας και Αναγεννητικής Ιατρικής του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΣ». Τέλος, η τεχνική της ELISA πραγματοποιήθηκε στο μικροβιολογικό διαγνωστικό εργαστήριο «Iatrorama», Κολωνός Αθήνα.

2.3 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

2.3.1 Αρχή μεθόδου

Η μελέτη της έκφρασης πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τα αντίστοιχα γονίδια τους μπορεί να γίνει με διάφορες βιοχημικές, ανοσολογικές, ερευνητικές ή μορφολογικές μεθόδους. Από αυτές η πιο σημαντική στη διαγνωστική Παθολογική Ανατομική και Ερευνητική Ογκολογία είναι η μέθοδος της ανοσοϊστοχημείας.

Η Ανοσοϊστοχημεία (Immunohistochemistry, IHC) συνδυάζει την ιστοπαθολογία με τη χημεία και την ανοσολογία και ασχολείται με την αναγνώριση φυσιολογικών ή παθολογικών συστατικών των κυττάρων ή ιστών. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων τα οποία υβριδοποιούνται με το αντιγόνο-στόχο και φέρουν ειδικές χρωστικές που καθιστούν ορατό το σύμπλεγμα που δημιουργείται.

Πρώτος τη δεκαετία του '60, ο Coons με τους συνεργάτες του εφάρμοσε την ιδέα σήμανσης αντισωμάτων με φθορίζουσα χρωστική, την ισοθειοκυανική φλουροσκεΐνη, με στόχο τον εντοπισμό αντιγόνου σε ιστό πειραματόζωου. Έτσι, αναπτύχθηκε ο ανοσοφθορισμός που αποτέλεσε για αρκετά χρόνια τη μόνη μέθοδο αναγνώρισης ειδικών αντιγόνων. Ωστόσο, εμφάνιζε αρκετά μειονεκτήματα τα οποία επιλύθηκαν με τη χρήση ειδικών ενζύμων ή ενζυμικών συστημάτων τα οποία εφαρμόζονται στους ιστούς μετά τη σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος, χρωματίζοντας έντονα τις θέσεις εντοπισμού τους ώστε να γίνονται ορατές με απλό μικροσκόπιο. Με αυτό τον τρόπο αναπτύχθηκαν οι ανοσοενζυμικές μέθοδοι της ανοσοϊστοχημείας με υψηλότερη ευαισθησία και απλότητα στους χειρισμούς (Sternberg and Joseph, 1979 & Hsu et al, 1981).

Η επόμενη ανακάλυψη στον τομέα των ανοσοενζυμικών μεθόδων έδωσε και την τελική αποτελεσματική μορφή της ανοσοϊστοχημείας. Τα μονοκλωνικά αντισώματα αποτέλεσαν μια νέα πηγή ειδικών αντιδραστηρίων μεγάλης εξειδίκευσης για την ανίχνευση διάφορων αντιγόνων σε κύτταρα και ιστούς. Με τη χρήση τους προωθήθηκε ραγδαία ο τομέας της διαγνωστικής ογκολογίας και εξηγήθηκαν ανοσοπαθογενετικοί μηχανισμοί πολλών ασθενειών. Τα μονοκλωνικά αντισώματα παράγονται καθαρά με τη χρήση πειραματόζωου και σε μεγάλες ποσότητες, εφαρμόζονται εύκολα με τις ανοσοενζυμικές μεθόδους και έχουν υψηλή ευαισθησία.

Πλέον η ανοσοϊστοχημεία με τα μονοκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιείται ευρέως για την εντόπιση ενζύμων, πρωτεϊνών γονιδίων, προϊόντων έκκρισης κυττάρων ή πρωτεϊνών, κυτταρικών υποδοχέων, αντιγόνων μικροβίων και ιών καθώς και διαφόρων κυτταροπλασματικών και επιφανειακών ομάδων με ιστική ειδικότητα. Επίσης, οι καρκινικοί

όγκοι μπορεί να εκκρίνουν βιολογικά προϊόντα τα οποία ονομάζονται βιολογικοί, βιοχημικοί ή καρκινικοί δείκτες και μπορεί να είναι ορμόνες, εμβρυϊκές ή πλακουντιακές ουσίες, και άλλα. Η ανοσοϊστοχημεία μας παρέχει τη δυνατότητα με ειδικές τεχνικές να εντοπίζουμε τους δείκτες αυτούς και με αυτό τον τρόπο συμβάλλει στη διαφοροδιάγνωση, διερεύνηση, πρόγνωση και παρακολούθηση των διαφόρων κακοηθών νεοπλασμάτων.

Η ανοσοϊστοχημεία εμφανίζει δυο μεγάλες κατηγορίες μεθόδων για την εντόπιση αντιγόνου. Η μια κατηγορία χρησιμοποιεί σημασμένες μεθόδους που περιλαμβάνουν φθορίζουσες χρωστικές, το σύστημα αβιδίνης-βιοτίνης ή κολλοειδή χρυσό και η άλλη κατηγορία περιλαμβάνει τις μη σημασμένες μεθόδους που χρησιμοποιούν ένα σύμπλεγμα ενζύμου-αντισώματος έναντι του αντιγόνου. Οι σημασμένες μέθοδοι είναι πάντα έμμεσες, ενώ οι μη σημασμένες μπορεί να είναι έμμεσες ή άμεσες.

Οι μη σημασμένες μέθοδοι βασίζονται στην ειδική δέσμευση των ενζύμων, τα οποία φέρουν χρωμογόνες ενώσεις, στα μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία έχουν δεσμευθεί στα αντιγόνα. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται κυρίως είναι η υπεροξειδάση του υδρογόνου, η αλκαλική φωσφατάση και λιγότερο η οξειδάση της γλυκόζης. Τα δυο τελευταία χρησιμοποιούνται μόνο σε ειδικές περιπτώσεις ιστών ή σε ταυτόχρονη ανίχνευση δυο διαφορετικών αντιγόνων. Η υπεροξειδάση αντιθέτως χρησιμοποιείται ευρέως και καταλύει παρουσία ενός δότη ηλεκτρονίων τη διάσπαση του υπεροξειδίου σε νερό και οξυγόνο. Ως δότες ηλεκτρονίων χρησιμοποιούνται οι χρωμογόνες ουσίες με πιο διαδεδομένη την 3,3 τετραυδροχλωρική διάμινο-βενζιδίνη (DAB), η οποία παράγει σκούρο καφέ χρώμα το οποίο εντοπίζεται στο κοινό μικροσκόπιο. Οι τεχνικές της ανοσοϋπεροξειδάσης διακρίνονται σε άμεσες και έμμεσες. Η άμεση μέθοδος είναι απλή, γρήγορη και χρησιμοποιεί ένα αντίσωμα που είναι άμεσα συνδεδεμένο με την υπεροξειδάση προερχόμενο από κουνέλια όσον αφορά τα πολυκλωνικά. Η έμμεση μέθοδος ή αλλιώς τεχνική Sandwich είναι πιο ευαίσθητη και χρησιμοποιεί δυο αντισώματα, όπου το πρώτο δεν είναι συνδεδεμένο με χρωμογόνα ουσία και το δεύτερο φέρει την υπεροξειδάση. Τα δυο αντισώματα προέρχονται από διαφορετικά πειραματόζωα και υπάρχουν πάντα άφθονα στο εμπόριο καθιστώντας πιο εύκολη και άμεση τη χρήση τους στην ανοσοϊστοχημεία. Υπάρχουν διάφορες έμμεσοι μέθοδοι όπως είναι η μέθοδος υπεροξειδάσης-αντιυπεροξειδάσης (PAP), η μέθοδος αβιδίνης-βιοτίνης (ABC) και η μέθοδος βιοτίνης-στρεπταβιδίνης (BSA). Σε όλες τις μεθόδους έχουμε τρία βήματα με τα εξής αντιδραστήρια:

- Το πρώτο αντίσωμα (primary antibody) που είναι ειδικό για το υπό ανίχνευση αντιγόνο
- Το δεύτερο βιοτινυλιωμένο αντίσωμα (link), το οποίο συνδέεται στο πρώτο, και
- Το σύμπλοκο στρεπταβιδίνης-υπεροξειδάσης (label), το οποίο συνδέεται με το δεύτερο και γίνεται ορατό το σύμπλεγμα με την προσθήκη του χρωμογόνου DAB.

Η μέθοδος υπεροξειδάσης-αντιυπεροξειδάσης (PAP μέθοδος) περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Sternberger και τους συνεργάτες του και χρησιμοποιεί ένα δεύτερο αντίσωμα-γέφυρα για την ένωση του πρωτοταγούς αντισώματος με το αντιδραστήριο PAP. Τρία μόρια υπεροξειδάσης συνδέονται με δυο μόρια αντιυπεροξειδάσης και δημιουργούν ένα κυκλικό ανοσοσύμπλεγμα. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι το γεγονός ότι το πρωτοταγές αντίσωμα και το αντίσωμα της υπεροξειδάσης πρέπει να προέρχονται από το ίδιο ζωικό είδος, ωστόσο εμφανίζει υψηλή ειδικότητα, ευαισθησία και σταθερότητα των αντιδραστηρίων. Επίσης, βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυνατότητα χρήσης του πρωτογενούς αντισώματος σε μεγάλη αραιώση, ελαττώνοντας έτσι το βαθμό σύνδεσης του με ανεπιθύμητα αντιγόνα των ιστών.

Η μέθοδος αβιδίνης-βιοτίνης (ABC μέθοδος) είναι πιο ευαίσθητη μέθοδος καθώς εκμεταλλεύεται την υψηλή δεσμευτική δυνατότητα της αβιδίνης με τη βιοτίνη. Η αβιδίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που σημαίνεται με την υπεροξειδάση και ενώνεται σταθερά με τη βιοτίνη. Η βιοτίνη είναι μια βιταμίνη και συνδέεται με το πρωτοταγές αντίσωμα. Η βιοτίνη σε πολλούς ιστούς υπάρχει ενδογενώς με συνέπεια να συνδέεται άμεσα με το σύμπλοκο αβιδίνης-υπεροξειδάσης και να οδηγεί σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

Το προαναφερόμενο μειονέκτημα καθώς και άλλα λύνονται με τη χρήση της μεθόδου βιοτίνης-στρεπταβιδίνης (BSA μέθοδος). Η στρεπταβιδίνη είναι ένα τετραμερές ανάλογο της αβιδίνης και έχει τέσσερις θέσεις δέσμευσης με τη βιοτίνη. Προτιμάται έναντι της αβιδίνης για δυο κυρίως λόγους, πρώτον δεν έχει υδατάνθρακες, οι οποίοι συνδέονται μη ειδικά με τις λεκτίνες των ιστών, και δεύτερον το ισοηλεκτρικό της σημείο είναι ουδέτερο. Η μέθοδος βιοτίνης-στρεπταβιδίνης αποτελεί σήμερα την ανοσοϊστοχημική τεχνική με την ευρύτερη εφαρμογή καθώς σε σύγκριση με τις άμεσες ή τις έμμεσες δύο βημάτων, επιφέρει μεγαλύτερη ενίσχυση της έντασης του σήματος, ενώ σε σχέση με τις υπόλοιπες έμμεσες τεχνικές τριών βημάτων εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία και μικρότερου βαθμού μη ειδική χρώση.

Ανεξάρτητα από ποια μέθοδο θα χρησιμοποιηθεί, υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα της τεχνικής. Από τα πρώτα στάδια μονιμοποίησης του βιολογικού υλικού μέχρι και η χρήση του φούρνου μικροκυμάτων μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά ή αρνητικά αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, κατά τη μονιμοποίηση πρέπει να γίνει η επιλογή του καταλληλότερου μονιμοποιητικού υλικού ώστε να συντηρηθεί ο ιστός αλλά και να διατηρηθεί η αντιγονικότητα του. Συνήθως, χρησιμοποιείται φορμαλδεΐδη η οποία όμως μπορεί να οδηγήσει σε διασταυρούμενες αντιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών των ιστών οδηγώντας σε ένα δεύτερο πρόβλημα, αυτό της αποκάλυψης των αντιγονικών επιτόπων (Fraenkel Conrat and Olcott, 1948). Η λύση στο πρόβλημα αυτό δίνεται με ενζυμική πέψη των ιστών σε υψηλή θερμοκρασία (φούρνος μικροκυμάτων) ή με τη χρήση αλκαλικού διαλύματος. Επίσης, βασικός παράγοντας που επηρεάζει το τελικό αποτέλεσμα είναι η ευαισθησία και η ειδικότητα των αντισωμάτων οι οποίες διαφέρουν μεταξύ των εμπορικών εταιρειών αλλά και μεταξύ των αντιορών της ίδιας παρτίδας. Απαιτείται υψηλή αραίωση αντιορών με υψηλό τίτλο αντισωμάτων και η χρήση πάντα αρνητικών και θετικών μαρτύρων.

Συνοψίζοντας, η ανοσοϊστοχημεία αποτελεί μια ευρέως γνωστή εργαστηριακή τεχνική που εμφανίζει τα εξής πλεονεκτήματα:

1. Πολύ ικανοποιητική ευαισθησία και ειδικότητα που βασίζεται στην ειδική δέσμευση αντιγόνου-αντισώματος.
2. Υψηλή επαναληψιμότητα.
3. Σχετικά γρήγορη, απλή και οικονομική.
4. Δίνει μόνιμα αποτελέσματα επιτρέποντας έτσι την μετέπειτα επανεκτίμηση τους.
5. Δυνατότητα εφαρμογής σε αρχειακό υλικό ρουτίνας ακόμη και μετά την παρέλευση μεγάλου χρονικού διαστήματος.
6. Η εφαρμογή της σε μονιμοποιημένους ιστούς δίνει τη δυνατότητα αξιοποίησης μεγάλου αριθμού περιστατικών σε σύντομο χρόνο καθώς και τη διεξαγωγή αναδρομικών μελετών.
7. Συμβατή με όλα σχεδόν τα μονιμοποιητικά υλικά που χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα.
8. Εφαρμογή ακόμα και μετά από αφαλάτωση του υλικού, σε υλικά που έχουν υποστεί αυτόλυση ή ακόμα και νέκρωση.

2.3.2 Οργανολογία

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για όλες τις μετρήσεις με ανοσοϊστοχημεία ήταν το μηχάνημα Benchmark ULTRA VENTANA, της εταιρείας ROCHE. Στο μηχάνημα Benchmark ULTRA VENTANA η ανοσοϊστοχημεία πραγματοποιείται με τη χρήση της αυτόματης τεχνικής χρώσεων. Για την προετοιμασία των πρωτοκόλλων και των τομών και την παρακολούθηση της εξέλιξης των πειραμάτων το μηχάνημα συνδέεται κατάλληλα με έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή και ένα ειδικό μηχάνημα εκτύπωσης. Ο χρήστης εισάγει τα δεδομένα μέσω πληκτρολογίου (είδος δείγματος, ονόματα, υπό μελέτη γονίδιο, κωδικός πρωτοκόλλου κτλ) στο κατάλληλο λογισμικό πρόγραμμα ώστε να εκτυπωθούν οι αντίστοιχες αυτοκόλλητες ετικέτες για κάθε δείγμα, τις οποίες αναγνωρίζει αυτόματα το μηχάνημα Benchmark ULTRA VENTANA. Επίσης, εισάγει στο αναλυτικό λογισμικό πρόγραμμα τα απαραίτητα στάδια με τις κατάλληλες συνθήκες για κάθε αντίδραση διαμορφώνοντας το πρωτόκολλο για κάθε υπό μελέτη γονίδιο και στη συνέχεια ο υπολογιστής μεταφέρει τις πληροφορίες στο μηχάνημα. Με αυτόν τον τρόπο, διαβάζοντας την ετικέτα με τον κωδικό πρωτοκόλλου σε κάθε δείγμα, το μηχάνημα αντλεί από τον υπολογιστή τις πληροφορίες του αντίστοιχου πρωτοκόλλου και αυτόματα ακολουθεί τη σωστή σειρά χρώσεων και τιτλοποίησης.

Η αυτοματοποιημένη τεχνική χρώσεων που χρησιμοποιήσαμε διαλέγεται συχνά τα τελευταία χρόνια στην διαφοροδιάνωση, πρόγνωση και μελέτη γονιδίων-δεικτών στην Παθολογική Ανατομική και Ερευνητική Ογκολογία. Αποτελεί μια νέα και υψηλής τεχνολογίας μεθοδολογία με ταχεία αποτελέσματα καθώς επιτρέπει τη χρήση κάθε θέσης δείγματος του μηχανήματος οποιαδήποτε χρονική στιγμή ανεξάρτητα από το εάν σε άλλες θέσεις υπάρχει πείραμα σε εξέλιξη και επιπρόσθετα επιτρέπει πολυπαραγοντικά τεστ εφόσον διπλές και τριπλές χρώσεις για την εξέταση δείγματος ενός ατόμου μπορούν να πραγματοποιηθούν σε διαφορετικές αντικειμενοφόρους πλάκες ταυτόχρονα σε διαφορετικές θέσεις στο μηχάνημα.



Εικόνα 32. Το μηχάνημα Benchmark ULTRA VENTANA της εταιρείας ROCHE.

2.3.3 Πειραματική πορεία

Όπως προαναφέρθηκε, το βιολογικό μας υλικό αφορούσε στην πλειοψηφία δείγματα καρκινικών όγκων και των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών τους σε κύβους παραφίνης που συλλέχθηκαν από το αρχείο παλαιότερων περιστατικών του Νοσοκομείου. Τα δείγματα αυτά καρκινικών όγκων είχαν υποστεί τη λεγόμενη διαδικασία προετοιμασίας ιστών προτού χρησιμοποιηθούν για την τεχνική της ανοσοϊστοχημείας.

Συγκεκριμένα, τα δείγματα των ογκολογικών ιστών παραλήφθηκαν σε διάλυμα φορμόλης 10% και εισάχθηκαν στην ιστοκινέτα. Ένα μηχάνημα που στόχο έχει τη μονιμοποίηση του ιστού για τη διατήρηση της μορφολογικής και χημικής του σύνθεσης. Επίσης, πραγματοποιείται παράλληλα αφυδάτωση και διαύγαση του ιστού ώστε να αφαιρεθεί το νερό και το λίπος του ιστού. Ακολουθεί η διαδικασία της σκλήρωσης, όπου ο ιστός εγκλείεται σε κύβο παραφίνης με τη βοήθεια ειδικής θερμαινόμενης πλάκας καθώς η παραφίνη σε υψηλές θερμοκρασίες υγροποιείται. Η μεταφορά έπειτα σε παγωμένη πλάκα αποσκοπεί στη στερεοποίηση της παραφίνης, η οποία έχει πλέον εισχωρήσει σε όλα τα μεσοκυττάρια διαστήματα αλλά και στα κύτταρα, μετατρέποντας τον ογκολογικό ιστό σκληρό και δύσκαμπτο. Τέλος, έχουμε τη διαδικασία του τριμμαρίσματος, όπου σε κάθε κύβο παραφίνης που εγκλείει ένα δείγμα κόβονται τομές πάχους 10μm, ώστε να καθαριστεί η επιφάνεια του κύβου και να εμφανιστεί ο ιστός.

Εφόσον όλα τα δείγματα καρκινικών όγκων ήταν πλέον τριμμαρισμένα σε κύβους παραφίνης, ήταν εφικτό με την μικροτόμο να κοπούν λεπτές τομές των 3 μm και να μεταφερθούν σε θετικά φορτισμένες αντικειμενοφόρους πλάκες. Αυτές τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο με θερμοκρασία 60°C για μια ώρα με στόχο την αποπαραφίνωση. Πλέον, κολλημένοι στην αντικειμενοφόρο πλάκα και απαλλαγμένοι από παραφίνη οι ιστοί ήταν έτοιμοι για να τοποθετηθούν στο μηχάνημα Benchmark ULTRA VENTANA της εταιρείας ROCHE με τελικό στόχο την αυτόματη χρώση με τα υπό μελέτη αντισώματα. Να αναφέρουμε ότι της τοποθέτησης προηγήθηκε η εκτύπωση των ειδικών αυτοκόλλητων με τον κωδικό πρωτοκόλλου και τα απαραίτητα στοιχεία.

Στην παρούσα εργασία για όλα τα πειράματα μας χρησιμοποιήσαμε το ειδικό Ultra View DAB kit της εταιρείας ROCHE που ακολουθεί την έμμεση μέθοδο ελεύθερη βιοτίνης. Επίσης, έγινε χρήση των αντισωμάτων anti-Oct3/4 και anti-DAZL της εταιρείας SIGMA, τα οποία ήταν απαραίτητο να αραιωθούν 1:100 και 1:200 αντίστοιχα, με το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα Antibody diluent της VENTANA Medical systems, ειδικό για την αραιώση αντισωμάτων κουνελιών για τη χρήση τους σε ανοσοϊστοχημικές χρώσεις, πριν τη χρήση τους.

Εν συντομία, το πρωτόκολλο που ακολουθήσαμε και για τα δυο αντισώματα περιλάμβανε τα εξής βήματα:

- Αποπαραφίνωση (deparaffinization), σε μέτρια θερμοκρασία 72 °C.
- Διαμόρφωση περιβάλλοντος κατάλληλου για τα κύτταρα (Cell Conditioning), 64 λεπτά υπό την επίδραση του διαλύματος ULTRA CC1, το οποίο είναι ένα προαραιωμένο διάλυμα προεπεξεργασίας του ιστού και έχει κύριο στόχο την αποκάλυψη των αντιγονικών επιτόπων.
- Τιτλοποίηση (titration), προσθήκη του αντισώματος (100 μl) κατάλληλα αραιωμένο. Επώαση για 32 λεπτά.
- Επίχρωση (counterstain), με αιματοξυλίνη για 8 λεπτά, ώστε να βαφτούν οι πυρήνες των κυττάρων.
- Αντιχρώση (post counterstain), με bluing reagent για 4 λεπτά, το οποίο αποτελεί ένα υδατικό διάλυμα του ρυθμιστικού ανθρακικού λιθίου που αποσκοπεί στη μπλε χρώση των σημείων που βάφτηκαν με αιματοξυλίνη στις αντικειμενοφόρους πλάκες.

Αφού ολοκληρώθηκε η αυτόματη χρώση, οι αντικειμενοφόροι πλάκες πλύθηκαν με άφθονο νερό και σαπούνι και έπειτα μεταφέρθηκαν στο ειδικό μηχάνημα χρώσης της MEDITE. Εκεί πραγματοποιήθηκε μια διαδικασία αφυδάτωσης του ιστού με βαθμιαία στάδια αιθυλικής αλκοόλης, διαδικασία ανιούσας. Τέλος, οι αντικειμενοφόροι πλάκες καλύφθηκαν με ειδικές καλυπτρίδες ώστε να είναι εφικτή η παρατήρηση τους σε μικροσκόπιο.

2.4. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΕΙΔΙΚΩΝ ΣΤΗΛΩΝ

2.4.1 Αρχή μεθόδου

Η απομόνωση ολικού RNA από ένα ανθρώπινο ιστό μπορεί να γίνει με διάφορες τεχνικές από τις οποίες οι πιο γνωστές είναι η μέθοδος της φικόλης, η χρήση του αντιδραστηρίου Trizol και η χρήση ειδικών στηλών. Στην περίπτωση μας, διαλέξαμε τη μέθοδο απομόνωσης με τη χρήση ειδικών στηλών, καθώς η μέθοδος της φικόλης χρησιμοποιείται κυρίως σε δείγματα περιφερειακού αίματος και η χρήση του αντιδραστηρίου Trizol είναι επίπονη.

Αποτελεί μια απλή και ταχύτατη μέθοδο απομόνωσης που δίνει προϊόν υψηλής καθαρότητας. Συγκεκριμένα, η χρήση ειδικών μικροστηλών RNeasy (MinElute spin columns, QIAGEN) μας δίνει τη δυνατότητα να συνδυάσουμε την ικανότητα της εκλεκτικής προσρόφησης από μια μεμβράνη διοξειδίου του πυριτίου με την ταχύτητα της μικροφυγοκέντρωσης. Ένα ειδικό σύστημα ρυθμιστικού διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης αλάτων επιτρέπει τη σύνδεση έως και 100μg RNA μήκους μεγαλύτερου από 200 βάσεων πάνω στη στήλη. Τα βιολογικά δείγματα υπόκειται αρχικά σε λύση και ομογενοποίηση παρουσία ενός ισχυρού αποδιατακτικού ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει ισοθειακυανική γουανιδίνη, η οποία απενεργοποιεί τις RNases, ώστε να εξασφαλιστεί η απομόνωση άθικτου RNA. Επίσης, προστίθεται αιθανόλη για να δημιουργηθούν βέλτιστες συνθήκες πρόσδεσης και το δείγμα μεταφέρεται στη μικροστήλη Rneasy. Έτσι, συγκρατείται στη μεμβράνη το ολικό RNA και οι υπόλοιπες ουσίες απομακρύνονται με διαδοχικές εκπλύσεις. Τέλος, RNA υψηλής ποιότητας εκλύεται από τη στήλη με την προσθήκη κατάλληλου όγκου ύδατος.

2.4.2 Αντιδραστήρια – Διαλύματα - Αναλώσιμα

- Διάλυμα λύσης PKD
- Ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων με γουανιδίνη RBC
- Διάλυμα Proteinase K
- Διάλυμα αιθανόλης (97%v/v)
- Διάλυμα ξυλόλης
- Διάλυμα έκπλυσης RPE
- Νερό ελεύθερο από RNάσες (RNase free water)
- Μικροστήλες RNeasy MinElute
- Σωληνάρια συλλογής 1,5 ml (Eppendorfs)
- Σωληνάρια έκλυσης 1,5ml

2.4.3 Πειραματική πορεία

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος απομόνωσης ολικού RNA με τη χρήση του RNeasy FFPE kit (Qiagen) για τα δείγματα που είχαμε από το Metropolitan Hospital σε κύβους παραφίνης.

Αρχικά, η βιοψία όγκου που έχει εγκλεισθεί σε κύβο παραφίνης πρέπει να «αποπαραφινωθεί» ακολουθώντας τη μέθοδο της ξυλόλης. Κόβουμε τεμάχια όγκου των 5μm από κάθε κύβο παραφίνης και τα μεταφέρουμε σε σωληνάκι errendorf όπου έχουμε προσθέσει 1ml ξυλόλη και φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα (14.000 rpm), ώστε να διαλυθεί η παραφίνη. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο υγρό και προσθέτουμε 1ml καθαρής αιθανόλης, η οποία κατά τη φυγοκέντρωση πάλι για 2 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα θα εξάγει τα υπολείμματα της ξυλόλης από το δείγμα. Απορρίπτουμε όσο περισσότερο από το υπερκείμενο υγρό μπορούμε και μεταφέρουμε το σωληνάκι στο υδατόλουτρο στους 55°C με στόχο να εξατμιστεί όλη η αιθανόλη. Με αυτή τη διαδικασία, πετυχαίνουμε την αποπαραφίνωση του καρκινικού ιστού και μπορούμε να ξεκινήσουμε τη διαδικασία απομόνωσης ολικού RNA.

Προσθέτουμε στο δείγμα 150μl PKD και 10 μl Proteinase K και πιπετάρουμε καλά. Επιάζουμε για 10-15 λεπτά στο υδατόλουτρο στους 55 °C και 15 λεπτά στους 80 °C. Σε αυτή τη θερμοκρασία και με τη βοήθεια του διαλύματος λύσης PKD λύεται ο ιστός και αποτρέπονται οι τροποποιήσεις των νουκλεϊκών οξέων από τη υπάρχουσα φορμαλδεΐδη. Στη συνέχεια μεταφέρουμε την υγρή φάση σε νέο σωληνάριο και φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 13.500 rpm. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο υγρό σε σωληνάριο έκλυσης και προσθέτουμε 320μl από το RBC αποδιατακτικό διάλυμα που περιέχει το διάλυμα αλάτων και γουανιδίνης και 720μl καθαρής αιθανόλης, για τη δημιουργία βέλτιστων συνθηκών πρόσδεσης. Πιπετάρουμε καλά και μεταφέρουμε 700μl στη μικροστήλη RNeasy. Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό στις 10.000 rpm. Ακολουθούν δυο διαδοχικές πλύσεις με 500μl RPE, φυγοκεντρώνοντας στις 10.000 rpm για 1 και 2 λεπτά αντίστοιχα και μια φυγοκέντρωση σε μέγιστη ταχύτητα για 5 λεπτά. Έτσι, απομακρύνονται στη βάση της στήλης οι ανεπιθύμητες ουσίες και κρατιέται στη μεμβράνη της το ολικό RNA. Τέλος, μεταφέρουμε τη στήλη σε νέο σωληνάριο και προσθέτουμε 14μl RNase free water, το οποίο κατά τη φυγοκέντρωση των 2 λεπτών στη μέγιστη ταχύτητα θα επιτυγχάνει την έκλυση του ολικού, άθικτου RNA από τη μεμβράνη της στήλης. Απομακρύνουμε τη στήλη και φυλάττουμε το υποκείμενο του σωληναρίου στους -80 °C.

2.5. ΣΥΝΘΕΣΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA

2.5.1 Αρχή μεθόδου

Το RNA είναι μονόκλωνο μόριο και αδυνατεί να πολλαπλασιαστεί με οποιαδήποτε μέθοδο. Για το λόγο αυτό, είναι αναγκαίο να μετατραπεί στο συμπληρωματικό του δίκλωνο μόριο DNA. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από ένα ειδικό ένζυμο, την αντίστροφη μεταγραφάση η οποία είναι ικής προέλευσης και μπορεί να συνθέσει DNA με εκμαγείο RNA. Έως σήμερα, έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές και διάφορες μεταγραφάσες, οι κυριότερες των οποίων είναι εκείνες που προέρχονται από τους ιούς *Moloney Murine Leukemia Virus* (MMLV) και *Avian Myeloblastosis Virus* (AMV).

2.5.2 Αντιδραστήρια – Διαλύματα - Αναλώσιμα

- Διάλυμα εκκινητών Random hexamers (50ng/μl)
- Διάλυμα δεσοξυριβονουκλεοτιδίων 10 Mm dNTP mix
- Ρυθμιστικό διάλυμα 10xRTbuffer
- Διάλυμα 25 mM MgCl₂
- Διάλυμα 0,1 M DTT
- Διάλυμα αναστολέα RNaseOUT (40 U/μl)
- Διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης SuperScript II RT
- Διάλυμα RNase H
- Σωληνάρια συλλογής 1 ml (eppendorfs)

2.5.3 Πειραματική πορεία

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA) για τη σύνθεση του πρώτου συμπληρωματικού DNA από το ολικό RNA κάθε δείγματος. Η αντίδραση καταλύεται από την αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript II, ένα ένζυμο που μειώνει τη δράση των RNase H, που αποδιατάσσουν το RNA κατά τη διάρκεια σχηματισμού του πρώτου κλώνου DNA. Επιπλέον, το ένζυμο αυτό είναι ανθεκτικό σε υψηλές θερμοκρασίες και δεν επηρεάζεται από την ύπαρξη ριβοσωμικού και μεταφορικού RNA. Έτσι επιτυγχάνεται γρηγορότερη και μέγιστη απόδοση στη σύνθεση cDNA από ολικό RNA.

Αρχικά προετοιμάζουμε σε ένα σωληνάριο, απαλλαγμένο από DNάσες, το πρώτο μίγμα αντίδρασης που περιλαμβάνει τους εκκινητές Random hexamers και το διάλυμα των δεσοξυριβονουκλεοτιδίων για τη σύνθεση της νουκλεοτιδικής αλυσίδας του DNA. Οι Random hexamers είναι οι πιο μη ειδικοί εκκινητές που χρησιμοποιούνται όταν είναι δύσκολο το mRNA να αντιγραφεί ως σύνολο και για αυτό αντιγράφεται το ολικό RNA του πληθυσμού των κυττάρων στο δείγμα. Στο σωληνάριο προσθέτουμε 5μl Random hexamers και 1μl dNTPmix για κάθε δείγμα και 4μl RNA. Στη συνέχεια, επωάζουμε στους 65°C για 5 λεπτά στο θερμικό κυκλοποιητή με στόχο την αποδιάταξη του RNA και του εκκινητή. Αμέσως μετά μεταφέρουμε τα σωληνάρια στον πάγο για 1 λεπτό. Με τη διαδικασία αυτή, θέρμανσης και ψύξης, καταστρέφονται τυχόν συσσωματώματα ή δευτεροταγείς δομές που θα μπορούσαν να εμποδίσουν την έναρξη σύνθεσης του πρώτου cDNA. Σε ένα δεύτερο σωληνάριο προετοιμάζουμε το κύριο μίγμα της αντίδρασης, το οποίο περιλαμβάνει για κάθε δείγμα 2μl ρυθμιστικού διαλύματος RTxbuffer, 4μl MgCl₂, 2μl DTT, το οποίο εμποδίζει και σπάει τους δισουλφιδικούς δεσμούς και αναστέλλει τη δράση των RNασών, και 1μl RNaseOUT, που είναι ανασυνδυασμένος αναστολέας και ενισχύει τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης. Ο συνολικός όγκος των 9μl προστίθεται στον αρχικό όγκο μίγματος και προσθέτουμε 1μl SuperScript II. Επωάζουμε το δείγμα αρχικά στους 25 °C για 10 λεπτά, μετά στους 42 °C για 50 λεπτά και τέλος στους 70 °C για 15 λεπτά με τη βοήθεια του θερμικού κυκλοποιητή. Στους 70 °C αποδιατάσσονται τα υβρίδια RNA-DNA και απενεργοποιείται η αντίστροφη μεταγραφάση. Τέλος, προσθέτουμε 1μl RNase H και επωάζουμε στους 37 °C για 20 λεπτά. Με αυτό τον τρόπο καταστρέφονται όσα RNA υπάρχουν ακόμη. Φυλάττουμε τα δείγματα στους -20 °C.

2.6. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ
ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ
ΧΡΟΝΟ (Real-time PCR)

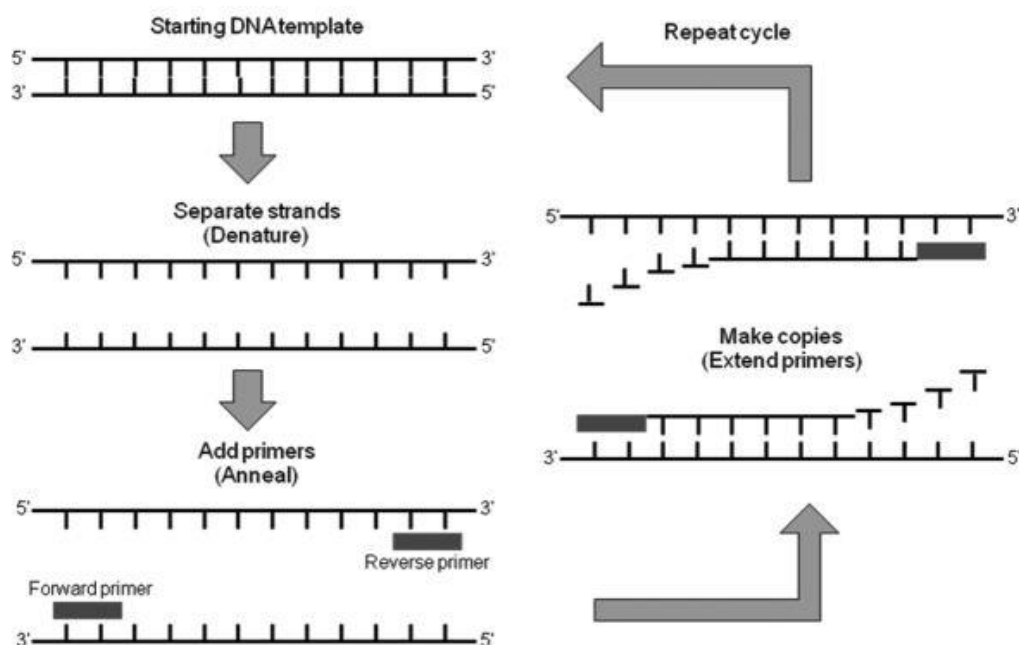
2.6.1 Ιστορική αναδρομή της Αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης PCR και αρχή μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) σχεδιάστηκε πρώτη φορά από τον Dr. Kary Mullis το 1983 στην Καλιφόρνια. Στόχο έχει την *in vitro* ενίσχυση μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA ώστε να παράγεται ένας μεγάλος αριθμός πιστών αντιγράφων της με σχετικά απλό τρόπο. Η πρώτη δημοσίευση για την PCR εμφανίστηκε το 1985 και από τότε ο αριθμός των δημοσιεύσεων αυξάνεται εκθετικά. Το 1989 το περιοδικό Science επέλεξε την PCR «σαν το μέγιστο επιστημονικό επίτευγμα» και την Taq πολυμεράση σαν «το μόριο της χρονιάς» και το 1993 ο Dr Kary Mullis τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ Χημείας.

Η αντίδραση PCR αποτελεί μια από τις σημαντικότερες μεθόδους που ανακαλύφθηκε στο τομέα της μοριακής διαγνωστικής και έφερε επανάσταση και σε άλλους τομείς της βιολογίας και ιατρικής. Η βασική αρχή της έχει προσαρμοσθεί για ένα μεγάλο εύρος διαφορετικών εφαρμογών, που αφορά τόσο το χαρακτηρισμό, την κλωνοποίηση και μελέτη γονιδίων όσο και την ανίχνευση και ταυτοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών και μεταλλάξεων. Αποτελεί λοιπόν βασικό και ουσιαστικό εργαλείο στα εργαστήρια Μοριακής διαγνωστικής, Κυτταρογενετικής αλλά και Τοξικολογίας, Εγκληματολογίας και Ιατροδικαστικής. (33,βιβλιογραφία)

Η αρχή της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης εκμεταλλεύεται ορισμένα χαρακτηριστικά του *in vivo* μηχανισμού αντιγραφής του DNA και συνοψίζεται στην *in vitro* ενζυμική ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA (100-600bp), με τη χρήση διαδοχικών μεταβολών θερμοκρασίας. Για να πραγματοποιηθεί αυτό χρειάζονται εκτός από το αρχικό δίκλωνο μόριο DNA ως εκμαγείο, η DNA πολυμεράση, ένα μίγμα δεσοξυριβονουκλεοτιδίων, ένα ρυθμιστικό διάλυμα με ιόντα μαγνησίου και ειδικοί εκκινητές με σύνθητες μήκος 17-30 βάσεων. Οι εκκινητές αυτοί είναι συμπληρωματικοί και προσδένονται σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία μιας εκ των δυο αλυσίδων του DNA, η οποία επιμηκύνεται μέσω της DNA πολυμεράσης, με σκοπό την παραγωγή πολλών αντιγράφων της επιθυμητής αλληλουχίας. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εκμαγεία και οι δυο κλώνοι του DNA εφόσον διαθέτουμε εκκινητή για κάθε ένα. Σε κάθε αντίδραση συντίθεται ένας νέος κλώνος DNA. Κάθε επανάληψη της αντίδρασης αποτελεί έναν κύκλο ενίσχυσης, ενώ κάθε νεοσυντιθέμενος κλώνος DNA αποτελεί ένα νέο εκμαγείο για τον επόμενο κύκλο. Το μίγμα της αντίδρασης

θερμαίνεται ξανά για να αποδιαταχθούν οι παλιοί και νέοι κλώνοι DNA (denaturation) και επαναλαμβάνεται ο κύκλος υβριδοποίησης των εκκινητών (primer annealing), σύνθεσης DNA (primer extension) και αποδιάταξης των κλώνων για 25-40 φορές.



Εικόνα 33. Αρχή λειτουργίας της PCR. Διακρίνονται τα στάδια της αντίδρασης: Αποδιάταξη των δυο κλώνων DNA, επαναδιάταξη – πρόσδεση των εκκινητών του DNA και σύνθεση της αλληλουχίας.

Με βάση την προαναφερομένη αρχή της μεθόδου έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης οι οποίες διακρίνονται σε εσωτερική, ασύμμετρη, διπλή, πολλαπλή, ποιοτικές και ποσοτικές. Από αυτές, η πιο ακριβής και ευαίσθητη τεχνική είναι αυτή της ποσοτικής PCR καθώς επιτρέπει πέρα από την ανίχνευση της αλληλουχίας-στόχο και την ποσοτική της μέτρηση κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σχετίζοντας την ποσότητα της με αυτήν του γενετικού υλικού στο αρχικό δείγμα. Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι ποσοτικής PCR από τις οποίες οι κυριότερες είναι η συναγωνιστική PCR, η PCR τελικού σημείου και η PCR σε πραγματικό χρόνο.

2.6.2 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-time qPCR), Αρχή της μεθόδου

Το 1989 πρώτοι ο Higuchi και οι συνεργάτες του κατασκεύασαν ένα σύστημα που ανιχνεύει τα προϊόντα της PCR καθώς αυτά συσσωρεύονται αναπτύσσοντας την ιδέα της PCR σε πραγματικό χρόνο. Το αρχικό αυτό σύστημα βασιζόταν στην παρεμβολή του βρωμιούχου αιθιδίου σε κάθε αντίδραση ενίσχυσης και συμπεριλάμβανε έναν θερμοκυκλοποιητή, μια πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας ώστε τα δείγματα να εκπέμπουν φθορισμό και μια κάμερα CCD συνδεδεμένη με ηλεκτρονικό υπολογιστή για την ανίχνευση του φθορισμού. Η PCR παρήγαγε μεγάλο αριθμό δίκλωνων DNA, στα οποία προσδενόταν το βρωμιούχο αιθίδιο, δίνοντας υψηλό φθορισμό. (36,βιβλιογραφία)

Η σύγχρονη τεχνική Real-time qPCR είναι μια μέθοδος με υψηλή ευαισθησία και επαναληψιμότητα, η οποία παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα αφού καταφέρνει να συνδυάσει την αντίδραση πολυμερισμού αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων με την ταυτόχρονη παρακολούθηση σε πραγματικό χρόνο. Επίσης, μας δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης των παραγόμενων προϊόντων και την ποσοτικοποίηση τους σε σχετικές και απόλυτες τιμές. Επιπρόσθετα ουσιαστικά πλεονεκτήματα αποτελούν η ταχύτητα των αποτελεσμάτων της, η μη χρήση ραδιενέργειας και η μείωση των επιμολύνσεων και των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. (Mackay,2004)

Κάθε αντίδραση της Real-time qPCR διακρίνεται σε τρεις φάσεις:

1. Η πρώιμη φάση υποβάθρου ή λανθάνουσα φάση (background phase)
2. Η εκθετική φάση ή λογαριθμική (exponential or log phase)
3. Η φάση κορεσμού (plateau)

Η πρώιμη φάση του υποβάθρου διαρκεί για μερικούς κύκλους αντίδρασης όπου το σήμα φθορισμού του υποβάθρου είναι μεγαλύτερο από αυτό του προϊόντος της PCR. Ο κύκλος αντίδρασης, όπου το φθορίζον σήμα του προϊόντος της PCR είναι δεκαπλάσιο της τυπικής απόκλισης του ανιχνεύσιμου σήματος ονομάζεται σημείο τομής (Crossing Point, Cp) και είναι σημαντικό για την ποσοτικοποίηση. Είναι αντιστρόφως ανάλογο της αρχικής ποσότητας του γενετικού υλικού, άρα όσο μικρότερη είναι η τιμή του Cp τόσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση του δείγματος. Από αυτόν τον κύκλο αντίδρασης ξεκινάει η εκθετική φάση και τελειώνει όταν η απόδοση της αντίδρασης μειωθεί. Στη λογαριθμική φάση υπάρχουν επαρκείς ποσότητες από όλα τα αναγκαία αντιδραστήρια και έτσι παρατηρείται ακριβής διπλασιασμός της επιθυμητής αλληλουχίας σε κάθε κύκλο αντίδρασης. Έτσι, έχουμε τη σχέση

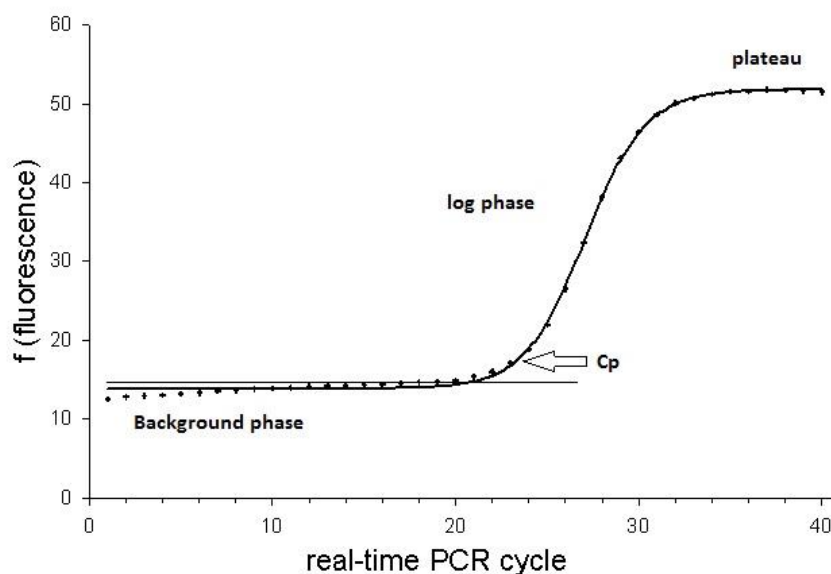
$$N_n = N_0(E)^n$$

N_n : η ποσότητα της επιθυμητής αλληλουχίας μετά από n κύκλους

N_0 : η αρχική ποσότητα της επιθυμητής αλληλουχίας

n : ο αριθμός των κύκλων αντίδρασης της PCR

E : η απόδοση της ενίσχυσης, η οποία υπολογίζεται με βάση την κλίση της ευθείας (slope) από τον τύπο $E = 10^{-1/\text{slope}}$



Εικόνα 34. Οι τρεις φάσεις κάθε κύκλου αντίδρασης της Real-time qPCR όπως απεικονίζονται λογισμικά σε καμπύλη από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Όπως προαναφέρθηκε η ανίχνευση του προϊόντος της PCR γίνεται με βάση τον φθορισμό. Υπάρχουν δύο είδη χημειών για την ανίχνευση, τα οποία διακρίνονται σε μη ειδικά, όπου ανιχνεύονται όλα τα δίκλιωνα μόρια DNA τα οποία ενισχύονται κατά την αντίδραση, και ειδικά, στα οποία διαχωρίζεται η ενισχυόμενη αλληλουχία-στόχος από τυχόν μη ειδικά προϊόντα.

Στα μη ειδικά συστήματα ανίχνευσης γίνεται χρήση μιας φθορίζουσας χρωστικής η οποία ενσωματώνεται σε δίκλινο μόριο DNA. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη χρωστική είναι η SYBR Green I. Η ουσία αυτή φθορίζει μόνο όταν ενσωματώνεται στο DNA κατά τη σύνθεση του και όχι όταν είναι ελεύθερη στο διάλυμα και εκπέμπει στα 520nm. Η ένταση του φθορισμού της είναι ανάλογη του παραγόμενου προϊόντος και μετρείται στο τέλος επέκτασης των εκκινήτων κάθε κύκλου PCR με αποτέλεσμα η ειδικότητα της να

καθορίζεται αποκλειστικά από τους εκκινητές. Το βασικό πλεονέκτημα της αλλά και παράλληλα μειονέκτημα της τεχνικής SYBR Green I είναι ότι συνδέεται σε οποιοδήποτε δίκλωνο DNA, με συνέπεια τόσο το ειδικό προϊόν της PCR όσο και τα μη ειδικά προϊόντα καθώς και τα διμερή εκκινητών που μπορεί τυχόν να δημιουργηθούν να φθορίζουν. Μόνο η βελτιστοποίηση των συνθηκών μπορεί να μειώσει το σχηματισμό των διμερών των εκκινητών σε ικανοποιητικό βαθμό (38,βιβλιογραφία). Επίσης, υψηλότερη ειδικότητα μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση ανάλυσης καμπύλης τήξης για την ανίχνευση του σήματος φθορισμού. Αυτή η καμπύλη μας δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού του κλάσματος φθορισμού που προέρχεται από το επιθυμητό προϊόν από το κλάσμα των διμερών των εκκινητών. Για τον καλύτερο διαχωρισμό των ειδικών από τα μη ειδικά προϊόντα, ο φθορισμός μετριέται σε υψηλές θερμοκρασίες, αφού τα σημεία τήξης των μη ειδικών προϊόντων είναι πιο χαμηλά από τα αντίστοιχα των ειδικών.

Στα ειδικά συστήματα ανίχνευσης γίνεται χρήση ειδικού ανιχνευτή για την αλληλουχία-στόχο, ο οποίος έχει τη δυνατότητα σήμανσης με διάφορες φθορίζουσες χρωστικές, των οποίων τα διαφορετικά φάσματα διέγερσης και εκπομπής επιτρέπουν τον σαφή διαχωρισμό τους. Έχουν αναπτυχθεί πολλά ειδικά συστήματα από τα οποία τα πιο γνωστά είναι των Taqman, Molecular beacon, Scorpions και Hybridisation probes.

Όλα τα ειδικά συστήματα ανίχνευσης βασίζονται στην αρχή του φαινομένου μεταφοράς ενέργειας φθορισμού (FRET). Σύμφωνα με αυτήν, η ενέργεια μεταφέρεται ανάμεσα σε δυο μόρια απόστασης 10-100Å τα οποία έχουν επικαλυπτόμενα φάσματα εκπομπής και απορρόφησης. Τα μόρια αυτά αποτελούν δυο φθορίζοντες ιχνηθέτες (ένα δότη και ένα δέκτη) ή ένα φθορισμοφόρο μόριο αναφοράς και ένα μη-φθορίζοντα αποσβέστη, ο οποίος διαχέει την ενέργεια με τη μορφή θερμότητας.

Το ειδικό σύστημα ανίχνευσης των Taqman ή αλλιώς ανιχνευτών DNA διπλής χρωστικής χρησιμοποιεί ολιγονουκλεοτίδια, τα οποία διαθέτουν δυο χρωστικές στο ίδιο μόριο και υβριδοποιούνται στην αλληλουχία-στόχο μεταξύ του πρόσθιου και του ανάστροφου εκκινητή κατά την αντίδραση κάθε κύκλου της PCR. Ο ανιχνευτής υδρολύεται από την Taq πολυμεράση με συνέπεια οι δυο χρωστικές να αποχωρίζονται όταν το φθορισμοφόρο μόριο δε βρίσκεται κοντά στο μόριο αποσβέστη και η ενέργεια φθορισμού να είναι ανιχνεύσιμη. Τα πλεονεκτήματα του συστήματος Taqman είναι ο ειδικός υβριδισμός του ανιχνευτή με την αλληλουχία-στόχο για να παραχθεί φθορισμός, η δυνατότητα επισήμανσης των ανιχνευτών με διάφορες χρωστικές και η δυνατότητα χρήσης πολλών χρωστικών με διαφορετικά μήκη κύματος εκπομπής για πολλαπλούς προσδιορισμούς.

Το ειδικό σύστημα ανίχνευσης των Molecular beacon ή αλλιώς των Μοριακών φάρων χρησιμοποιεί ανιχνευτές που σχηματίζουν δομές φουρκέτας. Ο ανιχνευτής διαθέτει συμπληρωματικό αριθμό βάσεων στα δύο άκρα του, όπου βρίσκονται προσκολλημένες και δυο φθορίζουσες χρωστικές. Έτσι, όταν διπλώνεται ο ανιχνευτής, στο κέντρο του δημιουργείται μια θηλιά στην οποία μπορεί να υβριδοποιηθεί ο ένας συμπληρωματικός κλώνος της αλληλουχίας-στόχου της αντίδρασης της PCR. Παρουσία κατάλληλης ακτινοβολίας, η χρωστική αναφοράς διεγείρεται και απορροφάται από τη δεύτερη χρωστική απόσβεσης. Με αυτό τον τρόπο παράγεται σήμα φθορισμού το οποίο αυξάνεται γραμμικά με την αύξηση του προϊόντος της PCR. Όπως και στο σύστημα των Taqman, έτσι και εδώ μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλές χρωστικές με διαφορετικά μήκη κύματος και έτσι να επιτευχθούν πολλαπλές PCR.

Το ειδικό σύστημα ανίχνευσης Scorpions ή αλλιώς Σκορπιού χρησιμοποιεί έναν εκκινητή συνδεδεμένο ομοιοπολικά με τον ανιχνευτή της αλληλουχίας-στόχου DNA. Στο ένα άκρο του ανιχνευτή υπάρχει το φθορισμοφόρο μόριο και στο άλλο το μόριο αποσβέστης. Η ομοιοπολική σύνδεση εκκινητή-ανιχνευτή γίνεται συνήθως με τη χρήση του μονομερούς γλυκόλης και εμποδίζει την αντιγραφή δομής φουρκέτας που έχει το μόριο αυτό ενώ ταυτόχρονα αναστέλλει και την αντιγραφή των αλληλουχιών του ανιχνευτή κατά τον πολυμερισμό της αντίδρασης PCR, ώστε να μη παραχθεί μη ειδικό σήμα φθορισμού. Σε αντίθεση με τα υπόλοιπα ειδικά συστήματα ανίχνευσης, τα σύστημα του Σκορπιού δεν απαιτεί τη χρήση ξεχωριστού ανιχνευτή DNA. Η αντίδραση πραγματοποιείται ακαριαία δημιουργώντας ισχυρότερα σήματα σε πιο σύντομο χρονικό διάστημα.

Το ειδικό σύστημα ανίχνευσης των Hybridisation probes ή αλλιώς του ζεύγους ανιχνευτών υβριδισμού DNA χρησιμοποιεί τέσσερα ολιγονουκλεοτίδια, δύο εκκινητές και δυο ανιχνευτές. Ο πρώτος ανιχνευτής φέρει το φθορισμοφόρο μόριο και ο δεύτερος το μόριο αποσβέστη. Και οι δυο δεσμεύονται σε παρακείμενες θέσεις στην αλληλουχία-στόχο με συνέπεια να γειτνιάζουν τα δυο φθορίζον μόρια και να ενεργοποιείται το φαινόμενο FRET. Η ένταση του παρατηρούμενου φθορισμού είναι ανάλογη του συνολικού γενετικού υλικού που παράγεται κατά την αντίδραση της PCR. Τα πλεονεκτήματα του συστήματος αυτού είναι η υψηλή ειδικότητα, η δυνατότητα για καλύτερο σχεδιασμό εκκινητών και η σταθερότητα φθορισμού, καθώς οι ανιχνευτές δεν υδρολύονται.

Εφόσον πραγματοποιηθεί η ανίχνευση σήματος φθορισμού από την αλληλουχία-στόχο με κάποιο από τα προαναφερόμενα συστήματα ακολουθούν η ανάλυση και διάφοροι υπολογισμοί της καμπύλης ενίσχυσης με στόχο την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Γενικότερα, ο ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται με βάση μια από τις δυο μεθόδους, την απόλυτη ή τη σχετική. Στην απόλυτη προσέγγιση μπορούμε να ποσοτικοποιήσουμε μια συγκεκριμένη αλληλουχία-στόχο και το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται σε απόλυτη τιμή (αντίγραφα/ml), ενώ στη σχετική προσέγγιση γίνεται σύγκριση των επιπέδων έκφρασης δυο διαφορετικών αλληλουχιών-στόχων σε κάθε δείγμα, όπου η δεύτερη αλληλουχία αφορά ένα γονίδιο αναφοράς, και το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται ως κλάσμα (ratio). Η απόλυτη προσέγγιση χρησιμοποιείται κυρίως για ερευνητικούς σκοπούς στη μικροβιολογία και ιολογία ενώ η σχετική είναι χρήσιμη στην ογκολογική έρευνα εφόσον μπορεί να συγκριθεί η έκφραση του γονιδίου-στόχου κάτω από δυο τουλάχιστον συνθήκες (ελευθέρου νόσου/ νοσούμενου ή υπό θεραπεία/ χωρίς θεραπεία). Κάθε μια από τις δυο αναλύσεις μπορεί να αναπτυχθεί με δυο μεθόδους, από τις οποίες η μια βασίζεται στη χρήση πρότυπων καμπυλών και αυτόματων μοντέλων του λογισμικού προγράμματος και η άλλη επιτρέπει υπολογιστικούς χειρισμούς από το χρήστη-ερευνητή ρυθμίζοντας διάφορες συνθήκες, όπως για παράδειγμα το χρονικό περιθώριο υποβάθρου με βάση τους κύκλους αντίδρασης της PCR.

2.6.3 Οργανολογία

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για όλες τις μετρήσεις με Real-time qPCR ήταν το LightCycler 480 της εταιρείας ROCHE. Στο όργανο LightCycler 480 η αντίδραση πραγματοποιείται με τη χρήση ειδικής μικροπλακέτας, η οποία τοποθετείται σε ειδικό δίσκο και περιλαμβάνει το φθορισμόμετρο, το θερμικό θάλαμο, τον ανεμιστήρα, την ηλεκτρική παροχή και τα ηλεκτρονικά εξαρτήματα. Για την παρακολούθηση της αντίδρασης της PCR ενώ αυτή εξελίσσεται, οι διάφορες πληροφορίες μεταφέρονται από και προς έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή, μέσω κατάλληλης σύνδεσης. Ο χρήστης εισάγει τα δεδομένα μέσω πληκτρολογίου (αριθμό δειγμάτων, ονόματα, συγκεντρώσεις κτλ.) στο κατάλληλο πειραματικό πρωτόκολλο μέσα στον υπολογιστή και στη συνέχεια ο υπολογιστής μεταφέρει τις πληροφορίες στο όργανο. Επιπρόσθετα, ο υπολογιστής καταγράφει τις θερμοκρασίες και τα σήματα φθορισμού κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και τέλος επεξεργάζεται τα αποτελέσματα μέσω των αναλυτικών λογισμικών προγραμμάτων.



Εικόνα 35. Το μηχάνημα LightCycler 480 της ROCHE μαζί με τον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

2.6.4 Αντιδραστήρια - Διαλύματα - Αναλώσιμα

- Ρυθμιστικό διάλυμα LightCycler 480 Genotyping Master
- LightCycler 480 H₂O, PCR grade
- Διάλυμα εκκινητή Primer Sense
- Διάλυμα εκκινητή Primer Anti-Sense
- Διάλυμα ανιχνευτή Hyprobe FL
- Διάλυμα ανιχνευτή Hyprobe PH
- Μικροπλακέτες 96 θέσεων (LightCycler 480 Multiwell Plate 96)
- Ταινίες επικόλλησης (sealing foils)
- Σωληνάρια συλλογής 1.5ml (ependorfs)

2.6.5 Πειραματική πορεία

Στα πειράματα μας χρησιμοποιήσαμε το σύστημα ανίχνευσης των Hybridisation probes, όπου είχαμε τον ανιχνευτή δέκτη ο οποίος περιλάμβανε μια ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία συμπληρωματική της αλληλουχίας-στόχου και τη φθορίζουσα LC Red640 στο 3' άκρο του, και τον ανιχνευτή δότη ο οποίος περιλάμβανε μια αλληλουχία συμπληρωματική με ένα άλλο

τμήμα της αλληλουχίας-στόχου και τη φθορίζουσα φλουορεσκεΐνη στο 5' άκρο του. Κατά τη φάση πρόσδεσης των εκκινητών, η φλουορεσκεΐνη διεγείρεται και με μεταφορά ενέργειας από το δότη στον δέκτη παρατηρείται εκπομπή σήματος μήκους κύματος 640nm από την LC Red ανάλογη του PCR προϊόντος.

Σε ένα σωληνάριο προσθέτουμε 4μl Master mix, 0,5μl από κάθε εκκινητή, 0,2μl από κάθε ανιχνευτή και 9,6μl H₂O για κάθε δείγμα. Το Master mix περιέχει μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων και την ανασυνδυασμένη Taq DNA πολυμεράση. Το μίγμα της αντίδρασης αναδεύεται καλά και μεταφέρουμε 15μl από αυτό σε μια συγκεκριμένη θέση της μικροπλακέτας και προστίθονται 5μl cDNA του υπό μελέτη δείγματος. Αυτό γίνεται για κάθε δείγμα. Εκτός από τα δείγματα στην μικροπλακέτα τοποθετούμε και ένα δείγμα cDNA γνωστής συγκέντρωσης για το γονίδιο G6PD που θα χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς και ένα αρνητικό μάρτυρα, όπου προσθέτουμε 5μl H₂O. Για το γονίδιο αναφοράς G6PD προετοιμάζουμε ένα λίγο διαφορετικό μίγμα αντίδρασης, το οποίο αποτελείται από 2μl Master mix, 4μl Primer mix ειδικό για G6PD από το σχεδιαστή, 2,4μl MgCl₂ και 6,6μl H₂O. Τοποθετούμε με προσοχή την ταινία επικόλλησης και φυγοκεντρούμε στις 10.000 rpm για 1 λεπτό. Έπειτα, τοποθετούμε την μικροπλακέτα στο κατάλληλο δίσκο στο όργανο LighCycler 480 και ρυθμίζουμε στον υπολογιστή το αντίστοιχο πρωτόκολλο που θέλουμε να ακολουθήσει το όργανο.

Γενικά, οι συνθήκες της αντίδρασης της PCR έχουν ως εξής:

- Θέρμανση στους 95°C για 10 λεπτά με σκοπό την αρχική αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA (pre-incubation).
- 40 κύκλοι ενίσχυσης (amplification), όπου ο κάθε κύκλος αποτελείται από 3 επιμέρους στάδια. Το πρώτο στάδιο αφορά την αποδιάταξη των δυο κλώνων DNA (denaturation) στους 95°C για 10 δευτερόλεπτα. Το δεύτερο στάδιο αφορά την επαναδιάταξη – πρόσδεση των εκκινητών με το DNA (annealing) και εκτελείται στην θερμοκρασία επαναδιάταξης των εκκινητών του υπό μελέτη γονιδίου για 20 δευτερόλεπτα. Στο τρίτο στάδιο γίνεται η σύνθεση της αλληλουχίας (extension) μέσω της DNA πολυμεράσης στους 72°C για 10 δευτερόλεπτα.
- Ψύξη στους 40°C για 30 δευτερόλεπτα ώστε να τερματιστεί η αντίδραση (cooling).

Πίνακας. Ζεύγη εκκινητών και ανιχνευτών που είναι ειδικά σχεδιασμένοι για κάθε ένα από τα υπό μελέτη γονίδια. Παρουσιάζεται η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων και οι θερμοκρασίες επαναδιάταξης, όπως αυτές προτείνονται από το σχεδιαστή.

	DAZL	Θερμοκρασία Επαναδιάταξης (T_m, °C)
Εκκινητές	<i>Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδίων</i>	
DAZL S	5'- gCTATgTTgTACCTCCggCTTA -3'	57.1
DAZL A	5'- gCCCgACTTCTTCTAAAgTgATg -3'	57.6
Ανιχνευτές	<i>Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδίων</i>	
DAZL FL	5'- TTTCCAgAgggTggAgTAgCTTCATg -FL	63.4
DAZL LC	5'- LC640- ACTgAACATTCATTTggCACAACTTCAgCT-PH	65.2
	OCT-4	
Εκκινητές	<i>Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδίων</i>	
OCT-4 S	5'- AAgCAgAAACCCTCgTg -3'	52
OCT-4 A	5'- ACTCggACCACATCCCT -3'	50.5
Ανιχνευτές	<i>Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδίων</i>	
OCT-4 FL	5'- AACAAATTCTCCAaggTTgCCTC -FL	58.2
OCT-4 LC	5'- LC640-CACTCggTTCTCgATACTggTTCgC-PH	65.2

2.7. ENZYMIKH ΑΝΟΣΟΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ELISA

2.7.1 Αρχή μεθόδου

Μία σημαντική πρόοδος, σε επίπεδο λειτουργικών μελετών, επιτεύχθηκε στην Ανοσολογία με την ανάπτυξη διαφόρων ανοσοδοκιμασιών (Immunoassays). Ορισμένες ανοσοδοκιμασίες στηρίχθηκαν στην ειδικότητα αναγνώρισης και αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός αντιγόνου και ενός ειδικού αντισώματος. Η ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA—Enzyme-linked Immunoassay Antibody πρωτοπεριγράφηκε από τους Engvall και Perlman το 1971. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση σοβαρών παθογόνων του ανθρώπου και των ζώων, ενώ από το 1977 άρχισαν οι εφαρμογές στη φυτοπαθολογία για τη διάγνωση ιών, βακτηριών, μυκήτων και φυτοπλάσμάτων. Σήμερα, αποτελεί μία ευρύτατα χρησιμοποιούμενη μέθοδο τόσο για ερευνητικούς όσο και για διαγνωστικούς σκοπούς σε όλους τους τομείς.

Η ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA ή Δοκιμασία Ενζυμο-Συζευγμένης Ανοσοπροσρόφησης αποτελεί μια βιοχημική μέθοδο που επιτρέπει τον προσδιορισμό αντισωμάτων, αντιγόνων, κυτταροκινών, χημικών ουσιών και ορμονών σε βιολογικά υγρά. Ανήκει στην κατηγορία των ετερογενών ανοσοχημικών μεθόδων και χρησιμοποιείται πολύ στις δια χειρός μεθόδους (manual). Είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί για ποιοτική ανάλυση, όπου παρέχει πληροφορίες για την ύπαρξη αρνητικού ή θετικού αποτελέσματος στο δείγμα, ή για ποσοτική ανάλυση, η οποία στηρίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης του δείγματος και στη σύγκριση αυτής με μία πρότυπη καμπύλη (γραφική παράσταση), ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του αντιγόνου ή του αντισώματος του δείγματος.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ειδική αλληλεπίδραση αντιγόνου-αντισώματος και ανάλογα με την εφαρμογή, τα αντιδραστήρια και την ευαισθησία που επιδιώκεται, η μέθοδος παρουσιάζει πολλαπλές παραλλαγές, όπως η έμμεση ELISA, η ELISA τύπου Sandwich, η ανταγωνιστική ELISA, η άμεση και η έμμεση κυτταρική ELISA. Ωστόσο, σε όλες τις παραλλαγές της χαρακτηρίζεται από τρία βασικά στοιχεία. Πρώτον, την πρόσδεση και ακινητοποίηση αντιγόνου ή αντισώματος σε στερεή επιφάνεια (Ανοσοπροσρόφηση, ImmunoSorbent), δεύτερον την χρήση ενζυμο-συζευγμένου (Enzyme-Linked) αντισώματος και τρίτον τη χρήση χρωμογόνων υποστρωμάτων, τα οποία μετά από αντίδραση με το ένζυμο παράγουν διαλυτό έγχρωμο προϊόν, χρώμα ή φθορισμό, επιτρέποντας την ποσοτικοποίηση της αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος.

Το πρώτο βασικό στοιχείο στοχεύει στην ακινητοποίηση του αντιγόνου ή αντισώματος σε μια στερεή φάση, χαρακτηριστικό που εντάσσει την ανοσοδοκιμασία αυτή στην κατηγορία των ετερογενών μεθόδων. Η προσκόλληση-ακινητοποίηση αυτή εξασφαλίζεται με τις παρακάτω μεθόδους :

1. Ένωση αντισώματος με πλαστική επιφάνεια. Γίνεται με ηλεκτροστατικές και κυρίως υδρόφοβες δυνάμεις. Είναι η πιο συνηθισμένη περίπτωση.
2. Ένωση αντισώματος με μαγνητικά σφαιρίδια. Γίνεται με ηλεκτροστατικές δυνάμεις. Χρησιμοποιείται κυρίως σε αυτόματες μεθόδους χημειοφωταύγειας.
3. Ένωση αντισώματος με σφαιρίδια πολυακρυλαμίδης, κυτταρίνης, αγαρόζης. Γίνεται με χημικό δεσμό και χρησιμοποιείται σε αυτόματες μεθόδους.
4. Ένωση αντισώματος με γυάλινα σωληνάκια. Γίνεται με ηλεκτροστατικές δυνάμεις, αλλά δεν χρησιμοποιείται ιδιαίτερα σε αντιδραστήρια IVDs.

Το δεύτερο στοιχείο αναφέρεται στη χρήση ενός ενζυμο-συζευγμένου αντισώματος που στοχεύει στο σχηματισμό ενός σταθερού ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ του ενζύμου και του αντισώματος. Η χρήση αυτή διαφοροποιεί την ELISA από τις υπόλοιπες ανοσοδοκιμασίες που χρησιμοποιούν ραδιένεργια για την ανίχνευση των προϊόντων.

Ένας σημαντικός αριθμός ενζύμων χρησιμοποιείται επιτυχώς στη μέθοδο ELISA, όπως η ραφανική υπεροξειδάση (HRP), η αλκαλική φωσφατάση (AP), η β-γαλακτοσιδάση (β-Gal), και διακρίνονται σε αυτά που δρουν άμεσα στο υπόστρωμα (αλκαλική φωσφατάση, β-γαλακτοσιδάση) και σε αυτά που δρουν έμμεσα (ραφανική υπεροξειδάση). Η επιλογή του ενζύμου εξαρτάται από την εφαρμογή της μεθόδου και γίνεται με βάση την προσδοκώμενη ευαισθησία, επαναληψιμότητα, ταχύτητα αντίδρασης, τυχόν παρεμβολές στην αναλυτική μέθοδο και άλλα. Για παράδειγμα, η υπεροξειδάση απαιτεί μικρότερη επώαση από τα άλλα δύο ένζυμα, ενώ η αλκαλική φωσφατάση και η β-γαλακτοσιδάση εξασφαλίζουν καλύτερη επαναληψιμότητα, μετά από μεγάλο χρόνο επώασης.

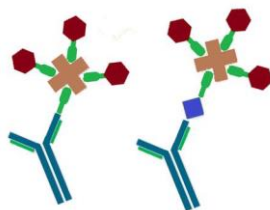
Η αρχική ένωση αντιγόνου – αντισώματος γίνεται εύκολα λόγω της χημικής συγγένειας των δύο μορίων. Αντίθετα, η ένωση ενζύμου - υποστρώματος μετέπειτα απαιτεί συγκεκριμένες χημικές συζεύξεις, δηλαδή χημικές γέφυρες. Οι συζεύξεις αυτές άλλοτε εξασφαλίζουν απλά τη σταθερή ένωση ενζύμου και αντισώματος και άλλοτε ενισχύουν σημαντικά το παραγόμενο σήμα. Αυτές οι συζεύξεις γίνονται με:

- Υπεριωδικό νάτριο. Χρησιμοποιείται αποκλειστικά για τη σύζευξη της υπεροξειδάσης με αντισώματα μέσω της υδατανθρακικής περιοχής του αντισώματος και της υπεροξειδάσης. Επειδή η υδατανθρακική περιοχή δεν συμμετέχει συνήθως στην ένωση ενζύμου και αντισώματος δεν επηρεάζεται η ενζυμική δραστηριότητα.
- Γλουταλδεύδη. Εξασφαλίζει τη διασταυρούμενη αντίδραση μεταξύ ενζύμου και αντισώματος μέσω των ελεύθερων ε-αμινομάδων της λυσίνης.
- Σύμπλεγμα αβιδίνης – βιοτίνης και στρεπταβιδίνης - βιοτίνης.

Η βιοτίνη είναι μία μικρή πρωτεΐνη (MB = 244 D) που ανήκει στη κατηγορία των βιταμινών (βιταμίνες H, B7). Βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα και παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές μεταβολικές διαδικασίες. Η βιοτίνη μπορεί να ενωθεί με πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες μεταξύ των οποίων ένζυμα και αντισώματα, δημιουργώντας μια γέφυρα ανάμεσα στο ένζυμο και το αντίσωμα. Λόγω του μεγέθους της όμως, μπορεί να ενωθεί είτε με το ένα είτε με το άλλο. Για να επιτελέσει επομένως τον ρόλο της χρειάζεται ένα ακόμα ενδιάμεσο μόριο. Αυτό μπορεί να είναι είτε η αβιδίνη, είτε η στρεπταβιδίνη.

Η αβιδίνη είναι ένα μόριο με 4 ενεργά κέντρα μοριακού βάρους περίπου 65000 D με τα οποία μπορεί να αντιδράσει με τη βιοτίνη, αλλά και πολλές άλλες πρωτεΐνες με μη ειδικό τρόπο. Βρίσκεται σε πολλά κύτταρα και παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές μεταβολικές διαδικασίες. Στην εργαστηριακή τεχνολογία χρησιμοποιείται για την ένωσή της με το μόριο της βιοτίνης, όχι όμως με τόσο ισχυρή χημική συγγένεια, όπως συμβαίνει με το μόριο της στρεπταβιδίνης. Πλεονεκτεί από τη στρεπταβιδίνη στο ότι παράγεται εύκολα από αυγά κότας.

Η στρεπταβιδίνη παρόμοια με την αβιδίνη είναι ένα τετραμερές μόριο μοριακού βάρους 60.000 D. Σε αντίθεση με την αβιδίνη επιτυγχάνει ειδική σύνδεση με τη βιοτίνη λόγω της διαφορετικής αμινοξικής της ακολουθίας. Η παραγωγή της όμως, είναι δυσκολότερη και μεγαλύτερου κόστους, αφού προέρχεται από τον *Streptomyces avidinii*.



Εικόνα 36. Αναπαράσταση της ένωσης συμπλέγματος βιοτίνης-αβιδίνης και βιοτίνης-στρεπταβιδίνης.

Το τρίτο και τελικό κύριο στοιχείο της μεθόδου ELISA είναι η χρήση χρωμογόνου υποστρώματος το οποίο προστίθεται με σκοπό να αντιδράσει με το ένζυμο και να παραχθεί έγχρωμο προϊόν (φως ή φθορισμός). Η επιλογή του ζεύγους ενζύμου-υποστρώματος της χρωμογόνου αντίδρασης καθορίζει την ευαισθησία της δοκιμασίας. Παράμετροι που συντελούν στην επιλογή ενζύμου-υποστρώματος και εξασφαλίζουν την υψηλότερη ευαισθησία της δοκιμασίας είναι η ταχύτητα αντίδρασης μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος προκειμένου να παράγεται έγχρωμο προϊόν σε μεγάλη ποσότητα, το έγχρωμο προϊόν της αντίδρασης να ανιχνεύεται με μεγάλη ευαισθησία και η ενζυμική δραστηριότητα να μην επηρεάζεται από παράγοντες του εξεταζόμενου δείγματος.

Συνοψίζοντας, η μέθοδος ELISA παραμένει διαδεδομένη τόσο για διαγνώσεις ρουτίνας όσο και για ερευνητικούς σκοπούς, γιατί παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα:

1. Υψηλότερη ευαισθησία και επαναληψιμότητα συγκριτικά με τις υπόλοιπες ανοσοδοκιμασίες.
2. Ταχεία λήψη αποτελεσμάτων
3. Χαμηλό κόστος και διατήρηση των αντιδραστηρίων για μεγάλο χρονικό διάστημα
4. Δυνατότητα εφαρμογής σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων
5. Μη χρησιμοποίηση ραδιενέργειας
6. Ιδιαίτερα ασφαλής για την υγεία των χειριστών

2.7.2 Οργανολογία

Για την πραγματοποίηση της ανοσοενζυμικής ανοσοδοκιμασίας ELISA χρειάστηκαν διάφορα μηχανήματα για τα επιμέρους βήματα της πειραματικής πορείας.

Κατά την παρασκευή αντιδραστηρίων είναι επιθυμητή η πλήρη διαλυτοποίηση των βαθμονομητών με απεσταγμένο νερό, η οποία πετυγχάνεται με ανάδευση και κατόπιν ανάμειξη σε αναμείκτη στροβιλισμού. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ο αυτοματοποιημένος αναμείκτης στροβιλισμού Vortex Mixer SA2 της εταιρείας Stuart. Για τις πολλαπλές πλύσεις των πλακιδίων μικροτιτλοδότησης έγινε χρήση της αυτοματοποιημένης συσκευής πλύσης MW-12A της εταιρείας Mindray, ενώ για τις επώσεις σε θερμοκρασία δωματίου υπήρχε στη διάθεση μας ο οριζόντιος αναδευτήρας orbital Shaker S03 της εταιρείας Stuart.

Τέλος, χρησιμοποιήθηκε ως αναγνώστης πλακών μικροτιτλοδότησης το μηχάνημα Stat Fax 2100 της εταιρείας Awareness Technology. Μια πλήρως αυτόματη μονάδα ανάγνωσης πλακιδίων μικροτιτλοδότησης ELISA με δυνατότητα ανάγνωσης και μέτρησης μονοχρωματικά ή διχρωματικά στα 450/405 nm και στα 630 nm για την καμπύλη αναφοράς.



Εικόνα 37. Stuart Scientific Auto Vortex Mixer SA2 & Stuart Scientific Orbital Shaker S03



Εικόνα 38. Microtitration plate washer Mindray MW-12A & Microtitration plate reader Awareness Stat Fax 2100

2.7.3 Αντιδραστήρια - Διαλύματα - Αναλώσιμα

- Πλακίδια μικροτιτλοδότησης 96 φρεατίων από πολυστυρένιο με μονοκλωνικό αντίσωμα anti-AMH IgG σε κάθε φρεάτιο.
- Βαθμονομητές για τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς του ποσοτικού προσδιορισμού.
- Διαλύματα ελέγχου
- Αντίσωμα συζευγμένο με βιοτίνη
- Διάλυμα στρεπταβιδίνης
- Ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας με BSA (Bovine serum albumin), πρωτεΐνη (βοοειδή, ποντικού), <0.3% ProClin 300 και αζίδιο νατρίου.
- Χρωμογόνο υπόστρωμα TMB (3,3',5,5'-τετραμεθυλοβενζιδίνη). Το TMB οξειδώνεται κατά την ενζυμική αποικοδόμηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου από τη υπεροξειδάση της ραφάνου (HRP). Το οξειδωμένο προϊόν του TMB έχει έντονο μπλέ χρώμα. Σε όξινο περιβάλλον το χρώμα μετατρέπεται σε κίτρινο.
- Διάλυμα έκπλυσης των πλακιδίων ανάμεσα στο κάθε στάδιο της μεθόδου με μη ιονικό απορρυπαντικό. Πρόκειται για ένα συμπυκνωμένο διάλυμα το οποίο πρέπει να αραιωθεί πριν τη χρήση του με απεσταγμένο νερό.
- Ανασχετικό διάλυμα 0.2 M Θεικού οξέος. Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης
- Απεσταγμένο νερό υψηλής ποιότητας
- Πλαστικά σωληνάρια για την αραιώση διεγμάτων
- Πιπέτες 10 – 1000 μl

2.7.4 Πειραματική πορεία

Στα πειράματα μας χρησιμοποιήθηκε το AMH Gen II ELISA kit της εταιρείας Beckman Coulter και εκτελέστηκε το πρωτόκολλο όπως ακριβώς περιγράφεται από το επισυναπτόμενο αρχείο του κατασκευαστή.

Πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία είναι απαραίτητο να προετοιμαστούν κατάλληλα όλα τα δείγματα, οι βαθμονομητές και διαλύματα ελέγχου. Σε πλαστικά σωληνάρια αραιώνεται κάθε προαναφερόμενο διάλυμα ή δείγμα με το ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας με

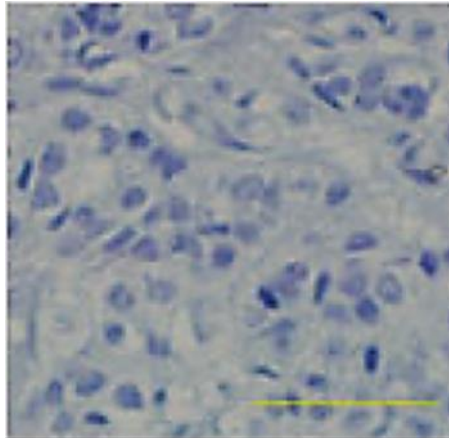
BSA σε αναλογία 1:5 και ακολουθεί καλή ανάμειξη. Σημαδεύουμε τα φρεάτια των πλακιδίων μικροτιλοδότσης ELISA. Εντός μιας ώρας, πιπετάρουμε 120μl από τα δείγματα, διαλύματα ελέγχου και τους βαθμονομητές στις εκάστοτε θέσεις του πλακιδίου. Επωάζουμε το πλακίδιο τοποθετημένο στο οριζόντιο αναδευτήρα ρυθμισμένο στις 600-800 στροφές ανά λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου για μια ώρα. Πλένουμε το πλακίδιο 5 φορές χρησιμοποιώντας το ειδικό διάλυμα έκπλυσης και την αυτοματοποιημένη συσκευή πλύσης. Διανέμουμε με πιπέτα 100μl από το διάλυμα αντισώματος συζευγμένου με βιοτίνη σε κάθε φρεάτιο. Επωάζουμε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε οριζόντιο αναδευτήρα ρυθμισμένο στις 600-800 στροφές ανά λεπτό. Αναρροφούμε το υγρό από κάθε φρεάτιο και πλένουμε καλά 5 φορές. Στη συνέχεια, διανέμουμε με πιπέτα 100μl από το διάλυμα στρεπταβιδίνης σε κάθε φρεάτιο και επωάζουμε για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου στο οριζόντιο αναδευτήρα ρυθμισμένο στις 600-800 στροφές ανά λεπτό. Αναρροφούμε το υγρό και πλένουμε ξανά 5 φορές κάθε φρεάτιο. Προσθέτουμε 100μl από το χρωμογόνο υπόστρωμα TMB με ειδική πιπέτα, προσέχοντας να μην εκτεθεί άμεσα σε ηλιακή ακτινοβολία και επωάζουμε για 8-12 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε οριζόντιο αναδευτήρα ρυθμισμένο στις 600-800 στροφές ανά λεπτό. Τέλος, διανέμουμε 100μl ανασχετικού διαλύματος σε κάθε φρεάτιο και τοποθετούμε το πλακίδιο μικροτιλοδότσης ELISA στην ειδική αυτόματη μονάδα ανάγνωσης εντός 30 λεπτών. Κάνουμε ανάγνωση τα δείγματα του πλακιδίου στα 450 nm έναντι ενός φίλτρου αναφοράς που ρυθμίζεται μεταξύ 600 και 630 nm. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με την καμπύλη αναφοράς προσδιορίζονται οι τιμές συγκέντρωσης της AMH για κάθε υπό μελέτη δείγμα.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑΣ

Μάρτυρας Oct-4

Με σκοπό τον ποιοτικό έλεγχο της μεθόδου της ανοσοϊστοχημείας πραγματοποιήθηκε πρώτα ανοσοϊστοχημική χρώση αρνητικού μάρτυρα. Σε αυτή τη δοκιμασία πραγματοποιήθηκαν όλα τα στάδια της πειραματικής πορείας με μόνη διαφορά ότι στο στάδιο της τιτλοποίησης αντί για το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-Oct-3/4 (product code: NCL-L-OCT3/4) προστέθηκαν 100μl ρυθμιστικού διαλύματος PBS. Ως δείγμα για τον αρνητικό μάρτυρα χρησιμοποιήθηκε ιστός από βιοψία καρκίνου του μαστού.



Εικόνα 39. Αρνητική ανοσοέκφραση δείγματος καρκίνου του μαστού για την πρωτεΐνη Dazl. Κλίμακα: 50μm (κίτρινη γραμμή).

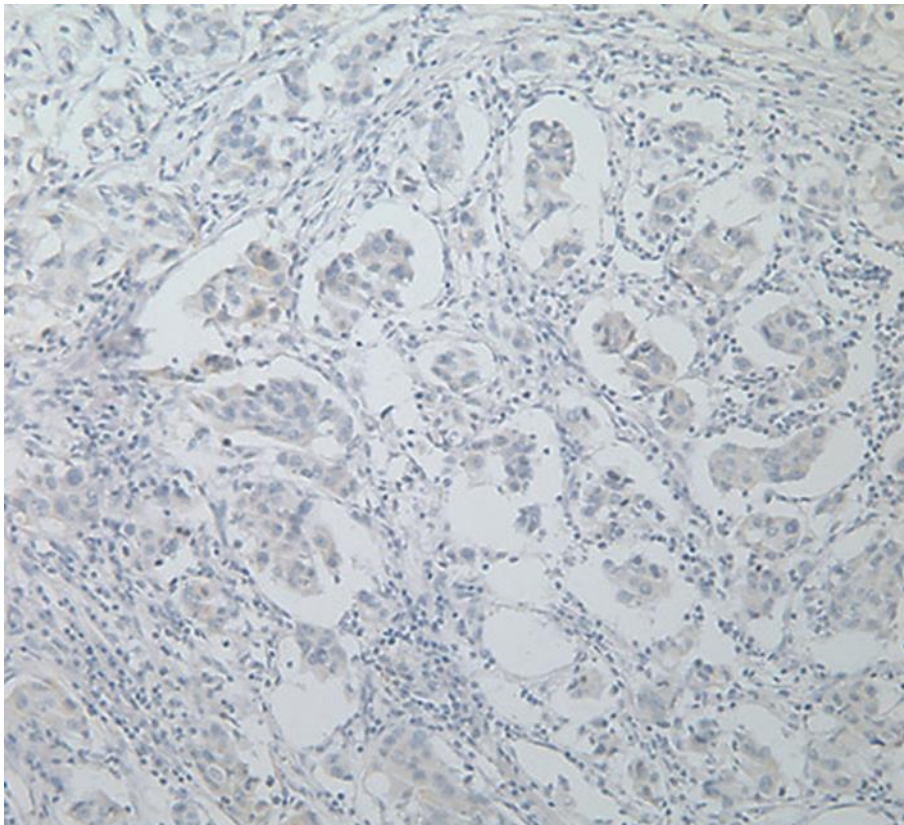
Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα, η ανοσοϊστοχημική χρώση έδωσε αρνητικό αποτέλεσμα, επιβεβαιώνοντας μας ότι το ειδικό Ultra View DAB kit της εταιρείας ROCHE που ακολουθεί την έμμεση μέθοδο ελεύθερη βιοτίνης είναι αποτελεσματικό και κατάλληλο για την συγκεκριμένη αυτοματοποιημένη τεχνική ανοσοϊστοχημείας που επιλέχθηκε για τα πειράματα της εργασίας.

Η έκφραση του Oct-4 σε κύτταρα του μαστού

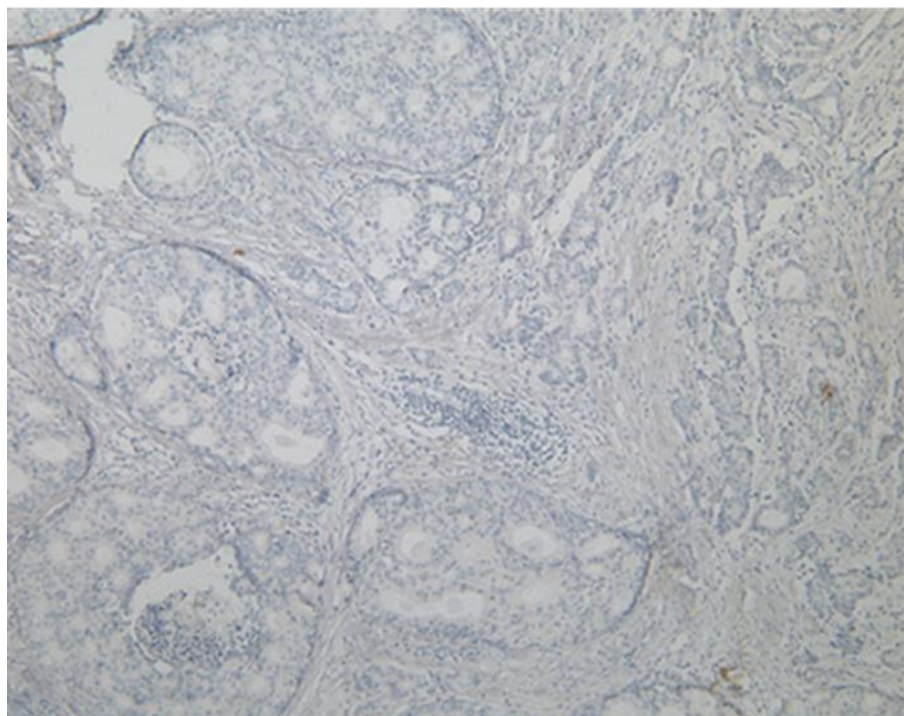
Η ανοσοέκφραση της πρωτεΐνης Oct-4 είναι αρνητική σε όλα τα δείγματα γυναικών ηλικίας 20 έως 84 ετών με καλοήθεις παθήσεις μαστού ή καρκίνο μαστού.

Πίνακας αποτελεσμάτων

Δείγμα	Ιστολογικός τύπος καρκινώματος	Ηλικία	Ανοσοέκφραση
1	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2	47	-
2	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2	47	-
3	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 3	43	-
4	Πορογενές in situ καρκίνωμα	51	-
5	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2	43	-
6	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2	54	-
7	Ινοαδένωμα	41	-
8	Πορογενές in situ καρκίνωμα	50	-
9	Διθητικό λοβιακό καρκίνωμα grade 2	43	-
10	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2-3	45	-
11	Διθητικό λοβιακό καρκίνωμα grade 2	67	-
12	Πορογενές in situ καρκίνωμα	57	-
13	Ινοαδένωμα	20	-
14	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 1	66	-
15	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 3	61	-
16	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2	53	-
17	Πορογενές in situ καρκίνωμα	70	-
18	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2	84	-



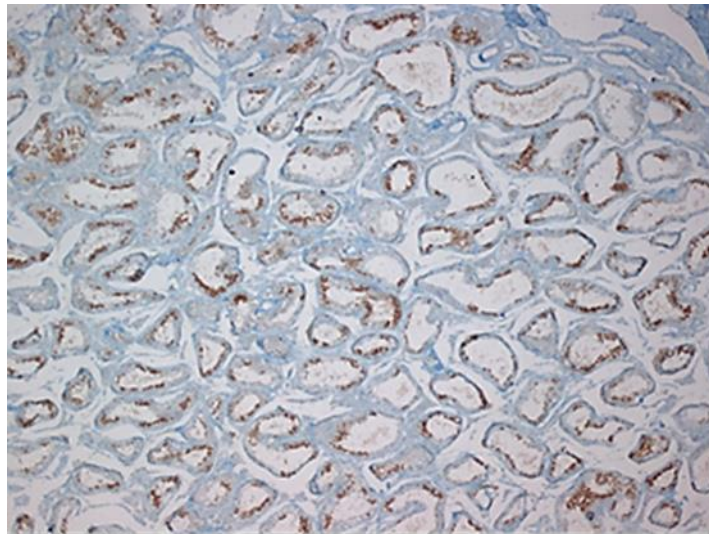
Εικόνα 40. Αρνητική ανοσοέκφραση σε διηθητικό πορογενές καρκίνο του μαστού grade 2 (οπτικό μικροσκόπιο, μεγέθυνση x200)



Εικόνα 41. Αρνητική ανοσοέκφραση σε μη διηθητικό πορογενές καρκίνωμα του μαστού (οπτικό μικροσκόπιο, μεγέθυνση x100)

Μάρτυρας Dazl

Με σκοπό την επιβεβαίωση της αποτελεσματικής λειτουργικότητας του αντισώματος anti-Dazl πραγματοποιήθηκε πρώτα ανοσοϊστοχημική χρώση σε ιστό-μάρτυρα. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία πως η πρωτεΐνη Dazl εκφράζεται στα σπερματοκύτταρα και συνεπώς στους όρχεις. Συνεπώς, έγινε χρήση ιστού από ορχεκτομή ως δείγμα-μάρτυρα. Ειδικότερα, ο ασθενής εμφάνιζε μικτό μη σεμινωματώδη όγκο αποτελούμενο από εμβρυϊκό καρκίνωμα (70%), ώριμο και άωρο τεράτωμα (30%) και όγκο λεκιθικού ασκού (<1%).



Εικόνα 42. Θετική ανοσοέκφραση (καφέ χρώμα) των σπερματογονίων για την πρωτεΐνη Dazl. Μεγέθυνση x40 στο οπτικό μικροσκόπιο

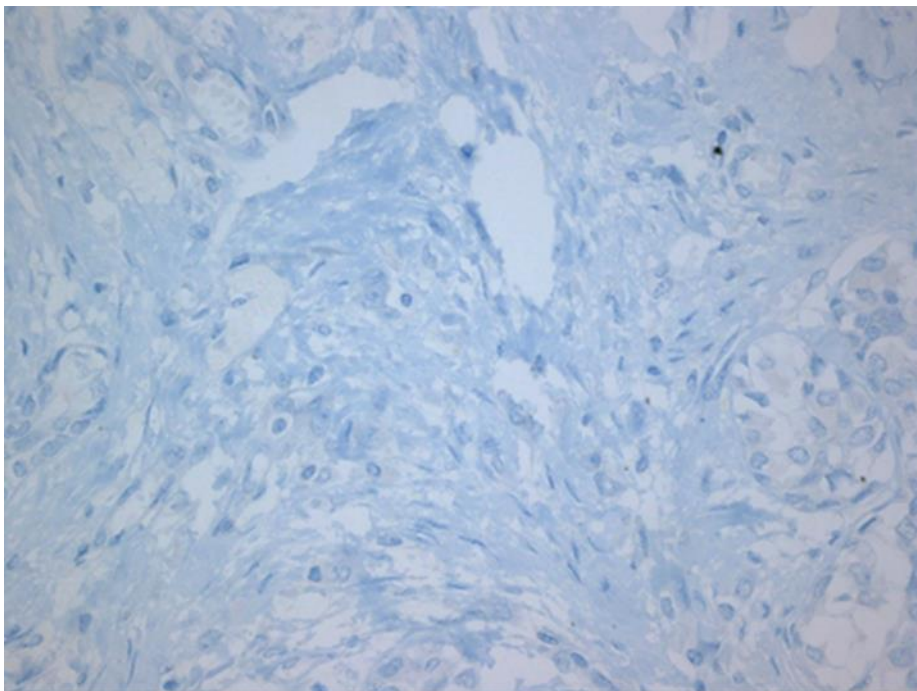
Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα, η ανοσοϊστοχημική χρώση έδωσε θετικό αποτέλεσμα, επιβεβαιώνοντας μας ότι το αντίσωμα είναι αποτελεσματικό και κατάλληλο για την συγκεκριμένη αυτοματοποιημένη τεχνική ανοσοϊστοχημείας που επιλέχθηκε για τα πειράματα της εργασίας.

Η έκφραση του Dazl σε κύτταρα του μαστού

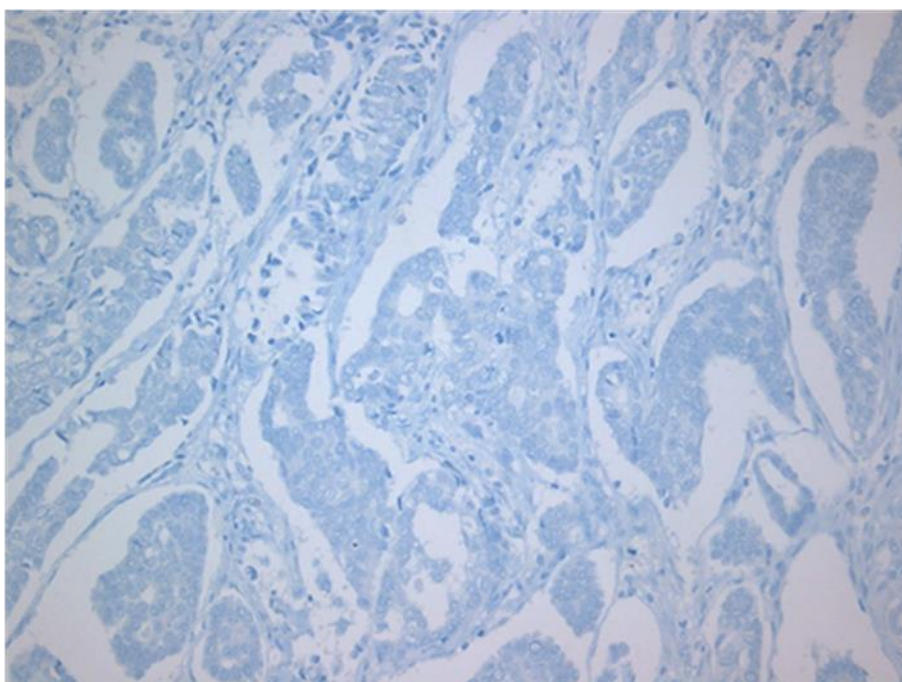
Η ανοσοϊστοχημική χρώση της πρωτεΐνης DAZL είναι αρνητική σε όλα τα δείγματα καλοηθών παθήσεων και καρκίνου μαστού που μελετήσαμε από γυναίκες ηλικίας από 20 έως 84 ετών.

Πίνακας αποτελεσμάτων

Δείγμα	Ιστολογικός τύπος καρκινώματος	Ηλικία	Ανοσοέκφραση
1	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2	47	-
2	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2	47	-
3	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 3	43	-
4	Πορογενές in situ καρκίνωμα	51	-
5	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2	43	-
6	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2	54	-
7	Ινοαδένωμα	41	-
8	Πορογενές in situ καρκίνωμα	50	-
9	Διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα grade 2	43	-
10	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2-3	45	-
11	Διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα grade 2	67	-
12	Πορογενές in situ καρκίνωμα	57	-
13	Ινοαδένωμα	20	-
14	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 1	66	-
15	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 3	61	-
16	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2	53	-
17	Πορογενές in situ καρκίνωμα	70	-
18	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2	84	-



Εικόνα 43. Αρνητική ανοσοχρώση σε πορογενές in situ καρκίνωμα του μαστού, οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση x40)



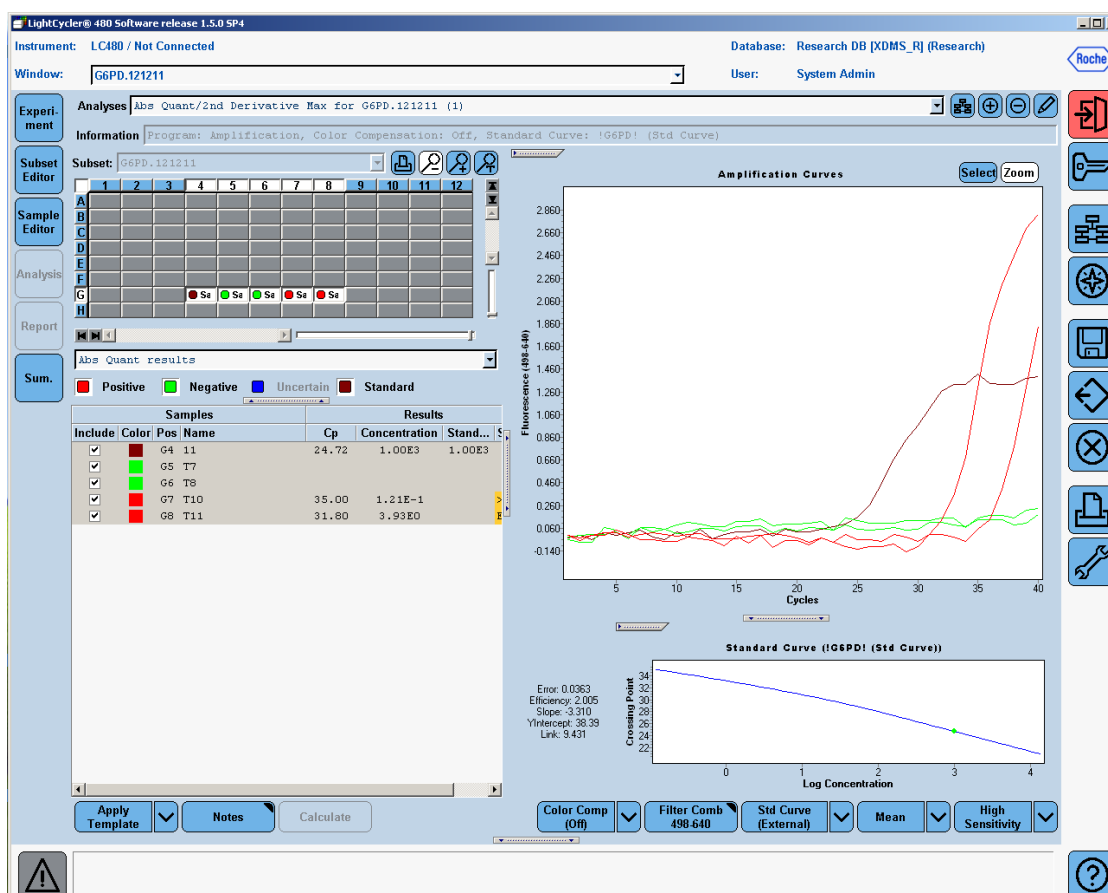
Εικόνα 44. Αρνητική ανοσοχρώση σε διηθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2, οπτικό μικροσκόπιο (μεγέθυνση x200)

3.2 ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ
ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ

Γονίδιο αναφοράς

Για την επιβεβαίωση ύπαρξης γενετικού υλικού σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε αρχικά έλεγχος έκφρασης του γονιδίου G6PD, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως ως γονίδιο αναφοράς.

Το γονίδιο της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης είναι ένα εξειδικευμένο ένζυμο που καταλύει μια ενδιάμεση αντίδραση κατά την οξειδωτική φάση της πορείας των φωσφορικών πεντοζών. Παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων και κωδικοποιείται από ένα γονίδιο, το οποίο γνωρίζουμε ότι είναι πάντα παρόν στο γενετικό υλικό όλων των κυττάρων. Συνεπώς, η παρουσία έκφρασης του δηλώνει ότι το δείγμα περιέχει γενετικό υλικό το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση έκφρασης και άλλων γονιδίων.



Εικόνα 45. Ενδεικτικές τιμές Cp και συγκεντρώσεων για το γονίδιο αναφοράς, όπως απεικονίζονται από το λογισμικό πρόγραμμα μετά το πέρας του πειράματος. Οι κόκκινες καμπύλες του διαγράμματος αντιστοιχούν στα δείγματα που εκφράζουν το γονίδιο και οι πράσινες σε αυτά που δεν το εκφράζουν. Αντιθέτως, η καφέ καμπύλη αντιστοιχεί σε δείγμα γνωστής συγκέντρωσης για το γονίδιο.

Η έκφραση του γονιδίου G6PD στα περισσότερα δείγματα των γυναικών ήταν σχετικά μικρή, ενώ σε πέντε από αυτά δεν βρέθηκε έκφραση ακόμη και μετά από επαναληπτικές προσπάθειες. Τα αριθμητικά αυτά δεδομένα υποδηλώνουν εν μέρει τη δυσκολία απομόνωσης γενετικού υλικού από ιστούς που έχουν εγκλειστεί σε κύβους παραφίνης και την ενδεχόμενη απώλεια έκφρασης γονιδίων με την πάροδο του χρόνου.

Πίνακας αποτελεσμάτων

Δείγμα	Έκφραση	Cp	Concentration
1	+	32.59	99
2	+	32.69	90
3	+	32.94	52
4	+	32.01	163
5	+	33.01	41
6	+	29.85	687
7	+	32.65	94
8	+	32.83	62
9	+	31.74	200
10	+	31.62	210
11	+	33.18	30
12	+	33.16	33
13	+	32.62	96
14	-		
15	-		
16	-		
17	-		
18	-		

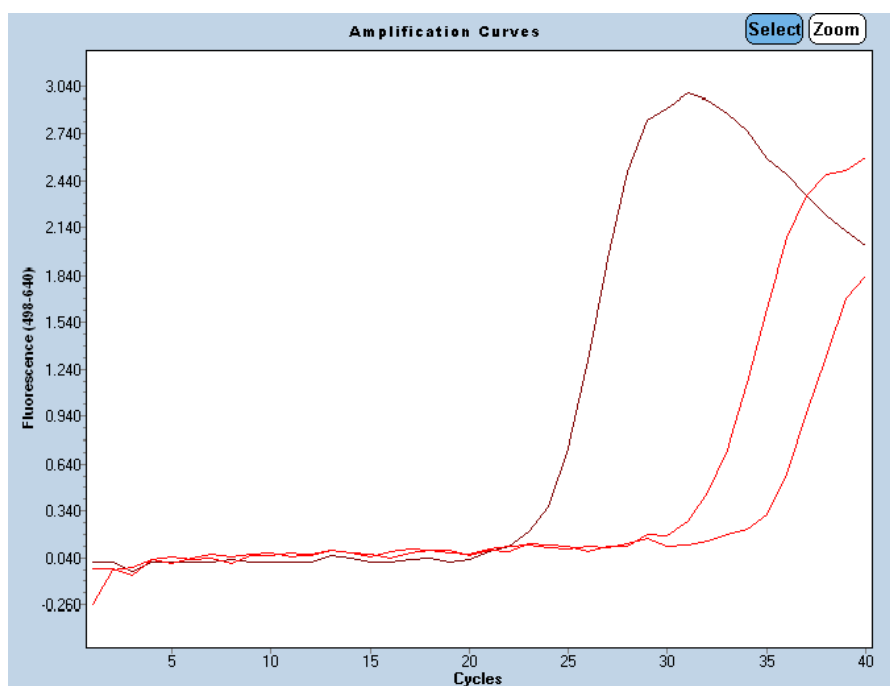
Στον πίνακα παρατηρούμε ότι τα τελευταία πέντε δείγματα δεν έδωσαν θετικό αποτέλεσμα στην Real-time PCR, που δηλώνει την απουσία γενετικού υλικού, εφόσον δεν εκφράζεται το γονίδιο αναφοράς. Πάρθηκε συνεπώς η απόφαση να μη διερευνηθεί η έκφραση ή όχι των υπό μελέτη γονιδίων σε αυτά τα δείγματα.

Η έκφραση του Oct-4

Τα 13 υπό μελέτη δείγματα κυττάρων του μαστού από γυναίκες ασθενείς με καλοήθεις παθήσεις ή καρκίνο, ηλικίας 41 έως 67 χρονών, έδειξαν θετική έκφραση για το γονίδιο Oct-4. Η έκφραση αυτή παρουσίασε διακυμάνσεις στο εύρος τιμών με χαμηλότερη τιμή τα 140 αντίγραφα και μεγαλύτερη αυτή των 2001 αντιγράφων.

Πίνακας αποτελεσμάτων

Δείγμα	Έκφραση	Cp	Concentration
1	+	32.00	166
2	+	31.02	241
3	+	31.78	194
4	+	30.84	290
5	+	30.05	500
6	+	29.72	751
7	+	32.17	140
8	+	30.30	382
9	+	29.02	900
10	+	28.55	2001
11	+	29.82	692
12	+	30.38	340
13	+	32.39	121



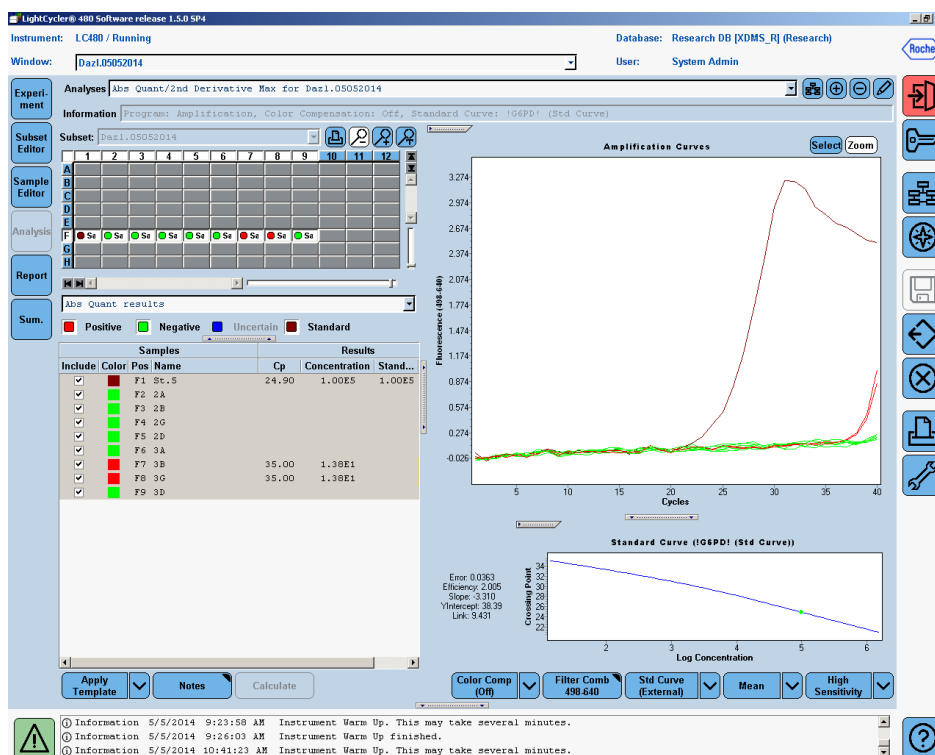
Εικόνα 44. Θετικές καμπύλες έκφρασης του γονιδίου Oct-4

Η έκφραση του Dazl

Στα 13 δείγματα που είχαμε από τις υπό μελέτη γυναίκες, ηλικίας από 41 έως 67 ετών, η έκφραση του γονιδίου διέφερε. Τα 9 δείγματα δεν παρουσίασαν έκφραση του γονιδίου Dazl, ενώ από στα υπόλοιπα 3 ανιχνεύτηκε ένα μικρό σήμα στους τελευταίους κύκλους, που υποδηλώνει ελάχιστα ανιχνεύσιμη έκφραση.

Πίνακας αποτελεσμάτων

Δείγμα	Έκφραση	Cp	Concentration καρκινώματος	Ιστολογικός τύπος
1	-			
2	-			
3	-			
4	-			
5	-			
6	+	35.00	10	διηθητικό πορογενές grade 2
7	-			
8	+	35.00	8	πορογενές grade 3
9	-			
10	+	35.00	5	διηθητικό πορογενές grade 2-3
11	-			
12	+	35.00	7	πορογενές in situ
13	-			



Εικόνα 46. Απεικόνιση των θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων από τα δείγματα μαστού από το λογισμικό πρόγραμμα της συσκευής LightCycler 480.

3.3 ΑΝΟΣΟΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ELISA

Παρακολούθηση της νόσου και έκφραση της ΑΜΗ

Μετά την παρέλευση μιας πενταετίας, ήρθαμε σε επικοινωνία με τις γυναίκες για να συλλέξουμε πληροφορίες σχετικά με την πορεία της νόσου. Από τις 18 υπό μελέτη γυναίκες, οι 3 απεβίωσαν σε αυτό το χρονικό διάστημα. Από αυτές τις γυναίκες, οι 2 είχαν εκδηλώσει διηθητικά πορογενή καρκινώματα του μαστού grade 2, ενώ η 3^η είχε μη διηθητικό πορογενές καρκίνωμα. Οι υπόλοιπες 14 γυναίκες είναι υγιείς έως και σήμερα και δεν εμφάνισαν καμιά υποτροπή της νόσου ύστερα από το χειρουργείο.

Πίνακας αποτελεσμάτων

Δείγμα	Ιστολογικός τύπος καρκινώματος	5ετής επιβίωση
1	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2	-
2	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2	√
3	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 3	√
4	Πορογενές in situ καρκίνωμα	√
5	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2	√
6	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2	-
7	Ινοαδένωμα	√
8	Πορογενές καρκίνωμα grade 3	√
9	Διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα grade 2	√
10	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2-3	√
11	Διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα grade 2	√
12	Πορογενές in situ καρκίνωμα grade 1	√
13	Ινοαδένωμα	√
14	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 1	√
15	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 3	√
16	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2	√
17	Πορογενές in situ καρκίνωμα grade 1	-
18	Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2	√

Επιπρόσθετα, ζητήθηκε από τις γυναίκες να παρευρεθούν στο μικροβιολογικό εργαστήριο για τη δειγματοληψία αίματος, ώστε να γίνει μέτρηση έκφρασης της Αντιμυλλέριου ορμόνης, Amh με τη μέθοδο της ενζυμικής ανοσοδοκιμασίας ELISA. Οι τιμές της AMH δεν παρουσιάζουν μεγάλη διακύμανση στα δείγματα των ασθενών και κυμαίνονται από 0,10 έως 0,20 ng/ml με μέσο όρο 0,13ng/ml.

Πίνακας αποτελεσμάτων

Δείγμα	Ιστολογικός τύπος καρκινώματος	Ηλικία	Συγκέντρωση ng/ml
1	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2	47	-
2	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2	47	0,12
3	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 3	43	0,11
4	Πορογενές in situ καρκίνωμα	51	0,13
5	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2	43	0,11
6	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2	54	-
7	Ινοαδένωμα	41	0,10
8	Πορογενές καρκίνωμα grade 3	50	0,14
9	Διθητικό λοβιακό καρκίνωμα grade 2	43	0,20
10	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2-3	45	0,13
11	Διθητικό λοβιακό καρκίνωμα grade 2	67	0,19
12	Πορογενές in situ καρκίνωμα grade 1	57	0,15
13	Ινοαδένωμα	20	0,12
14	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 1	66	0,10
15	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 3	61	0,10
16	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2	53	0,11
17	Πορογενές in situ καρκίνωμα grade 1	70	-
18	Διθητικό πορογενές καρκίνωμα grade 2	84	0,14

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Έκφραση των Oct-4 και Dazl στις καλοήθειες παθήσεις και σε καρκίνο του μαστού

Τις τελευταίες δεκαετίες η επιστημονική κοινότητα έχει επικεντρώσει το ενδιαφέρον της στα ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα, λόγω των μοναδικών τους ιδιοτήτων. Τα βλαστικά κύτταρα είναι ικανά να διαιρούνται συμμετρικά σε δυο θυγατρικά κύτταρα, από τα οποία το ένα είναι πανομοιότυπο με το μητρικό και διατηρεί το χαρακτηριστικό του αδιαφοροποίητου φαινοτύπου και το άλλο είναι ικανό να δώσει γένεση σε διαφοροποιημένου κυτταρικού τύπου απογόνους. Επίσης, εμφανίζουν πολυδυναμικότητα, δηλαδή μπορούν να παράγουν πληθυσμούς κυττάρων διαφορετικού τύπου, τα οποία όμως θα έχουν λειτουργική σύσταση σε ένα συγκεκριμένο ιστό.

Πολλές έρευνες που έχουν δημοσιευθεί έως σήμερα με υλικό τα βλαστικά κύτταρα προσπαθούν να εντοπίσουν διάφορους αντιγονικούς δείκτες και συγκεκριμένα γονίδια, η παρουσία και έκφραση των οποίων θα αποτελέσουν γενικά εργαλεία για την αναγνώριση και εντόπιση των βλαστικών κυττάρων σε οποιοδήποτε ανθρώπινο ιστό. Για παράδειγμα τα αρχέγονα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ταυτοποιούνται και χαρακτηρίζονται σήμερα με βάση την παρουσία των αντιγόνων Tra-160 και Tra-1-81 και των μορίων επιφάνειας SSEA3 και SSEA4.

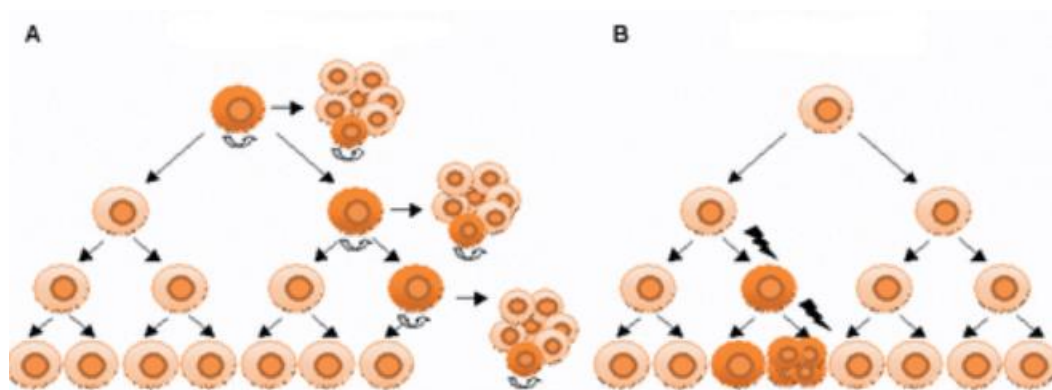
Σε διάφορες μελέτες, έχει αναφερθεί το γονίδιο Oct-4 ως πιθανός δείκτης της πολυδυναμικότητας των βλαστικών κυττάρων. Το γονίδιο Oct-4 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με δράση μεταγραφικού παράγοντα, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση πολλών άλλων γονιδίων στο κύτταρο. Μέσω σύνδεσης σε ένα χαρακτηριστικό οκταμερές μοτίβο βάσεων στο DNA του γονιδίου-στόχου και σε συνεργασία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες μπορεί να ενεργοποιεί ή να καταστέλλει τη λειτουργία του γονιδίου αυτού. Έχειδειχθεί, πως σε συνεργασία με τους παράγοντες Sox2 και Nanog δημιουργεί δραστικά σύμπλοκα και ενεργοποιεί συγκεκριμένα μονοπάτια σηματοδότησης με στόχο τη διατήρηση της πολυδυναμικότητας και της ικανότητας για αυτοανανέωση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Ο στόχος αυτός επιτυγχάνεται μέσω καταστολής των γονιδίων που οδηγούν σε διαφοροποίηση.

Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί το γονίδιο DAZL το οποίο αναφέρεται ως δείκτης των γεννητικών κυττάρων και πιθανόν των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Το γονίδιο DAZL κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη πρόσδεσης στο RNA, η οποία σταθεροποιεί και επάγει την έκφραση γονιδίων. Παίζει κεντρικό ρόλο στη γαμετογένεση και εκφράζεται τόσο στα

αρσενικά όσο και στα θηλυκά γεννητικά κύτταρα. Επίσης, έχει βρεθεί έκφραση του σε αδιαφοροποίητες σειρές ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων και εμβρυϊκών σωμάτων (Clark AT et al., 2004).

Στη συγκεκριμένη εργασία βασιστήκαμε στην ιδιότητα των Oct-4 και Dazl ως δείκτες των βλαστικών κυττάρων για να εντοπίσουμε και να μετρήσουμε ποσοτικά την έκφραση τους σε κύτταρα καλοηθών παθήσεων και καρκίνου του μαστού. Ανώτερος στόχος της αναζήτησης αυτής είναι η πιθανή υποστήριξη της «θεωρίας των καρκινικών βλαστικών κυττάρων». Επιστήμονες έχουν διατυπώσει την υπόθεση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων η οποία αναφέρει ότι οι κακοήθεις νεοπλασίες ξεκινούν κατά το μετασχηματισμό φυσιολογικών βλαστικών ή προγονικών κυττάρων. Αυτά τα «καρκινικά βλαστικά κύτταρα» αποκλίνουν από την κανονική εξέλιξη της διαφοροποίησης και μεταμορφώνονται σε κύτταρα όγκου, τα οποία εκθέτουν ένα μεγάλο εύρος από εμβρυϊκούς έως διαφοροποιημένους φαινοτύπους. Η θεωρία αυτή προτάθηκε πρώτη φορά από τον Tai και τους συνεργάτες του το 2005.

Σήμερα, ως «καρκινικό βλαστικό κύτταρο» ορίζεται ένα κύτταρο εντός του καρκινικού όγκου, το οποίο χαρακτηρίζεται από απεριόριστο δυναμικό πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης σε ετερογενείς σειρές καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο, η προέλευση του δεν συμπεριλαμβάνεται στον ορισμό, εφόσον υποθετικά είναι δυνατόν να έχει προέλθει από βλαστικό, προγονικό ή υπάρχον διαφοροποιημένο κύτταρο ενήλικου ιστού (Charles A. & Goldthwaire Jr, 2011).



Εικόνα 47. Υποθέσεις καρκινογένεσης. Α. Ο καρκινικό όγκος προέρχεται από ένα καρκινικό βλαστικό κύτταρο (σκούρο χρώμα) το οποίο προσελκύει ταυτόχρονα περισσότερα κύτταρα δημιουργώντας έτσι έναν όγκο. Β. Ένα βλαστικό κύτταρο υπόκειται μεταλλάξεις σε κάθε διαίρεση που το υποκινούν σε ανεξέλεγκτες κυτταρικές διαιρέσεις και το σχηματισμό καρκινικού όγκου. Στην πραγματικότητα και οι δυο υποθέσεις μπορεί να πραγματοποιούνται παράλληλα ή σε συνδυασμό (Gottschling S. et al., 2012).

Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν αρνητική έκφραση και των δυο γονιδίων με την μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας και θετική με τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου για το γονίδιο Oct-4 στο σύνολο των δειγμάτων και για το γονίδιο Dazl στο 31%.

Όσον αφορά την έκφραση του Oct-4 τα δείγματα καλοηθών παθήσεων του μαστού, που αφορούσαν γυναίκες ηλικίας 20 και 41 ετών με ινοαδένωμα, εμφάνισαν τη μικρότερη έκφραση. Λίγο παραπάνω από διπλάσια έκφραση παρατηρήθηκε στα δείγματα γυναικών με μη διηθητικά πορογενή καρκινώματα του μαστού. Στα δείγματα ασθενών με διηθητικά πορογενή καρκινώματα η έκφραση του Oct-4 εμφάνισε κάποια διακύμανση στο εύρος τιμών και ειδικότερα τα παλαιότερα δείγματα (βιοψίες χειρουργείων του 2007) έδειξαν μικρότερη έκφραση σε σύγκριση με τα νεότερα δείγματα (βιοψίες χειρουργείων του 2012). Τέλος, στα δείγματα διηθητικών λοβιακών καρκινωμάτων μετρήθηκε υψηλότερη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Oct-4 σε σύγκριση με τα ινοαδενώματα, τα μη διηθητικά πορογενή καρκινώματα και το 67% των διηθητικών πορογενών καρκινωμάτων του μαστού.

Αν και μικρό το συνολικό βιολογικό υλικό που μελετήθηκε (13 δείγματα) μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα πως όσο πιο κακοήθης είναι η πάθηση του μαστού τόσο αυξάνεται και η έκφραση του δείκτη βλαστικών κυττάρων Oct-4. Η έκφραση του παραμένει χαμηλή στις γυναίκες με καλοήθεις παθήσεις και υψηλή στις γυναίκες με διηθητικούς καρκίνους, υποδηλώνοντας πως τα καρκινικά κύτταρα καθώς διαιρούνται ανεξέλεγκτα πιθανόν να χρησιμοποιούν το χαρακτηριστικό του αδιαφοροποίητου φαινοτύπου που διαθέτουν τα βλαστικά κύτταρα, ως αποτέλεσμα λειτουργικής συνεργασίας των Oct-4, Sox2 και Nanog.

Τα ευρήματα της εργασίας είναι σύμφωνα με αυτά άλλων μελετών που έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα. Πριν από 3 χρόνια ο Shoullang Cai και οι συνεργάτες του εντόπισαν έκφραση του Oct-4 σε ιστούς καρκίνου του μαστού και ανίχνευσαν αντίστοιχες διαφορές έκφρασης. Παρατήρησαν χαμηλότερη έκφραση σε μη διηθητικούς καρκίνους και στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη σε διηθητικούς καρκίνους του μαστού grade III. Στη δημοσίευσή τους συσχέτισαν την υπερέκφραση του Oct-4 με την μεταστατική ικανότητα του καρκίνου και πρότειναν το Oct-4 ως έναν πιθανό προγνωστικό δείκτη μεταστάσεων.

Το 2016 μια ακόμη ερευνητική ομάδα δημοσίευσε τη υψηλή συσχέτιση μεταξύ καρκινογένεσης του μαστού και έκφρασης του Oct-4. Τα ευρήματα των Soheili, Asadi και Farsinejad συμφωνούν με αυτά της παρούσας εργασίας, καθώς δείχνουν υψηλότερη

έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα σε διηθητικά λοβιακά καρκινώματα από ότι στα πορογενή. Επίσης, αναφέρουν ότι δεν παρατήρησαν σημαντική διαφορά στην έκφραση μεταξύ των διηθητικών πορογενών καρκινωμάτων διαφορετικών βαθμών (grade I-III).

Έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Oct-4 έχει ανιχνευθεί και σε άλλα είδη καρκίνου, όπως σε όγκους τραχήλου της μήτρας (Wang et al., 2013), σεμινώματα όρχεων (Grande et al., 2019), όγκους μελανώματος (Kumar et al., 2012), καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Atlasi et al., 2007) και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές παγκρέατος (Tai et al., 2005). Ενισχύεται λοιπόν συνεχώς η υπόθεση ότι ο καρκίνος μπορεί να προέρχεται από βλαστικά κύτταρα τα οποία εκφράζουν το γονίδιο του μεταγραφικού παράγοντα Oct-4.

Κατά τη μελέτη έκφρασης του γονιδίου Dazl τα αποτελέσματα των δυο εργαστηριακών μεθόδων συμφωνούν κατά 69% όσον αφορά την αρνητική χρώση και μη ποσοτική ανίχνευση. Δε βρέθηκε έκφραση του στις καλοήθεις παθήσεις του μαστού και στα διηθητικά λοβιακά καρκινώματα του μαστού. Ωστόσο, ανιχνεύτηκε με τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο μια ελάχιστη έκφραση στο 66% των δειγμάτων γυναικών με μη διηθητικά πορογενή καρκινώματα (in situ) και στο 33% των δειγμάτων από βιοψίες διηθητικών πορογενών καρκινωμάτων μαστού.

Η ελάχιστη έκφραση που εντοπίστηκε στα πορογενή καρκινώματα του μαστού μπορεί να εξηγηθεί κοιτώντας γενικά την προέλευση τους. Τα πορογενή καρκινώματα προέρχονται από κύτταρα των πόρων του μαστού, τα οποία πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα. Πρόκειται λοιπόν για ανωμαλία στα κύτταρα που μεταφέρουν το γάλα. Αντιθέτως, λοβιακά καρκινώματα ονομάζονται εκείνα που προέρχονται από υπέρμετρο πολλαπλασιασμό των κυττάρων των αδενικών λοβίων των μαστών, τα οποία παράγουν το γάλα. Σε αντίθεση το ινοαδένωμα εντάσσεται στις καλοήθεις παθήσεις του μαστού διότι οφείλεται στην πάχυνση των κυττάρων του μαστού σε κάποια περιοχή του και όχι σε μη ελεγχόμενο πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Φαίνεται λοιπόν, πως το γονίδιο του Dazl εκφράζεται σε εστιασμένα ανατομικά σημεία του μαστού και ότι σχετίζεται με τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό που οδηγεί στην καρκινογένεση.

Ο Ezeh και οι συνεργάτες του το 2005 απέδειξαν σε μελέτη τους, ότι το γονίδιο Dazl δεν εκφράζεται τόσο σε φυσιολογικά δείγματα μαστού όσο και σε δείγματα καρκίνου του μαστού με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Εντόπισαν όμως υψηλή έκφραση του γονιδίου σε δείγματα σεμινωμάτων, καρκίνου των όρχεων, με υψηλή συνέκφραση των γονιδίων Nanog και Oct-4, που αποτελούν δείκτες βλαστικών κυττάρων. Επίσης, εντόπισαν

έκφραση των γονιδίων Oct-4, Stellar και GDF3 σε δείγματα καρκίνου του μαστού και πρότειναν πως τα ευρήματα τους αποδεικνύουν την ύπαρξη πολυδυναμικότητας και βλαστικών κυττάρων σε καρκινικούς όγκους.

Μελέτη του 2014 από τον Στεφανίδη και την ερευνητική του ομάδα δεν έδειξε έκφραση του γονιδίου Dazl σε καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας, αλλά σε παλαιότερη έρευνα τους το 2008 εντόπισαν έκφραση με την τεχνική της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο σε κύτταρα της καρκινικής σειράς HeLa (πρότυπη ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά τραχήλου μήτρας). Παρατηρείται λοιπόν, μια διαφοροποίηση στην έκφραση του γονιδίου που σχετίζεται πιθανόν με μορφολογικά και ανοσοφαινοτυπικά χαρακτηριστικά του καρκινώματος. Αυτά τα αντιφατικά αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και στην παρούσα εργασία σε δείγματα διηθητικών και μη πορογενών καρκινωμάτων του μαστού θέτοντας απαραίτητη περαιτέρω μελέτη.

Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί με ανοσοφθορισμό με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης DAZL έκφραση του σε άλλους καρκινικούς τύπους, ενώ δεν υπάρχει στους φυσιολογικούς ιστούς, με εξαίρεση τους όρχεις. Σε δείγματα καρκίνου παχέους εντέρου, ωοθηκών, ενδομητρίου, στομάχου και παγκρέατος το επίπεδο χρώσης είναι υψηλό ενώ σε δείγματα καρκίνου των πνευμόνων, του προστάτη, των νεφρών και στο κακοήθες μελάνωμα είναι μέτριο (Uhlen M. et al., 2005).

Σε αυτό το σημείο, είναι αναγκαίο να αναφερθεί ότι η ελάχιστη ανιχνεύσιμη ποσότητα έκφρασης του γονιδίου Dazl μετρήθηκε σε δείγματα διηθητικών και μη πορογενών καρκινωμάτων του μαστού που είχαν ληφθεί και εγκλεισθεί σε κύβους παραφίνης τις χρονιές 2012 και 2013. Εν αντιθέσει, τα υπόλοιπα δείγματα με αρνητικά αποτελέσματα είχαν ληφθεί τις χρονιές 2007 και 2008. Γίνεται αντιληπτό ότι η παρέλευση μεγάλου χρονικού διαστήματος από την μονιμοποίηση του βιολογικού υλικού μέχρι την μελέτη έκφρασης γονιδίων με τη μέθοδο ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου πιθανόν να επηρεάζει τα αποτελέσματα. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες, όπως αυτή της Cronin και των συνεργατών της. Κατά τη μελέτη τους παρατήρησαν μέσω ηλεκτροφόρησης ότι από δείγματα καρκίνου του μαστού που είχαν εγκλειστεί σε κύβους παραφίνης πριν από περίπου 1 χρόνο ήταν εφικτή η απομόνωση RNAs μεγαλύτερου μήκους σε σύγκριση με δείγματα που είχαν αρχειοθετηθεί 6 έως 17 χρόνια πριν. Στα παλαιότερα δείγματα ανίχνευσαν περισσότερα θραύσματα μορίων RNAs μήκους 200 και λιγότερων βάσεων, υποδηλώνοντας πως ο θρυμματισμός των μαστικών ιστών συνεχίζεται και μετά την

αφυδάτωση και τη μονιμοποίηση. Ο θρυμματισμός των μορίων RNA μπορεί να οδηγήσει σε μη ανίχνευση έκφρασης των γονιδίων, καθώς είναι πιθανόν να έχει «κοπεί» η αλληλουχία αναγνώρισης του χρησιμοποιημένου εκκινητή. Κατά συνέπεια, ο εκκινητής κατά τη διάρκεια των κύκλων αντίδρασης της μεθόδου αδυνατεί να δεσμευτεί συμπληρωματικά στην αλληλουχία που αναζητεί και ενώ εκφράζεται φυσιολογικά το γονίδιο στο δείγμα το αποτέλεσμα να βγαίνει αρνητικό. Προκύπτουν λοιπόν νέα ερωτήματα, τα οποία οδηγούν σε νέες ιδέες για μελέτη, όπως η αναζήτηση της έκφρασης του γονιδίου Dazl σε νωπά δείγματα καρκίνου του μαστού άμεσα μετά την παραλαβή τους από το χειρουργείο.

Εν κατακλείδι, η «θεωρία των καρκινικών βλαστικών κυττάρων» παραμένει ακόμη αμφιλεγόμενη, εφόσον δεν αποδεικνύει ότι κάθε τύπος καρκίνου προκαλείται πάντα από βλαστικά κύτταρα και για αυτό αποτελεί ένα νέο παράθυρο στην έρευνα του καρκίνου. Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για την εξακρίβωση της ύπαρξης «καρκινικών βλαστικών κυττάρων» και το χαρακτηρισμό των ιδιοτήτων τους, ώστε να μας βοηθήσουν να κατανοήσουμε με πολύ καλύτερο τρόπο τη γέννηση και την εξέλιξη του καρκίνου. Επίσης, ο χαρακτηρισμός των «καρκινικών βλαστικών κυττάρων» θα παίξει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη νέων στοχευμένων θεραπευτικών μεθόδων που θα αποβλέπουν στην εξάλειψη των πιο επικίνδυνων καρκινικών κυττάρων, τα οποία προβάλλουν αντίσταση στην τώρα θεραπεία με χημειοθεραπεία. Φαίνεται λοιπόν, πως δεν υπάρχει μια απλή απάντηση στο ερώτημα για το αν τα βλαστικά κύτταρα είναι υπεύθυνα για τον καρκίνο.

Ανοσοϊστοχημεία - Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο

Ο εντοπισμός και η ακριβής μέτρηση έκφρασης των γονιδίων Oct-4 και Dazl είναι απαραίτητα για την ενδεικτική εύρεση ύπαρξης βλαστικών κυττάρων σε καλοήθειες και κακοήθειες ανθρώπινους ιστούς με ανώτερο στόχο την πλήρη κατανόηση των μηχανισμών καρκινογένεσης και τη δημιουργία στοχευμένων στρατηγικών θεραπειάς. Για το λόγο αυτό είναι επιθυμητό να συγκριθούν νέες μεθοδολογίες ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των γονιδίων αυτών με τις ήδη υπάρχουσες. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε σύγκριση δυο πολύ βασικών εργαστηριακών μεθόδων, της ανοσοϊστοχημείας (Immunohistochemistry, IHC) και της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time Polymerase Chain Reaction, PCR).

Η ανοσοϊστοχημεία αποτελεί την παλαιότερη από τις δυο μεθόδους που συγκρίθηκαν στην εργασία και αποτελεί μια κλασσική μέθοδο ανίχνευσης γονιδιακής έκφρασης που χρησιμοποιείται ευρέως σε διαγνωστικά εργαστήρια παρά τα μειονεκτήματά της, συμπεριλαμβανομένου το ευρύ φάσμα ευαισθησίας αναλόγως την πειραματική πορεία, την εξαρτώμενη αποτελεσματικότητα από τις συνθήκες μονιμοποίησης και τη μη δυνατότητα ποσοτικοποίησης με βάση βαθμονομημένη κλίμακα. Αντιθέτως, η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο υπερσχύει με πολλά πλεονεκτήματα, όπως είναι η υψηλή επαναληψιμότητα και ευαισθησία, η ποσοτικοποίηση έκφρασης καθόλη τη διάρκεια της αντίδρασης και η ικανότητα ταυτόχρονης πολλαπλής ανάλυσης, καθιστώντας την με όλα αυτά μια πολύ υποσχόμενη διαγνωστική μέθοδο.

Παρατηρώντας τα συνολικά πειραματικά αποτελέσματα της μελέτης και από τις δυο εργαστηριακές μεθόδους δεν βρέθηκε να ταυτίζονται. Συγκεκριμένα, διαφωνούν απόλυτα όσον αφορά την έκφραση του γονιδίου Oct-4, αφού δεν εντοπίστηκε έκφραση του με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας, αλλά ανιχνεύτηκε και μετρήθηκε ποσοτικά με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου στο σύνολο των υπό μελέτη δειγμάτων. Αντιθέτως, τα αποτελέσματα έκφρασης του Dazl συμφωνούν μεταξύ των δυο εργαστηριακών μεθόδων κατά 69% όσον αφορά τη μη ανιχνεύσιμη, αρνητική έκφραση του στο συνολικό δείγμα. Το υπόλοιπο 31% των αποτελεσμάτων διαφωνεί, καθώς ανιχνεύτηκε μια ελάχιστη έκφραση του Dazl σε δείγματα μαστού με τη μέθοδο της ποσοτικής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, αλλά δεν βρέθηκε αντίστοιχη έκφραση με την απεικονιστική μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας.

Πίνακας. Σύγκριση αποτελεσμάτων έκφρασης μεταξύ ανοσοϊστοχημείας (IHC) και της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR)

OCT-4	IHC +	IHC -
RT-PCR +	0	13
RT-PCR -	0	0
DAZL	IHC +	IHC -
RT-PCR +	0	4
RT-PCR -	0	9

Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό πως η χρήση θετικών και αρνητικών μαρτύρων από διαφορετικά είδη δειγμάτων αποτελεί απαραίτητο στοιχείο ποιοτικού έλεγχου και επιβεβαίωσης της λειτουργικότητας των αντιδραστηρίων σε κάθε εργαστηριακή μέθοδο. Το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκαν ορθά σε κάθε πειραματική διαδικασία της εργασίας και με τις δυο τεχνικές επιβεβαιώνει τη σημαντικότητα των προαναφερόμενων αποτελεσμάτων και την ευαισθησία των μεθόδων. Επίσης, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα θετικά αποτελέσματα έκφρασης γονιδίων με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου αποδεικνύουν τη δυνατότητα απομόνωσης γενετικού υλικού από δείγματα βιοψιών που είναι εγκλεισμένα σε κύβους παραφίνης. Η ποσοτικοποίηση μάλιστα της έκφρασης αυτής υποδηλώνει πως διατηρείται η υψηλή ευαισθησία της τεχνικής.

Σε πολλές ερευνητικές μελέτες τα αποτελέσματα έκφρασης μεταξύ των δυο μεθόδων σύγκρισης συμφωνούν μεταξύ τους. Ο Chang και οι συνεργάτες του μελέτησαν την έκφραση δεκάδων γονιδίων σε δείγματα από 97 γυναίκες με προχωρημένο καρκίνο του μαστού και κατέληξαν στο συμπέρασμα πως είτε με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας είτε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου, η ανίχνευση έκφρασης του γονιδίου υποδοχέων οιστρογόνου, ER ήταν ίδια σε όλα τα δείγματα. Επίσης, συμφωνούσαν κατά πολύ τα αποτελέσματα μελέτης των γονιδίων προγεστερικών υποδοχέων, PgR και του υποδοχέα του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα HER-2. Ωστόσο, αναφέρουν στη δημοσίευσή τους ότι υπήρχαν και δείγματα όπου η έκφραση ήταν θετική με τη μια μέθοδο και αρνητική με την άλλη, όπως και στην περίπτωση της παρούσας μελέτης.

Ο Cobleigh και οι συνεργάτες του απομόνωσαν RNA από 78 δείγματα γυναικών με κακοήθειες μαστού που ήταν εγκλεισμένα σε κύβους παραφίνης με σκοπό την ποσοτικοποίηση έκφρασης γονιδίων με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου και προχώρησαν σε σύγκριση των αποτελεσμάτων με αυτά που έλαβαν με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας. Αναφέρουν παρόμοια αποτελέσματα με την προαναφερόμενη εργασία όσον αφορά τα γονίδια ER και HER-2, αλλά δεν κατάφεραν να αποδείξουν κάποια συσχέτιση για το γονίδιο του αντιγόνου Ki-67. Αποτελεί λοιπόν μια εργασία που επιβεβαιώνει πως τα αποτελέσματα των δυο μεθόδων δεν συμφωνούν πάντα για κάθε υπό μελέτη γονίδιο, όπως στην περίπτωση των γονιδίων Oct-4 και Dazl.

Το 2014 ο Park και οι συνεργάτες του μελετώντας την έκφραση του γονιδίου HER-2 σε δείγματα μαστού επισήμαναν πως η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης μπορεί στο μέλλον να αποτελεί την πρώτη επιλογή τεχνικής διάγνωσης. Σε αντίθεση με την χρονοβόρα ανοσοϊστοχημεία, η χρήση ειδικών εκκινητών, οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί με συγκεκριμένες αλληλουχίες αναγνώρισης, αυξάνει ακόμη περισσότερο την ευαισθησία και εξειδίκευση της μεθόδου. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συμφωνούν με την παραπάνω πρόταση. Φαίνεται πως η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο μπορεί να ανιχνεύσει ακόμη και πολύ μικρές ποσότητες, όπως παρατηρήσαμε με την έκφραση των υπό μελέτη γονιδίων σε αντίθεση με την ανοσοϊστοχημεία.

Τόσο ο Chang στην προαναφερόμενη μελέτη όσο και η Mina με τους συνεργάτες της σε δημοσίευση το 2007 κάνουν αναφορά στη μεθοδολογία των ερευνών τους πως ήταν αδύνατο να απομονώσουν γενετικό υλικό από το σύνολο των υπό μελέτη δειγμάτων. Κατάφεραν να εξάγουν γενετικό υλικό για μελέτη έκφρασης γονιδίων με τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο από το 80% και 79% αντίστοιχα των κύβων παραφίνης που διέθεταν. Η αδυναμία απομόνωσης RNA παρατηρήθηκε και στην παρούσα εργασία, καθώς από τα 18 συνολικά δείγματα που μελετήθηκαν με ανοσοϊστοχημεία μόνο από τα 13 ήταν εφικτή, δηλαδή στο 72%. Τα ευρήματα αυτά τονίζουν πως είναι εφικτό να χρησιμοποιηθούν βιοψίες από κύβους παραφίνης ως βιολογικό υλικό για την διεξαγωγή ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο, αλλά η χρήση τους δεν είναι απόλυτα αποτελεσματική.

Συνοψίζοντας, κρίνεται απαραίτητο να πραγματοποιηθούν περισσότερες μελέτες σύγκρισης των δυο μεθόδων για την έκφραση των γονιδίων Oct-4 και Dazl, καθώς η υπάρχουσα σχετική βιβλιογραφία είναι ελάχιστη, ώστε να κριθεί αξιόπιστα αν ο συνδυασμός τους είναι δυνατόν να αποτελέσει μια αποτελεσματική στρατηγική στο μέλλον.

Παρακολούθηση της νόσου στην 5ετία και μέτρηση της ΑΜΗ

Η 5ετής επιβίωση είναι ένας στατιστικός όρος που αποτελεί ορόσημο για την ογκολογία. Οι ασθενείς που ζουν χωρίς υποτροπή ή μετάσταση της νόσου τους επί 5 χρόνια έπειτα από την αρχική διάγνωση και θεραπεία, έχουν πολλές πιθανότητες να ξεπεράσουν τον καρκίνο. Και όσο περισσότερα χρόνια περνούν τόσο πιο πιθανό είναι να μην υποτροπιάσουν. Η πενταετής επιβίωση για τον καρκίνο διαφέρει αναλόγως της εντόπισης της νόσου.

Σύμφωνα με τα τωρινά δεδομένα, το πενταετές ποσοστό επιβίωσης σε περιπτώσεις διάγνωσης καλοηθών παθήσεων και κακοηθών σε πρώιμο στάδιο φθάνει ως και το 95%, στοιχείο που υποδηλώνει πως οι παθήσεις του μαστού μπορούν να αντιμετωπιστούν επιτυχώς για την πλειονότητα των γυναικών που φροντίζουν να τον εντοπίσουν έγκαιρα, μέσω συχνών προληπτικών ελέγχων και ψηλάφησης του στήθους. Οι ασθενείς με μικρού μεγέθους όγκους που ανακαλύπτονται μαστογραφικά και έχουν θετικούς οιστρογονικούς και προγεστερονικούς υποδοχείς και καμία ένδειξη μασχαλιαίας επέκτασης πιθανότατα έχουν 5ετή επιβίωση μεγαλύτερη από 90%. Όταν οι μασχαλιαίοι λεμφαδένες είναι διηθημένοι από τον όγκο, τα ποσοστά επιβίωσης πέφτουν στο 40-50% στα 5 χρόνια και περίπου στο 25% στα 10 χρόνια.

Στη συγκεκριμένη εργασία για όλα τα είδη παθήσεων του μαστού που μελετήσαμε βρήκαμε κατά μέσο όρο 83% 5ετή επιβίωση, η οποία συμφωνεί με το 86% της υπάρχουσας παγκόσμιας βιβλιογραφίας. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε 100% επιβίωση χωρίς καμία υποτροπή της νόσου στις γυναίκες που είχαν καλοήθεις παθήσεις του μαστού σε νεαρή ηλικία (ινοαδενώματα, ηλικίες 20 και 41) και διηθητικά λοβιακά καρκινώματα μαστού grade 2. Το 25% των γυναικών που είχαν διαγνωσθεί με μη διηθητικά πορογενή καρκινώματα απεβίωσε και το 20% των γυναικών με διηθητικό πορογενές καρκίνωμα μαστού grade 2.

Πίνακας εκατοστιαίων αναλογιών 5ετής επιβίωσης στο συνολικό δείγμα της μελέτης ανά κατηγορία καλοηθών και κακοηθών παθήσεων του μαστού και συνολικά ανεξαρτήτως είδους πάθησης.

Τύπος πάθησης του μαστού	5ετή επιβίωση (%)
Ινοαδένωμα	100
Μη διηθητικό πορογενές	75
Διηθητικό πορογενές	80
Διηθητικό λοβιακό	100
Συνολικά	83

Μελέτη του 2010 στην Ογκολογική Κλινική του 6ου Νοσοκομείου ΙΚΑ Αθηνών διαπίστωσε ότι η πενταετής επιβίωση σε μη διηθητικούς τύπους καρκινώματων του μαστού που χειρουργήθηκαν εκεί, κυμαίνεται στο 98%, ενώ εάν επεκτείνεται στους περιοχικούς λεμφαδένες, η 5ετής σχετική επιβίωση είναι 84%. Αναφέρουν ακόμη πως ακόμα και αν ο καρκίνος του μαστού διαγνωσθεί σε ένα προχωρημένο στάδιο, οι σύγχρονες μέθοδοι αντιμετώπισης και θεραπείας δίνουν την δυνατότητα σε πολλές/πολλούς ασθενείς να έχουν ποιότητα ζωής παρόμοια με αυτήν που είχαν πριν την διάγνωση της πάθησης τους. Τα εκατοστιαία ευρήματα αυτά φαίνεται να μην συμφωνούν με αυτά της παρούσας εργασίας που αφορούν γυναίκες που αντιμετωπίστηκαν χειρουργικά στο Μητροπολίτικο Θεραπευτήριο ΠΕΡΣΕΥΣ, Metropolitan Hospital στην Αθήνα. Η διαφωνία αυτή πιθανόν να οφείλεται στις διαφορετικές θεραπείες που επιλέχθηκαν για την αντιμετώπιση της κάθε πάθησης.

Το 100% επιβίωσης των υπό μελέτη γυναικών με διηθητικά λοβιακά καρκινώματα του μαστού δεν πρέπει να εφησυχάζει. Ο καρκίνος του μαστού δε θεωρείται πάντα ότι έχει θεραπευτεί καθώς το ποσοστό των υποτροπών συνεχίζει να αυξάνει αθροιστικά μέσα στα 10 χρόνια μετά τη διάγνωση. Συνεπώς είναι απαραίτητος ο έλεγχος των γυναικών και στην 10ετία ανεξάρτητα από το είδος της πάθησης μαστού κατά τη διάγνωση και την 5ετη έκβαση. Από τα δείγματα της εργασίας θα μπορούσε να εξαχθεί αποτέλεσμα 10ετής επιβίωσης για τις γυναίκες που χειρουργήθηκαν τις χρονιές 2007, 2008 και 2009. Πρόκειται για 6 γυναίκες από τις οποίες απεβίωσε μια που είχε διαγνωσθεί με διηθητικό πορογενές καρκινώμα του μαστού grade 2, δηλαδή το ποσοστό 10ετης επιβίωσης κυμαίνεται στο 83%. Ωστόσο, το δείγμα μελέτης είναι πολύ μικρό και τα αριθμητικά αυτά αποτελέσματα είναι απλά αναφορικά.

Τα τελευταία χρόνια, τα ποσοστά θανάτου από καλοήθεις και κακοήθεις παθήσεις του μαστού χαρακτηρίζονται από πτωτική τάση ειδικά στις γυναίκες κάτω των 50 ετών. Η πτώση αυτή αποδίδεται στην έγκαιρη διάγνωση μέσω μαστογραφιών καθώς και στις βελτιώσεις που έχουν επέλθει στις σχετικές θεραπευτικές αγωγές με στοχευμένα φάρμακα, λόγω των συνεχόμενων νέων γνώσεων σχετικά με τα μοριακά χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων και τους μηχανισμούς καρκινογένεσης. Ο αριθμός των ατόμων που έχουν αντιμετωπίσει με επιτυχία παθήσεις του μαστού αυξάνεται συνεχώς, όπως καταγράφεται και στις ΗΠΑ, όπου από τον Ιανουάριο του 2006 περίπου 2,5 εκατομμύρια γυναίκες έχουν ξεπεράσει με επιτυχία την περιπέτεια του καρκίνου του μαστού. Η ελεύθερη νόσου 5ετης επιβίωση επιβεβαιώνεται και από τα ευρήματα της εργασίας σε γυναίκες της Ελλάδας και αποδεικνύει την αποτελεσματικότητα των νέων θεραπειών με στόχο αφενός την επιμήκυνση της ζωής και αφετέρου τη βελτίωση της ποιότητάς της.

Ωστόσο, η επιβίωση κάθε ασθενούς και η ποιότητα ζωής του αποτελεί εν μέρει και προσωπική υπόθεση καθώς επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Προτείνεται η αποφυγή καπνίσματος και κατανάλωσης αλκοόλ, η ισορροπημένη διατροφή και η ήπια άσκηση. Αν δεν προσέχει ο ίδιος ο ασθενής και δεν παρευρίσκεται στον απαραίτητο τακτικό έλεγχο σε εξειδικευμένους ιατρούς οι πιθανότητες εμφάνισης υποτροπιάζουσας νόσου και θανατηφόρων μεταστάσεων αυξάνονται. Στους τακτικούς ελέγχους περιλαμβάνονται τόσο απεικονιστικές εξετάσεις, όπως η μαστογραφία ή/και το υπερηχογράφημα όσο και εξετάσεις αίματος. Στις εξετάσεις αίματος μελετώνται διάφοροι ορμονικοί δείκτες, καθώς φαίνεται ότι η χημειοθεραπεία και η ορμονοθεραπεία για την αντιμετώπιση των παθήσεων του μαστού έχουν μακροπρόθεσμες συνέπειες.

Η πλειοψηφία των ερευνών που έχουν δημοσιευθεί έως σήμερα παγκοσμίως προσπαθούν να προσδιορίσουν διάφορους ορμονικούς δείκτες, οι οποίοι θα αποτελέσουν εργαλεία για την εκτίμηση του κινδύνου επανεμφάνισης της νόσου, αλλά και την επίτευξη μιας καλύτερης μετεγχειρητικής ποιότητας ζωής του ατόμου. Καθώς οι παθήσεις του μαστού επηρεάζουν κυρίως το γυναικείο πληθυσμό, ένα μεγάλο κομμάτι της έρευνας στρέφεται στη μελέτη ορμονών που προσδιορίζουν την ωθητική λειτουργία και κατά συνέπεια την αναπαραγωγική ικανότητα. Για παράδειγμα οι μετρήσεις της θυλακιοτρόπου ορμόνη FSH, της ινχιμπίνης Β, της οιστραδιόλη Ε2 και του αριθμού των ωοθυλακίων με άντρο AFC αντικατοπτρίζουν το ωθητικό απόθεμα και την διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής μιας γυναίκας.

Την τελευταία δεκαετία, η έρευνα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της και στη μελέτη της Αντιμυλλέριου ορμόνης AMH, μιας διμερή γλυκοπρωτεΐνης. Η AMH έγινε αρχικά γνωστή για το ρόλο της στη διαφοροποίηση του ανδρικού φύλου εκφραζόμενη στα εμβρυϊκά κύτταρα Sertoli του όρχεως, όπου επάγει την υποστροφή των πόρων του Müller επιτρέποντας στην ανδρική αναπαραγωγική οδό να εξελιχθεί κάτω από την επίδραση της τεστοστερόνης. Απουσία της AMH, οι πόροι του Müller εξελίσσονται σε μήτρα, σάλπιγγες και στο ανώτερο τμήμα του κόλπου. Μετέπειτα, η αντιμυλλέριος ορμόνη παράγεται από τα κοκκώδη κύτταρα των μικρών αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων ενός θήλεος ατόμου και η παραγωγή της διαφέρει αναλόγως του σταδίου ωοθυλακικής ανάπτυξης. Αποτελεί έτσι ένα αξιόπιστο ποσοτικό δείκτη του ωθητικού αποθέματος και χρησιμοποιείται ευρέως ως προγνωστικός δείκτης της ποσοτικής ωθητικής απάντησης σε ορμονικές θεραπείες.

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τα επίπεδα της αντιμυλλέριου ορμόνης στον ορό αίματος των γυναικών υπό μελέτη στα πλαίσια παρακολούθησης της 5ετής επιβίωσης μετά τη χειρουργική αφαίρεση. Από τα αποτελέσματα της έρευνας δεν προέκυψε κάποια σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση της AMH στις γυναίκες που είχαν διαγνωσθεί και χειρουργηθεί για καλοήθεις παθήσεις του μαστού ή καρκίνο του μαστού. Οι φυσιολογικές τιμές της αντιμυλλέριου ορμόνης για γυναίκες άνω των 40 ετών κυμαίνονται μεταξύ 0,02 και 4,2 ng/ml με τη μέθοδο ELISA και <0,3 ng/ml μετά την εμμηνόπαυση. Ανεξαρτήτου διάγνωσης, οι τιμές της AMH στις γυναίκες υπό μελέτη κυμαίνονταν μεταξύ 0,10 και 0,20 ng/ml, οι οποίες εντάσσονται εντός των προαναφερόμενων φυσιολογικών τιμών.

Ελάχιστες έρευνες έως σήμερα έχουν μετρήσει τα επίπεδα της AMH κατά την παρακολούθηση των γυναικών έπειτα από 5 έτη από τη διάγνωση παθήσεων του μαστού και ίσως για αυτό το προαναφερομένο εύρημα της μελέτης μας δεν είναι σύμφωνο με εκείνα άλλων ερευνών που έχουν δημοσιευθεί έως σήμερα.

Η Η. Irene Su με τους συνεργάτες της μελέτησαν τα επίπεδα της AMH σε 127 ασθενείς μεγαλύτερης αναπαραγωγικής ηλικίας με καρκίνο του μαστού. Ο μέσος ηλικιακός όρος ήταν τα 43,2 χρόνια και η μέτρηση της AMH έγινε εντός 1-4 ετών μετά τη χειρουργική επέμβαση και χημειοθεραπεία. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι τιμές της AMH στον ορό αίματος των γυναικών με ιστορικό καρκίνου μαστού ήταν χαμηλότερες σε σύγκριση με φυσιολογικές γυναίκες ίδιας ηλικίας και συσχετίστηκαν με μειωμένη ωοθηκική λειτουργία και αμηνόρροια. Στα ίδια συμπεράσματα κατέληξε η Kim HA με την ερευνητική της ομάδα και στις δυο δημοσιεύσεις τους το 2016 και 2018, όπου μελέτησαν τα επίπεδα της AMH λίγους μήνες μετά την αντιμετώπιση του καρκίνου μαστού σε γυναίκες μέσης ηλικίας.

Το 2017 ο Freour και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν μια ανασκόπηση 121 ερευνών με θέμα την έκφραση της αντιμυλλέριου ορμόνης σε γυναίκες που είχαν διαγνωσθεί με καρκίνο του μαστού. Σε 8 έρευνες υπήρχαν δεδομένα για τις τιμές της AMH μετά την παρέλευση 5 ετών από τη χειρουργική αφαίρεση. Σε όλες αναφέρονταν πολύ χαμηλά και σταθερά επίπεδα της AMH που φαίνεται να συμφωνούν με τις χαμηλές τιμές της δικής μας μελέτης.

Στην εργασία μας, υπήρχε και μια ασθενής που είχε διαγνωσθεί με ινοαδένωμα ηλικίας 20 ετών, η οποία παρουσίασε χαμηλότερη τιμή (0,12) σε σύγκριση με τις τιμές αναφοράς ηλικιακά (0.9-11.5). Αν και αποτελεί τη μοναδική νεαρή γυναίκα υπό μελέτη επιβεβαιώνει την άποψη άλλων μελετών. Σύμφωνα με τα ευρήματα της μελέτης του Morarji K. και των

συνεργατών του το 2017, οι νεαρής ηλικίας επιζώντες γυναίκες από παθήσεις του μαστού εμφανίζουν χαμηλές τιμές ορού AMH οι οποίες είναι ισοδύναμες με τιμές γυναικών μεγαλύτερης ηλικία (+12 ετών) φυσιολογικού πληθυσμού. Έτσι, επιβεβαιώνεται πως η AMH μειώνεται ραγδαία μετά τη χειρουργική αντιμετώπιση των καλοήθων παθήσεων του μαστού και υποδεικνύει ένα χαμηλό ωοθηκικό απόθεμα σε αναπαραγωγική ηλικία.

Συμπερασματικά, στη δική μας ανάλυση δε μπορέσαμε να επιβεβαιώσουμε τη σχέση χαμηλότερων τιμών AMH σε γυναίκες μεγαλύτερης αναπαραγωγικής ηλικίας γεγονός που ίσως να οφείλεται στο μικρό αριθμό γυναικών που μελετήθηκαν (15) σε σύγκριση με τους αριθμούς των υπόλοιπων ερευνών. Σε αντίθεση, επιβεβαιώθηκε στη νεαρή γυναίκα με ινοαδένωμα και έτσι μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η ωοθηκική λειτουργία σε νεαρές γυναίκες επηρεάζεται από το ιστορικό παθήσεων του μαστού σύμφωνα με τα επίπεδα της αντιμυλλέριου ορμόνης.

Τέλος, έρευνες αναφέρουν πως τα υψηλότερα επίπεδα της AMH είναι δυνατόν να σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο επανεμφάνισης καρκίνου του μαστού στο μέλλον σε επιζώντες γυναίκες. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της έρευνας όντως οι γυναίκες που επιβίωσαν 5 χρόνια μετά τη χειρουργική επέμβαση χωρίς υποτροπή ή μετάσταση της νόσου εμφάνισαν χαμηλές τιμές της αντιμυλλέριου ορμόνης. Ωστόσο, κρίνεται απαραίτητο να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό μετρήσεων ώστε να εξαχθεί ένα στατιστικά σημαντικό συμπέρασμα της κλινικής συσχέτισης της με την πορεία της νόσου.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- I. Οι γυναίκες με καλοήθους πάθηση των μαστών και συγκεκριμένα ινοαδένωμα αφορούσαν τις νεότερες υπό μελέτη ασθενείς και φαίνεται να έχουν τη μικρότερη έκφραση της πρωτεΐνης Oct-4 με τη μέθοδο της Real-time PCR και να μην εκφράζουν καθόλου το γονίδιο της Dazl πρωτεΐνης σε οποιαδήποτε μέθοδο. Συνεπώς, επιβεβαιώνεται η συσχέτιση των καλοηθών παθήσεων με την μικρότερη ηλικία εμφάνισης και εν μέρει η θεωρία της έκφρασης των γονιδίων με την καρκινογένεση και όχι με προκαρκινικές, καλοήθεις καταστάσεις.
- II. Ασθενείς με μη διηθητικά πορογενή καρκινώματα παρουσιάζουν με τη μέθοδο της Real-time qPCR μέτρια έκφραση της πρωτεΐνης Oct-4 σε σύγκριση με τα διηθητικά πορογενή καρκινώματα και μικρότερη έκφραση από τα διηθητικά λοβιακά καρκινώματα. Επίσης, τα 2 από τα 3 δείγματα που μελετήθηκαν με την ίδια τεχνική ως προς την έκφραση του Dazl έδωσαν μια θετική ελάχιστη ανιχνεύσιμη τιμή. Η παρουσία των γονιδίων Oct-4 και Dazl δηλώνει την ύπαρξη βλαστικών κυττάρων στα ενδοπορικά καρκινώματα.
- III. Όλες οι γυναίκες με διηθητικά πορογενή καρκινώματα grade 2 ή 3 έδωσαν θετικά αποτελέσματα έκφρασης Oct-4 με την Real-time PCR. Ωστόσο, η έκφραση αυτή εμφάνισε μικρές διακυμάνσεις στις τιμές, οι οποίες πιθανόν να σχετίζονται με την ημερομηνία δειγματοληψίας, καθώς οι μικρότερες τιμές έκφρασης προέρχονταν από δείγματα του 2007, ενώ οι υψηλότερες από δείγματα γυναικών που χειρουργήθηκαν το 2012. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η παρέλευση χρόνου σε δείγματα κύβων παραφίνης είναι πιθανόν να επηρεάσει τη μελέτη έκφρασης γονιδίων. Επίσης, το 1/3 των υπό μελέτη δειγμάτων έδωσε ελάχιστη ανιχνεύσιμη έκφραση Dazl.
- IV. Η μελέτη δειγμάτων από γυναίκες που έπασχαν από διηθητικά λοβιακά καρκινώματα grade 2 έδειξε αρνητική έκφραση Dazl και με τις δυο τεχνικές και θετική έκφραση Oct-4 με την τεχνική της Real-time PCR. Ειδικότερα, ανιχνεύθηκε πολύ μεγαλύτερη έκφραση σε σύγκριση με τα ινοαδενώματα και τα μη διηθητικά πορογενή καρκινώματα και υψηλότερη από το 67% των δειγμάτων που αφορούσαν διηθητικά πορογενή καρκινώματα. Εξάγεται το συμπέρασμα ότι το γονίδιο Oct-4 εκφράζεται περισσότερο στα καρκινικά κύτταρα των αδενικών λοβίων από ότι στους πόρους των μαστών.
- V. Στην παρούσα εργασία τα αποτελέσματα από την ανίχνευση έκφρασης των γονιδίων Oct-4 και Dazl με τη μέθοδο αυτόματων χρώσεων ανοσοϊστοχημείας μέσω του μηχανήματος Benchmark ULTRA VENTANA δεν συμφωνούν απόλυτα με τα αντίστοιχα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν με τη μέθοδο της real-time PCR,

χρησιμοποιώντας το μηχάνημα LightCycler 480 της ίδιας εταιρείας. Κατά συνέπεια, ο συνδυασμός αυτών των δυο εργαστηριακών μεθόδων με στόχο τον προσδιορισμό έκφρασης των γονιδίων Oct-4 και Dazl σε δείγματα καλοήθων παθήσεων και καρκίνου του μαστού φαίνεται να μην αποτελεί μια αποδοτική στρατηγική και κρίνεται απαραίτητη περαιτέρω μελέτη. Ωστόσο, η μέθοδος qPCR φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητη από την ανοσοιστοχημεία για την ανίχνευση των συγκεκριμένων γονιδίων.

- VI. Το 83% των γυναικών που συμμετείχαν στη μελέτη επιβίωσαν στην πενταετία μετά τη χειρουργική αφαίρεση χωρίς να εμφανίσουν κάποια υποτροπή της νόσου ή μεταστάσεις καρκίνου. Το μικρό ποσοστό θανάτου αποδίδεται στις βελτιώσεις που έχουν επέλθει στις σχετικές θεραπευτικές αγωγές τα τελευταία χρόνια λόγω της τεχνολογικής εξέλιξης.
- VII. Οι τιμές της Αντιμυλλέριου ορμόνης δεν παρουσιάζουν μεγάλη διακύμανση στα δείγματα των ασθενών και κυμαίνονται εντός φυσιολογικών τιμών για γυναίκες άνω των 40 ετών και μετά την εμμηνόπαυση. Ωστόσο, η ασθενής που είχε διαγνωσθεί με ινοαδένωμα ηλικίας 20 ετών παρουσιάζει χαμηλότερη τιμή (0,12) σε σύγκριση με τις τιμές αναφοράς ηλικιακά (0.9-11.5). Αν και αποτελεί τη μοναδική νεαρή γυναίκα υπό μελέτη επιβεβαιώνει πως η AMH μειώνεται ραγδαία μετά τη χειρουργική αντιμετώπιση των καλοήθων παθήσεων του μαστού και υποδεικνύει ένα χαμηλό ωθητικό απόθεμα σε αναπαραγωγική ηλικία.
- VIII. Τα χαμηλά επίπεδα της AMH σε συνδυασμό με την 5ετή καθαρή επιβίωση των γυναικών συμφωνούν με τα δεδομένα ερευνών που αναφέρουν πως τα υψηλότερα επίπεδα της AMH σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του μαστού.

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός:

Η μελέτη αυτή στοχεύει στην ανίχνευση παρουσίας και έκφρασης των γονιδίων Oct-4 και Dazl σε καλοήθεις παθήσεις και καρκινικούς όγκους του μαστού με τη χρήση δυο διαφορετικών εργαστηριακών μεθόδων. Επίσης, στοχεύει στον προσδιορισμό της διαγνωστικής αξίας της αντιμυλλέριου ορμόνης AMH σε συσχέτιση με την 5ετή επιβίωση χωρίς υποτροπές και μεταστάσεις μετά τη χειρουργική αφαίρεση.

Υλικό – Μέθοδος:

Τον πληθυσμό της μελέτης αποτέλεσαν 18 ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε χειρουργική επέμβαση ριζικής τροποποιημένης ή απλής μαστεκτομής ύστερα από διάγνωση καλοήθους παθήσεως ή καρκίνου του μαστού. Για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των γονιδίων Oct-4 και Dazl εκτελέστηκε τόσο η τεχνική της Real-time qPCR με το μηχάνημα LightCycler 480 όσο και η τεχνική της ανοσοϊστοχημείας με τη χρήση του μηχανήματος Benchmark ULTRA VENTANA, όπου πραγματοποιείται αυτόματη τεχνική χρώσεων. Τέλος, ο ορμονικός προσδιορισμός της AMH των δειγμάτων έγινε με τη χρήση της AMH Gen II Elisa.

Αποτελέσματα:

Η έκφραση και των δυο γονιδίων ήταν αρνητική με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας. Αντιθετικά με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο όλα τα δείγματα έδειξαν θετική έκφραση του γονιδίου Oct-4 και 4 στα 13 για το γονίδιο του Dazl. Το 83% των γυναικών που συμμετείχαν στη μελέτη επιβίωσαν στην πενταετία μετά τη χειρουργική αφαίρεση χωρίς να εμφανίσουν κάποια υποτροπή της νόσου ή μεταστάσεις καρκίνου και εμφάνισαν εκείνη την χρονική περίοδο χαμηλά επίπεδα της αντιμυλλέριου ορμόνης στον ορό αίματος τους.

Συμπεράσματα:

Η παρούσα εργασία έδειξε ότι δεν συμφωνούν μεταξύ τους τα αποτελέσματα των δυο εργαστηριακών μεθόδων με στόχο τον προσδιορισμό έκφρασης των γονιδίων Oct-4 και Dazl σε δείγματα καλοηθών παθήσεων και καρκίνου του μαστού. Ωστόσο, με τη μέθοδο της Real-time qPCR εντοπίστηκε μια ελάχιστη ανιχνεύσιμη έκφραση του γονιδίου Dazl και αποδείχθηκε μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου Oct-4 στα δείγματα διηθητικών λοβιακών

καρκινωμάτων grade 2 σε σύγκριση με τα ινοαδενώματα και τα μη διηθητικά πορογενή καρκινώματα και υψηλότερη από το 67% των δειγμάτων που αφορούσαν διηθητικά πορογενή καρκινώματα. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι το γονίδιο Oct-4 εκφράζεται περισσότερο στα καρκινικά κύτταρα και κυρίως των αδενικών λοβίων από ότι στους πόρους των μαστών υποδηλώνοντας πως τα καρκινικά κύτταρα καθώς διαιρούνται ανεξέλεγκτα πιθανόν να χρησιμοποιούν το χαρακτηριστικό του αδιαφοροποίητου φαινοτύπου που διαθέτουν τα βλαστικά κύτταρα, ως αποτέλεσμα λειτουργικής συνεργασίας των Oct-4, Sox2 και Nanog.

Η παρακολούθηση των γυναικών μετά από 5 έτη από τη χειρουργική μαστεκτομή επιβεβαίωσε την παγκόσμια βιβλιογραφία για τις βελτιώσεις που έχουν επέλθει στις θεραπευτικές αγωγές, καθώς 15 στις 18 γυναίκες δεν εκδήλωσαν κάποια υποτροπή της νόσου. Σε αντίθεση, οι μετρήσεις της αντιμυλλέριου ορμόνης μετά την 5ετή επιβίωση, εκτός από αυτή μιας ασθενής με ινοαδένωμα ηλικίας 20 ετών, κυμαίνονταν εντός των φυσιολογικών τιμών και έτσι δε μπορέσαμε να επιβεβαιώσουμε τα ευρήματα άλλων εργασιών που δηλώνουν χαμηλότερα επίπεδα και κατά συνέπεια μειωμένη ωοθηκική λειτουργία σε επιζώντες παθήσεων του μαστού.

7. SUMMARY

Purpose:

This study aims to detect the presence and expression of the Oct-4 and Dazl genes in benign diseases and cancerous breast tumors using two different laboratory methods. It also aims to determine the diagnostic value of anti-Müllerian hormone AMH in relation to 5-year recurrence-free and metastases-free survival after surgical removal.

Material – Method:

The study population consisted of 18 patients who had undergone radical modified or simple mastectomy surgery after a diagnosis of benign disease or breast cancer. For the detection and quantification of the Oct-4 and Dazl genes, both the Real-time qPCR technique with the LightCycler 480 machine and the immunohistochemistry technique using the Benchmark ULTRA VENTANA machine, where an automatic staining technique is performed, were performed. Finally, the hormonal determination of the AMH of the samples was done using the AMH Gen II Elisa.

Results:

The expression of both genes was negative by immunohistochemistry. Contrasted with the real-time polymerase chain reaction method all samples showed positive expression of the Oct-4 gene and 4 of 13 for the Dazl gene. 83% of the women in the study survived five years after surgical removal without developing any disease recurrence or cancer metastases, and during that time they had low levels of anti-Müllerian hormone in their blood serum.

Conclusions:

The present work showed that the results of the two laboratory methods aimed at determining the expression of the Oct-4 and Dazl genes in samples of benign diseases and breast cancer do not agree with each other. However, real-time qPCR detected a barely detectable expression of the Dazl gene and demonstrated a higher expression of the Oct-4 gene in grade 2 invasive lobular carcinoma samples compared to fibroadenomas and non-invasive lobular carcinomas and higher than 67 % of specimens involving invasive serous carcinomas. We therefore conclude that the Oct-4 gene is more expressed in cancer cells and mainly in glandular lobes than in breast ducts, suggesting that cancer cells, as they divide uncontrollably, may use the undifferentiated phenotype characteristic of stem cells, as a result of functional cooperation of Oct-4, Sox2 and Nanog.

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Anderson RA, Fulton N, Cowan G, Coutts S, Saunders PT “Conserved and divergent patterns of expression of DAZL, VASA and OCT4 in the germ cells of the human fetal ovary and testis.” *BMC Dev Biol.* 2007 Dec 18;7:136

Anderson RA & Wallace WH. “Antimüllerian hormone, the assessment of the ovarian reserve, and the reproductive outcome of the young patient with cancer.” *Fertil Steril* 2013, 99:1469–1475.

Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O & Borg A et al. “Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies.” *Am J Hum Genet* 2003, 72:1117–1130.

Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB (June 1983). “Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization” *J. Biol. Chem.* 258 (11): 7155–60.

Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Bahrami AR. “OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer.” *Int J Cancer* 2007, 120:1598–602.

Bakkum-Gamez JN, Aletti G, Lewis KA, Keeney GL, Thomas BM, & Navarro-Teulon I, et al. “Müllerian inhibiting substance type II receptor (MISIIR): a novel, tissue-specific target expressed by gynecologic cancers.” *Gynecol Oncol* 2008, 108:141-8.

Barbie T, Barbie D, MacLaughlin D, Maheswaran S, Donahoe P. “Müllerian inhibiting substance inhibits cervical cancer cell growth via a pathway involving p130 and p107”. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:15601–6.

Beck TN, Korobeynikov VA, Kudinov AE, Georgopoulos R, Solanki NR, Andrews-Hoke M, Kistner TM, Pépin D, Donahoe PK, Nicolas E, Einarson MB, Zhou Y, Boumber Y, Proia DA, Serebriiskii IG, Golemis EA. “Anti-Müllerian Hormone Signaling Regulates Epithelial Plasticity and Chemoresistance in Lung Cancer.” *Cell Rep.* 2016 Jul 19;16(3):657-71.

Behringer RR, Finegold MJ, Cate RL “Müllerian inhibiting substance function during mammalian sexual development” *Cell* 1994; 79: 415-25

Bloom HJ, Richardson WW, “Histological grading and prognosis in breast cancer.” *Br. J. Cancer*, 1957;11(3):359-377

Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer.* 2013 Mar 1;132(5):1133-45. doi: 10.1002/ijc.27711. Epub 2012 Jul 26.

Brekhman V, Itskovitz-Eldor J, Yodko E, Deutsch M, Seligman J. "The DAZL1 gene is expressed in human male and female embryonic gonads before meiosis." *Mol Hum Reprod* 2000;6:465–8.

Broer SL, Eijkemans MJ, Scheffer GJ, van Rooij I, de Vet A, Themmen AP, Laven JS, de Jong FH, te Velde ER & Fauser BC et al. "Anti-Mullerian hormone predicts menopause: a long-term follow-up study in normoovulatory women." *J Clin Endocrinol Metab* 2011, 96:2532–2539.

Brougham MF, Crofton PM, Johnson EJ, Evans N, Anderson RA & Wallace WH. "Anti-Mullerian hormone is a marker of gonadotoxicity in pre- and postpubertal girls treated for cancer: a prospective study." *J Clin Endocrinol Metab* 2012, 97:2059–2067.

Bonache S., Algaba F., Franco E., Bassas L. and Larriba S. "Altered gene expression signature of early stages of the germ line supports the pre-meiotic origin of human spermatogenic failure" *Andrology*, 25-Mar-2014 doi: 10.1111/j.2047-2927.2014.00217.

Cai S, Geng S, Jin F, Liu J, Qu C, Chen Bo „POU5F1/Oct-4 expression in breast cancer tissue is significantly associated with non-sentinel lymph node metastasis“ *BMC Cancer*, 2016, 16:175

Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, et al. "Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells." *Cell* 1986 ;45 :685-98

Cauffman G., H. Van de Velde, I. Liebaers and A. Van Steirteghem, «Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development» *Mol Hum Reprod.*, 2005 (3):173-81

Cauffman G, Van de Velde H, Liebaers I, Van Steirteghem A. "DAZL expression in human oocytes, preimplantation embryos and embryonic stem cells." *Mol Hum Reprod.* 2005 Jun;11(6):405-11. Epub 2005 May 6

Chang, C.C., Shieh G.S., Wu P., Lin C.C., Shiau, A.L., Wu C.L. "Oct-3/4 expression reflects tumor progression and regulates motility of bladder cancer cells." *Cancer Res.* 2008, 68, 6281–6291

Chang JC, Makris A., Gutierrez M.C et al., "Gene expression patterns in formalin-fixed, paraffin-embedded core biopsies predict docetaxel chemosensitivity in breast cancer patients" *Breast Cancer Res Treat* (2008) 108:233–240

Chang C.J., Chien Y., Lu K.H., Chang S.C., Chou Y.C., Huang Y.T. "Oct4-related cytokine effects regulate tumorigenic properties of colorectal cancer cells." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011, 415, 245–251.

Chang HL, Pieretti-Vanmarcke R & Nicolaou F et al. "Mullerian inhibiting substance inhibits invasion and migration of epithelial cancer cell lines." *Gynecol Oncol* 2011, 120(1):128–134

Charles A. Goldthwaire, Jr. PhD, (2011) «Are Stem Cells Involved in Cancer?»

Cheng Liang, «Establishing a Germ Cell Origin for Metastatic Tumors Using OCT4 Immunohistochemistry», *Cancer*. 2004 Nov 1;101(9):2006-10.

Chiou SH, Wang ML, Chou YT, Chen CJ, Hong CF, Hsieh WJ, Chang HT, Chen YS, Lin TW, Hsu HS, Wu CW. "Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation." *Cancer Res.* 2010, 70:10433–44.

Clark AT, Bodnar MS, Fox M, Rodriguez RT, Abeyta MJ, Firpo MT, Pera RA

"Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro." *Hum Mol Genet.* 2004 Apr 1;13(7):727-39.

Clarke TR, Hoshiya Y, Yi SE, Liu X, Lyons KM & Donahoe PK. "Müllerian inhibiting substance signaling uses a bone morphogenetic protein (BMP)-like pathway mediated by ALK2 and induces SMAD6 expression." *Molecular Endocrinology* 2001, 15, 946–959.

Cobleigh MA, Tabesh B, Bitterman P et al., "Tumor gene expression and prognosis in breast cancer patients with 10 or more positive lymph nodes" *Clin Cancer Res* 2005, 11, 8623-31

Cohen-Haguenaer O, Picard JY, Mattei MG, Serero S, Nguyen VC, de Tand MF, Guerrier D, Hors-Cayla MC, Josso N & Frezai J "Mapping of the gene for anti-Mullerian hormone to the short arm of human chromosome 19". *Cytogenetics and Cell Genetics* 1987;44(1):2-6

Collier B, Gorgoni B, Loveridge C, Cooke HJ, Gray NK. "The DAZL family proteins are PABP-binding proteins that regulate translation in germ cells." *EMBO J.* 2005 Jul 20;24(14):2656-66.

Coons AH, Leduc EH, Connolly JM. "Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit.", *J Exp Med.* 1955 Jul 1;102(1):49-60.

Coons AH. "Antibodies and antigens labelled with fluorescein.", *Schweiz Z Pathol Bakteriolog.* 1959;22:693-9.

Covello KL, Kehler J, Yu H, et al. «HIF-2a regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev* 2006, 20:557–70.

Cronin M., Pho M., Dutta D et al. "Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues" *American Journal of Pathology* 2004, vol.164

Cutuli B1, Lacroze M, Dilhuydy JM, Velten M, De Lafontan B, Marchal C, Resbeut M, Graic Y, Campana F, Moncho-Bernier V, et al. "Male breast cancer: results of the treatments and prognostic factors in 397 cases." *Eur J Cancer.* 1995 Nov;31A(12):1960-4.

Danidson N, Abeloff MD. "Adjuvant therapy of breast Cancer", *World of Surgery*, 18Q112-116, 1994

di Clemente N, Josso N, Gouedard L, Belville C. "Components of the anti-Mullerian hormone signaling pathway in gonads." *Mol Cell Endocrinol.* 2003;211:9–14.

Dillon KE, Sammel MD, Prewitt M, Ginsberg JP, Walker D, Mersereau JE, Gosiengfiao Y, Gracia CR. "Pretreatment antimullerian hormone levels determine rate of posttherapy ovarian reserve recovery: acute changes in ovarian reserve during and after chemotherapy." *Fertil Steril.* 2013 Feb;99(2):477-83.

Dolleman M, Faddy MJ, van DJ, van der Schouw YT, MessowCM, Leader B, Peeters PH, McConnachie A, Nelson SM & Broekmans FJ. (2013). "The relationship between anti-Mullerian hormone in women receiving fertility assessments and age at menopause in subfertile women: evidence from large population studies." *J Clin Endocrinol Metab* 98:1946–1953.

Dorfman DM, Genest DR, Reijo Pera RA. "Human DAZL1 encodes a candidate fertility factor in women that localizes to the prenatal and postnatal germ cells." *Hum Reprod.* 1999 Oct;14(10):2531-6

Dumesic DA, Lesnick TG, Stassart JP, Ball GD, Wong A, Abbott DH. "Intrafollicular antimüllerian hormone levels predict follicle responsiveness to follicle-stimulating hormone (FSH) in normoandrogenic ovulatory women undergoing gonadotropin releasing-hormone analog/recombinant human FSH therapy for in vitro fertilization and embryo transfer." *Fertil Steril.* 2009 Jul;92(1):217-21.

Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. "Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary." *Endocrinology.* 2002 Mar;143(3):1076-84.

Duvilla E, Lejeune H, Trombert-Paviot B, Gentil-Perret A, Tostain J, Levy R. "Significance of inhibin B and anti-Müllerian hormone in seminal plasma: a preliminary study." *Fertil Steril*. 2008;89(2):444-8.

Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group "Systemic treatment of early breast cancer by hormonal cytotoxic or immune therapy:133 randomized trials involving 31.000 recurrences and 24.000 deaths among 75.000 women", *Lancet* 339:1-15, 71-85, 1992

Eberhart, C.G. Maines, J.Z. Wasserman, S.A. "Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human Deleted in Azoospermia." *Nature* 1996, 381, 783–785

Eliassen AH, Zeleniuch-Jacquotte A, Rosner B, Hankinson SE. "Plasma Anti-Müllerian Hormone Concentrations and Risk of Breast Cancer among Premenopausal Women in the Nurses' Health Studies." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2016 May;25(5):854-60

Elston, CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 1991;19(5):403-10.

EzehUI, TurekPJ, ReijoRA, ClarkAT"Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR,and GDF3 are expressed in both seminoma andbreast carcinoma" *Cancer*. 2005 Nov 15, 104(10):2255-65.

Fassnacht W., Mempel A., Strowitzki T., Vogt P.H. "Premature ovarian failure (POF) syndrome: towards the molecular clinical analysis of its genetic complexity." *Current Medicinal Chemistry* 2006, 13:1397-1410.

Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013 Apr;49(6):1374-403. doi: 10.1016/j.ejca.2012.12.027.

Figuroa JD, Pfeiffer RM, Brinton LA, Palakal MM, Degnim AC, Radisky D et al. "Standardized measures of lobular involution and subsequent breast cancer risk among women with benign breast disease: a nested case-control study." *Breast Cancer Research & Treatment* 2016;159(1):163-172

Fraenkel-Conrat H, Olcott HS."The reaction of formaldehyde with proteins; cross-linking between amino and primary amide or guanidyl groups." *J Am Chem Soc*. 1948 Aug;70(8):2673-84.

Freeman EW, Sammel MD, Lin H & Gracia CR. (2012). “Anti-mullerian hormone as a predictor of time to menopause in late reproductive age women.” *J Clin Endocrinol Metab* 97:1673–1680.

Fréour T, P Barrière, D Masson “Anti-müllerian Hormone Levels and Evolution in Women of Reproductive Age With Breast Cancer Treated With Chemotherapy” *Eur J Cancer* 2017 Mar;74:1-8. doi: 10.1016

Gidekel S, Pizov G, Bergman Y, Pikarsky E. “Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant.” *Cancer Cell*. 2003 Nov 4(5):361-70.

Gottschling S, Schnabel P.A, Herth F and Herpel E. “Are we Missing the Target? – Cancer Stem Cells and Drug Resistance in Non-small Cell Lung Cancer” *Cancer Genomics and Proteomics* September-October 2012 vol. 9 no. 5 275-286

Grande G, Milardi D, Martini M, Cenci T, Gulino G, Mancini F, Bianchi A, Pontecorvi A, Pierconti F “Protein Expression of PTTG-1, OCT-4, and KLF-4 in Seminoma: A Pilot Study” *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Sep 11;10:619

Guerrier D, Boussin L, Mader S, Josso N, Kahn A, Picard JY. “Expression of the gene for anti-Mullerian hormone.” *J Reprod Fertil* 1990 ;88 :695-706

Gupta V, Carey JL, Kawakubo H, Muzikansky A, Green JE & Donahoe PK et al. “Mullerian inhibiting substance suppresses tumor growth in the C3(1)T antigen transgenic mouse mammary carcinoma model.” *Proc Natl Acad Sci* 2005, 102:3219–3224.

H Irene Su, Mary D Sammel, Jamie Green, Luke Velders, Corrie Stankiewicz, Jennifer Matro, Ellen W Freeman, Clarisa R Gracia, Angela DeMichele, Antimullerian Hormone and Inhibin B Are Hormone Measures of Ovarian Function in Late Reproductive-Aged Breast Cancer Survivors. *Cancer* 2010 Feb 1;116(3):592-9.

Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, Jaenisch R. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* 2005, 121:465–477.

Hoshiya Y, Gupta V, Kawakubo H, Brachtel E, Carey JL & Sasur L et al. “Mullerian inhibiting substance promotes interferon gamma-induced gene expression and apoptosis in breast cancer cells”. *J Biol Chem*.2003, 278:51703–51712

Hoshiya Yasunori, Gupta Vandana, Dorry L. Segev, Makiko Hoshiya, Jennifer L. “Mullerian Inhibiting Substance induces NFkB signaling in breast and prostate cancer cells” *Molecular and Cellular Endocrinology* 211 (2003) 43–49

Houston DW, Zhang J, Maines JZ, Wasserman SA, King ML. «A *Xenopus* DAZ-like gene encodes an RNA component of germ plasm and is a functional homologue of *Drosophila* *boule*.» *Development* 1998;125:171–80.

Houston DW, King ML. «A critical role for *Xdazl*, a germ plasm-localized RNA, in the differentiation of primordial germ cells in *Xenopus*.» *Development* 2000;127:447–56.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. “Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.”, *J Histochem Cytochem.* 1981 Apr;29(4):577-80.

Hu T, Liu S, Breiter DR, Wang F, Tang Y, Sun S «Octamer 4 small interfering RNA results in cancer stem cell-like cell apoptosis.» *Cancer Res.* 2008 Aug 15, 68(16):6533-40. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6642.

Imbeaud, S., Faure, E., Lamarre, I., Mattei, M.G., di Clemente, N., Tizard, R., Carré-Eusèbe, D., Belville, C., Tragethon, L., Tonkin, C., Nelson, J., McAuliffe, M., Bidart, J.M., Lababidi, A., Josso, N., Cate, R.L. & Picard, J.Y “Insensitivity to anti-Müllerian hormone due to a spontaneous mutation in the human anti-Müllerian hormone receptor.” *Nature Genetics* 1995, 11, 382–388.

Imbeaud, S., Carre-Eusebe, D., Rey, R., Belville, C., Josso, N. & Picard, J.Y. “Molecular genetics of the persistent müllerian duct syndrome: a study of 19 families.” *Human Molecular Genetics* 1994, 3, 125–131.

Ingraham, H.A., Hirokawa, Y., Roberts, L.M., Mellon, S.H., McGee, E., Nachtigal, M.W. & Visser, J.A. “Autocrine and paracrine Müllerian inhibiting substance hormone signaling in reproduction.” *Recent Progress in Hormone Research* 2000, 55, 53–67.

Itman C, Mendis S, Barakat B & Loveland LK “ All in the family: TGF- β family action in testis development.” *Reproduction* 2006 Aug;132(2):233-246.

Itoh, S., Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P., "Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins", *Eur J Biochem*, 2000: 267(24): p. 6954-67.

Jamin SP, Arango NA, Mishina Y, Hanks MC & Behringer RR. “Requirement of *Bmpr1a* for Müllerian duct regression during male sexual development.” *Nat Genet* 2002, 32:408-10.

Jenkins HT, Malkova B, Edwards TA. “Kinked β -strands mediate high-affinity recognition of mRNA targets by the germ-cell regulator DAZL.” *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Nov 8;108(45):18266-71. doi: 10.1073/pnas.1105211108. Epub 2011 Oct 20.

Jost A. "Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones." *Recent Prog Horm Res* 1953;8:379–418.

Kalich-Philosoph L, Roness H, Carmely A, Fishel-Bartal M, Ligumsky H, Paglin S, Wolf I, Kanety H, Sredni B, Meirow D. "Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility." *Sci Transl Med.* 2013 May 15;5(185):185ra62.

Karashima T, Sugimoto A, Yamamoto M. "Caenorhabditis elegans homologue of the human azoospermia factor DAZ is required for oogenesis but not for spermatogenesis." *Development* 2000;127:1069–79.

Khan R, Agrotis A., Bobik A. "Understanding the role of transforming growth factor-beta1 in intimal thickening after vascular injury." *Cardiovasc Res* 2007; 74: 223-234.

Kim HA, Seong MK, Kim JH, Kim YG, Choi HS, Kim JS, Park IC, Jin HO, Lee JK, Noh WC. "Prognostic Value of Anti-Müllerian Hormone and Inhibin B in Patients with Premenopausal Hormone Receptor-positive Breast Cancer." *Anticancer Res.* 2016 Mar;36(3):1051-7.

Hyun-Ah Kim, Jihye Choi, Chan Su Park , Min-Ki Seong , Sung-Eun Hong 2, Jae-Sung Kim, In-Chul Park, Jin Kyung Lee , Woo Chul Noh , The ASTRRA trial investigators "Post-chemotherapy Serum anti-Müllerian Hormone Level Predicts Ovarian Function Recovery" *Endocr Connect* 2018 Aug 1;7(8):949-956

Kleene KC "Connecting cis-elements and trans-factors with mechanisms of developmental regulation of mRNA translation in meiotic and haploid mammalian spermatogenic cells." *Reproduction.* 2013 Jun 14;146(1):R1-19. doi: 10.1530

Knight PG & Glister C "TGF- β superfamily members and ovarian follicle development." *Reproduction* 2006 Aug;132(2):191-206.

Kumar SM, Liu S, Lu H, Zhang H, Zhang PJ, Gimotty PA, Guerra M, Guo W, Xu X., "Acquired cancer stem cell phenotypes through Oct4-mediated dedifferentiation." *Oncogene.* 2012 Jan 30

Kuo PL, Wang ST, Lin YM, Lin YH, Teng YN, Hsu CC. "Expression profiles of the *DAZ* gene family in human testis with and without spermatogenic failure." *Fertil Steril* 2004;81:1034–40.

La Marca A, Volpe A. "The Anti-Müllerian hormone and ovarian cancer." *Hum Reprod Update.* 2007 May-Jun;13(3):265-73.

Lanza R., Geahart, Hogan, Melton, Pedersen, Thomas, Thomson & West, «Essentials of Stem Cell Biology», Kindle Edition 2005, σελ.34-39

Lawrenz B, Fehm T, von Wolff M, Soekler M, Huebner S, Henes J & Henes M. “Reduced pretreatment ovarian reserve in premenopausal female patients with Hodgkin lymphoma or non-Hodgkin-lymphoma-evaluation by using antimullerian hormone and retrieved oocytes.” *Fertil Steril*. 2012

Lee MM, Donahoe PK, Silverman BL, Hasegawa T, Hasegawa Y, Gustafson ML, Chang YC & MacLaughlin DT. “Measurements of serum mullerian inhibiting substance in the evaluation of children with nonpalpable gonads.” *N Engl J Med* 1997, 336:1480–1486.

Lee MM, Donahoe PK, Hasegawa T, Silverman B, Christ GB, Best S, Hasegawa Y, Noto RA, Schoenfeld D, MacLaughlin DT „Müllerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood” *J Clin Endocrinol* 1996; 81: 571-6.

Lee J, Kim HK, Rho JY, Han YM, Kim J«The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal.» *J Biol Chem*. 2006 Nov 3, 281(44):33554-65.

Lifschitz-Mercer Beatriz, J. Elliott David, Issakov Josephine, Leider-Trejo Leonor,

Schreiber Letizia, Misonzhnik Faina, Eisenthal Avi, Bar-Shira Maymon Batia “Localization of a specific germ cell marker, DAZL1, in testicular germ cell neoplasias” Published online: 23 November 2001 © Springer-Verlag

Lin YM, Chen CW, Sun HS, Tsai SJ, Hsu CC, Teng YN, et al. “Expression patterns and transcript concentrations of the autosomal DAZL gene in testes of azoospermic men.” *Mol Hum Reprod* 2001;11:1015–22.

Lin YM, Chen CW, Sun HS, Tsai SJ, Lin J SN, Kuo PL. “Presence of DAZL transcript and protein in mature spermatozoa”. *Fertil Steril* 2002b; 77:626–9.

Long WQ,Ranchin V,Pautier P,Belville C,Denizot P,Caila H,Lhomme C,Picard JY,Bidart JM,Rey R. “Detection of minimal levels of serum anti-Mullerian hormone during follow up of patient with ovarian granulosa cell tumor by means of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay.” *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:540-4

Looijenga LH, Stoop H, de Leeuw HP, de Gouveia Brazao CA, Gillis AJ, van Roozendaal KE, van Zoelen EJ, Weber RF, Wolffenbuttel KP, van Dekken H,Honecker F, Bokemeyer C, Perlman EJ, Schneider DT, Kononen J, Sauter G, Oosterhuis JW. “POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors.” *Cancer Res*. 2003 May 1, 63(9):2244-50

Luo F., Yang K., Liu R.L., Meng C., Dang R.F., Xu Y. “Formation of vasculogenic mimicry in bone metastasis of prostate cancer: Correlation with cell apoptosis and senescence regulation pathways.” *Pathol. Res. Pract.* 2014, *210*, 291–295.

McDonald NQ1, Hendrickson WA. “A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif.” *Cell.* 1993 May 7;73(3):421-4.

MacLaughlin DT & Donahoe PK. “Mullerian inhibiting substance/anti-mullerian hormone: a potential therapeutic agent for human ovarian and other cancers.” *Future Oncol* 2010, *6*(3):391–405

Marca A. La, Sighinolfi G., Radi D., C. Argento, E. Baraldi, A. Carducci Artenisio, G. Stabile, A. Volpe “Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART) “ *Human Reproduction Update* 2010, Volume 16, Issue 2, Pages 113–130

Matthai C., Horvat R., M.Noel F.Nagele, Radjabi A., M.van Trotsenburg Huber J and A.Kolbus, «Oct-4 expression in human endometrium» *Mol Hum Reprod.* 2006, (1):7-10

Marilyn Monk and Cathy Holding «Human embryonic genes re-expressed in cancer cells», *Oncogene* 2001, *20*, 8085 ± 8091.

Meirelles K, Benedict LA & Dombkowski D et al. “Human ovarian cancer stem/progenitor cells are stimulated by doxorubicin but inhibited by Mullerian inhibiting substance.” *Proc Natl Acad Sci* 2012, *109*(7):2358–2363

Mina Lida Z Sharon E. Soule Z Sunil Badve Z Fredrick L. Baehner Z Joffre Baker Z Maureen Cronin Z Drew Watson Z Mei-Lan Liu Z George W. Sledge Jr Z Steve Shak Z Kathy D. Miller “Predicting response to primary chemotherapy: gene expression profiling of paraffin-embedded core biopsy tissue” *Breast Cancer Res Treat* (2007) *103*:197–208

Morarji K, O McArdle, K Hui 1, G Gingras-Hill 1, S Ahmed, E M Greenblatt, E Warner, S Sridhar, A M F Ali, A Azad, D C Hodgson “Ovarian Function After Chemotherapy in Young Breast Cancer Survivors” *Curr Oncol* 2017 Dec;24(6):e494-e502.

Nielsen SN, Andersen AN, Schmidt KT, Rechnitzer C, Schmiegelow K, Bentzen JG & Larsen EC. “A 10-year follow up of reproductive function in women treated for childhood cancer.” *Reprod Biomed Online* 2013, *27*:192–200.

Nishi S, Hoshi N, Kasahara M, Ishibashi T, Fujimoto S. “Existence of human DAZLA protein in the cytoplasm of human oocytes.” *Mol Hum Reprod.* 1999 Jun;5(6):495-7

Niwa H, Miyazaki J, Smith AG., «Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells» *Nat Genet.* 2000, (4):372-6

Oktay K, Kim JY, Barad D & Babayev SN. “Association of BRCA1 mutations with occult primary ovarian insufficiency: a possible explanation for the link between infertility and breast/ovarian cancer risks.” *J Clin Oncol* 2010, 28:240–244.

Onami S1, Ozaki M, Mortimer JE, Pal SK., “Male breast cancer: an update in diagnosis, treatment and molecular profiling.”, *Maturitas.* 2010 Apr;65(4):308-14. doi: 10.1016/j.maturitas.2010.01.012. Epub 2010 Feb 6.

Ottini L1, Palli D, Rizzo S, Federico M, Bazan V, Russo A. , “Male breast cancer.”, *Crit Rev Oncol Hematol.* 2010 Feb;73(2):141-55. doi: 10.1016/j.critrevonc.2009.04.003. Epub 2009 May 7.

Palinska-Rudzka KE, Ghobara T, Parsons N, Milner J, Lockwood G, Hartshorne GM. “Five-year study assessing the clinical utility of anti-Müllerian hormone measurements in reproductive-age women with cancer.” *Reprod Biomed Online.* 2019 Oct;39(4):712-720.

Pan HA, Tsai SJ, Chen CW, Lee YC, Lin YM, Kuo PL. “Expression of DAZL protein in the human corpus luteum.” *Mol Hum Reprod* 2002;8:540–5.

Pan HA, Liao RW, Chung CL, Teng YN, Lin YM, Kuo PL. “DAZL protein expression in mouse preimplantation embryo.” *Fertil Steril.* 2008 May;89(5 Suppl):1324-7.

Pangas SA. “Regulation of the ovarian reserve by members of the transforming growth factor beta family.” *Mol Reprod Dev.* 2012 Oct;79(10):666-79.

Park Sangjung, Wang Hye-Young, Sunghyun Kim, Sungwoo Ahn, Dongsup Lee, Yoonjung Cho, Kwang Hwa Park, Dongju Jung, Seung Il Kim, Hyeyoung Lee “Quantitative RT-PCR assay of HER2 mRNA expression in formalin-fixed and paraffin-embedded breast cancer tissues” *Int J Clin Exp Pathol.* 2014; 7(10): 6752–6759.

Pavone ME, Mittal N, Smith K & Giordano SB. “Amh values in reproductive aged women with and without the brca1 mutation.” *Fertil Steril* 2014, 102:e156.

Pellatt L, Rice S, Mason HD. “Anti-Müllerian hormone and polycystic ovary syndrome: a mountain too high?” *Reproduction.* 2010 May;139(5):825-33.

Pepinsky RB, Sinclair LK, Chow EP. “Proteolytic processing of mullerian inhibiting substance produces a transforming growth factor- β -like fragment.” *J Biol Chem.* 1988, 263, 18961–18964.

Pesce M, Schöler HR «Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development.» Stem Cells. 2001, 19(4):271-8.

Picard JY, Josso N. “Purification of testicular anti-Müllerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor.” Mol Cell Endocrinol 1984 ;34:23-9

Raftery LA1, Sutherland DJ. “TGF-beta family signal transduction in Drosophila development: from Mad to Smads.” Dev Biol. 1999 Jun 15;210(2):251-68.

Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, Rozen S, Jaffe T, Straus D, Hovatta O, et al. “Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene.” Nat Genet. 1995 Aug;10(4):383-93.

Reijo RA, Dorfman DM, Slee R, Renshaw AA, Loughlin KR, Cooke HJ, et al. «DAZ family proteins exist throughout male germ cell development and transit from nucleus to cytoplasm at meiosis in human and mice.» Biol Reprod 2000;63:1490–6.

Renaud E, MacLaughlin D, Oliva E, Rueda B, Donahoe P. “Endometrial cancer is a receptor-mediated target for Müllerian inhibiting substance.” Proc Natl Acad Sci 2005;102:111–6.

Rey RA, Lhommé C, Marcillac I, Lahlou N, Duvillard P, Josso N, Bidart JM. “Anti-Müllerian hormone as a serum marker of granulosa cell tumors of the ovary: comparative study with serum alpha-inhibin and estradiol.” Am J Obstet Gynecol. 1996 Mar;174(3):958-65.

Reynolds N., Cooke H.J. “Role of DAZ genes in male infertility.” Reprod. Biomed. Online 2005,10:72-80.

Ruark Elise, Seal Sheila, McDonald Heather et al., “Identification of nine new susceptibility loci for testicular cancer, including variants near DAZL and PRDM14.” Nature Genetics, 686–689 (2013)

Ruggiu M, Speed R, Taggart M, McKay SJ, Kilanowski F, Saunders P, et al. «The mouse Dazl gene encodes a cytoplasmic protein essential for Gametogenesis». Nature 1997;389:73–7.

Ruggiu M., Cooke H.J. «In vivo and in vitro analysis of homodimerization activity of the mouse Dazl protein.» Gene 2000, 252:119-126

Saigusa S., Tanaka K., Toiyama Y., Yokoe T., Okugawa Y., Ioue Y., Miki C., Kusunoki M. «Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in rectal cancer and their association with distant recurrence after chemoradiotherapy.» *Ann. Surg. Oncol.* 2009, *16*, 3488–3498.

Salhi I, Cambon-Roques S, Lamarre I, Laune D, Molina F, Pugniere M, Pourquier D, Gutowski M, Picard JY & Xavier F et al. “The anti-Mullerian hormone type II receptor: insights into the binding domains recognized by a monoclonal antibody and the natural ligand.” *Biochem J* 2004, *379*:785–793.

Savage C, Das P, Finelli AL, Townsend SR, Sun CY, Baird SE, Padgett RW. “Caenorhabditis elegans genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components.”, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jan 23;93(2):790-4.

Saxena R, Brown LG, Hawkins T, Alagappan RK, Skaletsky H, Reeve MP, et al. «The *DAZ* gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transported, repeatedly amplified and pruned.» *Nat Genet* 1996;14:292–9.

Schmierer B1, Hill CS. “TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility.” *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Dec;8(12):970-82.

Schöler HR, Hatzopoulos AK, Balling R, Suzuki N, Gruss P “A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor.” *EMBO J.* 1989 Sep 8, (9):2543-50

Schoeler,H.R., Ruppert,S., Suzuki,N., Chowdhury,K. and Gruss,P. «New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4.» *Nature* 1990, 344,435--439.

Segev DL, Ha TU, Tran TT, Kenneally M, Harkin P & Jung M et al. “Mullerian inhibiting substance inhibits breast cancer cell growth through an NFkappa B-mediated pathway.” *J Biol Chem.* 2000, *275*:28371–28379.

Shah C, Vangompel MJ, Naeem V, Chen Y, Lee T, Angeloni N, Wang Y, Xu EY “Widespread presence of human BOULE homologs among animals and conservation of their ancient reproductive function.” *PLoS Genet.* 2010 Jul 15;6(7):e1001022.

Slee, R. Grimes, B., Speed, R. M., Taggart, M., Maguire, S. M., Ross A., McGill, N. I., Saunders, P. T. K. and Cooke, H. J. (1999). «A human *DAZ* transgene confers partial rescue of the mouse *Dazl* null phenotype.» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8040-8045.

Soheilia Saamaaneh, Asadia Malek Hossien, Farsinejad Alireza “Distinctive expression pattern of OCT4 variants in different types of breast cancer” *Cancer Biomarkers* 2016, DOI 10.3233/CBM-160675

Song JY, Chen KY, Kim SY, Kim MR, Ryu KS & Cha JH, et al. “The expression of Mullerian inhibiting substance/anti- Mullerian hormone type II receptor protein and mRNA in benign, borderline and malignant ovarian neoplasia”. *Int J Oncol* 2009, 34:1583-91.

Stefanidis K, Pergialiotis V, Christakis D, Patta J, Stefanidi D, Loutradis D. “OCT-4 and DAZL expression in precancerous lesions of the human uterine cervix.” *J Obstet Gynaecol Res.* 2015 May;41(5):763-7.

Stefanidis K, Loutradis D, Koumbi L, Anastasiadou V, Dinopoulou V, Kiapekou E, Lavdas AA, Mesogitis S, Antsaklis A. “Deleted in Azoospermia-Like (DAZL) gene-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for germ cells research?” *Fertil Steril.* 2008 Sep;90(3):798-804.

Stefanidis K., Loutradis D, Anastasiadou V, et al. “ Embryoid bodies from mouse stem cells express oxytocin receptor, Oct-4 and DAZL” *BioSystems* 98 (2009) 122-126

Stefanidis K, Loutradis D, Vassiliou LV, Anastasiadou V, Kiapekou E, Nikas V, Patris G, Vlachos G, Rodolakis A, Antsaklis A. “Nevirapine induces growth arrest and premature senescence in human cervical carcinoma cells.” *Gynecol Oncol.* 2008 Nov;111(2):344-9. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.08.006. Epub 2008 Sep 26.

Stefanidis K., Loutradis D., Anastasiadou V., Bletsas R., Kiapekou E., Drakakis P., Beretsos P., Elenis E., Mesogitis S., & Antsaklis A., «Oxytocin receptor- and Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid» *Gynecol Endocrinol.* 2008, (5):280-4.

Sternberger LA and Joseph SA,. “The unlabeled antibody method. Contrasting color staining of beta-lipotropin and ACTH-associated hypothalamic peptides without antibody removal.”, *J Histochem Cytochem.* 1979 Nov;27(11):1430-7.

Su HI, Flatt SW, Natarajan L, DeMichele A & Steiner AZ. “Impact of breast cancer on anti-Mullerian hormone levels in young women.” *Breast Cancer Res Treat.* 2013, 137(2): 571–577

Tai MH, Chang CC, Olson K, Trosko J “Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis” *Carcinogenesis* 2005, vol.26 no.2 pp.495—502

Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE «Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis.» *Carcinogenesis*. 2005 Feb 26, (2):495-502. Epub 2004 Oct 28.

Takeda Jun, Seino Susumu and Bell Graeme I., «Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues» *Nucleic Acids Res*. 1992, 20(17):4613-20

Takeda Y, Mishima Y, Fujiwara T, Sakamoto H, Inoue K “DAZL relieves miRNA-mediated repression of germline mRNAs by controlling poly(A) tail length in zebrafish.” *PLoS One*. 2009 Oct 19;4(10):e7513. doi: 10.1371/journal.pone.0007513.

Tehrani FR, Shakeri N, Solaymani-Dodaran M & Azizi F. (2011) Predicting age at menopause from serum antimullerian hormone concentration. *Menopause* 18:766–770.

Teixeira J, Maheswaran S & Donahoe PK. “Mullerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications.” *Endocr Rev* 2001, 22:657–674

Teng YN, Lin YM, Lin YH, Tsao SY, Hsu CC, Lin SJ, et al. “Association of a single-nucleotide polymorphism of the deleted-in-azoospermia-like gene with susceptibility to spermatogenic failure.” *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5258–64

Tsui S, Dai T, Warren ST, Salido EC, Yen PH. «Association of the infertility factor DAZL1 with actively translating polyribosomes.» *Biol Reprod* 2000;6:1655–60.

Tung JY, Luetjens CM, Wistuba J, Xu EY, Reijo Pera RA, Gromoll J. “Evolutionary comparison of the reproductive genes, DAZL and BOULE, in primates with and without DAZ.” *Dev Genes Evol*. 2006 Mar;216(3):158-68. Epub 2006 Jan 20.

Uhlén M1, Björling E, Agaton C et al. “A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics.” *Mol Cell Proteomics*. 2005 Dec;4(12):1920-32.

van Beek RD, van den Heuvel-Eibrink MM, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Hakvoort-Cammel FG, van den BC, van den BH, Pieters R & de Muinck Keizer-Schrama SM. “Anti-Mullerian hormone is a sensitive serum marker for gonadal function in women treated for Hodgkin’s lymphoma during childhood.” *J Clin Endocrinol Metab* 2007, 92:3869–3874.

VanGompel MJ, Xu EY. “The role of the DAZ family in spermatogenesis; more than just translation?” *Spermatogenesis* 1, 20011, 36-46

Visser JA, de Jong FH, Laven JS, Themmen AP. “Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function”. *Reproduction*. 2006 Jan;131(1):1-9. Review.

Visser JA, Olaso R, Verhoef-Post M, Kramer P, Themmen AP & Ingraham HA. “The serine/threonine transmembrane receptor ALK2 mediates Müllerian inhibiting substance signaling.” *Molecular Endocrinology* 2001, 15, 936–945.

Wang L., Guo Z.Y., Zhang R., Xin B., Chen R., Zhao J., Wang T., Wen W.H., Jia L.T., Yao L.B., *et al.* «Pseudogene OCT4-pg4 functions as a natural micro RNA sponge to regulate OCT4 expression by competing for miR-145 in hepatocellular carcinoma.» *Carcinogenesis* 2013, 34, 1773–1781.

Wang YD, Cai N, Wu XL, Cao HZ, Xie LL, Zheng PS «OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway.» *Cell Death Dis.* 2013 Aug 8, 4:e760. doi: 10.1038/cddis.2013.272.

Wang PY, Koishi K, McGeachie AB, Kimber M, Maclaughlin DT & Donahoe PK, *et al.* “Mullerian inhibiting substance acts as a motor neuron survival factor in vitro.” *Proc Natl Acad Sci* 2005, 102:16421-5.

Weenen C, Laven JSE, von Bergh ARM, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BCJM & Themmen APN. “Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment.” *Molecular Human Reproduction* 2004 Feb;10(2):77-83.

Wilson JD, George FW & Griffin JE. “The hormonal control of sexual development.” *Science* 1981, 211:1278–1284.

Wen J, Park JY, Park KH, Chung HW, Bang S, Park SW, Song SY. Oct4 and Nanog expression is associated with early stages of pancreatic carcinogenesis. *Pancreas*. 2010, 39:622–6.

Xu EY, Moore FL, Reijo RA. «A gene family required for human germ cell development evolved from an ancient meiotic gene conserved in metazoans.» *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:7414–9.

Yen PH. “Putative biological functions of the DAZ family” *Int J Androl* 2004, 27 (3): 125-9

Zangrossi S, Marabese M, Brogгинi M, Giordano R, D'Erasmus M, Montelatici E, Intini D, Neri A, Pesce M, Rebulli P, Lazzari L., «Oct-4 Expression in Adult Human Differentiated Cells Challenges Its Role as a Pure Stem Cell Marker» *Stem Cells*. 2007, (7):1675-80

Zhang S, Tang Q, Wu W, Yuan B, Lu C, Xia Y, Ding H5, Hu L, Chen D6, Sha J, WangX“Association between DAZL polymorphisms and susceptibility to male infertility: systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis.” *Sci Rep.* 2014 Apr 10;4:4642. doi: 10.1038/srep04642.

Zhou X., Huang G.R., Hu P. «Over-expression of Oct4 in human esophageal squamous cell carcinoma.» *Mol. Cells* 2011, 32, 39–45

Zwaka TP, Thomson JA. “A germ cell origin of embryonic stem cells?” *Development.* 2005 Jan;132(2):227-33.

Αγοραστός Θ., Βαβίλης Δ., Μπόντης Γ. Κωνσταντινίδης Θ. «Σύγχρονες εξελίξεις στην πρόληψη του γυναικολογικού καρκίνου», Θεσσαλονίκη, University Studio Press,2006, σελ. 19-27

Ιωαννίδου Α., Μανδρέκας Α., Μπαρμπούνης Β., ’Συγχρονη Μαστολογία’, Τόμος Ι, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης 2007

Λύπας Γ.Δ και Μπαρμπούνης Β., «Γενετική Επιδημιολογία του καρκίνου του μαστού στους άνδρες, πρόγραμμα καταγραφής με κλινικές προεκτάσεις», ΤΑ ΝΕΑ ΤΗΣ ΕΟΠΕ #17, Δεκέμβριος 2012

Μαρκόπουλος Χ.Ι, «Παθήσεις του Μαστού», 2η έκδοση Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης, Αθήνα 2007

Creagan Edward Καρκίνος του μαστού, Εκδόσεις Αλκυών, London 2006

El-Wakeel H, Umpleby HC. “Systematic review of fibroadenoma as a risk factor for breast cancer.” *Breast* 2003, 12:302–307.

Feuer EJ, Wun LM, Boring CC, et al. The lifetime risk of developing breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85 :892-97.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. «Cancer statistics» 2006. *CA Cancer J Clin* 2006, 56:106-130

Moller Torsten Ακτινοδιαγνωστική του μαστού, Εκδόσεις Παρισσιανού, Αθήνα 2000

