

1989

A.
5



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ – ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Η ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΙΚΗ Ι. ΑΓΝΑΝΤΗ



ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ
ΗΝΩΜΕΝΟ ΒΑΣΙΛΕΙΟ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Β.Α. GUSTERSON

376

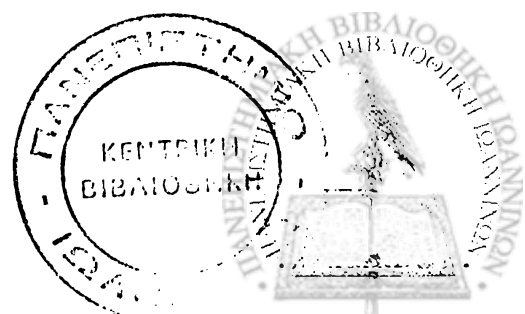
ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΤΗΣ
ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΚΑΡΚΙΝΟ
ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ
ΑΠΑΝΤΗΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

ΕΛΕΝΗ ΙΩΑΝΝΟΥ ΤΡΙΧΙΑ

ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΟΣ - ΚΥΤΤΑΡΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2000



‘ Η έγκριση της διατριβής απ’ την Ιατρική Σχολή δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα’ (Νόμος 5343/32, άρθρο 202, παρ. 2)



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Νίκη Αγνάντη: Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Νίκος Παυλίδης: Καθηγητής Ογκολογίας

Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μιχάλης Φατούρος: Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής

Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Νίκη Αγνάντη: Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων

Νίκος Παυλίδης: Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων

Μιχάλης Φατούρος: Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Αγγελος Καππός: Καθηγητής Χειρουργικής Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων

Βασιλική Μαλάμου-Μήτση: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής
Ανατομίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Δημήτριος Στεφάνου: Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογικής
Ανατομίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μαρία Μπάη: Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων



Πρόεδρος Ιατρικού Τμήματος: καθηγήτρια κ. Νίκη Αγνάντη

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς επιτροπής: 9 Μαΐου 1996

Ημερομηνία ορισμού του θέματος: 24 Φεβρουαρίου 1997

**Ημερομηνία κατάθεσης της διδακτορικής διατριβής:
22 Μαρτίου 2000**

Η διατριβή έγινε αποδεκτή με το βαθμό 'ΑΡΙΣΤΑ'



Στη Μητέρα μου

«Τη νύχτα να κοιτάς τ' αστέρια. Δεν μπορώ να σου δείξω που βρίσκεται το δικό μου γιατί είναι πολύ μικρό. Μά καλύτερα έτσι. Για σένα, τ' αστέρι μου θα είναι μέσα σ' όλα τούτα τ' αστέρια. Έτσι όλα τ' αστέρια θα σ' αρέσει να τα κοιτάζεις... Όλα θα είναι φίλοι σου.

Οι άνθρωποι έχουν άστρα, μά δεν είναι τα ίδια για όλους. Για εκείνους που ταξιδεύουν, τ' άστρα είναι οδηγοί. Για άλλους είναι μόνο κάτι φωτάκια. Για τους σοφούς είναι προβλήματα. Όλα όμως αυτά τ' αστέρια σωπαίνουν. Εσύ, μόνο εσύ, θα έχεις άστρα που δεν τά' χει κανένας...

Όταν θα κοιτάζεις τον ουρανό, τη νύχτα, κι αφού εγώ θα κατοικώ σ' ένα από αυτά, κι αφού εγώ θα γελώ σ' ένα απ' αυτά, για σένα λοιπόν θα είναι σα να γελούν όλα τ' αστέρια. Εσύ θα έχεις άστρα που ξέρουν να γελούν...

Κοιτάξτε καλά το τοπίο αυτό για να'στε σίγουροι πως θα τ' αναγνωρίσετε, αν ταξιδέψετε καμιά μέρα στην Αφρική, στην έρημο. Κι' αν τύχει και περάσετε απ' εκεί, σας ικετεύω, μη βιαστείτε, περιμένετε λιγάκι ίσα ίσα κάτω από τ' άστρο. Αν έρθει τότε κοντά σας ένα παιδί, και γελά, κι έχει χρυσά μαλλιά, και δεν αποκρίνεται όταν το ρωτούνε, θα μαντέψετε βέβαια ποιος είναι. Τότε, σας παρακαλώ, κάντε μου τη χάρη. Μη μ' αφήσετε να μένω τόσο λυπημένος: γρήγορα γράψτε μου πως ξαναγύρισε...»

'Antoine de Saint-Exupery: Ο μικρός Πρίγκηπας'



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



Πρόλογος

Η εκπόνηση της μελέτης αυτής έγινε στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Αντικαρκινικής Έρευνας στο Ηνωμένο Βασίλειο.

Το θέμα αφορά τη μελέτη της προγνωστικής αξίας του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki-67 στο καρκίνο του μαστού, σε μία σειρά ασθενών με μακροχρόνια παρακολούθηση, και η σχέση του με συστήματα αξιολόγησης του ιστολογικού βαθμού κακοηθείας, κλινικές παραμέτρους και άλλους προγνωστικούς παράγοντες.

Το υλικό παραχωρήθηκε ευγενώς από το Ινστιτούτο Αντικαρκινικής Έρευνας στο Ηνωμένο Βασίλειο.

Με την ολοκλήρωση της μελέτης αυτής, αισθάνομαι βαθιά υποχρεωμένη να ευχαριστήσω και να εκφράσω τη μεγάλη ευγνωμοσύνη μου σε όλους όσους με βοήθησαν και μου συμπαραστάθηκαν:

Στη Καθηγήτρια κ. Νίκη Αγνάντη, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομίας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την ευκαιρία που μου έδωσε για τη πραγματοποίηση αυτής της μελέτης και την εποικοδομητική εποπτεία εκπόνησής της.

Στο Καθηγητή B. Gusterson, Διευθυντή του Ινστιτούτου Αντικαρκινικής Έρευνας, στο Ηνωμένο Βασίλειο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, με τη παραχώρηση του απαραίτητου υλικού για την εκπόνηση αυτής της μελέτης και τη πολύτιμη εμπειρία που αποκόμισα από τη συνεργασία μαζί του.

Στη Susan Murray του τμήματος Βιοστατιστικής του Αντικαρκινικού Ινστιτούτου Dana Farber στη Βοστώνη, για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Στο Δάσκαλο και Διευθυντή του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου του Τζανείου νοσοκομείου Πειραιά, κ. Ιωάννη Ελεμένογλου εκφράζω τη βαθύτατη ευγνωμοσύνη όλων όσων μαθήτευσαν κοντά του για την αγάπη που μας ενέπνευσε για το αντικείμενο της Παθολογικής Ανατομίας, τις γνώσεις και την αμέριστη και πολύτιμη βοήθειά του 'όπου δει'.

Στο Καθηγητή κ. Νίκο Παυλίδη και Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Μιχάλη Φατούρο, μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής για την



αξιόλογη βοήθειά τους κατά τη διάρκεια προετοιμασίας της παρούσας μελέτης.

Στο κ. Ν. Τραπεζόντα και κ. Ν. Στρατικόπουλο για τις πολύτιμες συμβουλές και πρακτική βοήθεια για τη σύνταξη και τελική παρουσία του κειμένου.

Στην οικογένειά μου.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΜΑΣΤΟΣ – ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ	1
2. ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΜΑΣΤΟΥ	
3. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΩΝ ΜΑΣΤΟΥ	3
4. ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	4
4.1. Ηλικία ασθενούς	
4.2. Εγκυμοσύνη	5
4.3. Αντισυλληπτικά	
4.4. Πρώιμη διάγνωση	
4.5. Παρουσία ή απουσία διήθησης	
4.6. Μέγεθος όγκου	6
4.7. Εντόπιση	
4.8. Ιστολογικός τύπος	
4.9. Ιστολογικός βαθμός κακοηθείας	7
4.9α. Ποσοστό σχηματισμού αδενίων	
4.9β. Πυρηνική πλειομορφία	8
4.9γ. Μιτώσεις	
4.10. Τύπος των διηθητικών ορίων του όγκου	10
4.11. Νέκρωση του όγκου	
4.12. Αντίδραση του στρώματος	
4.13. Πυκνότητα μικροαγγείων (αγγειογένεση)	
4.14. Ελάστωση	11
4.15. Καθεψίνη D	
4.16. C-erb-B2	
4.17. P53 και nm3	
4.18. Bcl-2	12
4.19. Διήθηση του δέρματος	
4.20. Διήθηση της θηλής	
4.21. Καρκινικά έμβολα σε λεμφαγγεία	
4.22. Αγγειακά έμβολα	
4.23. Υποδοχείς οιστρογόνων	
4.24. Πλοειδισμός	
4.25. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός	
4.26. Μασχαλιαίες λεμφαδενικές μεταστάσεις	
4.27. Μετάσταση στους έσω μαστικούς λεμφαδένες	
4.28. Τοπική υποτροπή	



4.29. Τύπος της θεραπείας	
5. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ ΣΤΟ ΔΙΗΘΗΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	15
5.1. Ιστορική αναδρομή	
6. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ- ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΟΥ	21
6.1. Μέτρηση πυρηνοκινησιών	
6.2. Δείκτης σήμανσης θυμιδίνης (thymidine labelling index/ TLI)	23
6.3. Βρωμοδε(σ)οξουριδίνη	24
6.4. Αντιγόνα σχετιζόμενα με το κυτταρικό πολλαπλασιασμό	
6.4α. Ki-67	
6.4β. Μελέτες της χρήσης του δείκτη Ki-67 ως προγνωστικού δείκτη στις παθήσεις του μαστού	26
6.4γ. Εκφραση του δείκτη Ki-67 σε βιοπτικό υλικό- Ποσοτικοποίηση	27
6.4δ. Κυτταροπλασματική χρώση	
6.5. Περιοχές οργάνωσης πυρηνίου (AgNORs)	28
6.6. Ανάλυση με τη κυτταρομετρία ροής	29
6.7. Άλλες μέθοδοι	
7. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ	31
8. Η ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΤΑΜΟΞΙΦΑΙΝΗΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	34
9. ΣΥΝΘΕΤΑΣΗ ΤΗΣ ΘΥΜΙΔΙΛΙΝΗΣ	37
10. ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	39

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	40
2. ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΜΕΛΕΤΗΣ	41
3. ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	
4. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΧΡΩΣΗΣ	43
5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
ΠΙΝΑΚΕΣ	50-71
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	72
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	76
SUMMARY	78



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΜΑΣΤΟΣ – ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΙΑ

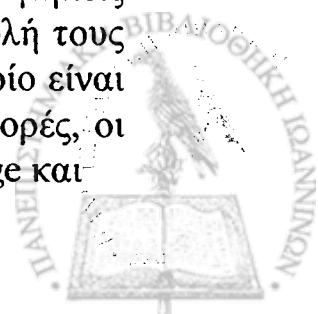
Η καταβολή του μαστού εμφανίζεται κατά την έκτη εμβρυική εβδομάδα με τη μορφή μαστικών ακρολοφιών, οι οποίες αντιστοιχούν σε δύο παράλληλες γραμμοειδείς παχύνσεις του έξω βλαστικού δέρματος, που εκτείνονται από την μασχालιαία μέχρι τη βουβωνική χώρα. Κατά την ένατη εβδομάδα της εμβρυικής ζωής η μαστική ακρολοφία έχει κατά το μεγαλύτερο μέρος ατροφήσει και παραμένει μόνο το μαστικό λοφίδιο που αποτελεί την αρχέγονη θηλή. Τον πέμπτο εμβρυικό μήνα τα κύτταρα της αρχέγονης θηλής πολλαπλασιάζονται και σχηματίζουν καταδύσεις στο υποκείμενο μεσέγγυμα.

Κατά την περίοδο της γέννησης υπάρχει ένα διακλαδιζόμενο σύστημα πόρων που εκβάλλει σε μία καλά ανεπτυγμένη θηλή. Γιά την ανάπτυξη του εμβρυικού μαστού σημαντική είναι η επίδραση της προλακτίνης, των οιστρογόνων και της προγεστερόνης του πλακούντα. Λίγο μετά την γέννηση ο μαστός φαίνεται να μεγαλώνει λίγο και μπορεί να παρουσιάσει εκροή γαλακτώδους υγρού από τη θηλή. Το επιθηλιακό στοιχείο στην περίοδο αυτή αποτελείται από μικρούς πόρους, χωρίς σχηματισμό λοβίων, οι οποίοι περιβάλλονται από ινώδες συνδετικό υπόστρωμα (Haagansen 1986).

2. ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΜΑΣΤΟΥ

Στην περίοδο της ήβης υπό την επίδραση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης παρατηρείται επιμήκυνση, υπερπλασία και περαιτέρω διακλάδωση των γαλακτοφόρων πόρων, αύξηση του συνδετικού ιστού και του λίπους με αποτέλεσμα συνολική αύξηση του μεγέθους του μαστού.

Ο ώριμος μαστός είναι ένας σύνθετος σωληνοκυψελιδώδης αδένας, αποτελούμενος από 15-20 ακανόνιστους λοβούς, οι οποίοι διαχωρίζονται μεταξύ τους από πυκνό συνδετικό ιστό και περιβάλλονται από άφθονο λιπώδη ιστό. Κάθε λοβός μέσω του γαλακτοφόρου πόρου εκβάλλει στην θηλή του μαστού. Λίγο πριν την εκβολή τους οι πόροι εμφανίζουν τοπική διάταση και σχηματίζουν τους γαλακτοφόρους κόλπους. Οι μεγάλοι γαλακτοφόροι πόροι έχουν διάμετρο 2-4,5mm και εμφανίζουν επιμήκεις πτυχώσεις, ιδιαίτερα εμφανείς κατά τις διατομές. Κατά την εκβολή τους στη θηλή, επενδύονται από πολύστιβο πλακώδες επιθήλιο, το οποίο είναι συνέχεια του επιφανειακού επιθηλίου, με αποτέλεσμα, μερικές φορές, οι αυλοί των πόρων να αποφράσσονται από βύσματα κερατίνης (Page και



Anderson 1987). Το υπόλοιπο τμήμα των πόρων επενδύεται από κυλινδρικά η κυβοειδή επιθηλιακά κύτταρα και από μυοεπιθηλιακά κύτταρα τα οποία σχηματίζουν μία ασυνεχή στιβάδα μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων και της βασικής μεμβράνης. Τα πρώτα, σε τομές αιματοξυλίνης και ηωσίνης έχουν συνήθως ελαφρά ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα και ωοειδείς πυρήνες, ενώ τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα εμφανίζουν διαυγές κυτταρόπλασμα και στρογγυλούς πυρήνες. Οι γαλακτοφόροι πόροι περιβάλλονται από χαλαρό ινώδη συνδετικό ιστό καθώς και ελαστικό ιστό. Ο τελευταίος σταδιακά εξαφανίζεται στην περιοχή των εξολόβιων τελικών πόρων.

Οι γαλακτοφόροι πόροι διακλαδίζονται συνεχώς εντός των λοβών προς μικρότερης διαμέτρου πόρους και τα τελικά τους τμήματα (τελικοί πόροι – terminal ducts) καταλήγουν στα μαστικά λόβια. Ο τελικός πόρος, ο οποίος διακρίνεται σε εξωλόβιο και ενδολόβιο, θεωρείται από μερικούς συγγραφείς (Wellings και συν., 1975) ότι αποτελεί μετά του μαστικού λόβιου (terminal ductal-lobular unit, TDLU) βασική μονάδα ανατομικής και λειτουργικής σημασίας. Αυτή αποτελεί τη θέση ανάπτυξης ινοαδενωμάτων, διαφόρων αλλοιώσεων της ινοκυστικής νόσου αλλά και *in situ* και διηθητικών καρκινωμάτων τόσο πορογενούς όσο και λοβιακού τύπου.

Τα τελικά στοιχεία του εκφορητικού συστήματος του μαστού, δηλαδή οι τελικοί πόροι, ή πορίδια (ductules) κατ' άλλους, είναι εκείνα τα οποία κατά την περίοδο της γαλουχίας θα αναπτύξουν εκκριτικές μεταβολές παίρνοντας τη μορφή αδενοκυψελών (acinus). Κατ' αναλογία με το αναπνευστικό βρογχιόλιο του πνεύμονα οι τελικοί πόροι παίζουν ένα διπλό ρόλο τόσο εκκριτικό όσο και μεταφορικό. Έχει προκύψει κάποια διχογνωμία σχετικά με τον όρο «αδενοκυψέλη». Πολλοί συγγραφείς επιμένουν να διατηρούν τον όρο ακόμη και για την κατάσταση ηρεμίας, ενώ άλλοι ισχυρίζονται ότι οι τελικοί πόροι ή πορίδια πρέπει να ονομάζονται αδενοκυψέλες μόνο κατά την περίοδο της γαλουχίας (Mc Divitt και συν. 1968).

Τα τελικά πορίδια ή αδενοκυψέλες περιβάλλονται από ένα εξειδικευμένο συνδετικό υπόστρωμα με ανατομική και λειτουργική σημασία, το οποίο αφορίζει τη λοβιακή μονάδα. Ο ενδολόβιος αυτός συνδετικός ιστός είναι χαλαρός, με αρκετά τριχοειδή αγγεία και συχνά περιέχει λίγα λεμφοκύτταρα, πλασματοκύτταρα, ιστιοκύτταρα ή μαστοκύτταρα. Αποτελείται κυρίως από βλεννοπολυσακχαρίτες και με τη χρώση βλεννοκαρμίνη, το στρώμα του λόβιου διακρίνεται πολύ καλά, αντίθετα με τον περιβάλλοντα μεσολόβιο συνδετικό ιστό, ο οποίος δεν αντιδρά (Azzopardi 1979). Ο μεσολόβιος συνδετικός ιστός επιπλέον είναι πιο πυκνός από τον ενδολόβιο και έχει βασικά ανατομική, παρά λειτουργική σημασία για το μαστό.



Το επιθήλιο των αδενοκυψελών (acini) αποτελείται από δύο τύπους κυττάρων: τα προς τον αυλό επιθηλιακά κύτταρα και τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα. Τα πρώτα είναι κυβοειδή, ή κυλινδρικά, έχουν ηωσινόφιλο πρωτόπλασμα με ασαφή όρια και σφαιροειδείς πυρήνες με κεντρική εντόπιση. Τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα ευρίσκονται μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων και της βασικής μεμβράνης όπου σχηματίζουν μία ασυνεχή στιβάδα, έχουν μικρότερους πυρήνες από τα επιθηλιακά κύτταρα, και σε τομές αιματοξυλίνης και ηωσίνης εμφανίζουν διαυγές πρωτόπλασμα (Bloom και Fawcett 1986, Page και Anderson 1987, Mc Carty και Tucker 1992).

Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και σε κατάσταση ηρεμίας, παρατηρείται ομοιόμορφη εμφάνιση των κυττάρων καθ' όλη την έκταση των πόρων μέχρι και τα τελικά τους τμήματα. Τα επιθηλιακά κύτταρα παρουσιάζουν ομαλές η ελαφρά πτυχωτές κυτταρικές μεμβράνες, οι οποίες προς τον αυλό σχηματίζουν μικρολάχνες, ενώ στις θέσεις επαφής με τα γειτονικά κύτταρα διαθέτουν συνήθως δεσμοσώματα. Οι πυρήνες είναι ομαλοί, με ομοιογενή κατανομή της χρωματίνης και αρκετά μεγάλο πυρήνιο. Παρουσιάζουν μέτριο αριθμό μιτοχονδρίων, ελάχιστα εμφανές ενδοπλασματικό δίκτυο και μικρή και συχνά δυσδιάκριτη συσκευή Golgi. Περιέχουν συνήθως ελεύθερα ριβοσώματα, κοκκία γλυκογόνου, εκκριτικά κοκκία, λυσοσωμάτα και κοκκία λιποφουσκίνης (Fisher και συν. 1976). Τα μυοεπιθηλιακά κύτταρα, τα οποία είναι τοποθετημένα με τον επιμήκη τους άξονα κάθετο προς αυτόν των επιθηλιακών κυττάρων, εμφανίζουν μακριές προσεκβολές και πτυχώσεις της πρωτοπλασματικής μεμβράνης, η οποία στο κατώτερο τμήμα της συνδέεται με ημιδεσμοσώματα με τη βασική μεμβράνη. Ο πυρήνας τους καταλαμβάνει συνήθως το ανώτερο τμήμα του κυττάρου. Στο κυτταρόπλασμα περιέχουν ελάχιστα μικρά μιτοχόνδρια, λίγο ενδοπλασματικό δίκτυο και κυμαινόμενο αριθμό ριβοσωμάτων. Περιέχουν επίσης, ιδίως στις αποφυάδες, ινίδια με χαρακτηριστικές ατρακτοειδείς σκουρόχρωμες περιοχές που μοιάζουν με αυτές που παρατηρούνται στα μυοϊνίδια των λείων μυικών ινών και ονομάζονται πυκνά σωματίδια (dense bodies) (Fisher 1976, Bloom και Fawcett 1986).

3. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΩΝ ΜΑΣΤΟΥ

Η ταξινόμηση των καρκινωμάτων του μαστού που προτείνεται από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (ΠΟΥ, 1982) έχει ως εξής:



ΜΗ-ΔΙΗΘΗΤΙΚΑ

Πορογενές καρκίνωμα in situ
Λοβιακό καρκίνωμα in situ

ΔΙΗΘΗΤΙΚΑ

Διηθητικό πορογενές καρκίνωμα (μή ειδικού τύπου, NOS)
Νόσος Paget
Διηθητικό λοβιακό καρκίνωμα
Μυελοειδές καρκίνωμα
Βλεννώδες καρκίνωμα
Σωληνώδες καρκίνωμα
Διηθητικό θηλώδες καρκίνωμα
Αδενοειδές κυστικό καρκίνωμα
Εκκριτικό καρκίνωμα
Αποκρινές καρκίνωμα
Μεταπλαστικό καρκίνωμα
Μικτός τύπος

Η τυποποίηση των διηθητικών καρκινωμάτων έχει αναγνωρισμένη προγνωστική αξία^{1,2}.

Οι όγκοι που περιλαμβάνονται στην κατηγορία των διηθητικών καρκινωμάτων, αφορούν τα νεοπλάσματα στα οποία είναι εμφανής η διήθηση του στρώματος, ανεξάρτητα της συνύπαρξης, ή όχι, in situ στοιχείου και της αναλογίας των δύο.

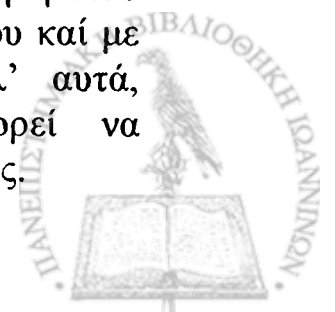
Πορογενές – μή ειδικού τύπου: Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει διηθητικά καρκινώματα που δεν μπορούν να ταξινομηθούν στις πύο σπάνιες ποικιλίες διηθητικού καρκινώματος. Είναι ο τύπος του καρκινώματος που συνήθως υπονοείται με τον όρο < καρκίνωμα του μαστού >, παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία και ισοδυναμεί με το 75% των περιπτώσεων στις περισσότερες σειρές.

4. ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

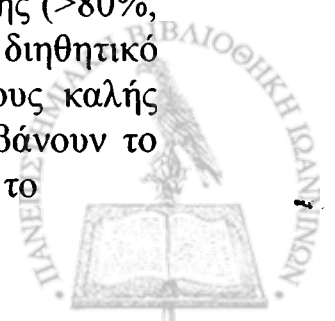
Το προσδόκιμο πενταετούς επιβίωσης για το διηθητικό καρκίνωμα του μαστού είναι 60% για κλινικά εντοπισμένη νόσο και 34% για νόσο με επιχώριους μεταστατικούς λεμφαδένες³. Το ποσοστό αυτό τροποποιείται σημαντικά από μία μεγάλη ποικιλία κλινικών και παθολογοανατομικών παραγόντων:



- 4.1. **Ηλικία ασθενούς.** Γυναίκες νεότερες των 50 ετών κατά τη διάρκεια της διάγνωσης έχουν την καλύτερη πρόγνωση. Η σχετική επιβίωση ελαττώνεται μετά την ηλικία των 50 ετών και είναι ιδιαίτερα χαμηλή σε ηλικιωμένες γυναίκες⁴. Οσον αφορά πολύ νέες γυναίκες (ηλικίας μικρότερης ή ίσης των 35 ετών), μερικές μελέτες έχουν δείξει πρόγνωση, παρόμοια με αυτή των μεγαλύτερων σε ηλικία ασθενών⁵, ενώ άλλες έχουν δείξει σημαντικά πιο αυξημένο κίνδυνο υποτροπής της νόσου και απομακρυσμένων μεταστάσεων⁶.
- 4.2. **Εγκυμοσύνη.** Υπάρχει γενική συμφωνία για το καρκίνωμα του μαστού που εμφανίζεται κατά τη διάρκεια εγκυμοσύνης ή θηλασμού, ότι σχετίζεται με συνολικά φτωχότερη πρόγνωση. Το ποσοστό πενταετούς επιβίωσης στις περισσότερες σειρές κυμαίνεται από 15% έως 35%⁷. Παρ'όλ' αυτά έχει λεχθεί ότι η διαφορά αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική όταν αξιολογηθεί συγκριτικά στάδιο προς στάδιο⁸.
- 4.3. **Αντισυλληπτικά.** Καμία πειστική ένδειξη δεν υπάρχει ανάμεσα στη χρήση αντισυλληπτικών και στην εμφάνιση ή επιβίωση του καρκινώματος του μαστού⁹.
- 4.4. **Πρώιμη διάγνωση.** Τα ποσοστά της σχετικής πενταετούς, οκταετούς και δεκαετούς επιβίωσης για ασυμπτωματικό καρκίνωμα του μαστού, που ανιχνεύτηκε σε μία μεγάλη μελέτη εφαρμογής προληπτικού ελέγχου (BCDDP) ήταν 88%, 83% και 79% αντίστοιχα¹⁰. Αυτά τα ποσοστά είναι πολύ μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα του κλινικά εμφανούς καρκίνου και σχετίζονται με το γεγονός ότι οι όγκοι ήταν μικρού μεγέθους στις περισσότερες περιπτώσεις, ήταν συνήθως ελεύθεροι μασχαλιαίας μεταστατικής νόσου και περιελάμβαναν ένα υψηλό ποσοστό ευνοικών ιστολογικών τύπων.
- 4.5. **Παρουσία ή απουσία διήθησης.** Αποτελεί τον πιο σημαντικό προγνωστικό παράγοντα στον καρκίνο του μαστού. Πρακτικά, τα in situ καρκινώματα είναι 100% ιάσιμα με μαστεκτομή. Σε καρκινώματα πορογενούς τύπου με in situ και διηθητικό στοιχείο, η πιθανότητα λεμφαδενικών μεταστάσεων, σχετίζεται με το ποσοστό της διηθητικής νόσου. Το ποσοστό του μή διηθητικού στοιχείου σχετίζεται με την παρουσία πολυεστιακής νόσου και με την πιθανότητα λανθάνουσας διήθησης^{11,12}. Παρ'όλ' αυτά, ενδοπορικά καρκινώματα φαγεσωρικού τύπου μπορεί να σχετίζονται με μεταστάσεις σε απουσία εμφανούς διήθησης.



- 4.6. Μέγεθος όγκου.** Η διάμετρος του πρωτοπαθούς όγκου σχετίζεται σημαντικά με την παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων και με το ποσοστό επιβίωσης^{13,14}. Στην πραγματικότητα αποτελεί έναν από τους ισχυρότερους προγνωστικούς δείκτες εξάπλωσης της νόσου και του ποσοστού υποτροπής σε καρκινώματα με αρνητικούς μασχालιαίους λεμφαδένες¹⁵. Το μέγεθος του όγκου είναι ένα από τα δύο κριτήρια για τον ορισμό του < ελάχιστου > (minimal) καρκινώματος του μαστού, που περιλαμβάνει όλα τα in situ καρκινώματα, ανεξαρτήτως μεγέθους και τα διηθητικά καρκινώματα μεγέθους ίσου ή μικρότερου του 1 εκ.
- 4.7. Εντόπιση.** Καμία συσχέτιση δεν έχει βρεθεί ανάμεσα στην πρόγνωση και την εντόπιση του πρωτοπαθούς όγκου, όσον αφορά τα τεταρτημόρια του μαζικού αδένου.
- 4.8. Ιστολογικός τύπος.** Δεν υπάρχει καμία σημαντική προγνωστική διαφορά μεταξύ του διηθητικού πορογενούς και του διηθητικού λοβιακού καρκινώματος του μαστού. Μορφολογικές ποικιλίες του διηθητικού πορογενούς καρκινώματος με πύε ευνοϊκή πρόγνωση είναι τα: σωληνώδες καρκίνωμα, ηθμοειδές καρκίνωμα, μυελοειδές καρκίνωμα, αμιγές βλεννώδες καρκίνωμα, θηλώδες καρκίνωμα, αδενοκυστικό καρκίνωμα και το νεανικό (εκκριτικό) καρκίνωμα¹⁶. Μία ποικιλία λοβιακού (και μερικές φορές πορογενούς) καρκινώματος με εξαιρετικά κακή πρόγνωση, είναι το καρκίνωμα από κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου. Η πρόγνωση επίσης του φλεγμονώδους καρκίνου είναι κακή. Όγκοι, οι οποίοι θεωρούνται ότι έχουν πύε επιθετική συμπεριφορά από τα πορογενή καρκινώματα, αν και τελικά δείχνουν μικρή διαφορά όσον αφορά τα ποσοστά επιβίωσης είναι το πλακώδες καρκίνωμα, το μεταπλαστικό καρκίνωμα και το καρκίνωμα με νευροενδοκρινικά χαρακτηριστικά (συμπεριλαμβανομένου του καρκινοειδούς). Στη μελέτη για το καρκίνο του μαστού από την ομάδα του Νόττιγχαμ¹¹³ ο ιστολογικός τύπος παρέχει ανεξάρτητες προγνωστικές πληροφορίες, αν και η επίπτωσή του στη συνολική επιβίωση είναι μικρός. Οι ιστολογικοί τύποι μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με την προγνωστική τους αξία. Σε όγκους εξαιρετικής πρόγνωσης (>80%, 10ετής επιβίωση), που περιλαμβάνουν το σωληνώδες, διηθητικό ηθμοειδές, βλεννώδες και σωληνοδο-λοβιακό. Σε όγκους καλής πρόγνωσης (60%-80%, 10ετής επιβίωση), που περιλαμβάνουν το μικτό σωληνώδες, το μικτό πορογενές με ειδικό τύπο και το



κυψελιδοειδές λοβιακό καρκίνωμα. Το διηθητικό θηλώδες, το κλασσικό λοβιακό, το μυελοειδές και το άτυπο μυελοειδές καρκίνωμα έχουν μέτρια πρόγνωση (50%-60%, 10ετής πρόγνωση) και το πορογενές μη ειδικού τύπου, το συμπαγές λοβιακό, το μικτό πορογενές με λοβιακό και τα μικτά λοβιακά καρκινώματα έχουν φτωχή πρόγνωση (<50%, 10ετής επιβίωση). Παρ'όλ'αυτά σε πολυπαραγοντικές αναλύσεις, όταν αυτές οι ομάδες ιστολογικών τύπων εξετάζονται σε σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας, ο τελευταίος έχει πολύ πιο ισχυρή επίδραση.

4.9. Ιστολογικός βαθμός κακοηθείας (microscopic grade). Τα δύο κυριότερα χρησιμοποιούμενα συστήματα αξιολόγησης του βαθμού διαφοροποίησης του καρκινώματος του μαστού, τα τελευταία χρόνια είναι αυτά των Bloom και Richardson¹⁷ και του Black¹⁸. Το πρώτο βασίζεται κυρίως σε αρχιτεκτονικά χαρακτηριστικά (ποσοστό σχηματισμού αδενίων) και το δεύτερο στο βαθμό πυρηνικής ατυπίας. Αυτά τα στοιχεία συνήθως εκτιμούνται σε μικροσκοπική εξέταση υπό το οπτικό μικροσκόπιο πλακιδίων ρουτίνας, χρωματισμένων με τη χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης, αν και έχουν γίνει ποικίλες προσπάθειες για την ποσοστιαία εκτίμηση αυτών των χαρακτηριστικών (ιδιαίτερα των πυρηνικών αλλαγών) με συστήματα ανάλυσης υποβοηθούμενα από κομπιούτερ¹⁹⁻²². Εφόσον τόσο η αρχιτεκτονική, όσο και η κυτταρολογία σχετίζονται με την πρόγνωση, έγινε η λογική πρόταση να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό^{23,24}. Ο Elston υπήρξε ο πιο ένθερμος υποστηρικτής αυτής της προσέγγισης, που συνήθως αναφέρεται ως τροποποιημένη έκδοση του Νότιτγχαμ του συστήματος των Bloom και Richardson, η οποία επίσης συμπεριλαμβάνει και την εκτίμηση της μιτωτικής δραστηριότητας^{25,26}. Σ' αυτή την πρόταση, ο βαθμός κακοηθείας υπολογίζεται από την πρόσθεση των αθροίσεων, που προκύπτουν από το ποσοστό σχηματισμού αδενίων, το ποσοστό πυρηνικού πλειομορφισμού και τον αριθμό των πυρηνοκινησιών. Αναλυτικότερα:

Ποσοστό σχηματισμού αδενίων

Αθροισμα

Πλειονότητα του όγκου (περισσότερο από 75%): 1

Μέτριο ποσοστό (10-75%): 2

Λίγο ή καθόλου (λιγότερο από 10%): 3



Πυρηνική πλειομορφία

Άθροισμα

Μικροί πυρήνες, με μικρή αύξηση του μεγέθους σε σύγκριση με τα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα του μαζικού παρεγχύματος, ομαλό περίγραμμα, ομοιόμορφη κατανομή χρωματίνης, μικρή ποικιλία μεγέθους: **1**

Κύτταρα μεγαλύτερα του φυσιολογικού, με ανοιχτόχρωμους φυσσαλιδώδεις πυρήνες, ορατά πυρήνια και μέτρια ποικιλία μεγέθους και σχήματος: **2**

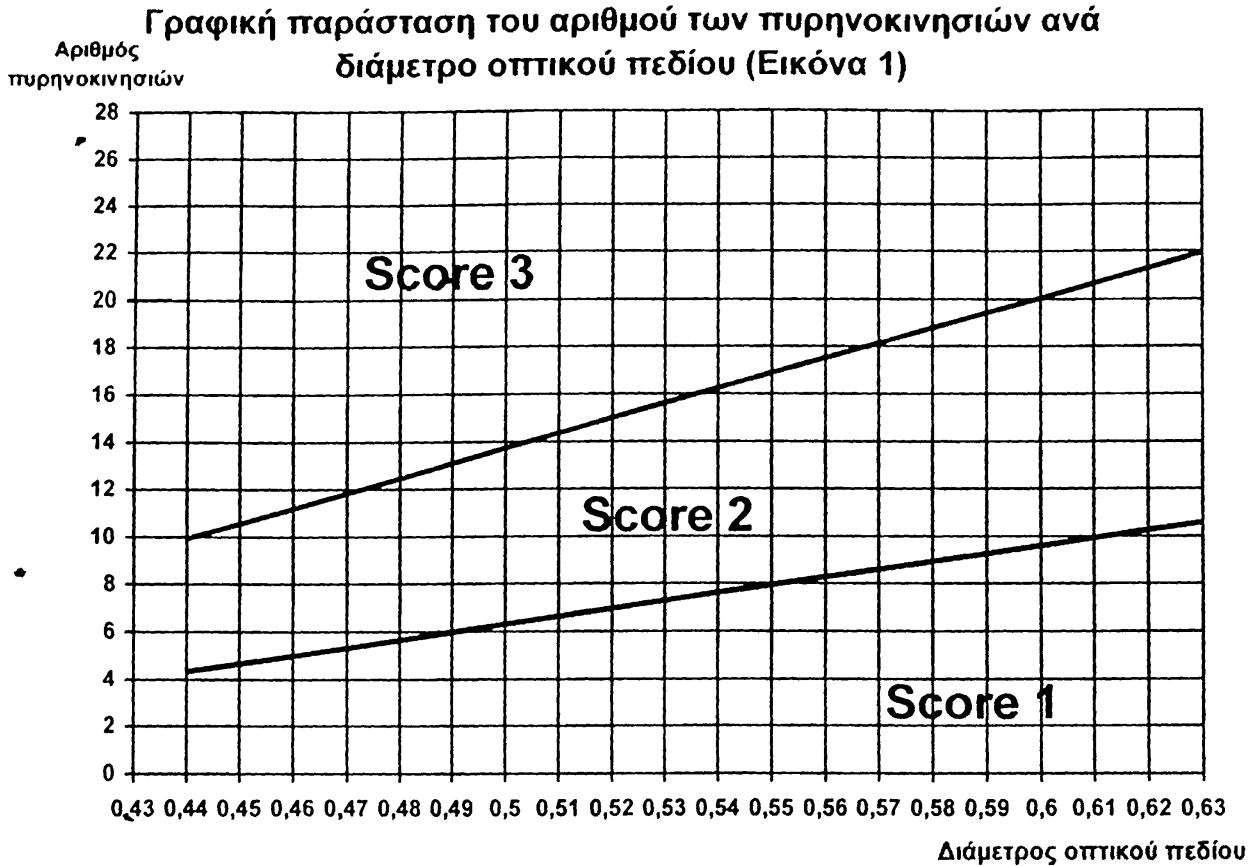
Φυσσαλιδώδεις πυρήνες, συχνά με εμφανή πυρήνια, με σημαντική ποικιλία μεγέθους και σχήματος, μερικές φορές με πολύ μεγάλες και 'ανώμαλες' κυτταρικές μορφές: **3**

Μιτώσεις

Βάσει των οδηγιών για τη σύνταξη των ιστολογικών εκθέσεων στο πρόγραμμα προληπτικού πληθυσμιακού ελέγχου για τον καρκίνο του μαστού, της συντονιστικής ομάδας του Εθνικού Συστήματος Υγείας στο Ηνωμένο Βασίλειο (Pathology Reporting in Breast Cancer Screening, second edition, NHSBSP Publication No 3, April 1995), ο αριθμός των μιτώσεων υπολογίζεται, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Το άθροισμα εξαρτάται από τον αριθμό των μιτώσεων ανά δέκα μεγάλα οπτικά πεδία, αξιολογούμενα στην περιφέρεια του όγκου. Το μέγεθος των οπτικών πεδίων μεγάλης μεγέθυνσης, ποικίλλει και επομένως είναι απαραίτητο να προσαρμοστεί η μέτρηση των πυρηνοκινησιών χρησιμοποιώντας τη σχηματική παράσταση υπολογισμού του μιτωτικού δείκτη σε σχέση με τη διάμετρο του οπτικού πεδίου (εικόνα 1). Αυτό χρειάζεται να γίνει μία φορά για κάθε μικροσκόπιο.





Στον κάθετο άξονα αναγράφεται ο αριθμός των μιτώσεων ανά δέκα οπτικά πεδία 40X. Αν ο αριθμός των μιτώσεων σε ένα μικροσκόπιο βρίσκεται κάτω από την κατώτερη καμπύλη τότε ο μιτωτικός δείκτης είναι 1. Αν βρίσκεται μεταξύ των δύο καμπυλών είναι 2 και αν βρίσκεται πάνω από την ανώτερη καμπύλη είναι 3.

Προκειμένου να υπολογιστεί ο αριθμός των πυρηνοκινήσιών για τον κάθε τύπο μικροσκοπίου, πρέπει να ακολουθηθεί η ακόλουθη διαδικασία:

1. Μετράμε τη διάμετρο του οπτικού πεδίου με τη βοήθεια μικρομετρικής κλίμακας (graticule)
2. Σημειώνουμε την τιμή αυτή στον οριζόντιο άξονα της γραφικής παράστασης
3. Φέρουμε μία κάθετη γραμμή που να διέρχεται από αυτή την τιμή
4. Διαβάζουμε την τιμή α στον οριζόντιο άξονα όπου η γραμμή τέμνει την κατώτερη τονισμένη γραμμή
5. Διαβάζουμε την τιμή β στον οριζόντιο άξονα όπου η κάθετη γραμμή τέμνει την ανώτερη τονισμένη γραμμή
6. Το άθροισμα τότε είναι:

Άθροισμα	Μετρηση
3	$>\beta$
2	ανάμεσα $\alpha+1$ και β
1	0 έως α

Παραδείγματος χάριν, για μία διάμετρο οπτικού πεδίου 0.48 $\alpha=6$, $\beta=12$ και επομένως :

Άθροισμα 3 = > 12 μιτώσεις / μοπ (οπτικό πεδίο μεγάλης μεγένθυσης)

Άθροισμα 2 = 7-12 μιτώσεις / μοπ

Άθροισμα 1 = 0-6 μιτώσεις / μοπ

Ο τελικός βαθμός κακοηθείας υπολογίζεται από το άθροισμα που προκύπτει από την πρόσθεση των αθροισμάτων για κάθε παράμετρο, κάθε μία εκ των οποίων βαθμολογείται με ένα, δύο ή τρεις βαθμούς. Αυτό καταλήγει σε μία άθροιση 3 έως 9 βαθμών, το οποίο μεταφράζεται στο τελικό βαθμό διαφοροποίησης ως εξής:

Βαθμός κακοηθείας 1 (grade 1) = άθροισμα 3-5

Βαθμός κακοηθείας 2 (grade 2) = άθροισμα 6-7

Βαθμός κακοηθείας 3 (grade 3) = άθροισμα 8-9

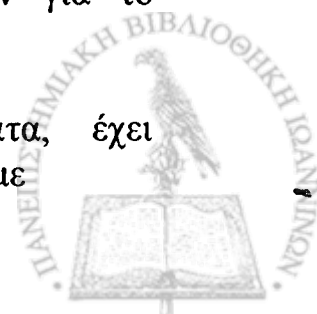
Η χρησιμότητα του ανωτέρω και άλλων σχετιζόμενων συστημάτων αξιολόγησης του βαθμού κακοηθείας των καρκινωμάτων του μαστού έχει πειστικά και επανειλημμένα αποδειχθεί²⁷⁻³⁰. Ετσι ώστε, η παροχή της ανωτέρω πληροφορίας στην καθ' ημέρα ιστολογική έκθεση να αποτελεί αναγκαιότητα³¹. Αυτό έχει επίσης ενισχυθεί και από το γεγονός, ότι με τη χρήση των ανωτέρω συστημάτων έχει επιτευχθεί ένας σημαντικός βαθμός συμφωνίας μεταξύ των διαφόρων διαγνωστών^{32,33}.

4.10. Τύπος των διηθητικών ορίων του όγκου. Ογκοι με 'απωθούντα' διηθητικά όρια ('pushing') έχουν καλύτερη πρόγνωση, από τους όγκους με 'ανώμαλα' διηθητικά όρια. Αυτό αφορά όχι μόνο το μυελοειδές καρκίνωμα, αλλά και άλλους τύπους καλά περιγεγραμμένων νεοπλασμάτων³⁴⁻³⁶.

4.11. Νέκρωση του όγκου. Η νέκρωση του όγκου σχετίζεται με αυξημένη επίπτωση λεμφαδενικών μεταστάσεων και ελαττωμένα ποσοστά επιβίωσης³⁷, αν και αυτή η παράμετρος συνήθως σχετίζεται με όγκους αυξημένου βαθμού ιστολογικής κακοηθείας.

4.12. Αντίδραση του στρώματος. Έχει βρεθεί, ότι όγκοι με απουσία φλεγμονώδους αντίδρασης στην περιφέρεια του όγκου, έχουν ελαττωμένα ποσοστά λεμφαδενικών μεταστάσεων και επομένως καλύτερη πρόγνωση³⁸. Βέβαια, τα ανωτέρω δεν ισχύουν για το μυελοειδές καρκίνωμα.

4.13. Πυκνότητα μικροαγγείων (αγγειογένεση). Πρόσφατα, έχει εκφραστεί η άποψη ότι τα διηθητικά καρκινώματα του μαστού με



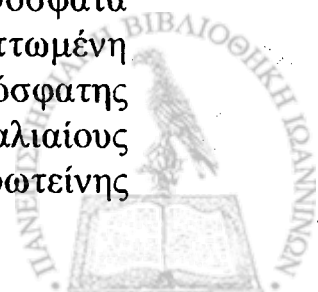
αυξημένη αγγείωση στο περιβάλλον στρώμα συμπεριφέρονται πιο επιθετικά από τα υπόλοιπα καρκινώματα³⁹⁻⁴¹. Έχει γίνει προσπάθεια να ποσοτικοποιηθεί η 'πυκνότητα' των αγγείων και να συγκριθεί αυτή η παράμετρος με άλλες προγνωστικές παραμέτρους και την πρόγνωση⁴². Οι αρχικοί υποστηρικτές αυτής της άποψης έδειξαν εντυπωσιακά αποτελέσματα, και τα ανωτέρω υποστηρίχτηκαν και από ανεξάρτητους ερευνητές^{43,44}. Άλλοι, απέτυχαν να δείξουν κάποια συσχέτιση και σχολίασαν τη μεγάλη δυσκολία όσον αφορά την εκτίμηση του αγγειακού δικτύου που περιβάλλει αυτούς τους όγκους⁴⁵⁻⁴⁷.

4.14. Ελάστωση. Έχει υποστηριχτεί, ότι καρκινώματα του μαστού χωρίς συνοδό ελάστωση, εμφανίζουν χαμηλότερο ποσοστό απαντητικότητας στην ενδοκρινική θεραπεία, απ'ότι τα καρκινώματα με μακροελάστωση⁴⁸. Όσον αφορά το ποσοστό επιβίωσης, δεν έχουν βρεθεί πειστικές διαφορές μεταξύ όγκων με, ή χωρίς ελάστωση^{49,50}.

4.15. Καθεψίνη D. Σε αντίθεση με αρχικές απόψεις⁵¹, ούτε η ανοσοιστοχημική έκφραση της καθεψίνης D στον όγκο, ούτε τα επίπεδα του ενζύμου αυτού στον ορό του αίματος, έχουν αποδειχθεί να έχουν ξεχωριστή προγνωστική αξία⁵²⁻⁵⁶.

4.16. c-erb-B2 (neu/HER-2) ογκογονίδιο. Ανίχνευση αυτού του ογκογονιδίου (το οποίο κωδικοποιεί μία διακυττάρια γλυκοπρωτεΐνη με δραστηριότητα τυροσίνης-κινάσης, γνωστή ως p185) αναφέρεται σχεδόν σε όλα τα ενδοορμικά καρκινώματα φαγεσωρικού τύπου, σε 10%-40% των διηθητικών πορογενών καρκινωμάτων και μόνο σε λίγες περιπτώσεις διηθητικού λοβιακού καρκινώματος^{57,58}. Μπορεί να ανιχνευθεί με ανοσοιστοχημική ανίχνευση του προϊόντος της πρωτεΐνης ή με *in situ* υβριδισμό του mRNA. Η ανίχνευση αυτού του ογκογονιδίου, πιστεύεται ότι μπορεί να αναγνωρίσει μία υποκατηγορία ασθενών με φτωχή πρόγνωση, ιδιαίτερα όταν υπάρχουν μασχαλιαίες λεμφαδενικές μεταστάσεις⁵⁹⁻⁶¹. Παρ'όλ'αυτά, σε πολυπαραγοντικές αναλύσεις, αυτή η παράμετρος επισκιάζεται από τις μορφολογικές παραμέτρους^{62,63}. Ειδικότερα, σχετίζεται στενά με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας⁶⁴. Έχει επίσης υποστηριχτεί, ότι ασθενείς με υπερέκφραση του c-erb-B2 δείχνουν καλύτερη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία⁶⁵.

4.17. p53 και nm3. Συγκέντρωση της πρωτεΐνης p53 (σαν αποτέλεσμα γονιδιακής μετάλλαξης) και χαμηλή έκφραση της πρόσφατα ανακαλυφθείσας πρωτεΐνης nm3, λέγεται ότι σχετίζεται με ελαττωμένη επιβίωση⁶⁶⁻⁶⁸. Εντούτοις, οι συγγραφείς μίας μεγάλης πρόσφατης μελέτης που συμπεριέλαβε 440 ασθενείς με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, συμπέρανε ότι η ανοσοιστοχημική έκφραση της πρωτεΐνης



p53 δεν αποτελεί αξιόπιστο προγνωστικό δείκτη σ' αυτό τον πληθυσμό και δεν σχετίζεται με κανένα μεγάλο επιδημιολογικό παράγοντα κινδύνου⁶⁹.

4.18. Bcl-2. Έχει δειχτεί συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της πρωτεΐνης bcl-2 και τη μακρόχρονη επιβίωση στον καρκίνο του μαστού⁷⁰. Το bcl-2 σχετίζεται επίσης με την έκφραση οιστρογονικών υποδοχέων⁷¹.

4.19. Διήθηση του δέρματος. Τα καρκινώματα του μαστού στα οποία υπάρχει διήθηση του υπερκειμένου δέρματος, σχετίζονται με ελαττωμένα ποσοστά επιβίωσης⁷². Διήθηση των δερματικών λεμφαγγείων, όπως ορίζεται το 'φλεγμονώδες' καρκίνωμα, είναι ένα ιδιαίτερα κακό προγνωστικό σημείο.

4.20. Διήθηση της θηλής. Διήθηση της θηλής από καρκίνωμα σχετίζεται με μεγαλύτερο κίνδυνο λεμφαδενικών μεταστάσεων⁷³.

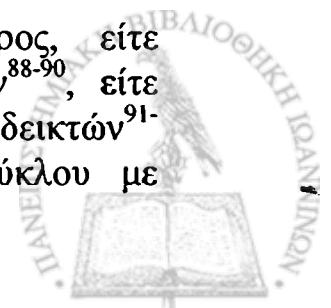
4.21. Καρκινικά έμβολα σε λεμφαγγεία. Η παρουσία καρκινικών εμβόλων σε λεμφαγγεία του μαστού σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο τοπικής υποτροπής του όγκου^{74,75}.

4.22. Αγγειακά έμβολα. Αυτό το εύρημα, σχετίζεται με το μέγεθος του όγκου, τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας, τον ιστολογικό τύπο, την κατάσταση των λεμφαδένων, την ανάπτυξη απομακρυσμένων μεταστάσεων, και φτωχή πρόγνωση⁷⁶⁻⁷⁹.

4.23. Υποδοχείς οιστρογόνων. Πολλοί συγγραφείς συμφωνούν ότι ασθενείς με όγκους που εκφράζουν υποδοχείς οιστρογόνων έχουν μεγαλύτερο μεσοδιάστημα ελεύθερο νόσου, από τους άλλους. Πάντως, οι διαφορές όσον αφορά την μακρόχρονη πρόγνωση είναι μηδαμινές και ίσως στατιστικά μη σημαντικές⁸⁰⁻⁸².

4.24. Πλοειδισμός. Αν και υπάρχει σημαντικός αριθμός μελετών για την πλοειδικότητα του καρκίνου του μαστού, δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο αν αυτή η παράμετρος, προσθέτει ανεξάρτητη πληροφορία, θεραπευτικής ή προγνωστικής αξίας, όταν ήδη έχουν ληφθεί υπόψιν το μέγεθος του όγκου, ο βαθμός ιστολογικής κακοηθείας, η κατάσταση των λεμφαδένων και η κατάσταση των οιστρογονικών υποδοχέων⁸³⁻⁸⁷.

4.25. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Αυτή η παράμετρος, είτε υπολογιζόμενη με τη μέτρηση του αριθμού των μιτώσεων⁸⁸⁻⁹⁰, είτε ανοσοϊστοχημικά με τη μέτρηση του δείκτη Ki-67, ή άλλων δεικτών⁹¹⁻⁹⁵, είτε με τη μέτρηση της φάσης S του κυτταρικού κύκλου με



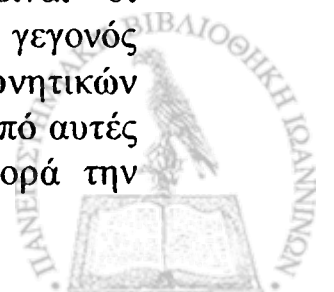
κυτταρομετρία ροής, αποτελεί ένα πολύ σημαντικό προγνωστικό παράγοντα^{84,96,97}. Ως τέτοιος έχει ενσωματωθεί στο συνδυασμένο σύστημα αξιολόγησης του ιστολογικού βαθμού κακοηθείας από τον Elston²⁵.

4.26. Μασχαλιαίες λεμφαδενικές μεταστάσεις. Αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς προγνωστικούς παράγοντες. Όχι μόνον, υπάρχει σημαντική διαφορά στα ποσοστά επιβίωσης μεταξύ των ασθενών με θετικούς και αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, αλλά το ποσοστό επιβίωσης εξαρτάται επίσης και από το επίπεδο των μασχαλιαίων λεμφαδένων που προσβάλλονται από τη νόσο (χαμηλό, μέσο, υψηλό)⁹⁸, τον απόλυτο αριθμό των προσβλημένων λεμφαδένων (λιγότεροι από τέσσερις, έναντι τεσσάρων ή περισσότερους)⁹⁹⁻¹⁰¹, τον 'όγκο' της μεταστατικής νόσου^{102,103}, την παρουσία ή απουσία εξωλεμφαδενικής επέκτασης του όγκου^{110,104-106}, και από την παρουσία η απουσία νεοπλασματικών κυττάρων στα προσαγωγά λεμφαγγεία των μασχαλιαίων λεμφαδένων¹⁰⁷. Ασθενείς, των οποίων οι αρχικές τομές των λεμφαδένων είναι αρνητικοί, αλλά που εμφανίζουν μικρομεταστάσεις σε εξέταση-βαθύτερων τομών σε σειρά, έχουν την ίδια πρόγνωση με τους ασθενείς στους οποίους δεν βρέθηκε όγκος στους μασχαλιαίους λεμφαδένες^{108,109}.

4.27. Μετάσταση στους έσω μαστικούς λεμφαδένες. Η επιβίωση των ασθενών με προσβολή της ομάδας αυτής των λεμφαδένων, είναι χαμηλότερη από αυτήν των ασθενών χωρίς προσβολή των ανωτέρω λεμφαδένων, ειδικότερα όταν αξιολογούνται ασθενείς με έναν η τρεις θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες¹¹⁰.

4.28. Τοπική υποτροπή. Αυτό αποτελεί ένα δυσοίωνα σημείο. Σε μία σειρά από εξήντα ασθενείς με ομόπλευρη υποτροπή του θωρακικού τοιχώματος και χωρίς εντοπισμένες απομακρυσμένες μεταστάσεις, όλες οι ασθενείς κατέληξαν τελικά από τη νόσο¹¹¹.

4.29. Τύπος της θεραπείας. Σύμφωνα με όλες τις ενδείξεις η έκβαση της νόσου εξαρτάται περισσότερο από τη φύση του εκάστοτε όγκου, παρά από τον τύπο της εφαρμοζόμενης θεραπείας. Υπάρχει οπωσδήποτε μία εξαιρετική ομοιότητα στα ποσοστά επιβίωσης από διαφορετικά κέντρα όπου ακολουθούνται ευρέως διαφορετικές θεραπευτικές προσεγγίσεις¹¹². Ένας σημαντικός περίπλοκος παράγοντας στην αξιολόγηση των θεραπευτικών αποτελεσμάτων από τα διάφορα κέντρα, είναι οι σημαντικές διαφορές όσον αφορά τη φυσική ιστορία της νόσου, γεγονός το οποίο καθιστά απαραίτητο τον προσεχτικό σχεδιασμό ερευνητικών πρωτοκόλλων και σειρών μελέτης της νόσου. Οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες δεν έχουν δείξει σημαντικές διαφορές, όσον αφορά την



επιβίωση, ανάμεσα στις ομάδες ασθενών, στις οποίες συμπεριέλαβαν τα ακόλουθα:

α. Για ασθενείς με κλινικά αρνητικούς λεμφαδένες:

- Ριζική μαστεκτομή έναντι ολικής μαστεκτομής με τοπική ακτινοβολήση μετεγχειρητικά
- Ολική μαστεκτομή έναντι τμηματεκτομής με τοπική ακτινοβολήση μετεγχειρητικά

β. Για ασθενείς με κλινικά θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες:

- Ριζική μαστεκτομή, έναντι ολικής μαστεκτομής με επιχώρια ακτινοβολήση μετεγχειρητικά

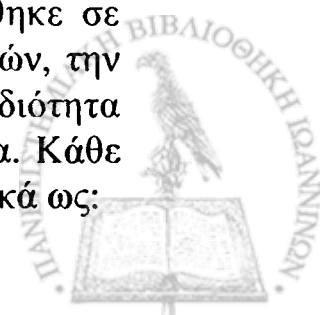


5. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΟΥ ΒΑΘΜΟΥ ΚΑΚΟΗΘΕΙΑΣ ΣΤΟ ΔΙΗΘΗΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

5.1. Ιστορική αναδρομή

Από τις πρώτες κιόλας μέρες της μικροσκοπικής Παθολογικής Ανατομικής, ήταν γνωστό ότι οι κακοήθεις όγκοι διαφέρουν όσον αφορά το βαθμό κακοηθείας, και το γεγονός αυτό αντανακλάται στην μορφολογική τους εμφάνιση (Hanseman 1890; Dennis 1891). Η πρώτη επίσημη ανάλυση σε καρκίνωμα του μαστού πραγματοποιήθηκε από τον Greenhough (1925). Ο Greenhough εξέτασε όγκους από ασθενείς που υπέστησαν ριζική μαστεκτομή, και κατόρθωσε να τους διαχωρίσει σε τρεις βαθμούς κακοηθείας, βασιζόμενος στην αξιολόγηση οκτώ ιστολογικών παραμέτρων: το ποσοστό σχηματισμού αδενίων, την παρουσία ή όχι επιθηλιακής έκκρισης, το μέγεθος των κυττάρων, το μέγεθος των πυρήνων, την ποικιλία κυτταρικού και πυρηνικού μεγέθους, την πυρηνική υπερχρωμασία και τη μιτωτική δραστηριότητα. Ο αριθμός των περιπτώσεων ήταν μικρός, αλλά έδειξε μία καθαρή συσχέτιση ανάμεσα στον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας και την 'ίαση', αν και ο όρος 'ίαση' δεν ήταν σαφώς καθορισμένος. Παρόμοια ευρήματα αναφέρθηκαν και από άλλους ερευνητές (White 1927; Patey & Scharff 1928; Haagansen 1933), ενώ άλλοι ερεύνησαν και άλλους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της αξιολόγησης στρωματικών παραγόντων (Hueper & Schmitz 1929). Οι Patey και Scharff (1928) ακολούθησαν τη μέθοδο του Greenhough, αλλά απέδωσαν μεγαλύτερη σημασία στο σχηματισμό αδενίων, την πυρηνική πολυμορφία και την παρουσία μιτώσεων. Οι Scarff & Handley (1938), χρησιμοποιώντας τα ίδια κριτήρια με τους Patey & Scarff (1928), επιβεβαίωσαν την ύπαρξη συσχέτισης ανάμεσα στον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας και την επιβίωση.

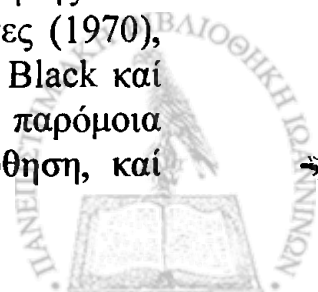
Μικρό ενδιαφέρον υπήρξε για τις ανωτέρω μελέτες, πιθανότατα επειδή κατά την περίοδο αυτή δεν χρησιμοποιούνταν προγνωστικές πληροφορίες για τον καθορισμό τού τύπου της θεραπείας των ασθενών. Έτσι, μόλις το 1950, η έννοια του ιστολογικού βαθμού κακοηθείας, ως σημαντικού προγνωστικού παράγοντα, αναβίωσε στο Ηνωμένο Βασίλειο από τον Bloom. Στη μέθοδό του, πρωταρχική σημασία αποδόθηκε σε τρεις παράγοντες: το ποσοστό σχηματισμού αδενικών σχηματισμών, την ομαλότητα όσον αφορά το μέγεθος-, το σχήμα και την χρωστική ιδιότητα του πυρήνα, την υπερχρωμασία και τη μιτωτική δραστηριότητα. Κάθε ένας από τους τρεις αυτούς παράγοντες, αξιολογήθηκε υποκειμενικά ως:



απών ή παρών, σε μικρό, μέτριο ή σημαντικό βαθμό και οι όγκοι βάσει αυτών κατατάχθηκαν σε τρεις κατηγορίες αξιολόγησης τού βαθμού κακοηθείας, χαμηλού, μέτριου και υψηλού βαθμού. Ο Bloom συμπέρανε ότι ο ιστολογικός βαθμός κακοηθείας έχει προγνωστική αξία, και επίσης τόνισε ότι η πρόγνωση της επιβίωσης, υποβοηθείται περισσότερο από το συνδυασμό του ιστολογικού βαθμού κακοηθείας και της σταδιοποίησης των επιχώριων λεμφαδένων. Σε ακόλουθη μελέτη, οι Bloom & Richardson (1957) επέκτειναν την αρχική μελέτη του Bloom, προσδίδοντάς της, τη μορφή ενός αριθμητικού συστήματος βαθμολόγησης. Γιά κάθε μία από τις τρεις ιστολογικές παραμέτρους, οι ορισμοί «μικρό», «μέτριο» και «υψηλό» αντικαταστάθηκαν από τους βαθμούς 1,2 και 3. Αυτό κατέληξε σε ένα συνολικό άθροισμα 3-9, και ο βαθμός κακοηθείας ορίστηκε ως: I- 3,4 η 5, II- 6 η 7, III- 8 η 9. Η μέθοδος των Bloom & Richardson εφαρμόστηκε σε μεγάλο αριθμό μελετών (Wolff 1966; Hamlin 1968; Tough et al 1969; Champion et al 1972; Andersen et al 1981; Elston et al 1982; Parl & Dupont 1982; Elston 1984) και σε όλες αποδείχτηκε πολύ χρήσιμη στον καθορισμό της πρόγνωσης.

Εναλλακτικές μέθοδοι αξιολόγησης του ιστολογικού βαθμού κακοηθείας του καρκίνου του μαστού αναπτύχθηκαν, όπως αυτή που περιγράφηκε από τον Black και συνεργάτες (1955) στις Η.Π.Α., και ορίστηκε ως «βαθμός πυρηνικής κακοηθείας». Σ' αυτήν αξιολογήθηκαν ξεχωριστά ο σχηματισμός αδενίων και η πυρηνική μορφολογία, και συμπέραναν ότι η αδενική διαφοροποίηση δεν βοηθούσε στον καθορισμό της πρόγνωσης, σε αντίθεση με την πυρηνική μορφολογία. Ορίστηκαν έτσι τέσσερεις βαθμοί, βασιζόμενοι στην ομαλότητα της πυρηνικής μεμβράνης, τον τρόπο κατανομής της χρωματίνης, την παρουσία, ή όχι, πυρηνίων και την παρουσία πυρηνοκινησιών. Το σύστημα βαθμολόγησης του βαθμού πυρηνικής κακοηθείας, χρησιμοποιήθηκε ευρέως από τον Black και συνεργάτες, και βρήκαν ισχυρή συσχέτιση με την επιβίωση (Black & Speer 1957, 1959; Cutler και συνεργατες 1963, 1969; Black & συνεργατες 1975). Η μέθοδος τροποποιήθηκε από τον Hartveit (1971), ο οποίος βασίστηκε εν μέρει στην εξέταση πρωτοπαθών όγκων και εν μέρει νεκροτομικού υλικού, χρησιμοποιώντας κυτταρολογικά κριτήρια, όπως τον τύπο των κυτταρικών ορίων και της αναλογίας πυρήνα/πρωτοπλάσματος, χωρίς όμως να λαμβάνει υπόψη τον αριθμό των μιτώσεων.

Συγκριτικές μελέτες των διαφόρων συστημάτων αξιολόγησης του βαθμού κακοηθείας, υπήρξαν λίγες. Ο Eichner και συνεργάτες (1970), εξέτασαν τη μέθοδο του Black & Richardson (1957) και του Black και συνεργατών (1955). Βρήκαν, ότι οι δύο μέθοδοι έδιναν παρόμοια συσχέτιση με την επιβίωση μετά από πενταετή παρακολούθηση, και



συμπέραναν ότι και οι δύο μέθοδοι αποτελούσαν ένα χρήσιμο μέσο για την εκτίμηση της νεοπλασματικής δυνητικότητας των όγκων του μαστού.

Οι Turner & Berry (1972) επίσης εκτίμησαν τη μέθοδο των Bloom & Richardson, αλλά τη συνέκριναν με το σύστημα του Hartveit (1971). Η μέθοδος των Black & Richardson κρίθηκε πιο αξιόπιστη στην εκτίμηση της πρόγνωσης σε σειρές με μακρόχρονη και ολιγόχρονη παρακολούθηση. Ο Stenkvist και συνεργάτες (1979) προέβησαν σε ανάλυση, η οποία αφορούσε κυρίως την αναπαραγωγικότητα και τη συσχέτιση μεταξύ των συστημάτων, όπως της WHO (Π.Ο.Υ) (Bloom & Richardson 1957; Scharff & Torloni 1968), τη μέθοδο του Black (Black & Speer 1957) και αυτή του Hartveit (1971). Εδειξαν ότι οι μέθοδοι του Black και της WHO, σχετίζονταν στενά και διέκριναν τους όγκους σε τρεις προγνωστικές κατηγορίες, ενώ η μέθοδος του Hartveit δεν περιελάμβανε τέτοιου είδους κατηγοριοποίηση. Η μέθοδος των Black & Richardson αποδείχτηκε καλύτερη από αυτήν του Hartveit σε πρακτικό επίπεδο και σε σχέση με την πρόγνωση.

Ο Fisher και συνεργάτες πρότειναν μία μέθοδο που συνδύαζε στοιχεία και των δύο συστημάτων (Fisher και συν 1975; Fisher και συν 1977), συμπεριλαμβάνοντας την παρουσία ή απουσία σωληνωδών σχηματισμών και το βαθμό κακοηθείας του πυρήνα. Εδειξαν μία ικανοποιητική σχέση με την επιβίωση (Fisher και συν 1980), και αργότερα εισήγαγαν μία τροποποίηση, αξιολογώντας το ποσοστό και τον τύπο των σωληνωδών σχηματισμών (Fisher και συν 1984).

Η μορφολογική εκτίμηση του ιστολογικού βαθμού κακοηθείας, έχει αποδειχθεί σε πολλές μελέτες ότι παρέχει χρήσιμες προγνωστικές πληροφορίες για τον καρκίνο του μαστού, αλλά μέχρι και πρόσφατα η εκτίμηση του ιστολογικού βαθμού κακοηθείας παρουσίαζε προβλήματα, όσον αφορά τη συνέπεια και αναπαραγωγικότητα.

Ο ιστολογικός βαθμός κακοηθείας βασίζεται σε υποκειμενική εκτίμηση μικροσκοπικών εικόνων και δυσκολίες, όσον αφορά τη συμφωνία μεταξύ των διαφόρων διαγνωστών (αναπαραγωγικότητα) είναι πολύ πιθανή. Αυτό αντικατοπτρίζεται στη σημαντική διακύμανση των σχετικών ποσοστών κάθε βαθμού κακοηθείας στις δημοσιευμένες σειρές (Bloom & Richardson 1957, Wolff 1966, Tough και συν 1969, Champion και συν 1972, Fisher και συν 1980, 1984, Elston 1984). Οι διακυμάνσεις αυτές, μπορεί να οφείλονται σε αληθινές διαφορές ανάμεσα στους πληθυσμούς που μελετήθηκαν, αλλά και άλλοι παράγοντες πρέπει επίσης να ληφθούν υπόψη. Δυστυχώς, οι περισσότερες από τις μελέτες έχουν γίνει από μη Παθολογοανατόμους (Bloom & Richardson 1957; Wolff 1966; Tough και συν 1969; Champion και συν 1972), οι οποίοι οπωσδήποτε δεν



μπορεί να είχαν την ευρεία εμπειρία των εκπαιδευμένων Παθολογοανατόμων.

Στη μελέτη Nottingham/Tenopus του πρωτοπαθούς καρκίνου του μαστού¹¹³, η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος μέχρι τότε, των Bloom & Richardson, τροποποιήθηκε από τον Elston, ώστε τα κριτήρια να γίνουν πιο αντικειμενικά.

Απαραίτητη προϋπόθεση για την ακριβή ιστολογική εκτίμηση του βαθμού κακοηθείας, είναι η προσεκτική προπαρασκευή του παρασκευάσματος. Μονιμοποίηση σε φωσφορυλιωμένη (phosphate-buffered) φορμόλη δίνει πολύ καλά αποτελέσματα μονιμοποίησης, αλλά τα καλύτερα αποτελέσματα προκύπτουν όταν ο όγκος τεμαχιστεί, όντας ακόμα νωπός, ώστε να είναι δυνατή η καλή διείσδυση του μονιμοποιητικού σε αυτόν. Η λήψη ιστολογικών τομών πρέπει να γίνει με τρόπο, ώστε να εκπροσωπείται όλος ο όγκος, και ιδιαίτερα η περιφέρειά του. Ο αριθμός των ιστολογικών τομών εξαρτάται από το μέγεθος του όγκου. Οι τομές πρέπει να κοπούν στα 4μm. Αν οι τομές είναι πολύ χοντρές, η πυρηνική λεπτομέρεια δεν θα είναι σαφής. Η κοινή χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης είναι αρκετή, και δεν είναι απαραίτητες ειδικές χρώσεις. Η τροποποιημένη μέθοδος, αποτελεί μία ημιποσοτική εκτίμηση τριών μορφολογικών χαρακτηριστικών: του ποσοστού σχηματισμού αδενικών σχηματισμών, του βαθμού πυρηνικού πλειομορφισμού και του ακριβούς αριθμού των μιτώσεων. Αναλυτικότερα:

1. Ποσοστό αδενικών σχηματισμών του όγκου

α. όταν ποσοστό, μεγαλύτερο του 75% του όγκου διατάσσεται σε αδενικούς σχηματισμούς, βαθμολογείται με 1

β. Όταν ποσοστό, μεγαλύτερο του 10% και μικρότερο του 75%, διατάσσεται σε αδενικούς σχηματισμούς, βαθμολογείται με 2

γ. Όταν ποσοστό, μικρότερο του 10%, διατάσσεται σε αδενικούς σχηματισμούς, βαθμολογείται με 3

2. Πυρηνικός πλειομορφισμός

α. όταν οι πυρήνες είναι ομαλοί σε μέγεθος και σχήμα, σχετικά μικροί, με ομαλή κατανομή χρωματίνης, και στερούνται εμφανών πυρηνίων, βαθμολογείται με 1

β. όταν οι πυρήνες είναι σχετικά πλειόμορφοι, έχουν εμφανή πυρήνια, και είναι μετρίου μεγέθους, βαθμολογείται με 2



γ. όταν οι πυρήνες είναι σχετικά μεγάλοι με εμφανή ή πολλαπλά πυρήνια, με ανώμαλη κατανομή χρωματίνης και ποικίλλουν σε μέγεθος και σχήμα, βαθμολογείται με 3

3. Ποσοστό μιτώσεων

Με μικροσκόπηση σε μικρού βαθμού μεγένθυση (X100), εντοπίζεται η μιτωτικά, πίο ενεργής περιοχή του όγκου και προβαίνουμε σε μικροσκόπηση σε υψηλού βαθμού μεγένθυση (X400):

α. όταν ο αριθμός των μιτώσεων, ανά δέκα μεγάλα οπτικά πεδία (ΜΟΠ) είναι μικρότερος από 10, βαθμολογείται με 1

β. όταν ο αριθμός των μιτώσεων, είναι μεγαλύτερος ή ίσος του 10 και μικρότερος του 20, βαθμολογείται με 2

γ. όταν ο αριθμός των μιτώσεων, είναι μεγαλύτερος ή ίσος από 20, βαθμολογείται με 3

Το τελικό άθροισμα, προκύπτει από την άθροιση της βαθμολόγησης του κάθε παράγοντα ξεχωριστά:

-άθροισμα 3,4,5: χαμηλού βαθμού κακοηθείας

-άθροισμα 6,7: μέτριου βαθμού κακοηθείας

-άθροισμα 8,9: υψηλού βαθμού κακοηθείας

Στην ίδια μελέτη¹¹³, προτάθηκε ένας τύπος προγνωστικής κατηγοριοποίησης (prognostic index), μετά από την ανάλυση ενός αριθμού δυνητικών παραμέτρων, χρησιμοποιώντας τη τεχνική 'πολλαπλής υποστροφής' (multiple regression technique) κατά Cox. Οι μόνες παράμετροι, που βρέθηκαν να συσχετίζονται σημαντικά με τη πρόγνωση ήταν, το μέγεθος του όγκου (μετρούμενο παθολογοανατομικά), η παθολογοανατομική κατάσταση των λεμφαδένων και ο ιστολογικός βαθμός κακοηθείας¹¹³. Έτσι, σχεδιάστηκε ένα αριθμητικό σύστημα προγνωστικής κατηγοριοποίησης, ως εξής:

PI = 0.2 X μέγεθος του όγκου + σταδιοποίηση ανάλογα με τη κατάσταση των λεμφαδένων (1-3) + ιστολογικός βαθμός κακοηθείας (1-3)

Η πρόγνωση χειροτερεύει, καθώς αυξάνει το PI, και χρησιμοποιώντας τις τιμές 3, 4 και 5, οι ασθενείς μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε ομάδες καλής, μέτριας και φτωχής πρόγνωσης.

Περαιτέρω τροποποίηση της μεθόδου από τον Elston²⁵ αφορά την αναγνώριση και τη μέτρηση του αριθμού των μιτώσεων, προσαρμοσμένα



στον τύπο του εκάστοτε χρησιμοποιούμενου οπτικού
μικροσκοπίου, καί στη διάμετρο του οπτικού πεδίου, όπως αναφέρεται
αναλυτικά στη παράγραφο: 'Προγνωστικοί παράγοντες- Ιστολογικός
βαθμός κακοηθείας'.



6. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ-ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΟΥ

Είναι γνωστό ότι υπάρχει σχέση ανάμεσα στο ρυθμό πολλαπλασιασμού ορισμένων όγκων και τη βιολογική τους συμπεριφορά¹¹³⁻¹¹⁶. Νέες μέθοδοι μπορεί να βοηθήσουν στη πιο αντικειμενική εκτίμηση των χαρακτηριστικών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Υπάρχουν δύο ειδών νεοπλασματικοί κυτταρικοί πληθυσμοί: αυτοί που διαιρούνται και αυτοί που δεν διαιρούνται. Το κλάσμα κυτταρικού πολλαπλασιασμού (growth fraction) ορίζεται ως το ποσοστό των διαιρουμένων κυττάρων προς το συνολικό αριθμό των κυττάρων. Ρίχνοντας μία γρήγορη ματιά στα στάδια του κυτταρικού κύκλου, βλέπουμε ότι υπάρχουν και άλλες λειτουργικές καταστάσεις στις οποίες μπορεί να βρίσκονται τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, εκτός από τη μίτωση. Ολοκληρώνοντας τη μίτωση, τα θυγατρικά κύτταρα εισέρχονται στη φάση G1, στην οποία παραμένουν για χρονικό διάστημα, που ποικίλλει ανάλογα με τον ιστικό τύπο. Μετά εισέρχονται στη φάση S, ή συνθετική φάση, κατά την οποία υπάρχει διπλασιασμός του γενετικού υλικού, κατά τη φάση σύνθεσης του DNA. Ακολουθεί η φάση G2, πριν τα κύτταρα αρχίσουν πάλι να διαιρούνται. Το χρονικό διάστημα ανάμεσα σε δύο μιτώσεις καλείται χρόνος κυτταρικού κύκλου, και ποικίλλει πολύ, ανάλογα με τη διάρκεια της G1 φάσης. Η μίτωση (φάση M), συνιστά το συντομότερο τμήμα του κυτταρικού κύκλου, και ακολουθεί αμέσως μετά τη φάση G2. Ενώ το κλάσμα κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αποτελεί μία σημαντική παράμετρο στην αύξηση της νεοπλασματικής μάζας, δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι και άλλα στοιχεία, που συχνά δεν εκτιμούνται (ο μέσος χρόνος που απαιτείται για ένα κύτταρο για να ολοκληρώσει τον κυτταρικό του κύκλο και το ποσοστό κυτταρικής απώλειας με τη μέθοδο της απόπτωσης) επίσης συντελούν στην ανάπτυξη του όγκου. Οι ακόλουθες μέθοδοι έχουν περιγραφεί, σε μία προσπάθεια να μετρηθούν οι διάφορες παράμετροι του κυτταρικού κύκλου, και να συγκριθούν με τη βιολογική συμπεριφορά του κυττάρου.

6.1. Μέτρηση πυρηνοκινήσιων

Είναι η πιο βολική και για το λόγο αυτό, η πιο διαδεδομένη μέθοδος σε χρήση. Από παλιά έχειδειχθεί, ότι η μέτρηση του αριθμού των πυρηνοκινήσιων αποτελεί ένα χρήσιμο διαγνωστικό 'εργαλείο' και προγνωστικό δείκτη στη μελέτη της ιστοπαθολογίας των όγκων. Ως αριθμός των πυρηνοκινήσιων (mitotic count), ορίζεται ο αριθμός των



μιτώσεων ανά δέκα μεγάλα οπτικά πεδία. Η διάρκεια της μίτωσης αποτελεί το συντομότερο τμήμα του κυτταρικού κύκλου. Έτσι, ο υπολογισμός του κλάσματος κυτταρικού πολλαπλασιασμού, με τη μέθοδο μέτρησης του αριθμού των μιτώσεων, έχει μία ενδογενή αδυναμία, εξαιτίας του μεγέθους του εξεταζόμενου υλικού. Ολοι οι συγγραφείς τονίζουν το γεγονός της εξέτασης επαρκούς υλικού, για την αξιόπιστη εκτίμηση της μιτωτικής δραστηριότητας του όγκου. Αυτή η αδυναμία, συνηγορείται και από το γεγονός, ότι πολύ πυκνές πυρηνοκινησιές δεν μπορούν αξιόπιστα να διαχωριστούν από πυκνωτικούς πυρήνες. Γενικά, αναφέρεται ποικιλία στην εκτίμηση του αριθμού των μιτώσεων, εξαιτίας της αποτυχίας εντόπισης της πύο ενεργού, μιτωτικά, περιοχής στο πλακίδιο, αδυναμίας διαχωρισμού ανάμεσα σε πυρηνοκινησιές και πυκνωτικούς πυρήνες και της ποικιλίας των εξεταζόμενων μικροσκοπικών πεδίων. Επίσης η μέτρηση του αριθμού των μιτώσεων, θεωρείται ανεπαρκής, εξαιτίας του γεγονότος, ότι η περιοχή ενός οπτικού πεδίου, μπορεί να διαφέρει τουλάχιστον κατά έξι φορές, ανάμεσα σε διάφορα οπτικά μικροσκόπια, που σημαίνει ότι η μέτρηση για τον ίδιο όγκο, όταν εκτιμάται σε διαφορετικά οπτικά μικροσκόπια, μπορεί να ποικίλλει από 3 έως 20 μιτώσεις ανά δέκα μεγάλα οπτικά πεδία¹¹⁷. Μεγαλύτερη συμφωνία, θα μπορούσε να υπάρξει, υπολογίζοντας τον αριθμό των μιτώσεων ανά τετραγωνικό χιλιοστόμετρο του όγκου. Παρ'όλ'αυτά, ακόμα και αυτή η μέθοδος παραμένει ευαίσθητη σε διαφορές, όσον αφορά το μέσο κυτταρικό μέγεθος (όγκοι με μεγαλύτερου μεγέθους κύτταρα θα έχουν μικρότερο αριθμό κυττάρων και επομένως μικρότερο αριθμό πυρηνοκινησιών ανά τετραγωνικό χιλιοστόμετρο του όγκου), το πάχος της τομής (οι μιτώσεις κατανέμονται σε έναν ιστικό όγκο, απ'ότι σε μία περιοχή, και παχύτερες τομές θα περιέχουν μεγαλύτερο αριθμό πυρηνοκινησιών), καθώς και το μέγεθος του οπτικού πεδίου, που καταλαμβάνεται από τον όγκο. Γι' αυτό το λόγο, ο μιτωτικός δείκτης (mitotic index) (ο αριθμός των μιτώσεων ανά 1000 νεοπλασματικούς πυρήνες), αν και είναι πολύ περισσότερο χρονοβόρα μέθοδος, πρέπει να θεωρείται πύο ιδεατή μέθοδος υπολογισμού του ποσοστού της κυτταρικής αύξησης.

Η μέτρηση του αριθμού των πυρηνοκινησιών, αποτελεί μία σημαντική μέθοδο, αξιολόγησης των χαρακτηριστικών του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, κυρίως γιατί αποτελεί μία μέθοδο, χωρίς απαιτήσεις τεχνολογικού εξοπλισμού, που μπορεί να εφαρμοστεί στα μικρότερα και λιγότερο εξοπλισμένα εργαστήρια. Η μέθοδος δεν απαιτεί ειδικό τρόπο μονιμοποίησης ή ιστικής επεξεργασίας, με τρόπο ώστε να είναι



δυναμικά εφαρμόσιμη, αναδρομικά, και σε υλικό αρχείου. Παρ'όλ'αυτά, η μέτρηση του αριθμού των μιτώσεων, δεν αποτελεί ανεξάρτητη παράμετρο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και η μιτωτική δραστηριότητα μπορεί μόνο να ερμηνευθεί μέσα στα πλαίσια άλλων παθολογοανατομικών και κλινικών ευρημάτων.

6.2. Δείκτης σήμανσης θυμιδίνης (thymidine labelling index /TLI)

Αποτελεί μέτρο του ποσοστού των κυττάρων του όγκου, που βρίσκονται στη φάση συνθέσεως του DNA, του κυτταρικού κύκλου. Το TLI μετριέται *in vitro*, καλλιεργώντας νωπό νεοπλασματικό ιστό σε ένα υλικό, που περιέχει τριτιωμένη θυμιδίνη, η οποία ενσωματώνεται στο DNA. Στη συνέχεια προετοιμάζονται ραδιογραφίες, και τα σημασμένα κύτταρα μετριούνται και συγκρίνονται με τα μή-σημασμένα. Επειδή, η συνθετική φάση του κύκλου, διαρκεί περισσότερο από τη μίτωση, το TLI, είναι πάντα μεγαλύτερο από το μιτωτικό δείκτη, και γι'αυτό, θεωρητικά είναι πιο αξιόπιστος.

Η μέθοδος αυτή, εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1961 από τον Johnson, στη μελέτη των ινοαδενωμάτων¹¹⁸. Από τότε, η μεγαλύτερη προσοχή εστιάστηκε στο ρόλο του TLI, ως προγνωστικού παράγοντα στον καρκίνο του μαστού. Πολλές ομάδες, έδειξαν μία σημαντική συσχέτιση ανάμεσα σε υψηλό TLI και γρήγορη υποτροπή της νόσου, μετά μαστεκτομή¹¹⁹⁻¹²¹. Το TLI αποδείχτηκε ένας πολύ σημαντικός προγνωστικός δείκτης, ανεξάρτητος από την κατάσταση των λεμφαδένων. Ο Hery¹²² και συνεργάτες έδειξαν ότι το TLI αποτελεί το σημαντικότερο προγνωστικό δείκτη σε ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες. Έχει προταθεί, να χρησιμοποιείται το TLI για την αναγνώριση ασθενών υψηλού κινδύνου για συμπληρωματική θεραπεία^{120,122}.

Η χρήση του TLI ως δείκτη της νεοπλασματικής αυξητικής δραστηριότητας, έχει αρκετές αδυναμίες. Κατ' αρχάς, το TLI προσδιορίζει τον αριθμό των κυττάρων στη συνθετική φάση, χωρίς όμως να μπορεί να μετρήσει και τη χρονική της διάρκεια. Έτσι είναι δυνατόν, ένας όγκος να έχει ένα χαμηλό ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού και υψηλό TLI. Δεύτερον, μερικοί όγκοι είναι ετερογενείς, και έτσι οι μέθοδοι που στηρίζονται σε εξέταση μόνο ενός τμήματος του όγκου, δεν μπορεί να είναι απόλυτα αξιόπιστες. Τρίτον, όπως με κάθε τεχνική, που αφορά κυτταρική μέτρηση, η έλλειψη αναπαραγωγιμότητας μεταξύ διαφόρων και του ίδιου μελετητή και το μέγεθος του εξεταζόμενου υλικού, μπορεί να οδηγήσουν σε εσφαλμένα συμπεράσματα. Τέλος, η μέτρηση του TLI, απαιτεί νωπό παρασκεύασμα, είναι χρονοβόρα, απαιτεί αυτορραδιογραφία και δεν αποτελεί δυναμικά μία άμεσα χρησιμοποιούμενη μέθοδο στα εργαστήρια ρουτίνας.



6.3. Βρωμοδε(σ)οξουριδίνη

Η συνθετική φάση του κυτταρικού κύκλου, μπορεί επίσης να μετρηθεί χρησιμοποιώντας βρωμοδεοξουριδίνη (BudR). Η βρωμοδεοξουριδίνη, είναι ένα ανάλογο πυριμιδίνης (τροποποιημένο νουκλεοτίδιο), το οποίο ενσωματώνεται στα κύτταρα κατά τη διάρκεια S του κύκλου και ανιχνεύεται με διάφορα μονοκλωνικά αντισώματα¹²³⁻¹²⁶. Οι όγκοι που εκτίθενται στη βρωμοδεοξουριδίνη, *in vitro*, ή *in vivo*, χρωματίζονται με το αντίσωμα, χρησιμοποιώντας τη τεχνική της ανοσοπεροξειδάσης. Τα σημασμένα κύτταρα μετριοούνται με μικροσκόπιο αντιθέτων φάσεων, και εκφράζονται σε ποσοστό 500 ή 1000 νεοπλασματικών κυττάρων. Η τεχνική διέπεται από τους ίδιους περιορισμούς με την ανωτέρω περιγραφόμενη.

6.4. Αντιγόνα- σχετιζόμενα με το κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Η ανοσοιστοχημική σήμανση πυρηνικών αντιγόνων, που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, είναι μία πολλά υποσχόμενη μέθοδος για τη μέτρηση του κλάσματος κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Μονοκλωνικά αντισώματα, όπως το p105¹²⁷, ριβονουκλεοτιδική ρεδουκτάση¹²⁸, η DNA-πολυμεράση-α¹²⁹ και το μονοκλωνικό αντίσωμα Ki-67 έχουν περιγραφεί.

6.4α. Ki-67

Το Ki-67 αντίσωμα, είναι ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που παρήχθηκε από τον Gerdes και συνεργάτες το 1983¹³⁰. Το αντίσωμα αυτό, αναγνωρίζει ένα πυρηνικό αντιγόνο, που υπάρχει μόνο στα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα. Περίπου για μία εικοσαετία, το αντίσωμα αυτό, χρησιμοποιείται ως δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού, παρά το γεγονός, ότι η ακριβής φύση και σύνθεση του ανιχνευόμενου αντιγόνου δεν είναι γνωστά, αλλά φαίνεται ότι εκφράζεται μόνο σε συγκεκριμένα στάδια του κυτταρικού κύκλου^{131,132}. Μελέτες προτείνουν, ότι το αντιγόνο αποτελεί συστατικό του πυρηνικού στρώματος (matrix)^{133,134}. Ο Scott και συνεργάτες¹³⁵ ανέφεραν τρεις πυρηνικές πρωτείνες, που αντιδρούν με το Ki-67 αντίσωμα και έχουν μοριακά βάρη 35-40 KD. Ο Gerdes και συνεργάτες¹³⁶ απομόνωσαν ένα τμηματικό κλώνο, αποτελούμενο από 1095 ζεύγη βάσεων, που κωδικοποιεί τον επίτοπο του Ki-67. Ανάλυση αυτού του κλώνου έδειξε ότι περιείχε τρεις, επαλαμβανόμενες βασικές αλληλουχίες του DNA, η κάθε μία από τις οποίες είχε μήκος περίπου 366 νουκλεοτιδίων. Εκφραση μίας από αυτές τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, επέτρεψε την ανίχνευση του επίτοπου του αντιγόνου Ki-67 σε αυτήν την επαναλαμβανόμενη περιοχή. Σε περαιτέρω έρευνα, φάνηκε ότι το γονίδιο Ki-67 κωδικοποιείται από ένα μεγάλο mRNA (τουλάχιστον 11.5 kb) που εκφράζεται μόνο στα

πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα. Η περαιτέρω ανίχνευση της χρωμοσωμικής εντόπισης του γονιδίου του αντιγόνου Ki-67 αφορούσε τη θέση 10q25¹³⁷. Ο Schonk και συνεργάτες¹³⁸ εντόπισαν επίσης το/τα γονίδια που καθορίζουν την έκφραση του αντιγόνου Ki-67, στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 10.

Τα τελευταία χρόνια, με τη χρήση αυτού και της νέας γενιάς αντισωμάτων, ανοίχθηκε ένας καινούργιος ορίζοντας, με την υπέρβαση ενός μακροχρόνιου προβλήματος,- της ανάγκης χρήσης τομών κρυστάτη- εφόσον το αντίσωμα που αναγνωρίζει το αντιγόνο Ki-67, αντιδρά με ένα αντιγονικό επίτοπο, ανθεκτικό στη μονιμοποίηση. Ετσι αντισώματα έναντι του αντιγόνου Ki-67, μπορούν να εφαρμοσθούν σε υλικό αργείου, εγκλεισμένου σε παραφίνη και μονιμοποιημένου σε φόρμολη^{139,140}.

Το μονοκλωνικό αντίσωμα Ki-67, παρήχθηκε όταν ποντίκια ανοσοποιήθηκαν με ένα πυρηνικό παράγωγο της κυτταρικής σειράς L428, στην προσπάθεια ανάπτυξης μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι πυρηνικών αντιγόνων των κυττάρων Hodgkin και Reed-Sternberg. Σειρές μελετών, έδειξαν ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στην ανοσοδραστικότητα και τον κυτταρικό κύκλο. Το Ki-67 σε διαρκώς πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, εκφράζεται σε όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου, εκτός της G0, ενώ μή πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, που εισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο από τη φάση G0, στερούνται του αντισώματος στην πρώιμη G1 φάση¹⁴¹. Έχει επίσης δειχθεί ότι το ποσό του αντιγόνου ποικίλλει με τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Η έκφραση αρχίζει να εμφανίζεται στη μέση με όψιμη G1 φάση, διαρκεί στις S και G2 φάσεις και μεγιστοποιείται στη διάρκεια της μίτωσης. Μετά τη μίτωση, το αντιγόνο γρήγορα αποσυντίθεται (ο επίτοπος χάνεται), με χρόνο ημιζωής του ανιχνευόμενου αντιγόνου τη μία ώρα, ή και λιγότερο.

Σήμερα το αντίσωμα αυτό, χρησιμοποιείται ευρέως στην Παθολογική Ανατομική, ιδιαίτερα σε μελέτες που ερευνούν την πιθανή προγνωστική αξία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε κλινικό υλικό¹⁴². Ιδιαίτερα, εφόσον έχει δειχθεί ισχυρή αναλογία του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού, όπως αυτός εκφράζεται με το αντίσωμα Ki-67 σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, όπως την αυτοραδιογραφική ανίχνευση της ενσώματωμένης τριτωμένης θυμιδίνης¹⁴³, της ενσωμάτωσης βρωμοδεοξουριδίνης και άλλες¹⁴⁴⁻¹⁴⁶.

Είναι σημαντικό να αντιληφθεί κανείς, ότι υπάρχουν παρ' όλ' αυτά αρκετά πρακτικά προβλήματα, πού μπορεί να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα του Ki-67 ως προγνωστικού δείκτη, ιδιαίτερα στις μικροβιοψίες, όπως:



1. Η έκφραση του αντιγόνου φαίνεται να επηρεάζεται από το διατροφικό φορτίο του κυττάρου. Έτσι, ιστός που προέρχεται από την κεντρική περιοχή ενός μεγάλου όγκου, μπορεί να δώσει εσφαλμένα, χαμηλή τιμή του κλάσματος κυτταρικού πολλαπλασιασμού (growth fraction- αριθμός κυττάρων σε κυτταρικό κύκλο). Είναι γνωστό, ότι οι κεντρικές περιοχές μεγάλων συμπαγών όγκων μπορεί να στερούνται διατροφικού φορτίου και οξυγόνου, όπως καταδεικνύεται από το συχνό εύρημα νέκρωσης στις περιοχές αυτές. Πραγματικά, αυτό το φαινόμενο μπορεί να ευθύνεται για τα ποικίλα ευρήματα των Walker και Camprejohn¹⁴⁷, που μελέτησαν το κλάσμα κυτταρικού πολλαπλασιασμού 47 καρκινωμάτων του μαστού, χρησιμοποιώντας το δείκτη Ki-67 και συνέκριναν τα αποτελέσματα με τη συνθετική φάση του κυτταρικού κύκλου, που υπολογίστηκε με τη κυτταρομετρία ροής. Οι περιπτώσεις που μελέτησαν, ταξινομήθηκαν σε τρεις κατηγορίες: η πρώτη, περιελάμβανε εκείνα τα καρκινώματα, στα οποία η έκφραση του δείκτη Ki-67 και του περιεχόμενου της συνθετικής φάσης ήταν συγκρίσιμα, η δεύτερη περιελάμβανε τις περιπτώσεις με αυξημένη έκφραση του δείκτη Ki-67 και χαμηλό περιεχόμενο της συνθετικής φάσης και η τρίτη περιελάμβανε τις περιπτώσεις με τα αντίστροφα αποτελέσματα.
2. Οι περισσότεροι όγκοι αποτελούνται από ετερογενή πληθυσμό κυττάρων, ο καθένας από τους οποίους χαρακτηρίζεται από διαφορετικά ποσοστά κυτταρικού πολλαπλασιασμού¹⁴⁸. Έτσι, η έκφραση του δείκτη Ki-67 σε υλικό βιοψίας, μπορεί να μην αντιπροσωπεύει το κυρίαρχο ποσοστό κυτταρικού πολλαπλασιασμού του όγκου. Παρ'όλ'αυτά, ικανός αριθμός νεοπλασμάτων, αναφέρεται ότι χαρακτηρίζονται από ομοιογενή κατανομή των πολλαπλασιαζομένων κυττάρων¹⁴⁹⁻¹⁵¹.

6.4β. Μελέτες της χρήσης του δείκτη Ki-67, ως προγνωστικού δείκτη στις παθήσεις του μαστού

Σε σειρά μελετών, ερευνήθηκαν η σχέση ανάμεσα στο κλάσμα κυτταρικού πολλαπλασιασμού των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού (όπως μετρήθηκε με το δείκτη Ki-67) και άλλες προγνωστικές παραμέτρους της νόσου. Βάσει αυτών, έχει βρεθεί σχέση ανάμεσα στην έκφραση του δείκτη Ki-67 και του αριθμού των μιτώσεων¹⁵²⁻¹⁵⁴, τη διάμετρο του όγκου¹⁵⁵, τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας (ίδια με του αριθμού των μιτώσεων)^{152-154,156-159}, τη προσβολή των λεμφαδένων^{157,159} και την αγγειακή διήθηση¹⁵⁹. Μία ανάστροφη σχέση με την έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων έχει επίσης αναφερθεί^{154,155,158-160}. Αν και καλύτερα διαφοροποιημένα καρκινώματα έχουν χαμηλότερη έκφραση του δείκτη Ki-67, σε σχέση με τα φτωχά διαφοροποιημένα καρκινώματα,



εντούτοις τα ποσοστά κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα διάφορου ιστολογικού βαθμού κακοηθείας καρκινώματα του μαστού αλληλεπικαλύπτονται¹⁵⁶. Παρ'όλ'αυτά, λίγες μελέτες δεν βρήκαν καμία σχέση με μερικές από αυτές τις παραμέτρους, όπως η προσβολή λεμφαδένων^{152,153,158,161}, το μέγεθος του όγκου και τη κατάσταση των οιστρογονικών υποδοχέων^{152,153}. Άλλοι παράγοντες, επίσης σχετίζονται με την έκφραση του Ki-67, κάτι που ενισχύει την προγνωστική του αξία. Έκφραση της πρωτεΐνης p53, σχετίζεται με υψηλού βαθμού κακοηθείας καρκινώματα¹⁶² και έχειδειχθεί ότι σχετίζεται με τον αριθμό των θετικά εκφραζόμενων κυττάρων στο Ki-67¹⁶³ στον πρωτοπαθή καρκίνο του μαστού. Επίσης, η πρωτεΐνη p21 ras, που κωδικοποιείται από το ογκογονίδιο ras και ενέχεται στην ενεργοποίηση εκλυτικών παραγόντων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, αναφέρεται ότι έχει ισχυρή συσχέτιση με την έκφραση του Ki-67 στα καρκινώματα του μαστού¹⁶⁴.

Όσον αφορά τη διάκριση καλοήθων και κακοήθων παθήσεων του μαστού, υπάρχει σημαντική διαφορά, όσον αφορά τους μέσους όρους τιμών του Ki-67. Ο Gerdes και συνεργάτες¹⁵⁶ βρήκαν ένα μέσο όρο 3% για τις καλοήθεις παθήσεις και 16,6% για τα καρκινώματα, με σημαντική αλληλεπικάλυψη ανάμεσα στις δύο αυτές ομάδες και με μερικές καλοήθεις παθήσεις να δείχνουν υψηλότερη έκφραση του Ki-67 από ορισμένα καρκινώματα.

6.4γ. Έκφραση του Ki-67 σε βιοπτικό υλικό

Ποσοτικοποίηση

Ακριβείς μέθοδοι για τη ποσοτική μέτρηση του Ki-67 είναι εξειδικευμένες και ακριβείς, όπως η ανάλυση εικόνας¹⁶⁵⁻¹⁶⁸, και η κυτταρομετρία ροής¹⁶⁹⁻¹⁷¹ και συνήθως είναι απρόσιτες από τον γενικό διαγνωστή Παθολογοανατόμο. Στην πλειονότητα των μελετών, η χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η απλή μέτρηση του αριθμού των θετικών πυρήνων σε μία δεδομένη αντιπροσωπευτική περιοχή του όγκου και εκφραζόμενη ως το ποσοστό του συνολικού αριθμού των νεοπλασματικών κυττάρων της περιοχής. Η χρήση μιας μικρομετρικής κλίμακας, προσαρμοσμένης στο προσοφθάλμιο φακό του μικροσκοπίου, διευκολύνει τη μέτρηση. Σε αντίθεση με τη μέθοδο αξιολόγησης των περιοχών οργανώσεως του πυρηνίου (AgNORs), δεν είναι απαραίτητη η εμφάνιση του αντικειμενικού φακού σε λάδι, για την αξιολόγηση της πυρηνικής χρώσης με το αντίσωμα Ki-67.

Ο απαιτούμενος αριθμός των κυττάρων προς μέτρηση, για τη λήψη ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος ποικίλλει, αλλά ο αριθμός 500, αποτελεί το ελάχιστο απαιτούμενο¹⁷², ιδιαίτερα όταν η χρώση είναι σχετικά ομοιογενώς κατανεμημένη σε ολόκληρη τη βιοψία. Μεγαλύτερες τιμές



έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί^{14,173,174}. Ο Ueda και συνεργάτες¹⁷⁵, μέτρησαν τον αριθμό των θετικών κυττάρων, ανά δέκα μεγάλα οπτικά πεδία στη μελέτη τους των όγκων των μαλακών μορίων.

Μία εναλλακτική μέθοδος προσέγγισης, είναι η ημιποσοτική αξιολόγηση της χρώσης, με οπτική επισκόπηση σε χαμηλή μεγένθυση¹⁷⁶.

Διάφοροι τύποι βιοπτικού υλικού έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση του ποσοστού των πολλαπλασιαζομένων νεοπλασματικών κυττάρων, με πίο δημοφιλή μέθοδο τις τομές κρουστάτη. Κυτταρολογικό υλικό έχει επίσης χρησιμοποιηθεί με επιτυχία, όπως βιοψίες εγκεφάλου¹⁷⁷, αιματολογικό υλικό^{178,179} και παρακεντήσεις με λεπτή βελόνα (τόσο σε άμεσα επιχρίσματα όσο και σε φυγοκεντρήματα), με εξαιρετική αντιστοιχία ανάμεσα στις τιμές του Ki-67 σε κυτταρολογικά επιχρίσματα και τομές κρουστάτη από τις ίδιες βλάβες^{180,181}. Εντούτοις, δεν είναι όλοι οι τύποι κυτταρολογικού υλικού κατάλληλοι για την ανάλυση του αντισώματος Ki-67, όπως τα βρογχικά επιχρίσματα με βούρτσα, λόγω της αλληλεπικάλυψης των νεοπλασματικών κυττάρων και της παρουσίας βλέννης¹⁸².

6.4δ. Κυτταροπλασματική χρώση

Θετική κυτταροπλασματική χρώση έχει αναφερθεί σε πολλούς διαφορετικούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του καρκινώματος του τραχήλου¹⁷³, του πνευμονικού καρκινώματος¹⁷⁶, του καρκινώματος του μαστού¹⁴⁷ και αιματολογικών παρασκευασμάτων¹⁷⁸. Η εξήγηση γι' αυτό δεν είναι γνωστή. Μπορεί να οφείλεται σε διασταυρούμενη αντίδραση με κάποιο τυχαίο κυτταροπλασματικό επίτοπο, ή σε αυθεντική ανίχνευση του αντιγόνου Ki-67. Μερικοί ερευνητές ευνοούν την τελευταία εκδοχή¹⁸³. Άλλοι ερευνητές θεωρούν ότι πρόκειται για artefact, που παράγεται κάτω από ορισμένες συνθήκες, π.χ. από νεκρωμένα κύτταρα¹⁸⁴⁻¹⁸⁶, ή παρατεταμένους χρόνους αποθήκευσης του ιστού, πριν τη χρώση¹⁴⁷. Όπως και νά'χει, ένας αριθμός περιπτώσεων δεν θα είναι δυνατό να αξιολογηθεί με αυτή τη χρώση.

6.5. Περιοχές οργάνωσης πυρηνίου (AgNORs)

Το ριβοσωμικό RNA κωδικοποιείται από γονίδια που εντοπίζονται στους βραχείς βραχίονες των πέντε ανθρώπινων ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων. Αυτά τα γονίδια, με τις σχετιζόμενες πρωτεΐνες, σχηματίζουν τις περιοχές οργάνωσης πυρηνίου. Οι περιοχές αυτές, χρωματιζόμενες με άργυρο, μπορούν να ανιχνευθούν εύκολα στους πυρήνες νεοπλασματικών κυττάρων που βρίσκονται στη διάμεση φάση

(interphase), μετά από μονιμοποίηση σε φορμόλη και περαιτέρω επεξεργασία. Πολλές μελέτες έχουν δείξει καλή συσχέτιση ανάμεσα στο μέσο όρο των περιοχών οργάνωσης πυρηνίου και την αυξητική ικανότητα του όγκου¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Παρ' όλ' αυτά, η πιθανότητα, οι αυξημένοι αριθμοί των περιοχών αυτών ανά πυρήνα, να οφείλεται σε υπερπλοειδικότητα δεν μπορεί να αποκλειστεί. Επιπλέον η τεχνική χρώσης δεν έχει στανταρισθεί σε σχέση με το τύπο του μονιμοποιητικού, τη διάρκεια της μονιμοποιητικής περιόδου και τις συνθήκες χρώσης, παράμετροι οι οποίες επηρεάζουν την εμφάνιση των περιοχών οργάνωσης πυρηνίου¹⁹⁰. Γενικά, αυτή η μέθοδος προσφέρεται ως μία απλή τεχνική για την αξιολόγηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στους εξαιρεθέντες όγκους. Όπως και με τη μέτρηση των πυρηνοκινησιών, η ανάλυση εικόνας έχει τη δυνατότητα να επιταχύνει το χρόνο και την ακρίβεια της μεθόδου¹⁹¹.

6.6. Ανάλυση με τη κυτταρομετρία ροής

Το κλάσμα κυτταρικού πολλαπλασιασμού (growth fraction) των όγκων μπορεί να εκτιμηθεί σε νωπούς, ψυγμένους ή εγκλεισμένους σε παραφίνη ιστούς με τη κυτταρομετρία ροής. Ο ιστός πολτοποιείται και οι πυρήνες χρωματίζονται με χρωστικές ανοσοφθορισμού, πού προσαρτώνται στο DNA. Χιλιάδες πυρήνες περνάνε μονήρεις διά μέσου μίας συσκευής, όπου το περιεχόμενο DNA κάθε πυρήνα μπορεί να μετρηθεί. Το κλάσμα κυτταρικού πολλαπλασιασμού (φάσεις S, G₂, M) μπορεί να υπολογιστεί με μαθηματικό τρόπο, βάσει του DNA ιστογράμματος¹⁹². Η ανάλυση αυτή γίνεται πίο δύσκολη σε συνύπαρξη σημαντικού αριθμού πυρήνων μή-νεοπλασματικών κυττάρων, ή σε ύπαρξη ανευπλοειδικού πληθυσμού. Όπως και νά'χει, ένα σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου έγκειται στο γεγονός, ότι ένας σημαντικά μεγάλος αριθμός πυρήνων, μπορεί να εκτιμηθεί αντικειμενικά σε μικρό χρονικό διάστημα. Το κόστος της μεθόδου και η πολυπλοκότητα της ερμηνείας των αποτελεσμάτων, περιορίζουν την ευρεία χρήση της μεθόδου για την εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Επίσης η τυχαία επιλογή του νωπού όγκου, μπορεί να μην επιτρέπει μία ακριβή εκτίμηση της πίο ενεργού μιτωτικά περιοχής του όγκου.

6.7. Άλλες μέθοδοι

Αποτελούν η εκτίμηση της διαφορικής σταθερότητας της χρωματίνης των πολλαπλασιαζομένων κυττάρων σε χαμηλό pH¹⁹³, μεταβολές της μορφολογίας των πυρηνίων σε μικροσκοπικό επίπεδο¹⁹⁴ και in situ υβριδισμός ενός cDNA probe έναντι του αγγελιοφόρου RNA της ιστόνης



H3 (η έκφραση αυτού του γονιδίου σχετίζεται στενά με τη σύνθεση του DNA)¹⁹⁵.

Η έκφραση του γονιδίου H3, που κωδικοποιεί την ιστονίνη H3, είναι εξαιρετικά υψηλή σε ιστούς που υφίστανται γρήγορη κυτταρική διαίτιση, όπως ο εγκέφαλος και ο σπυρίδιος, και είναι πολύ χαμηλή σε ιστούς που υφίστανται αργή κυτταρική διαίτιση, όπως ο ήπαρ και ο σπλήν. Η υψηλή έκφραση του H3 σε ιστούς που υφίστανται γρήγορη κυτταρική διαίτιση υποδηλώνει ότι η ιστονίνη H3 είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και την διαίτιση των κυττάρων. Η έκφραση του H3 είναι επίσης υψηλή σε ιστούς που υφίστανται γρήγορη κυτταρική διαίτιση, όπως ο εγκέφαλος και ο σπυρίδιος, και είναι πολύ χαμηλή σε ιστούς που υφίστανται αργή κυτταρική διαίτιση, όπως ο ήπαρ και ο σπλήν. Η υψηλή έκφραση του H3 σε ιστούς που υφίστανται γρήγορη κυτταρική διαίτιση υποδηλώνει ότι η ιστονίνη H3 είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και την διαίτιση των κυττάρων.

Η έκφραση του γονιδίου H3 είναι εξαιρετικά υψηλή σε ιστούς που υφίστανται γρήγορη κυτταρική διαίτιση, όπως ο εγκέφαλος και ο σπυρίδιος, και είναι πολύ χαμηλή σε ιστούς που υφίστανται αργή κυτταρική διαίτιση, όπως ο ήπαρ και ο σπλήν. Η υψηλή έκφραση του H3 σε ιστούς που υφίστανται γρήγορη κυτταρική διαίτιση υποδηλώνει ότι η ιστονίνη H3 είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και την διαίτιση των κυττάρων. Η έκφραση του H3 είναι επίσης υψηλή σε ιστούς που υφίστανται γρήγορη κυτταρική διαίτιση, όπως ο εγκέφαλος και ο σπυρίδιος, και είναι πολύ χαμηλή σε ιστούς που υφίστανται αργή κυτταρική διαίτιση, όπως ο ήπαρ και ο σπλήν. Η υψηλή έκφραση του H3 σε ιστούς που υφίστανται γρήγορη κυτταρική διαίτιση υποδηλώνει ότι η ιστονίνη H3 είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και την διαίτιση των κυττάρων.

Η έκφραση του γονιδίου H3 είναι εξαιρετικά υψηλή σε ιστούς που υφίστανται γρήγορη κυτταρική διαίτιση, όπως ο εγκέφαλος και ο σπυρίδιος, και είναι πολύ χαμηλή σε ιστούς που υφίστανται αργή κυτταρική διαίτιση, όπως ο ήπαρ και ο σπλήν. Η υψηλή έκφραση του H3 σε ιστούς που υφίστανται γρήγορη κυτταρική διαίτιση υποδηλώνει ότι η ιστονίνη H3 είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και την διαίτιση των κυττάρων. Η έκφραση του H3 είναι επίσης υψηλή σε ιστούς που υφίστανται γρήγορη κυτταρική διαίτιση, όπως ο εγκέφαλος και ο σπυρίδιος, και είναι πολύ χαμηλή σε ιστούς που υφίστανται αργή κυτταρική διαίτιση, όπως ο ήπαρ και ο σπλήν. Η υψηλή έκφραση του H3 σε ιστούς που υφίστανται γρήγορη κυτταρική διαίτιση υποδηλώνει ότι η ιστονίνη H3 είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και την διαίτιση των κυττάρων.



7. ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Τα τελευταία χρόνια, η προεγχειρητική χημειοθεραπεία έχει κερδίσει πολύ έδαφος στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Ιστορικά, είχε πρωτοχρησιμοποιηθεί για τη μετατροπή τοπικά προχωρημένου καρκίνου του μαστού σε δυνητικά χειρουργήσιμο, μεταβάλλοντας το στάδιο της νόσου του πρωτοπαθούς όγκου¹⁹⁶. Ασθενείς υποβαλλόμενοι στην ως άνω θεραπεία, έδειχναν βελτιωμένη ολική επιβίωση, σε σύγκριση με εκείνους που αντιμετώπιζονταν με τοπική θεραπεία μόνο (χειρουργική +/- ακτινοθεραπεία)¹⁹⁶. Ένα άλλο πλεονέκτημα της μεθόδου ήταν η αποφυγή μαστεκτομής. Αυτό οδήγησε στην προοδευτική υιοθέτηση της προεγχειρητικής χημειοθεραπείας, ως ενός μείζονος τμήματος της πολυπαραγοντικής προσέγγισης του σταδίου III του καρκίνου του μαστού, από την Διεθνή Ένωση κατά του Καρκίνου (Union Internationale Contre le Cancer – UICC) και την Αμερικανική Ένωση κατά του Καρκίνου (American Joint Committee on Cancer – AJCC).

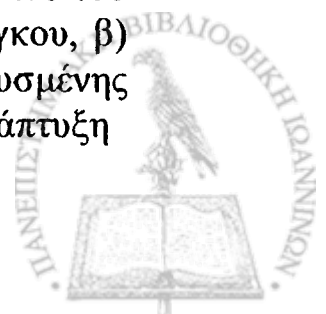
Ο όρος “ τοπικά προχωρημένος καρκίνος του μαστού” συμπεριλαμβάνει μία ετερογενή ομάδα νεοπλασμάτων του μαζικού αδένου, με διαφορετική κλινική και βιολογική συμπεριφορά. Επιπλέον, η επίπτωση τοπικά προχωρημένου καρκίνου του μαστού, παρουσιάζει σημαντικές γεωγραφικές διακυμάνσεις. Στις Δυτικές χώρες, αποτελεί λιγότερο από το 20% των διαγνωσμένων περιπτώσεων¹⁹⁶, ενώ αποτελεί σχεδόν το 70% των περιπτώσεων παγκοσμίως.

Το σκεπτικό που διέπει τη χρήση της προεγχειρητικής χημειοθεραπείας, είναι πολύ καλά τεκμηριωμένο και βασίζεται τόσο σε πειραματικά¹⁹⁷, όσο και σε κλινικά δεδομένα.

Σήμερα, η προεγχειρητική χημειοθεραπεία, χρησιμοποιείται, σε δύο φιλοσοφικά διαφορετικές κλινικές καταστάσεις:

- Πρώτον, σε περιπτώσεις τοπικά προχωρημένου καρκίνου του μαστού, επειδή άλλες στρατηγικές έχουν δώσει φτωχά αποτελέσματα και ο κίνδυνος λανθάνουσας διασποράς της νόσου θεωρητικά είναι μεγαλύτερος¹⁹⁶.

-Δεύτερον, έχει χρησιμοποιηθεί σε οποιοδήποτε εγχειρήσιμο καρκίνο του μαστού: α) για τον έλεγχο της in vivo χημειοευαισθησίας του όγκου, β) για την αποτελεσματικότερη ριζική αντιμετώπιση της απομακρυσμένης μεταστατικής νόσου με τη χρήση πρώιμης θεραπείας, πριν την ανάπτυξη



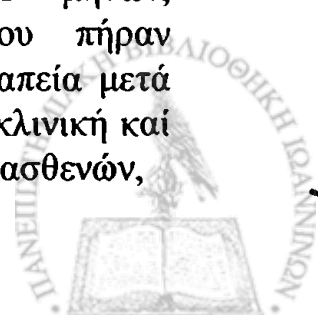
ανθεκτικών κλώνων, ενώ δυνητικά αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες, που εκκρίνονται από τον πρωτοπαθή όγκο, είναι ακόμη παρόντες, βελτιώνοντας έτσι την επιβίωση και γ) για τη πιο συχνή διατήρηση του μαστού.

Μία μεγάλη σειρά από δοκιμαστικές ομάδες ασθενών, που εξέτασαν την αποτελεσματικότητα της προεγχειρητικής χημειοθεραπείας, έχει δημοσιευτεί, ενώ πολύ λίγες μελέτες έχουν δείξει την αποτελεσματικότητα της σε μικρότερου μεγέθους όγκους¹⁹⁸⁻²⁰². Παρά, το υψηλό ποσοστό συρρίκνωσης του όγκου και διατήρηση του μαστού, η εκτίμηση και σύγκριση των αποτελεσμάτων είναι πολύ δύσκολη για πολλούς λόγους, όπως η ετερογένεια των νεοπλασματικών πληθυσμών, οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται και η έλλειψη μακρόχρονης παρακολούθησης.

Όσον αφορά τα ποσοστά απαντητικότητας, στην προεγχειρητική χημειοθεραπεία, είναι υψηλά (70-90%) και σπάνια μοιάζουν μεταξύ τους, ανεξαρτήτως του χρησιμοποιούμενου χημειοθεραπευτικού σκευάσματος. Προοδευτική εξέλιξη της νόσου έχει παρατηρηθεί σε λιγότερο από 5% των περιπτώσεων. Σε μία τυχαίοποιημένη δοκιμαστική σειρά ασθενών, δύο διαφορετικά σκευάσματα, αποτελούμενα από την επιρουβισίνη και 5-φθοριο-ουρακίλη με την πρόσθετη χρήση της κυκλοφωσφαμίδης ή της σισπλατίνης, έδειξε συγκρίσιμη αποτελεσματικότητα, με μικρότερο ποσοστό αιματολογικής τοξικότητας, με τη χρήση του αλκυλιωτικού παράγοντα²⁰³. Τα περισσότερα σκευάσματα επιτυγχάνουν κλινικά και ακτινολογικά, πλήρη ύφεση σε 15-30%, με 60% μερική ύφεση. Συνήθως, μόνο 10-15% των ασθενών επιτυγχάνουν παθολογοανατομικά πλήρη ύφεση.

Μία Γερμανική μελέτη, εξέτασε τον αριθμό των κύκλων χημειοθεραπείας, που δίνονται προεγχειρητικά²⁰⁴. Σ' αυτή τη μελέτη, πιο μακροχρόνια έκθεση στη χημειοθεραπεία σχετιζόταν σημαντικά με μακρύτερη ολική επιβίωση.

Μόνο λίγες τυχαίοποιημένες μελέτες έχουν δημοσιευθεί, όσον αφορά την προεγχειρητική έναντι της μετεγχειρητικής χημειοθεραπείας^{199,201,202,205,206}. Στο ίδρυμα Bergonie στο Μπορντώ, μία τυχαίοποιημένη μελέτη συνέκρινε την προεγχειρητική χημειοθεραπεία με επακόλουθη χειρουργική επέμβαση, έναντι της αντίθετης ακολουθίας, για όγκους μεγαλύτερους των 3εκ. Μετά από μέση παρακολούθηση 34 μηνών, μακρόχρονη επιβίωση παρατηρήθηκε σε ασθενείς, που πήραν προεγχειρητική χημειοθεραπεία. Παρ'όλ'αυτά, η τοπική θεραπεία μετά την προεγχειρητική χημειοθεραπεία, διέφερε ανάλογα με την κλινική και ακτινολογική απαντητικότητα. Έτσι, περίπου το ένα τρίτο των ασθενών,



του πρώτου σκέλους της θεραπείας, υποβλήθηκε σε ακτινοθεραπεία μόνο, για τοπικό έλεγχο της νόσου²⁰⁶.

Δύο μελέτες, ερεύνησαν την επίδραση της χημειοθεραπείας, σε συνδυασμό με ακτινοθεραπεία, έναντι της ακτινοθεραπείας ως αρχικής θεραπείας, για όγκους μεγαλύτερους των 3εκ^{202,205}. Μία σειρά από το Ινστιτούτο Κιουρί, αρχικά έδειξε ότι η αρχική προεγχειρητική χημειοθεραπεία είχε κάποια οφέλεια όσον αφορά την ολική επιβίωση, αλλά αυτό δεν επιβεβαιώθηκε σε μεγαλύτερο χρόνο παρακολούθησης. Παρ'όλ'αυτά, υπήρχε μία σημαντική τάση, για καθυστερημένες ή λιγότερες απομακρυσμένες υποτροπές με την προεγχειρητική χημειοθεραπεία²⁰². Σε μία άλλη μελέτη, η ίδια στρατηγική εφαρμόστηκε τόσο σε ασθενείς σταδίου IIB, όσο και IIIA. Ολοι οι ασθενείς πήραν επίσης συμπληρωματική χημειοθεραπεία. Οι συγγραφείς, ανέφεραν ότι οι ασθενείς που πήραν χημειοθεραπεία προεγχειρητικά, παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό παθολογοανατομικής πλήρους ύφεσης (29% έναντι 19%) και καλύτερη επιβίωση ελεύθερης νόσου, αλλά παρόμοια ολική επιβίωση με αυτήν των ασθενών της ομάδας που υποβλήθηκε σε μετεγχειρητική χημειοθεραπεία²⁰⁵.

Δεδομένων, των πολλά υποσχόμενων αποτελεσμάτων της θεραπείας σε τοπικά προχωρημένο καρκίνο του μαστού, η μεγάλη πολυκεντρική μελέτη NSABP-B18 (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) επέκτεινε τη στρατηγική της σε μικρότερους όγκους και τυχαιοποίησε 1523 ασθενείς με στάδιο νόσου I-III σε προ- ή μετεγχειρητική χημειοθεραπεία¹⁹⁹. Πρόσφατα, δημοσιευμένα αποτελέσματα, δείχνουν ότι 36% των ασθενών, που πήραν χημειοθεραπεία προεγχειρητικά, έδειξαν κλινικά πλήρη απαντητικότητα, που ήταν πιο συχνή στους μικρότερους όγκους. Περισσότερες ογκεκτομές (και επομένως λιγότερες μαστεκτομές), ακολούθησαν μετά τη λήψη προεγχειρητικής χημειοθεραπείας. Αν και δεν αναφέρθηκαν διαφορές στις παραμέτρους επιβίωσης ανάμεσα στα δύο σκέλη θεραπείας, μετά από μέση παρακολούθηση 5 ετών²⁰⁷, αναμένονται αποτελέσματα από πιο μακρόχρονη παρακολούθηση.



[The page contains extremely faint and illegible text, likely a document or report. The text is mostly obscured by noise and low contrast.]

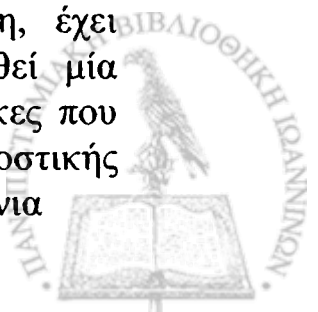


8. Η ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΤΑΜΟΞΙΦΑΙΝΗΣ ΚΑΤΑ ΤΟΥ

ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Είναι αποδεδειγμένο ότι τα οιστρογόνα ενέχονται στην ευόδωση του καρκίνου του μαστού. Η ταμοξιφαίνη, μία αντι-οιστρογονο-φαρμακευτική ουσία, εμποδίζει την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού σε μοντέλα ζώων²⁰⁸. Σε κλινικές μελέτες, που χρησιμοποίησαν τη ταμοξιφαίνη ως συμπληρωματική θεραπεία, μετά την πρωτοπαθή θεραπεία για τον καρκίνο του μαστού, παρατηρήθηκε μείωση κατά 50% στην επίπτωση του ετερόπλευρου, μετάχρονου πρωτοπαθούς καρκίνου του μαστού²⁰⁹. Για την αξιολόγηση της δυνατότητας της ταμοξιφαίνης να εμποδίζει την ανάπτυξη του καρκινώματος του μαστού σε υγιείς γυναίκες, ξεκίνησε μία τυχαιοποιημένη, placebo κλινική μελέτη το 1986, χρησιμοποιώντας ταμοξιφαίνη σε υγιείς γυναίκες με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού, λόγω επιβαρυσμένου οικογενειακού ιστορικού. Στη συνέχεια, πολυκεντρικές κλινικές μελέτες ξεκίνησαν στην Ιταλία το 1992 (Ινστιτούτο Ογκολογίας, Μιλάνο), στις Ηνωμένες Πολιτείες (Εθνικό Χειρουργικό Πρωτόκολλο μαστού και παχέος εντέρου- National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project/ NSABP) και στο Ηνωμένο Βασίλειο το 1993 (Διεθνής Παρεμβατική Μελέτη του καρκίνου του μαστού- International Breast Cancer Intervention Study/IBIS). Με την αρχή του 1998, ένα σύνολο 25,000 υγιών γυναικών τυχαιοποιήθηκαν σε θεραπεία με ταμοξιφαίνη ή placebo.

Η κλινική μελέτη του νοσοκομείου Royal Marsden στο Ηνωμένο Βασίλειο, που άρχισε το 1986, αρχικά σχεδιάστηκε για την εκτίμηση της αποδεκτικότητας, συνεργασίας, τοξικότητας και ασφάλειας της χρήσης της ταμοξιφαίνης σε υγιείς γυναίκες²¹⁰. Γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού, τυχαιοποιήθηκαν σε θεραπεία με ταμοξιφαίνη (20mg/ημέρα) ή placebo, για 8 χρόνια. Η οξεία συμπτωματική τοξικότητα ήταν χαμηλή και η συνεργατικότητα ήταν μεγάλη, με πάνω από 75% των γυναικών να συνεχίζουν να παίρνουν το φάρμακο μετά τα 5 χρόνια²¹¹. Επίσης δεν υπήρξε αρνητική επίδραση στους παράγοντες θρόμβωσης, αν και υπήρξαν αναφορές σε αυξημένα θρομβοεμβολικά επεισόδια σε γυναίκες μετά από λήψη ταμοξιφαίνης^{212,213}. Σημαντική ελάττωση των επιπέδων χοληστερόλης του πλάσματος (10%-15%) σε σύγκριση με τα προ-θεραπείας επίπεδα, στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες που έπαιρναν ταμοξιφαίνη, έχει αναφερθεί από πολλές ομάδες^{214,215}. Επίσης έχει παρατηρηθεί μία αύξηση της οστικής πυκνότητας, σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες που λαμβάνουν ταμοξιφαίνη, σε αντίθεση με σημαντική μείωση της οστικής πυκνότητας σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες στα πρώτα δύο χρόνια



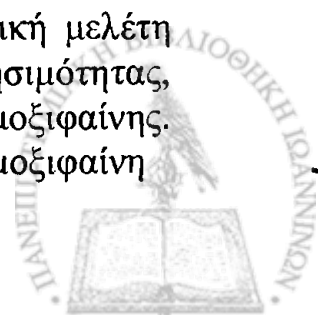
λήψης του φαρμάκου²¹⁶. Αυξημένη επίπτωση λειομυωμάτων και ενδομητρικών βλαβών, συμπεριλαμβανομένων κύστεων και πολυπόδων παρατηρήθηκε στις γυναίκες που ελάμβαναν ταμοξιφαίνη σε σύγκριση με τις γυναίκες που δεν έπαιρναν το φάρμακο²¹⁷. Υπάρχουν αναφορές αυξημένης συχνότητας ενδομητρικού καρκινώματος σε γυναίκες που παίρνουν ταμοξιφαίνη²¹⁸⁻²²⁰, που πιθανότατα σχετίζεται με την οιστρογονική επίδραση της ταμοξιφαίνης στο ενδομήτριο.

Τα αποτελέσματα από τις κλινικές δοκιμές, δημιούργησαν αντικρουόμενα αποτελέσματα και πολλά ερωτηματικά παραμένουν αναπάντητα.

Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα της κλινικής δοκιμής NSABP-P1, που έδειξαν μία πρόιμη ελάττωση στην επίπτωση του καρκίνου του μαστού δυστυχώς, δεν επιβεβαιώθηκαν από τις δύο μικρότερες Ευρωπαϊκές μελέτες. Αν και αυτές οι μελέτες είχαν λιγότερους συμμετέχοντες, η ισχύς και των δύο μελετών θα έπρεπε να είναι επαρκής να ανιχνεύσει τυχόν διαφορές, όπως αναφέρονταν στο NSABP. Ένας λόγος για αυτές τις διαφορές, θα μπορούσε να είναι τα διαφορετικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων γυναικών. Οι γυναίκες της Ιταλικής μελέτης, δεν είχαν κανένα ειδικό κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού, αλλά είχαν υποβληθεί σε υστερεκτομή, πολλές επίσης είχαν υποβληθεί σε αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομή με επακόλουθη λήψη ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης. Οι γυναίκες της μελέτης του νοσοκομείου Royal Marsden επλέγησαν, κυρίως, λόγω του βεβαρυμένου οικογενειακού ιστορικού για ανάπτυξη καρκινώματος του μαστού, με μεγάλη πιθανότητα κληρονομικότητας του προδιαθεσικού γονιδίου για τον καρκίνο του μαστού, όπως του BRCA1. Οι γυναίκες έγιναν αποδεχτές στη μελέτη NSABP-P1, εξαιτίας μη γενετικών παραγόντων κινδύνου.

Η παρουσία μετάλλαξης ενός αυξημένου κινδύνου- γονιδίου, μπορεί να παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη προφύλαξη με τη χρήση ταμοξιφαίνης, καθώς δεν είναι ξεκάθαρη η εξάρτηση ενός 'κληρονομικού' καρκίνου του μαστού από ενδοκρινικούς παράγοντες. Υπάρχουν κάποιες ενδείξεις, ότι γυναίκες με BRCA μεταλλάξεις σε οικογένειες αυξημένου κινδύνου, είναι πίο επιρρεπείς στο να αναπτύξουν μη-ορμονοεξαρτώμενους όγκους, πιθανότατα ανθεκτικούς στην ευεργετική επίδραση της ταμοξιφαίνης^{221,222}.

Η ελάττωση κατά 45% του καρκίνου του μαστού στη κλινική μελέτη NSABP-P1, δεν οδηγεί κατ' ανάγκη σε ελάττωση της θνησιμότητας, πράγμα που αποτέλεσε πρωταρχικό στόχο της λήψης της ταμοξιφαίνης. Τα καρκινώματα του μαστού στις γυναίκες που λαμβάνουν ταμοξιφαίνη



μπορεί να έχουν χειρότερη πρόγνωση, οφειλόμενη στην επιλογή όγκων ανθεκτικών στη ταμοξιφαίνη.

Επίσης η ολιγόχρονη περίοδος παρακολούθησης των 55 μηνών στην ίδια μελέτη, μπορεί να αποτέλεσε ένα συνηγορητικό παράγοντα για την αποτελεσματικότητα της ταμοξιφαίνης σε αυτή τη μελέτη. Η πρόωμη ελάττωση της συχνότητας του καρκίνου του μαστού, μπορεί να αντανakλά τη θεραπεία λανθανόντων όγκων, παρά τη παρεμπόδιση της ανάπτυξης όγκων, εμποδίζοντας την ευεργετική επίδραση της ταμοξιφαίνης.

Σήμερα, είναι δύσκολο να αναγνωρίσουμε υποομάδες γυναικών στις οποίες μπορεί να συστηθεί η προληπτική λήψη ταμοξιφαίνης, εκτός των ορίων μιάς κλινικής πειραματικής μελέτης. Απαιτείται μακρόχρονη παρακολούθηση, για την αξιολόγηση της επίδρασης της ταμοξιφαίνης στη μακρόχρονη επίπτωση και θνησιμότητα του καρκίνου του μαστού σε σχέση με μακρόχρονους παράγοντες κινδύνου, ιδιαίτερα σε γυναίκες με αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού.

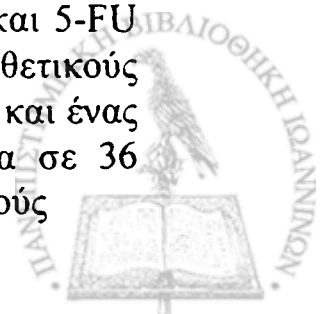


9. ΣΥΝΘΕΤΑΣΗ ΤΗΣ ΘΥΜΙΔΙΛΙΝΗΣ

Η συνθετάση της θυμιδιλίνης (TS; EC.2.1.1.45) καταλύει τη μεθυλίωση της μονοφωσφορικής δεοξουριδίνης dUMP σε μονοφωσφορική δεοξυθυμιδίνη dTMP που είναι απαραίτητη για τη σύνθεση του DNA. Η TS είναι επίσης ένας ζωτικός στόχος των φλουοροπυριμιδινών, που χρησιμοποιούνται ευρέως στη θεραπεία του μαστού²⁴⁷⁻²⁴⁹. Στα καρκινικά κύτταρα η 5-φλουο-ουρακίλη (5-FU) μετατρέπεται σε μονοφωσφορική 5-φλουοδεοξουριδίνη (FdUMP) που σχηματίζει ένα ισχυρό συνδεσμικό σύμπλεγμα με τη TS επί τη παρουσία του συνεργικού παράγοντα 5,10 τετραυδροξείκη μεθυλίνη²⁴⁷⁻²⁴⁹.

Η κλινική σημασία της TS στην ανάπτυξη νεοπλασματικής αντοχής έχει υποδειχθεί σε μελέτες που έχουν δείξει ότι η επαγωγή όπως και η σταθερός πολυμερισμός των ειδικών για τη TS γονιδίων, μπορεί να σχετίζεται με την ανάπτυξη αντοχής στη 5-FU²⁵⁰⁻²⁵⁴. Τόσο σε κλινικές, όσο και σε προκλινικές μελέτες αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης TS σχετίζεται με αντοχή στη 5-FU²⁵³⁻²⁵⁶. Εξαιτίας του δυνητικού ρόλου της TS ως καθοριστικού παράγοντα στην απαντητικότητα στη θεραπεία τη βασιζόμενη στη φλουοροπυριμιδίνη, έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες για το ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων της TS στους καρκινικούς ιστούς σε διάφορους ασθενείς. Η παραδοσιακή μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της TS είναι με βιοχημικές ενζυματικές μεθόδους. Αυτές όμως οι μέθοδοι έχουν μεγάλους περιορισμούς όταν εφαρμόζονται σε ανθρώπινους ιστούς. Πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων της TS πρωτεΐνης και της έκφρασης του TS γονιδίου²⁵⁷⁻²⁵⁸. Επιπλέον η ανάπτυξη μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι της TS, βοήθησε πολύ το ποσοτικό προσδιορισμό της TS σε τομές ιστών αρχείου, μονιμοποιημένων σε φορμόλη και εγκλεισμένων σε κύβους παραφίνης²⁵⁷.

Σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, ο συνδυασμός 5-FU και λευκοβορίνης έχει σημαντική επίδραση²⁴⁹. Επιπλέον, ο συνδυασμός 5-FU και 5-FU λευκοβορίνης αποτέλεσε τα κυριότερα χημειοθεραπευτικά σκευάσματα στην αντιμετώπιση ασθενών με πρώιμο καρκίνο του μαστού^{249,259}. Το 1981 η Ομάδα της Διεθνούς Μελέτης για τον Καρκίνο του Μαστού (IBSCSG) ξεκίνησε μία τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη για να εκτιμήσει την επίδραση της πρώιμης έναρξης συμπληρωματικής χημειοθεραπείας με κυτοζάνη, μεθοτρεξάτη και 5-FU (CMF) σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού με αρνητικούς και θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες²⁶⁰⁻²⁶¹. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι ακόμα και ένας κύκλος περιεγχειρητικής χημειοθεραπείας που ξεκινούσε μέσα σε 36 ώρες από τη στιγμή του χειρουργείου στους ασθενείς με αρνητικούς



λεμφαδένες προκαλούσε σημαντική βελτίωση στο μεσοδιάστημα ελεύθερο νόσου και τη συνολική επιβίωση²⁶¹. Επιπλέον, ασθενείς με θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες που έλαβαν 6 κύκλους παρατεταμένης CMF θεραπείας, επέδειξαν σημαντική βελτίωση όσον αφορά την επιβίωση, σε σύγκριση με τις ασθενείς που έλαβαν μόνο ένα κύκλο περιεγχειρητικής χημειοθεραπείας²⁶². Στην ίδια σειρά ασθενών μελετήθηκε η κλινική σημασία της έκφρασης του ενζύμου TS ως προγνωστικού δείκτη της υποτροπής της νόσου και της επιβίωσης καθώς και της απαντητικότητας στη χημειοθεραπεία²⁶². Σε πρώιμου σταδίου ασθενείς με καρκίνο του μαστού, υψηλή έκφραση της TS σχετιζόταν με σημαντικά χειρότερη πρόγνωση στις ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες. Η ίδια ομάδα ασθενών ήταν αυτή που επέδειξε τη σημαντικότερη βελτίωση όσον αφορά το μεσοδιάστημα ελεύθερο νόσου και τη συνολική επιβίωση όταν έλαβε 6 κύκλους συμπληρωματικής CMF θεραπείας. Η σχέση αυτή ήταν ανεξάρτητη από άλλους προγνωστικούς παράγοντες, όπως το μέγεθος του όγκου, ο ιστολογικός βαθμός κακοηθείας, η διήθηση αγγείων, η κατάσταση των ορμονουποδοχέων, το c-erb-B2 και η έκφραση του Ki-67²⁶³.



10. ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

Γενικά στοιχεία

Σύμφωνα με τη θεωρία της επιλογής των κλώνων (clonal selection) του Burnet, ένα πλασματοκύτταρο παράγει μία ανοσοσφαιρίνη.

Ένα από τα μεγαλύτερα επιτεύγματα στη σύγχρονη ανοσολογία, είναι, βάσει της θεωρίας αυτής, η ανακάλυψη μεθόδου παραγωγής, *in vitro*, μεγάλων ποσοτήτων ομοιογενών αντισωμάτων, έναντι μίας μόνον αντιγονικής ειδικότητας, δηλαδή των μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Πηγή παραγωγής των μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι το υβρίδωμα, το οποίο προκύπτει από τη σύντηξη ενός φυσιολογικού εκκριτικού αντισώματος-B λεμφοκυττάρου- και ενός κυττάρου μυελώματος ανθρώπου ή ζώου. Τα φυσιολογικά πλασματοκύτταρα πεθαίνουν, συνήθως, μετά από ένα ορισμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων. Η διαίρεσή τους μπορεί να συνεχισθεί μετά από σύντηξη (fusion) μ'ένα κακόηθεξ κύτταρο μυελώματος. Η τεχνική αυτή, παρέχει τη δυνατότητα συντήξεως των χαρακτηριστικών των δύο μητρικών κυττάρων, δηλαδή την αντιγονική ειδικότητα στο εκκρινόμενο αντίσωμα από το B-λεμφοκύτταρο, καθώς επίσης και τη διαίωση της παραγωγής μονοκλωνικών ανοσοσφαιρινών από το κύτταρο του μυελώματος.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα, παράγονται με διάφορες τεχνικές διεργασίες από λεμφοειδή (σπληνικά) κύτταρα, ανοσοποιημένα με αντιγόνο. Μετά από διεργασίες, λαμβάνονται τελικώς, μονοκλωνικά αντισώματα, ειδικά έναντι του αρχικού ή αρχικών ανοσοποιητικών αντιγόνων.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα έχουν πολλές εφαρμογές στη κλινική πράξη, ενώ η πλήρης γνώση της σημασίας τους βρίσκεται ακόμα στην οδό της ερεύνης. Έτσι, στην οροδιαγνωστική και ανοσοιστοχημεία, με τη βοήθεια των μονοκλωνικών αντισωμάτων, γίνεται ο καθορισμός και τυποποίηση των αντιγόνων της κυτταρικής επιφανείας, κυτταροπλάσματος, πυρήνα, υποπληθυσμών T- ή B λεμφοκυττάρων, διαφόρων ιών, προϊόντων ογκογονιδίων, ορμονών, δεικτών κυτταρικού πολλαπλασιασμού, κλπ.



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



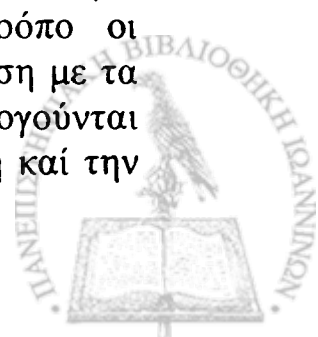
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το υλικό αυτής της μελέτης αποτέλεσαν μπλοκ παραφίνης από βιοψίες καρκινωμάτων μαστού από υλικό μαστεκτομών, που παραχωρήθηκαν ευγενώς από τον καθηγητή και Διευθύνοντα το Ινστιτούτο Αντικαρκινικής Έρευνας Β. Gusterson (Ηνωμένο Βασίλειο).

Το υλικό αυτής της μελέτης προήλθε από μία υποομάδα ασθενών που είχαν συμπεριληφθεί στη διεθνή ομάδα μελέτης του καρκίνου του μαστού, γνωστής υπό την ονομασία 'Μελέτη Λούντβιχ V' (International Breast Cancer Study Group- IBSCG- Ludwig Trial V)²²³⁻²²⁵. Το 1981 η διεθνής ομάδα μελέτης καρκίνου του μαστού (IBSCG), ξεκίνησε μία τυχαιοποιημένη μελέτη αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας της πρώιμης έναρξης συμπληρωματικής χημειοθεραπείας με τα σκευάσματα κυτοξαΐνη, μεθοτρεξάτη, και 5- φθορο-ουρακίλη (CMF) σε ασθενείς με προσβλημένους και μή, μασχαλιαίους λεμφαδένες. 2504 ήταν το σύνολο των ασθενών που αποτέλεσε το αντικείμενο μελέτης μεταξύ του 1981 και 1985. Οι ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες (σύνολο 1275) τυχαιοποιήθηκαν ανάμεσα σε αυτούς που έλαβαν ένα κύκλο περιεγχειρητικής χημειοθεραπείας και σε αυτούς που δεν έλαβαν θεραπεία. Οι ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες (σύνολο 1229) έλαβαν έναν από τους ακόλουθους τρεις τύπους θεραπείας: περιεγχειρητική χημειοθεραπεία, μετεγχειρητική χημειοθεραπεία ή και τα δύο. Η περιεγχειρητική χημειοθεραπεία περιελάμβανε ένα συνδυασμό ενδοφλέβιας κυκλοφωσφαμίδης, μεθοτρεξάτης και φθορο-ουρακίλης, τις ημέρες 1 και 8 μετά τη μαστεκτομή. Η μετεγχειρητική χημειοθεραπεία περιελάμβανε επίσης κυκλοφωσφαμίδη, μεθοτρεξάτη και φθορο-ουρακίλη (η κυκλοφωσφαμίδη λαμβανομένη από το στόμα) καθώς και χαμηλή δόση συνεχούς πρεδνιζολόνης, ξεκινώντας την 25-36η ημέρα μετά τη μαστεκτομή και συνεχιζόμενη για 6 κύκλους, κάθε 28 ημέρες. Οι μετεμμηνοπαυσιακές ασθενείς με θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες έλαβαν επίσης ταμοξιφαίνη για 6 μήνες.

Το 1993 η IBSCG καθιέρωσε μία 'τράπεζα' ιστών από μπλοκ παραφίνης των όγκων από υποομάδα ασθενών της 'μελέτης V'. Ο απώτερος στόχος ήταν η δημιουργία μίας ομάδας 500 περιπτώσεων, με επαρκές υλικό για την υποστήριξη διαφόρων μελετών. Κατ' αυτόν τον τρόπο οι παθολογικές παράμετροι θα μπορούν να μελετούνται σε σύγκριση με τα κλινικά δεδομένα, που ξεκινούν από το 1981 και αξιολογούνται αναπροσαρμοζόμενα σε ετήσια βάση όσον αφορά την επιβίωση και την



κατάσταση της νόσου. 500 περιπτώσεις από τις χώρες Λουμπλιάνα, Μαδρίτη, Πέρθ και Μπρέσια επιλέχθηκαν κατά τυχαιοποιημένο τρόπο, για να αποτελούν μία ομάδα ασθενών, αντιπροσωπευτική ολοκλήρου του πληθυσμού της ομάδας μελέτης, όσον αφορά την κατάσταση των λεμφαδένων, την κατάσταση της εμμήνου ρύσεως, τη θεραπεία, το μέγεθος του όγκου και την κατάσταση των ορμονουποδοχέων.

2. ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΜΕΛΕΤΗΣ

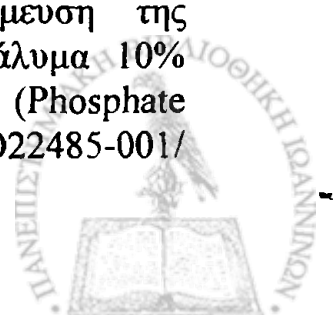
Το αντικείμενο της παρούσας μελέτης αποτέλεσαν τομές παραφίνης από εγχειρητικά παρασκευάσματα μαστεκτομών, για καρκίνωμα του μαστού, μονιμοποιημένων σε διάλυμα φορμόλης 10%, από 494 ασθενείς. Τα κλινικά στοιχεία και άλλες παθολογικές παράμετροι παραχωρήθηκαν από την IBSCG. Ένα σύνολο 434 περιπτώσεων με αξιολογήσιμο ποσοστό του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού, Ki-67, και του ιστολογικού βαθμού κακοηθείας κατά Bloom και Richardson και κατά Nottingham ήταν τελικά κατάλληλο για στατιστική ανάλυση. Αυτές οι 434 ασθενείς αποτελούνταν από 188 περιπτώσεις με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες και 246 περιπτώσεις με θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες. Περιπτώσεις που αποκλείστηκαν από τη μελέτη, αφορούσαν περιπτώσεις με απουσία διηθητικού όγκου, ή απουσία θετικής έκφρασης στο αξιολογήσιμο υλικό. Στη τελευταία περίπτωση, ήταν δυνατό η απουσία οιασδήποτε θετικής έκφρασης, να αντανακλούσε τη κατάσταση μονιμοποίησης του υλικού. Ετσι, έστω και λίγοι θετικοί πυρήνες, ήταν απαραίτητοι για την αποδοχή του υλικού ως κατάλληλου για αξιολόγηση. Ο μέσος όρος παρακολούθησης για την ομάδα μελέτης του δείκτη Ki-67 ήταν 10 χρόνια κατά τη στιγμή της ανάλυσης.

3. ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Για την ανοσοιστοχημική μελέτη του δείκτη Ki-67, χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα MIB-1 και η έμμεση ανοσοιστοχημική μέθοδος αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης (ABC). Η ανοσοιστοχημική μελέτη έγινε στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου των Ιωαννίνων. Οι τομές παραφίνης ήταν πάχους 3μm.

Η μέθοδος αβιδίνης-βιοτίνης-υπεροξειδάσης (ABC), που ακολουθήθηκε για το μονοκλωνικό αντίσωμα MIB-1, έχει ως εξής:

- Αποπαραφίνωση των τομών σε ξυλόλη
- Ενυδάτωση σε κατιούσα οιοπνευμάτων και δέσμευση της δραστηριότητας της ενδογενούς υπεροξειδάσης με διάλυμα 10% υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate Buffered Saline, DULBECCO 'A' tablets OXOID lot RO22485-001/ 1 tabl σε 100ml απεσταγμένου νερού) για 10 λεπτά



- Ξέπλυμα σε νερό βρύσης για 5 λεπτά και στη συνέχεια σε κιτρικό διάλυμα, pH 6.0 (2.1g σε 1l απεσταγμένου νερού pH 6.0 και 2m NaOH)
- Επώαση σε φούρνο μικροκυμάτων, πλήρους ισχύος, για 2Χ5 λεπτά σε 1l κιτρικού διαλύματος, προσέχοντας να μη στεγνώσουν οι τομές σε κανένα στάδιο της διαδικασίας. Η επώαση σε φούρνο μικροκυμάτων αυξάνει την ένταση της χρώσης και ελαττώνει τη μή ειδική χρώση υποστρώματος. Η χρήση του ελαττώνει τα εσφαλμένα αρνητικά αποτελέσματα υπερ-μονιμοποιημένων ιστών, αποκαλύπτοντας αντιγονικούς επίτοπους, αυξάνει το φάσμα των αντισωμάτων, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε επίπεδο ρουτίνας καθώς και τη χρησιμότητα του υλικού αρχείου για μελέτες, βασιζόμενες σε υλικό αρχείου. Ο φούρνος μικροκυμάτων που χρησιμοποιήθηκε ήταν τύπου Proline Micro Chef, Model ST44, 950 watts.
- Παραμονή στο κιτρικό διάλυμα για 15 λεπτά, μέχρι να κρυώσουν οι τομές
- Ξέπλυμα σε PBS, pH 7.3 και επώαση με φυσιολογικό ορό κουνελιού (normal rabbit serum, DAKO code X902) σε αραιώση 1:5, για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, για τη δέσμευση των μη-ειδικών ανοσοσφαιρινών
- Επώαση με το ειδικό αντίσωμα MIB-1 σε αραιώση 1:50, για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το μονοκλωνικό αυτό αντίσωμα (Immunotech S.A. AMAC, Inc lot no 0692, cat no dianova 505), τύπου mouse IgG 1, παρήχθηκε έναντι του 1002 bp Ki-67 DNA τμήματος, που εκφράζεται από βακτήρια. Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του πυρηνικού αντιγόνου Ki-67, που σχετίζεται με το κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τόσο σε κυτταρολογικό υλικό, όσο και σε ιστολογικές τομές. Το αντίσωμα αυτό μπορεί να εφαρμοστεί σε τομές κρυοστάτη. Για την εφαρμογή του σε υλικό μονιμοποιημένο σε φορμόλη και εγκλεισμένο σε κύβους παραφίνης, απαραίτητη είναι η προηγούμενη επώαση των τομών σε φούρνο μικροκυμάτων.
- Ξέπλυμα των τομών σε διάλυμα PBS
- Επώαση με αντιγόνο κουνελιού έναντι ανοσοσφαιρινών ποντικού (biotinylated Rabbit anti-mouse, DAKO, E0354) σε αραιώση 1:200, για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Παρασκευή του διαλύματος του συμπλέγματος στρεπταβιδίνης-βιοτίνης (StreptABC, DAKO, code K0377).
- Ξέπλυμα των τομών σε διάλυμα PBS
- Επώαση με το διάλυμα του συμπλέγματος στρεπταβιδίνης-βιοτίνης για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Ξέπλυμα των τομών σε PBS
- Επώαση με 0.05% χρωμογόνου 3,3 τετραυδροχλωρικής διαμινοβενζιδίνης (DAB, Sigma D-5637) με 100μl διαλύματος 30% υπεροξειδίου του υδρογόνου σε 100ml PBS για 10 λεπτά



- Ξέπλυμα σε νερό βρύσης για 5 λεπτά
- Μετάχρωση με αιματοξυλίνη Mayer για 30 δευτερόλεπτα
- Ξέπλυμα σε νερό βρύσης για 5 λεπτά
- Ενυδάτωση σε ανιούσα οινόπνευμάτων, εμβάπτιση των τομών σε ξυλόλη και επικάλυψη

Ως θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τομές λεμφαδένων με εικόνα λεμφοζιδιακής υπερπλασίας.

4. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΙΚΗΣ ΧΡΩΣΗΣ

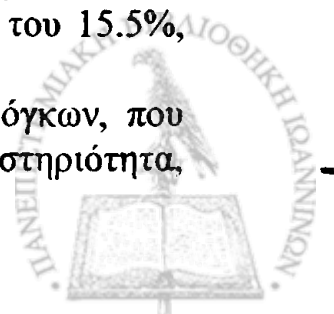
Τα πλακίδια αξιολογήθηκαν και βαθμολογήθηκαν, 'τυφλά' όσον αφορά τα κλινικά και παθολογοανατομικά δεδομένα. Το ποσοστό των θετικά εκφραζομένων κυττάρων, σε σχέση με το συνολικό αριθμό των μετρουμένων νεοπλασματικών κυττάρων, αξιολογήθηκε σε μεγένθυση X400, με τη χρήση μικρομετρικής κλίμακας, προσαρμοσμένης στον προσοφθάλμιο φακό του οπτικού μικροσκοπίου. Μετρήθηκαν δέκα, τυχαία επιλεγμένα οπτικά πεδία. Ο αριθμός των πυρήνων που μετρήθηκαν, ήταν 638 έως 7871 ανά περίπτωση.

5. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Από τις 434 ασθενείς με διηθητικό καρκίνωμα του μαστού αυτής της μελέτης, 188 δεν είχαν ιστολογικά, αποδεικτικά, στοιχεία λεμφαδενικής μεταστατικής νόσου, ενώ 246 είχαν μετάσταση στη μασχάλη. 63 ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες δεν έλαβαν συμπληρωματική θεραπεία και 125 έλαβαν περιεγχειρητική χημειοθεραπεία. Από τις ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες, 89 έλαβαν περιεγχειρητική χημειοθεραπεία, ενώ 157 έλαβαν παρατεταμένη θεραπεία. Η βαθμολόγηση του βαθμού κακοηθείας των καρκινωμάτων που συμπεριελήφθησαν στη μελέτη, έγινε βάσει του συστήματος Bloom-Richardson και κατά Νόττινχαμ (Nottingham).

Επειδή ένας από τους σκοπούς αυτής της μελέτης ήταν η πρόθεση της υποκατάστασης των τιμών των πυρηνοκινησιών (του τρίτου μορφολογικού κριτηρίου) στο σύστημα κριτηρίων κατά Νόττινχαμ, με αντίστοιχες κατηγορίες τιμών του Ki-67, ο δείκτης αυτός μελετήθηκε μετά τη διάκρισή του σε κατηγορίες. Έτσι δημιουργήθηκαν τρεις κατηγορίες του Ki-67, με ποσοστά μικρότερα, ή ίσα του 9.5%, για τη πρώτη κατηγορία, ποσοστά μεγαλύτερα του 9.5% και μικρότερα του 15.5%, για τη δεύτερη κατηγορία και ποσοστά μεγαλύτερα του 15.5%, για τη τρίτη κατηγορία.

Η επιλογή αυτών των τιμών βασίστηκε στο ποσοστό των όγκων, που βαθμολογήθηκαν με 1, 2 και 3 όσον αφορά τη μιτωτική δραστηριότητα, χρησιμοποιώντας τα κριτήρια των Elston και Ellis (1991)²⁵.



Η συμφωνία ανάμεσα στις κατηγορίες του Ki-67 και της μιτωτικής δραστηριότητας ήταν υψηλή, με K INTERRATER AGREEMENT SCORE 74%, όπου τέλειο ταίριασμα θεωρήθηκε τέλεια συμφωνία και διαφορά ανάμεσα σε γειτονικές κατηγορίες θεωρήθηκε μερική συμφωνία. Η παρατηρούμενη συμφωνία ανάμεσα σε αυτούς τους δύο τύπους μέτρησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ήταν σημαντικά υψηλότερη, απ'ότι θ' αναμενόταν από απλή τύχη και μόνο ($p < .0001$).

Στη συνέχεια, οι κατηγορίες αυτές του Ki-67 βαθμολογήθηκαν ως 1, 2 και 3, με αυξανόμενες τιμές υποδηλώνοντας υψηλότερα ποσοστά του Ki-67, και χρησιμοποιήθηκαν στη θέση του αριθμού των πυρηνοκινησιών, στο σύστημα αξιολόγησης του βαθμού κακοηθείας κατά Νότινχαμ. Το προκύπτον κατ'αυτό το τρόπο, τροποποιημένο σύστημα αξιολόγησης του βαθμού κακοηθείας κατά Νότινχαμ (adjusted Nottingham grade), αναφερόμενο ως '**Ki-67 grade**', μελετήθηκε στη συνέχεια, ξεχωριστά για τις υποκατηγορίες των ασθενών με αρνητικούς ($n=188$) και θετικούς ($n=246$) μασχαλιαίους λεμφαδένες.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Α. Χρησιμοποίηση του Ki-67 ως εναλλακτικού του αριθμού των πυρηνοκινησιών στο σύστημα Νότιγγαμ

Α.1. Σχέση ανάμεσα στο 'Ki-67 grade' και άλλα χαρακτηριστικά των ασθενών και των όγκων

Η σχέση ανάμεσα στο 'Ki-67 grade' και τα χαρακτηριστικά των ασθενών μελετήθηκε τόσο για τις ασθενείς με αρνητικούς-, όσο και για τις ασθενείς με θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες.

Στο πίνακα 1 φαίνονται τα αποτελέσματα για τις ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες. Οι τιμές p (στατιστική ανάλυση κατά χ^2) δείχνονται για τις σχέσεις του 'Ki-67 grade', του 'Nottingham grade', του 'Bloom & Richardson grade' και των κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών. Χαρακτηριστικά, που σχετίζονταν σημαντικά με το 'Ki-67 grade', ανάμεσα στις ασθενείς με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, ήταν το παθολογοανατομικό μέγεθος του όγκου, το 'Bloom & Richardson grade', το 'Nottingham grade', το ποσοστό Ki-67, η ιστολογία και η προγνωστική κατηγοριοποίηση των ιστολογικών τύπων κατά Νότιγγαμ. Υψηλότερα 'Ki-67 grade' είχαν τη τάση να σχετίζονται με όγκους μεγαλύτερους των 2εκ, υψηλό 'B-R grade', υψηλό 'Nottingham grade', Ki-67 ποσοστό μεγαλύτερο ή ίσο με 8 και φτωχής πρόγνωσης ιστολογικούς τύπους όγκων. Μία οριακά στατιστικά σημαντική συσχέτιση παρατηρήθηκε επίσης ανάμεσα στο c-erb-B2 και 'Ki-67 grade', με υψηλότερα grade να σχετίζονται με πιο συχνή υπερέκφραση του c-erb-B2. Κάποια χαρακτηριστικά, που φαίνονταν να σχετίζονται στατιστικά σημαντικά ή οριακά με το 'Nottingham grade' σε ασθενείς με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, όπως η κατάσταση των οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων, δε φάνηκε να σχετίζονται με το 'Ki-67 grade'. Επιπλέον, κάποια χαρακτηριστικά που σχετίζονταν στατιστικά σημαντικά με το 'Bloom & Richardson grade' σ' αυτές τις ασθενείς, όπως οι υποδοχείς προγεστερόνης και η αγγειακή διήθηση, δε σχετίζονταν σημαντικά με το 'Ki-67 grade'.

Στις ασθενείς με θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, το 'Bloom & Richardson grade', το 'Nottingham grade', το ποσοστό Ki-67 και ο τύπος κατά Nottingham επίσης σχετίζονταν στατιστικά σημαντικά με το 'Ki-67 grade'. Επιπλέον, όγκοι αρνητικοί για υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης και με υπερέκφραση του c-erb-B2, είχαν πολύ μεγαλύτερες πιθανότητες να έχουν υψηλό 'Ki-67 grade'. Οριακή, μόνο σχέση παρατηρήθηκε ανάμεσα στο 'Ki-67 grade' και το μέγεθος του όγκου, με μεγαλύτερους όγκους να έχουν τη τάση να έχουν υψηλότερες τιμές ιστολογικού βαθμού κακοηθείας. Η σχέση ανάμεσα στον



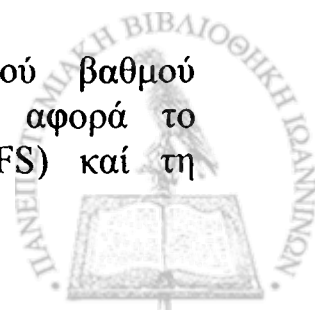
ιστολογικό βαθμό κακοηθείας και το μέγεθος του όγκου είναι λίγο ισχυρότερη χρησιμοποιώντας το 'Bloom & Richardson' και 'Nottingham' grade έναντι του 'Ki-67 grade'. Επίσης το 'Bloom & Richardson grade' σχετίζεται με τη κατάσταση της εμμήνου ρύσεως, την αγγειακή διήθηση στο πρωτοπαθή όγκο και την ιστολογία, συσχετίσεις, που δεν παρατηρήθηκαν με τα άλλα συστήματα αξιολόγησης του ιστολογικού βαθμού κακοηθείας.

A.2. Σχέση ανάμεσα στο 'Ki-67 grade', 'Nottingham grade' και 'Bloom & Richardson grade'

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στο 'Ki-67 grade', 'Nottingham grade' και 'Bloom & Richardson grade' ($p < 0.001$), τόσο στις ασθενείς με θετικούς, όσο και στις ασθενείς με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες. Η συμφωνία ανάμεσα στα τρία συστήματα αξιολόγησης του ιστολογικού βαθμού κακοηθείας ήταν υψηλή με τιμή K, 88% μεταξύ του 'Ki-67 grade' και του 'Nottingham grade' και 80% μεταξύ του 'Ki-67 grade' και 'Bloom & Richardson grade'. Η συμφωνία αυτή, ήταν σημαντικά μεγαλύτερη, απ'ότι θα μπορούσε να δικαιολογηθεί μόνο από τυχαίους λόγους. Συνολικά, σύμφωνα με το 'Ki-67 grade' κατηγοριοποιήθηκαν 18%, 50% και 32% των καρκινωμάτων σε ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες και 11%, 55% και 33% των καρκινωμάτων σε ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες στις κατηγορίες 1, 2 και 3 αντίστοιχα. Στη κατηγορία των ασθενών με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, η ομάδα των όγκων με ιστολογικό βαθμό κακοηθείας 1 κατά Nottingham και 'Ki-67 grade', συμπεριέλαβε περισσότερες περιπτώσεις καρκινωμάτων που βαθμολογήθηκαν ως 2 και 3 σύμφωνα με το σύστημα Bloom & Richardson (συνολικά 33 και 36 όγκοι ταξινομήθηκαν ως 'Ki-67 grade' 1 και 'Nottingham grade' 1 αντίστοιχα, σε σύγκριση με τις 21 περιπτώσεις ιστολογικού βαθμού κακοηθείας 1 κατά Bloom & Richardson. Ο αριθμός των όγκων που ταξινομήθηκαν ως ιστολογικού βαθμού κακοηθείας 1 με θετική νόσο στους λεμφαδένες, ήταν ουσιαστικά ο ίδιος στα διάφορα συστήματα. (28 'Ki-67 grade'-11%, 26 'Nottingham grade'-10.5% και 26 'Bloom & Richardson grade'-10.5%). Αντίθετα, η κατηγορία 3 κατά Bloom & Richardson συμπεριέλαβε μεγαλύτερο αριθμό περιπτώσεων απ'ότι οι αντίστοιχες κατηγορίες του 'Ki-67 grade' και 'Nottingham grade' και στις δύο κατηγορίες ασθενών.

A.3. 'Ki-67 grade' και επιβίωση

Τα διάφορα συστήματα αξιολόγησης του ιστολογικού βαθμού κακοηθείας, είχαν παρόμοια προγνωστική αξία, όσον αφορά το μεσοδιάστημα ελεύθερο νόσου (disease-free survival/DFS) και τη



συνολική επιβίωση (overall survival/OS) (Πίνακες 5,6) και στις δύο κατηγορίες ασθενών.

Μοντέλα ανάλυσης κατά Cox (Cox proportional hazards regression models with a single covariate for 'Ki-67 grade') χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση των ποσοστών κινδύνου (hazard ratios/HRs) για κάθε θεραπευτική κατηγορία, με τιμή HR μεγαλύτερη του 1, να υποδηλώνει μία αύξηση του κινδύνου για κάθε αύξηση του ιστολογικού βαθμού κακοηθείας (Πίνακες 5-8). Ασθενείς με όγκους υψηλότερου βαθμού κακοηθείας, είχαν στατιστικά σημαντικά, ή οριακά χειρότερη επιβίωση (DFS και OS) και στις δύο κατηγορίες ασθενών, με εξαίρεση τις ασθενείς με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, που δεν έλαβαν περιεγχειρητική χημειοθεραπεία. Σε αυτή την ομάδα των ασθενών, δε παρατηρήθηκαν διαφορές στο μεσοδιάστημα ελεύθερο νόσου και τη συνολική επιβίωση για τις διάφορες κατηγορίες του 'Ki-67 grade'. Μία αύξηση του 'Ki-67 grade' στη κατηγορία των ασθενών με θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, έχει πίο μεγάλη αρνητική επίπτωση στο μεσοδιάστημα ελεύθερο νόσου και τη συνολική επιβίωση, απ'ότι στους ασθενείς με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες.

A.4. 'Ki-67 grade' και θεραπεία

Τα τρία συστήματα αξιολόγησης του ιστολογικού βαθμού κακοηθείας, έδειξαν την ίδια προγνωστική αξία όσον αφορά το μεσοδιάστημα ελεύθερο νόσου και τη συνολική επιβίωση, όταν οι αναλύσεις έγιναν βάσει του τύπου της θεραπείας και της λεμφαδενικής κατάστασης. Η επίπτωση των θεραπευτικών επιλογών στο μεσοδιάστημα ελεύθερο νόσου και τη συνολική επιβίωση εξετάστηκε ξεχωριστά για τις κατηγορίες των ασθενών με 'Ki-67 grade' 1, 2 και 3.

Στους ασθενείς με θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες και με όγκους ιστολογικού βαθμού κακοηθείας 3 κατά Νότιγχαμ, αυτοί που έλαβαν παρατεταμένη θεραπεία παρουσίασαν σημαντικά αυξημένα ποσοστά μεσοδιαστημάτων ελεύθερα νόσου και συνολικής επιβίωσης ($p=0.009$ και $p=0.01$ αντίστοιχα), σε σχέση με τις ασθενείς που έλαβαν περιεγχειρητική χημειοθεραπεία. Αυτό το πλεονέκτημα επιβίωσης δεν εκφράστηκε στις ασθενείς με όγκους ιστολογικού βαθμού κακοηθείας 3, σύμφωνα με τα άλλα δύο συστήματα ταξινόμησης. Παρ'όλ'αυτά, ένα οριακά, σημαντικό πλεονέκτημα, όσον αφορά το μεσοδιάστημα ελεύθερο νόσου ($p=0.07$), παρατηρήθηκε στις ασθενείς που υποβλήθηκαν σε παρατεταμένη χημειοθεραπεία, με όγκους 'Ki-67-grade' 2. Κάτι που δεν φάνηκε με τα άλλα συστήματα ταξινόμησης. Σε ασθενείς με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες και όγκους 'Ki-67 grade' 3, παρατηρήθηκε ένα στατιστικά μη σημαντικό μειονέκτημα όσον αφορά το μεσοδιάστημα ελεύθερο νόσου και τη συνολική επιβίωση, στις γυναίκες που έλαβαν περιεγχειρητική χημειοθεραπεία σε σχέση με τις γυναίκες που δεν



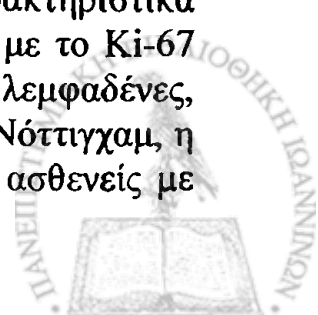
έλαβαν συμπληρωματική θεραπεία. Στις ασθενείς με θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, η παρατεταμένη θεραπεία υπερείχε ως προς τη περιεγχειρητική χημειοθεραπεία, όσον αφορά την επιβίωση και το μεσοδιάστημα ελεύθερο νόσου για όλες τις κατηγορίες του 'Ki-67 grade'.

Πολυπαραγοντικές αναλύσεις, έδειξαν ότι στις ασθενείς με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, που δεν έλαβαν περιεγχειρητική χημειοθεραπεία, πληροφορίες που αφορούσαν την ύπαρξη ή όχι αγγειακής διήθησης στον πρωτοπαθή όγκο, συνέβαλαν σημαντικά, πέραν του 'Ki-67 grade', στην εκτίμηση του 'κινδύνου' (hazards) για τη συνολική επιβίωση. Το ποσοστό κινδύνου (HR/ hazard ratio) για αύξηση ενός βαθμού του 'Ki-67 grade' παρέμεινε διαφορετικό από το 1 ($p=0.81$, 95% c.i.: 0.47, 1.80), ενώ το ποσοστό κινδύνου (HR) για τη παρουσία αγγειακής διήθησης ήταν 2.74 ($p=0.04$, 95% c.i.: 1.05, 7.15). Στις ασθενείς με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, που έλαβαν περιεγχειρητική χημειοθεραπεία, το μέγεθος του όγκου συνέβαλε σημαντικά, πέραν του 'Ki-67 grade', στην εκτίμηση του HR του μεσοδιαστήματος ελεύθερο νόσου και στις συνολικής επιβίωσης. Σε ασθενείς με θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες που έλαβαν περιεγχειρητική χημειοθεραπεία, η έκφραση του c-erb-B2 και η αγγειακή διήθηση, προσέφεραν σημαντικές πληροφορίες, πέραν του 'Ki-67 grade', όσον αφορά τη πρόγνωση. Στις ασθενείς με θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες που έλαβαν παρατεταμένη χημειοθεραπεία, η γνώση του μεγέθους του όγκου και η έκφραση του c-erb-B2, επιπλέον του 'Ki-67 grade' συνέβαλαν στη πιο ακριβή εκτίμηση του DFS και OS.

B. Αξιολόγηση του Ki-67 ως ανεξάρτητης παραμέτρου και ως υποκατάστατου για την εκτίμηση της βιολογικής συμπεριφοράς του όγκου σε σύγκριση με πολλαπλές άλλες παραμέτρους

B.1. Σύγκριση των κατηγοριών Ki-67 με χαρακτηριστικά των ασθενών και του όγκου

Οι πίνακες 3 και 4 δείχνουν τη σχέση ανάμεσα στα χαρακτηριστικά των ασθενών και των κατηγοριών του Ki-67 για τις υποομάδες των ασθενών με αρνητικούς και θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες αντίστοιχα. Στους πίνακες αυτούς, φαίνονται οι τιμές p του χ^2 για τις σχέσεις των κατηγοριών του Ki-67, του ιστολογικού βαθμού κακοηθείας κατά Bloom & Richardson και κατά Νόττιγχαμ με τα διάφορα χαρακτηριστικά των ασθενών. Χαρακτηριστικά που σχετίζονταν σημαντικά με το Ki-67 στη κατηγορία των ασθενών με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, ήταν ο ιστολογικός βαθμός κακοηθείας κατά B&R και κατά Νόττιγχαμ, η ιστολογία και ο προγνωστικός τύπος κατά Νόττιγχαμ. Στις ασθενείς με



όγκους ιστολογικού βαθμού κακοηθείας 1 κατά B&R, 90% είχαν ποσοστά Ki-67 μικρότερα η ίσα του 9.5. Επιπλέον, ποσοστά Ki-67 μικρότερα ή ίσα του 9.5%, παρατηρήθηκαν σε 72% των ασθενών με όγκους ιστολογικού βαθμού κακοηθείας 2 κατά B&R.

Στις ασθενείς με θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, τα συστήματα βαθμολόγησης κατά B&R, και κατά Νότιγχαμ, το c-erb-B2 και ο προγνωστικός τύπος κατά Νότιγχαμ, παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τις κατηγορίες του Ki-67. Όπως και στην υποομάδα των ασθενών με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, μεγάλα ποσοστά ασθενών με όγκους χαμηλού βαθμού κακοηθείας, είχαν ποσοστά Ki-67 μικρότερα ή ίσα του 9.5%. Επίσης, όγκοι που δεν εξέφραζαν το δείκτη c-erb-B2 είχαν περισσότερες πιθανότητες να έχουν μικρά ποσοστά Ki-67.

B.2. Συσχέτιση των κατηγοριών Ki-67 με τη πρόγνωση

Οι πίνακες 9-12, δείχνουν τη προγνωστική σημασία των κατηγοριών Ki-67 όσον αφορά το μεσοδιάστημα ελεύθερο νόσου και τη συνολική επιβίωση στις ασθενείς με, και χωρίς μασχαλιαίες λεμφαδενικές μεταστάσεις. Μοντέλα του Cox μελέτης των ποσοστιαίων κινδύνων με μία παράμετρο για το Ki-67 grade (Cox proportional hazards regression models with a single covariate for Ki-67 grade) χρησιμοποιηθήκαν για την εκτίμηση των ποσοστών κινδύνου (hazard ratios-HRs). HR μεγαλύτερο του 1.0, υποδήλωνε μεγαλύτερο κίνδυνο για κάθε αύξηση της κατηγορίας Ki-67. Ασθενείς με μεγαλύτερα ποσοστά του Ki-67 είχαν σημαντικά η οριακά χειρότερα DFS και OS και για τις δύο κατηγορίες ασθενών με εξαίρεση τις ασθενείς με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες που δεν έλαβαν περιεγχειρητική χημειοθεραπεία και στις οποίες δεν παρατηρήθηκε καμία προγνωστική αξία του Ki-67.

Είναι προφανές, ότι η μέτρηση του Ki-67 και μόνο, μπορεί να δώσει σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες, ιδιαίτερα στην ομάδα των ασθενών με θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, για τη συνολική επιβίωση, αλλά όχι για το μεσοδιάστημα ελεύθερο νόσου. Σε σχέση με τα συστήματα B&R και κατά Νότιγχαμ, η σημασία αυτή είναι κατά πολύ ελαττωμένη.

Οι τύποι θεραπείας αξιολογήθηκαν μέσα σε κάθε μία από τις τρεις κατηγορίες του Ki-67 σ'αυτή την υποκατηγορία των ασθενών, εντούτοις δεν προέκυψαν κάποια επιπλέον στοιχεία όσον αφορά την απαντητικότητα ή ανθεκτικότητα στη θεραπεία, με αυτή την ανάλυση.



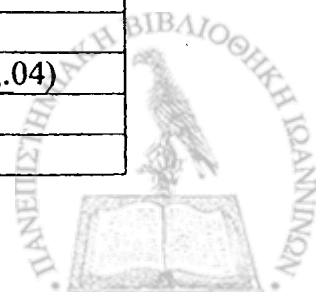
ΠΙΝΑΚΕΣ



ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Σχέση ανάμεσα στο 'Ki-67 grade' και άλλα κλινικά χαρακτηριστικά για τις 188 ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες

Ki-67 grade

	Βαθμός κακοηθείας 1	Βαθμός κακοηθείας 2	Βαθμός κακοηθείας 3	P, χ^2 (*)
Ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες	33 (18%)	94 (50%)	61 (32%)	
Εμμηνορρύση				
Προεμμηνοπαυσιακές	19 (19%)	47 (46%)	36 (35%)	.50(.97,.54)
Μετεμμηνοπαυσιακές	14 (16%)	47 (55%)	25 (29%)	
Μέγεθος όγκου				
≤2εκ.	22 (26%)	40 (48%)	22 (26%)	
> 2εκ.	10 (10%)	50 (51%)	39 (39%)	.02(.001,.001)
Άγνωστο	1 (20%)	4 (80%)	0 (0%)	
ER(οιστρογόνα)				
0-9 fmol	15 (21%)	32 (44%)	25 (35%)	
≥ 10 fmol	15 (16%)	51 (54%)	29 (31%)	.79(.08,.21)
Άγνωστο	3 (14%)	11 (52%)	7 (33%)	
PgR (προγεστερόνη)				
0-9 fmol	12 (14%)	41 (48%)	32 (38%)	
≥10 fmol	12 (20%)	30 (50%)	18 (30%)	.62(.02,.005)
Άγνωστο	9 (21%)	23 (53%)	11 (26%)	
B&R Grade				
1	14 (67%)	6 (29%)	1 (5%)	
2	17 (20%)	55 (65%)	13 (15%)	<.001(<.001,<.001)
3	2 (2%)	33 (40%)	47 (57%)	
Nottingham Grade				
1	33 (92%)	3 (8%)	0 (0%)	
2	0 (0%)	69 (78%)	19 (22%)	<.001(<.001,<.001)
3	0 (0%)	22 (34%)	42 (66%)	
Αγγειακή διήθηση				
Όχι	20 (21%)	46 (48%)	30 (31%)	
Ναι	12 (13%)	48 (54%)	29 (33%)	.30(.23,.04)
Άγνωστη	1 (33%)	0 (0%)	2 (67%)	



c-erb-B2				
Αρνητικό	33 (20%)	84 (50%)	50 (30%)	
Θετικό	0 (0%)	10 (53%)	9 (47%)	.07(.08,.11)
Ki-67				
<8%	32 (33%)	66 (67%)	0 (0%)	<.001(<.001,<.001)
≥ 8%	1 (1%)	28 (31%)	61 (68%)	
Ιστολογία				
Μη διηθητικό	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Περιορισμένη διήθηση	2 (40%)	3 (60%)	0 (0%)	
Ενδοπορικό με στρωματική διήθηση	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	
Διηθητικό πορογενούς τύπου	27 (18%)	67 (45%)	56 (37%)	.03(.01,.01)
Διηθητικό λοβιακού τύπου	1 (5%)	17 (89%)	1 (5%)	
Ειδικά χαρακτηριστικά	2 (29%)	3 (43%)	2 (29%)	
Διηθητικό πορογενούς και λοβιακού τύπου	1 (17%)	4 (67%)	1 (17%)	
Προγνωστικός τύπος κατά Nottingham				
1: Εξαιρετική πρόγνωση	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
2: Καλή πρόγνωση	23 (66%)	10 (29%)	2 (6%)	<.001(<.001,<.001)
3: Μέτρια πρόγνωση	0 (0%)	15 (83%)	3 (17%)	
4: Σχετικά φτωχή πρόγνωση	6 (5%)	69 (53%)	56 (43%)	

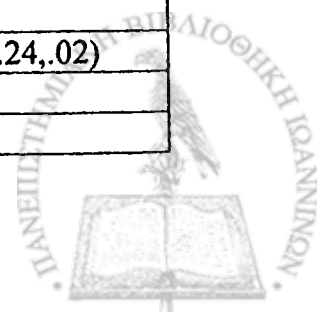
* Παρουσιάζονται τρεις τιμές p με την πιο κάτω σειρά:
Ki-67 grade p-value (Nottingham grade p-value, Bloom & Richardson p-value)



ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Σχέση ανάμεσα στο 'Ki-67 grade' και άλλα κλινικά χαρακτηριστικά σε 246 ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες

Ki-67 Grade

	Βαθμός κακοηθείας	Βαθμός κακοηθείας	Βαθμός κακοηθείας	P, X ² (*)
-	1	2	3	
Ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες	28 (11%)	136 (55%)	82 (33%)	
Εμμηνορρύση				
Προεμμηνοπα υσιακές	21 (13%)	91 (56%)	51 (31%)	.45(.25,.02)
Μετεμμηνοπα υσιακές	7 (8%)	45 (54%)	31 (37%)	
Μέγεθος όγκου				
≤ 2	15 (19%)	41 (53%)	22 (28%)	
> 2	12 (7%)	93 (57%)	57 (35%)	.07(.03,.02)
Αγνωστο	1 (17%)	2 (33%)	3 (50%)	
ER (Οιστρογόνα)				
0-9fmol	6 (7%)	40 (47%)	40 (47%)	
≥10fmol	21 (16%)	75 (59%)	32 (25%)	.004(.06,.04)
Αγνωστο	1 (3%)	21 (66%)	10 (31%)	
PgR (Προγεστερόνη)				
0-9 fmol	11 (10%)	50 (48%)	44 (42%)	
≥10 fmol	16 (17%)	53 (58%)	23 (25%)	.009(.09,.04)
Αγνωστο	1 (2%)	33 (67%)	15 (31%)	
B&R Grade				
1	15 (58%)	11 (42%)	0 (0%)	
2	12 (12%)	70 (69%)	20 (20%)	<.001(<.001,<.001)
3	1 (1%)	55 (47%)	62 (53%)	
Nottingham Grade				
1	25 (96%)	1 (4%)	0 (0%)	
2	3 (2%)	107 (79%)	25 (19%)	<.001(<.001,<.001)
3	0 (0%)	28 (33%)	57 (67%)	
Αγγειακή διήθηση				
Όχι	9 (15%)	34 (55%)	19 (31%)	.64(.24,.02)
Ναι	19 (10%)	102 (55%)	63 (34%)	



c-erb-B2				
Αρνητικό	27 (14%)	117 (59%)	55 (28%)	<.001(.002,<.001)
Θετικό	1 (2%)	19 (40%)	27 (57%)	
Ki-67				
<8%	28 (23%)	94 (77%)	0 (0%)	<.001(<.001,.001)
≥8%	0 (0%)	42 (34%)	82 (66%)	
Ιστολογία				
Μη διηθητικό	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Περιορισμένη διήθηση	2 (22%)	4 (44%)	3 (33%)	
Ενδοπορικό με στρωματική διήθηση	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Διηθητικό πορογενές	24 (11%)	115 (54%)	74 (35%)	.61(.06,.02)
Διηθητικό λοβιακό	1 (7%)	10 (71%)	3 (21%)	
Ειδικά χαρακτηριστικά	1 (33%)	2 (67%)	0 (0%)	
Διηθητικό πορογενές και λοβιακό	0 (0%)	5 (71%)	2 (29%)	
Προγνωστικός τύπος κατά Nottingham				
1: Εξαιρετική πρόγνωση	6 (86%)	0 (0%)	1 (14%)	
2: Καλή πρόγνωση	16 (36%)	28 (62%)	1 (2%)	<.001(<.001,<.001)
Μέτρια πρόγνωση	0 (0%)	15 (83%)	3 (17%)	
Σχετικά φτωχή πρόγνωση	6 (3%)	93 (53%)	77 (44%)	

* Παρουσιάζονται τρεις τιμές p, με τη πιο κάτω σειρά:

Ki-67 grade p-value (Nottingham grade p-value, Bloom & Richardson p-value)



ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Σχέση ανάμεσα στα ποσοστά του Ki-67 και κλινικά χαρακτηριστικά σε 188 ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες

Ποσοστό Ki-67

	Κατηγορία 1 ≤ 9.5%	Κατηγορία 2 9.5%-15.5%	Κατηγορία 3 > 15.5%	P, X ² (*)
Ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες	112 (60%)	29 (15%)	47 (25%)	
Εμμηνορρύση				
Προεμμηνορρυσιακές	60 (59%)	17 (17%)	25 (25%)	.27(.97,.54)
Μετεμμηνορρυσιακές	52 (60%)	12 (14%)	22 (26%)	
Μέγεθος όγκου				
≤ 2εκ.	54 (64%)	13 (15%)	17 (20%)	
> 2εκ.	53 (54%)	16 (16%)	10 (30%)	.18(.001,.001)
Αγνωστο	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
ER (Οιστρογόνα)				
0-9fmol	43 (60%)	8 (11%)	21 (29%)	
≥10fmol	57 (60%)	17 (18%)	21 (22%)	.69(.08,.21)
Αγνωστο	12 (57%)	4 (19%)	5 (24%)	
PgR (Προγεστερόνη)				
0-9 fmol	48 (56%)	10 (12%)	27 (32%)	
≥10 fmol	36 (60%)	11 (18%)	13 (22%)	.30(.02.005)
Αγνωστο	28 (65%)	8 (19%)	7 (16%)	
B&R Grade				
1	19 (90%)	1 (5%)	1 (5%)	
2	61 (72%)	14 (16%)	10 (12%)	<.001(.001,.001)
3	32 (39%)	14 (17%)	36 (44%)	
Nottingham Grade				
1	33 (92%)	2 (6%)	1 (3%)	
2	58 (66%)	15 (17%)	15 (17%)	<.001(<.001,<.001)
3	21 (33%)	12 (19%)	31 (48%)	
Αγγειακή διήθηση				
Όχι	59 (61%)	14 (15%)	23 (24%)	
Ναι	52 (58%)	15 (17%)	22 (25%)	.53(.23,.04)
Αγνωστο	1 (33%)	0 (0%)	2 (67%)	

c-erb-B2				
Αρνητικό	102 (61%)	24 (14%)	41 (25%)	.69(.08,.11)
Θετικό	10 (53%)	4 (21%)	5 (26%)	
TS				
Χαμηλή	29 (57%)	8 (16%)	14 (27%)	.92(.60,.74)
Υψηλή	82 (60%)	21 (15%)	33 (24%)	
Άγνωστη	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
Ιστολογία				
Μη διηθητικό	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Περιορισμένη διήθηση	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
Ενδοπορικό με στρωματική διήθηση	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	
Διηθητικό πορογενές	84 (56%)	22 (15%)	44 (29%)	.05(.01,.01)
Διηθητικό λοβιακό	14 (74%)	4 (21%)	1 (5%)	
Ειδικά χαρακτηριστικά	5 (71%)	0 (0%)	2 (29%)	
Διηθητικό πορογενές και λοβιακό	4 (67%)	2 (33%)	0 (0%)	
Προγνωστική κατηγορία κατά Nottingham				
1: Εξαιρετική πρόγνωση	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	
2: Καλή πρόγνωση	29 (83%)	4 (11%)	2 (6%)	.008(<.001,<.001)
3: Μέτρια πρόγνωση	13 (72%)	2 (11%)	3 (17%)	
4: Σχετικά φτωχή πρόγνωση	66 (50%)	23 (18%)	42 (32%)	

* Παρουσιάζονται τρεις τιμές p, με τη πιο κάτω σειρά:

Ποσοστό Ki-67 κατά κατηγορία p-value (Nottingham grade p-value, B&R grade p-value)



ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Σχέση ανάμεσα στα ποσοστά του Ki-67 και άλλα κλινικά χαρακτηριστικά σε 246 ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες

Ποσοστά Ki-67

	Κατηγορία 1	Κατηγορία 2	Κατηγορία 3	
	≤ 9.5%	9.5%-15.5%	>15.5%	P, X²(*)
Ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες	137 (56%)	52 (21%)	57 (23%)	
Εμμηνορρύση				
Προεμμηνοπαυσιακές	92 (56%)	35 (21%)	36 (22%)	.85(.25,.02)
Μετεμμηνοπαυσιακές	45 (54%)	17 (20%)	21 (25%)	
Μέγεθος όγκου				
≤2εκ.	44 (56%)	17 (22%)	17 (22%)	
> 2εκ.	91 (56%)	32 (20%)	39 (24%)	.51(.03,.02)
Αγνωστο	2 (33%)	3 (50%)	1 (17%)	
ER (Οιστρογόνα)				
0-9 fmol	41 (48%)	21 (24%)	24 (28%)	
≥10 fmol	78 (61%)	25 (20%)	25 (20%)	.42(.06,.04)
Αγνωστο	18 (56%)	6 (19%)	8 (25%)	
PgR (Προγεστερόνη)				
0-9 fmol	50 (48%)	29 (28%)	26 (25%)	
≥ 10 fmol	56 (61%)	16 (17%)	20 (22%)	.19(.09,.04)
Αγνωστο	31 (63%)	7 (14%)	11 (22%)	
B&R Grade				
1	24 (92%)	2 (8%)	0 (0%)	
2	67 (66%)	21 (21%)	14 (14%)	<.001(<.001,<.001)
3	46 (39%)	29 (25%)	43 (36%)	
Nottingham Grade				
1	25 (96%)	1 (4%)	0 (0%)	
2	86 (64%)	31 (23%)	18 (13%)	<.001<.001,<.001)
3	26 (31%)	20 (24%)	39 (46%)	
Αγγειακή δήθηση				
Όχι	38 (61%)	13 (21%)	11 (18%)	.47(.24,.02)
Ναι	99 (54%)	39 (21%)	46 (25%)	

c-erb-B2				
Αρνητικό	120 (60%)	36 (18%)	43 (22%)	.008(.002,<.001)
Θετικό	17 (36%)	16 (34%)	14 (30%)	
TS				
Χαμηλή	38 (58%)	9 (14%)	18 (28%)	.34(.89,.33)
Υψηλή	96 (54%)	43 (24%)	38 (21%)	
Αγνωστη	3 (75%)	0 (0%)	1 (25%)	
Ιστολογία				
Μη διηθητικό	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Περιορισμένη διήθηση	6 (67%)	2 (22%)	1 (11%)	
Ενδοπορικό με στρωματική διήθηση	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Διηθητικό πορογενές	115 (54%)	48 (23%)	50 (23%)	.64(.06,.02)
Διηθητικό λοβιακό	10 (71%)	0 (0%)	4 (29%)	
Ειδικά χαρακτηριστικά	2 (67%)	1 (33%)	0 (0%)	
Διηθητικό πορογενές και λοβιακό	4 (57%)	1 (14%)	2 (29%)	
Προγνωστικός τύπος κατά Nottingham				
1: Εξαιρετική πρόγνωση	6 (86%)	0 (0%)	1 (14%)	
2: Καλή πρόγνωση	34 (76%)	9 (20%)	2 (4%)	.003(<.001,<.001)
3: Μέτρια πρόγνωση	13 (72%)	2 (11%)	3 (17%)	
4: Σχετικά φτωχή πρόγνωση	84 (48%)	41 (23%)	51 (29%)	

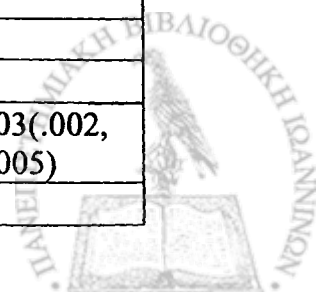
* Παρουσιάζονται τρεις τιμές p, με τη πιο κάτω σειρά:

Ποσοστό Ki-67 κατά κατηγορία p-value (Nottingham grade p-value, B&R grade p-value)



ΠΙΝΑΚΑΣ 5. 10ετές διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS) σύμφωνα με το Ki-67 grade:συνολικό και κατά ομάδα θεραπείας

	Αριθμός ασθενών	Αριθμός αποτυχιών	10ετές DFS (% ± SE)	HR**	95% c.i.	P(*)
Ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες						
Ki-67 grade						
1	33	11	65 ± 9			
2	94	47	49 ± 5	1.24	.91-1.67	.17(.11,.09)
3	61	30	51 ± 7			
Όχι PeCT						
Grade 1	11	4	63 ± 15			
Grade 2	32	18	44 ± 9	.92	.55-1.53	.75(.65,.39)
Grade 3	20	8	64 ± 11			
PeCT						
Grade 1	22	7	65 ± 11			
Grade 2	62	29	52 ± 7	1.44	.98-2.10	.06(.03,.15)
Grade 3	41	22	45 ± 8			
Ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες						
Ki-67 Grade						
1	28	10	69 ± 9			
2	136	89	35 ± 4	1.69	1.31-2.17	<.001(<.001, <.001)
3	82	59	26 ± 5			
PeCT						
Grade 1	9	4	56 ± 17			
Grade 2	48	36	26 ± 6	1.58	1.06-2.40	.03(.002, .005)
Grade 3	32	24	22 ± 8			



Παρατετα μένη θεραπεία						
Grade 1	19	6	74 ± 10			
Grade 2	88	53	40 ± 5	1.75	1.27-2.43	.001(.04, <.001)
Grade 3	50	35	28 ± 7			

* Παρουσιάζονται τρεις τιμές p, με τη πιο κάτω σειρά:
Ki-67 grade p-value (Nottingham grade p-value, Bloom-Richardson p-value)

** HR (για κάθε αύξηση κατά 1 της κατηγορίας του grade)



ΠΙΝΑΚΑΣ 6. 10ετής ολική επιβίωση (OS) σύμφωνα με το Ki-67 grade: συνολική και κατά ομάδα θεραπείας

	Αριθμός ασθενών	Αριθμός θανάτων	10ετής OS (% ± SE)	HR**	95% c.i.	P(*)
Ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες						
Ki-67 grade						
1	33	6	83 ± 8			
2	94	31	66 ± 5	1.35	.93-1.97	.12(.06,.005)
3	61	21	64 ± 6			
Όχι PeCT						
Grade 1	11	2	82 ± 12			
Grade 2	32	14	56 ± 9	.89	.47-1.68	.73(.80,.11)
Grade 3	20	4	80 ± 9			
PeCT						
Grade 1	22	4	83 ± 9			
Grade 2	62	17	71 ± 6	1.66	1.03-2.68	.04(.02,.04)
Grade 3	41	17	57 ± 8			
Ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες						
Ki-67 Grade						
1	28	6	77 ± 8			
2	136	64	51 ± 5	2.05	1.53-2.76	<.001(<.001, <.001)
3	82	55	30 ± 5			
PeCT						
Grade 1	9	2	71 ± 18			
Grade 2	48	23	49 ± 8	2.25	1.39-3.64	.001(<.001, <.001)
Grade 3	32	24	21 ± 8			

Παρατετα μένα θεραπεία						
Grade 1	19	4	79 ± 9			
Grade 2	88	41	52 ± 6	1.93	1.33-2.80	.001(.04,<.001)
Grade 3	50	31	36 ± 7			

* Παρουσιάζονται τρεις τιμές p, με τη πιο κάτω σειρά:

Ki-67 grade p-value (Nottingham grade p-value, Bloom-Richardson p-value)

** HR (για κάθε αύξηση του grade κατά 1)



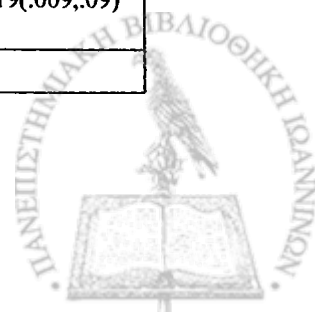
ΠΙΝΑΚΑΣ 7. 10ετές διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS) σύμφωνα με τη θεραπεία:
κατά Ki-67 grade

	Αριθμός ασθενών	Αριθμός αποτυχιών	10ετές DFS (% ± SE)	HR**	95% c.i.	P(*)
Ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες						
Grade 1						
PeCT	22	7	65 ± 11	.77	.22-2.62	.67(.36,.96)
Όχι PeCT	11	4	64 ± 15			
Grade 2						
PeCT	62	29	52 ± 7	.75	.42-1.36	.35(.50,.31)
Όχι PeCT	32	18	44 ± 9			
Grade 3						
PeCT	41	22	45 ± 8	1.62	.72-3.65	.24(.23,.76)
Όχι PeCT	20	8	64 ± 11			
Ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες						
Grade 1						
Παρατεταμένη θεραπεία	19	6	74 ± 10	.49	.14-1.75	.27(.39,.37)
PeCT	9	4	56 ± 17			
Grade 2						
Παρατεταμένη θεραπεία	88	53	40 ± 5	.67	.44-1.03	.07(.40,.23)
PeCT	48	36	26 ± 6			
Grade 3						
Παρατεταμένη θεραπεία	50	35	28 ± 7	.70	.42-1.19	.19(.009,.09)
PeCT	32	24	22 ± 8			

* Παρουσιάζονται τρεις τιμές p, με τη πιο κάτω σειρά:

Ki-67 grade p-value (Nottingham grade p-value, Bloom-Richardson p-value)

** HR (PeCT:όχι PeCT ή παρατεταμένη θεραπεία: PeCT)

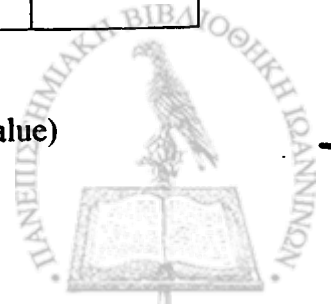


ΠΙΝΑΚΑΣ 8. 10ετής συνολική επιβίωση (OS) σύμφωνα με τη θεραπεία: κατά Ki-67 grade

	Αριθμός ασθενών	Αριθμός θανάτων	10ετής OS (% ± SE)	HR**	95% c.i.	P(*)
Ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες						
Grade 1						
PeCT	22	4	83 ± 9	.83	.15-4.61	.84(.43,1.00)
Όχι PeCT	11	2	82 ± 12			
Grade 2						
PeCT	62	17	71 ± 6	.62	.30-1.25	.18(.68,.19)
Όχι PeCT	32	14	56 ± 9			
Grade 3						
PeCT	41	17	57 ± 8	2.30	.77-6.84	.13(.50,.71)
Όχι PeCT	20	4	80 ± 9			
Ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες						
Grade 1						
Παρατεταμένη θεραπεία	19	4	79 ± 9	.92	.17-5.03	.92(.95,.85)
PeCT	9	2	71 ± 18			
Grade 2						
Παρατεταμένη θεραπεία	88	41	52 ± 6	.89	.54-1.49	.66(.85,.67)
PeCT	48	23	50 ± 8			
Grade 3						
Παρατεταμένη θεραπεία	50	31	36 ± 7	.66	.39-1.13	.13(.01,.20)
PeCT	32	24	21 ± 8			

* Παρουσιάζονται τρεις τιμές p, με τη πιο κάτω σειρά: Ki-67 grade p-value (Nottingham grade p-value, Bloom-Richardson p-value)

** HR (PeCT: Όχι PeCT ή παρατεταμένη θεραπεία: PeCT)



ΠΙΝΑΚΑΣ 9. 10ετές διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS) στις διάφορες κατηγορίες ποσοστών του Ki-67. Συνολικό και κατά ομάδα θεραπείας

	Αριθμός ασθενών	Αριθμός αποτυχιών	10-ετές DFS (%±SE)	HR**	95%c.i.	P(*)
Ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες						
Ki-67 ποσοστό						
≤9.5	112	51	53±5			
9.5-15.5	29	16	43±10	1.02	.80-1.30	.87(.11,.09)
>15.5	47	21	56±7			
Χωρίς ReCT***						
Ki-67% ≤9.5	39	19	51±8			
Ki-67% 9.5-15.5	9	6	30±16	.82	.53-1.28	.38(.65,.39)
Ki-67% >15.5	15	5	73±11			
ReCT						
Ki-67% ≤9.5	73	32	54±6			
Ki-67% 9.5-15.5	20	10	48±12	1.13	.84-1.52	.40(.03,.15)
Ki-67% >15.5	32	16	49±9			
Ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες						
Ki-67 ποσοστό						
≤9.5	137	82	42±4			
9.5-15.5	52	39	24±6	1.23	1.02-1.48	.03(.001,<.001)
>15.5	57	37	34±6			
ReCT						
Ki-67% ≤9.5	49	34	32±7			

Ki-67% 9.5-15.5	21	18	14±8	1.18	.87-1.59	.29(.002,.005)
Ki-67% >15.5	19	12	34±11			
Παρατετα μένη θεραπεία						
Ki-67% ≤9.5	88	48	47±5			
Ki-67% 9.5-15.5	31	21	30±9	1.28	1.01-1.61	.04(.04,<.001)
Ki-67% >15.5	38	25	34 ± 8			

* Παρουσιάζονται τρεις τιμές p, με τη σειρά:
Ki-67% p-value (Nottingham grade p-value, B&R grade p-value)

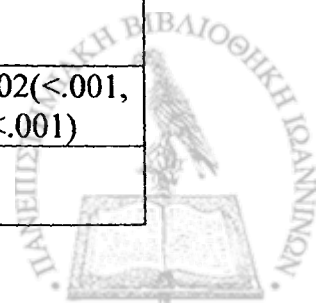
**HR (για μία αύξηση κατά 1 της κατηγορίας του Ki-67)

*** ReCT: Περιεγχειρητική χημειοθεραπεία



ΠΙΝΑΚΑΣ 10. 10ετής συνολική επιβίωση (OS) κατά κατηγορία ποσοστών του Ki-67: Συνολική και κατά ομάδα θεραπείας

	Αριθμός ασθενών	Αριθμός θανάτων	10-ετής OS (% ± SE)	HR**	95% c.i.	P(*)
Ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες						
Ποσοστό Ki-67						
≤9.5	112	31	72 ± 5			
9.5-15.5	29	12	58 ± 9	1.13	.84-1.51	.43(.06,.005)
>15.5	47	15	67 ± 7			
Όχι PeCT						
Ki-67% ≤9.5	39	13	67 ± 8			
Ki-67% 9.5-15.5	9	5	44 ± 17	.77	.43-1.35	.36(.80,.11)
Ki-67% >15.5	15	2	87 ± 9			
PeCT***						
Ki-67% ≤9.5	73	18	74 ± 6			
Ki-67% 9.5-15.5	20	7	64 ± 11	1.34	.94-1.90	.10(.04,.02)
Ki-67% >15.5	32	13	58 ± 9			
Ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες						
Ki-67 ποσοστό						
≤9.5	137	56	57 ± 5			
9.5-15.5	52	37	29 ± 7	1.39	1.14-1.71	.001(<.001, <.001)
>15.5	57	32	41 ± 7			
PeCT						
Ki-67% ≤9.5	49	21	55 ± 8			
Ki-67% 9.5-15.5	21	16	24 ± 9	1.48	1.06-2.06	.02(<.001, <.001)
Ki-67% >15.5	19	12	31 ± 12			



Παρατεταμέ νη θεραπεία						
Ki-67% ≤9.5	88	35	58 ± 6			
Ki-67% 9.5-15.5	31	21	33 ± 9	1.35	1.04-1.74	.02(.04,<.001)
Ki-67% >15.5	38	20	47 ± 8			

* Παρουσιάζονται τρεις τιμές p, με τη πιο κάτω σειρά:
Ki-67% p-value (Nottingham grade p-value, B&R grade p-value)

** HR (για την αύξηση κατά 1 της κατηγορίας Ki-67)

*** ReCT: Περιεγχειρητική χημειοθεραπεία



ΠΙΝΑΚΑΣ 11. 10ετές διάστημα ελεύθερο νόσου (DFS) σύμφωνα με τη
θεραπεία.: σύμφωνα με τα ποσοστά Ki-67

	Αριθμός ασθενών	Αριθμός αποτυχιών	10-ετη DFS (% ± SE)	HR**	95% c.i.	P(*)
Ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες						
Ki-67% ≤9.5						
PeCT	73	32	54 ± 6	.82	.46-1.44	.49(.36,.96)
Όχι PeCT	39	19	51 ± 8			
Ki-67% 9.5-15.5						
PeCT	20	10	48 ± 12	.71	.26-1.96	.50(.50,.31)
Όχι PeCT	9	6	30 ± 16			
Ki-67% >15.5						
PeCT	32	16	49 ± 9	1.80	.66-4.92	.25(.23,.76)
Όχι PeCT	15	5	73 ± 11			
Ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες						
Ki-67% ≤9.5						
Παρατετα μένη θεραπεία	88	48	47 ± 5	.63	.40-.97	.04(.39,.37)
PeCT	49	34	32 ± 7			
Ki-67% 9.5-15.5						
Παρατετα μένη θεραπεία	31	21	30 ± 9	.61	.32-1.14	.12(.40,.23)
PeCT	21	18	14 ± 8			
Ki-67%						

>15.5						
Παρατετα μένη θεραπεία	38	25	34 ± 8	.79	.40-1.58	.51(.009,.09)
PeCT	19	12	34 ± 11			

* Παρουσιάζονται τρεις τιμές p, με τη πιο κάτω σειρά:
Ki-67% p-value (Nottingham grade p-value, B&R grade p-value)

** HR (PeCT: όχι PeCT ή παρατεταμένη θεραπεία: PeCT)



ΠΙΝΑΚΑΣ 12. 10ετής συνολική επιβίωση (OS) σύμφωνα με τη θεραπεία:
σύμφωνα με τις κατηγορίες των ποσοστών Ki-67

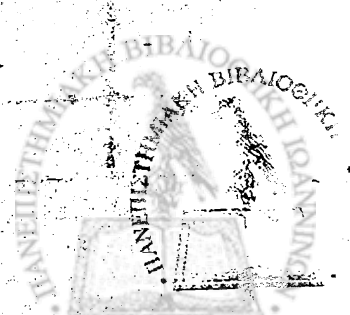
	Αριθμός ασθενών	Αριθμός θανάτων	10ετής OS (% ± SE)	HR**	95% c.i.	P(*)
Ασθενείς με αρνητικούς λεμφαδένες						
Ki-67% ≤9.5						
PeCT	73	18	74 ± 6	.73	.36-1.50	.40(.43,1.00)
Όχι PeCT	39	13	67 ± 8			
Ki-67% 9.5-15.5						
PeCT	20	7	64 ± 11	.55	.17-1.76	.32(.68,.19)
Όχι PeCT	9	5	44 ± 17			
Ki-67% >15.5						
PeCT	32	13	58 ± 9	3.44	.78-15.26	.10(.50,.71)
Όχι PeCT	15	2	87 ± 9			
Ασθενείς με θετικούς λεμφαδένες						
Ki-67% ≤9.5						
Παρατετα μένη θεραπεία	88	35	58 ± 6	.85	.49-1.45	.54(.95,.85)
PeCT	49	21	55 ± 8			
Ki-67% 9.5-15.5						
Παρατετα μένη θεραπεία	31	21	33 ± 9	.83	.43-1.58	.57(.85,.67)
PeCT	21	16	24 ± 9			
Ki-67% >15.5						



Παρατετα μένη θεραπεία	38	20	47 ± 8	.65	32-1.34	24(.01, 20)
PeCT	19	12	31 ± 12			

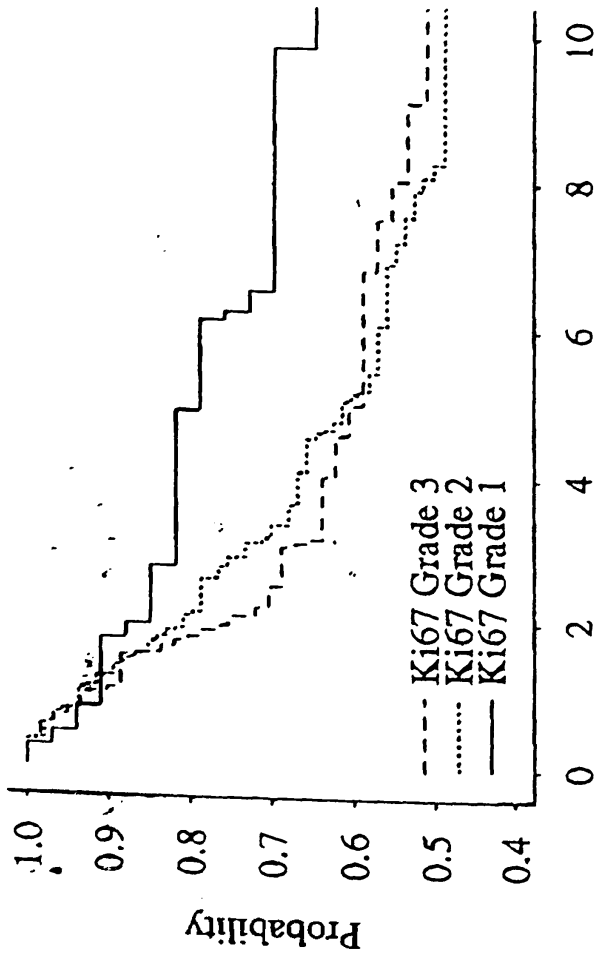
* Παρουσιάζονται τρεις τιμές p, με τη πιο κάτω σειρά:
Ki-67% p-value (Nottingham grade p-value, B&R grade p-value)

** HR (PeCT: όχι PeCT ή παρατεταμένη θεραπεία: PeCT)

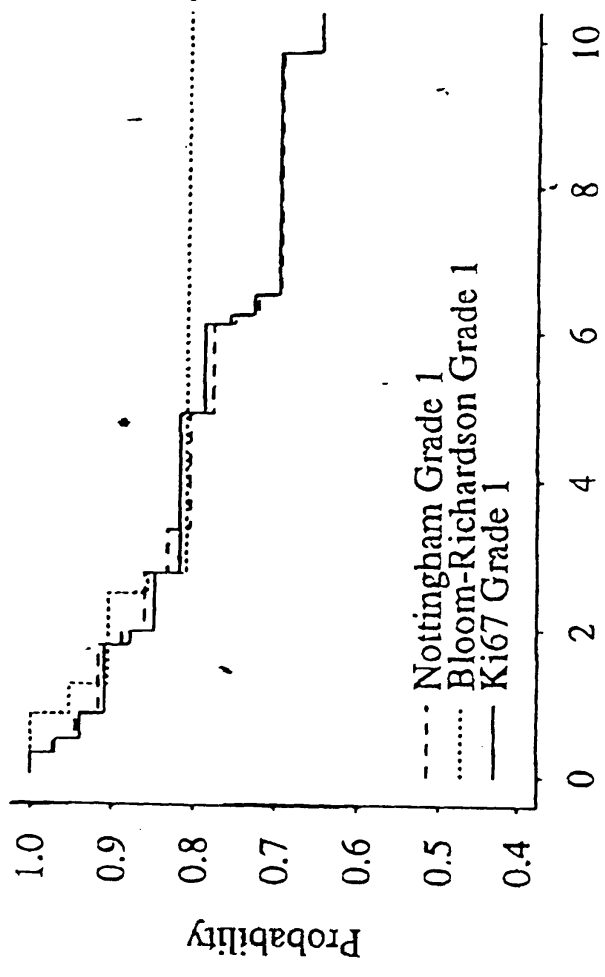


ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

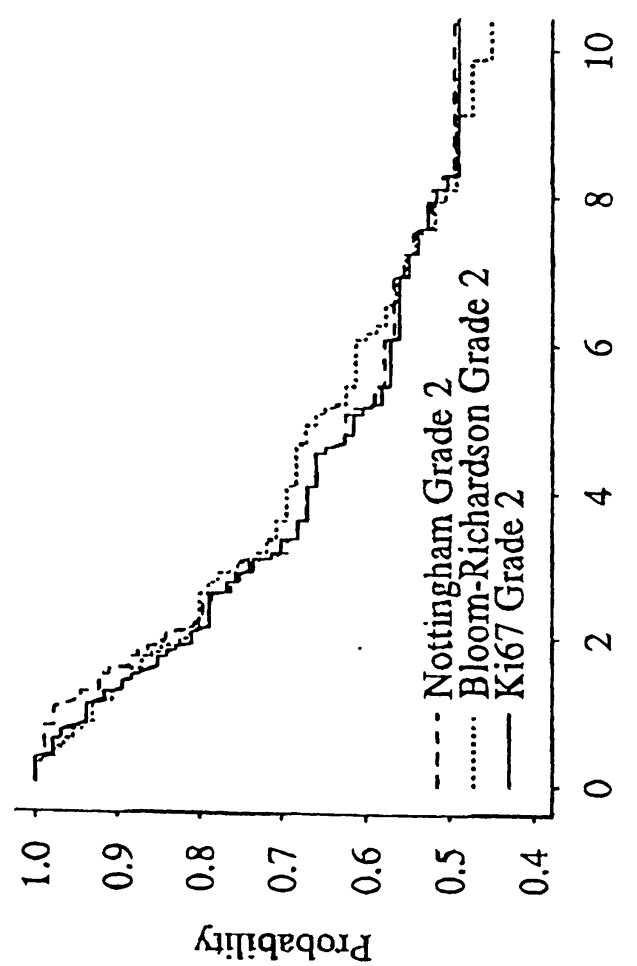




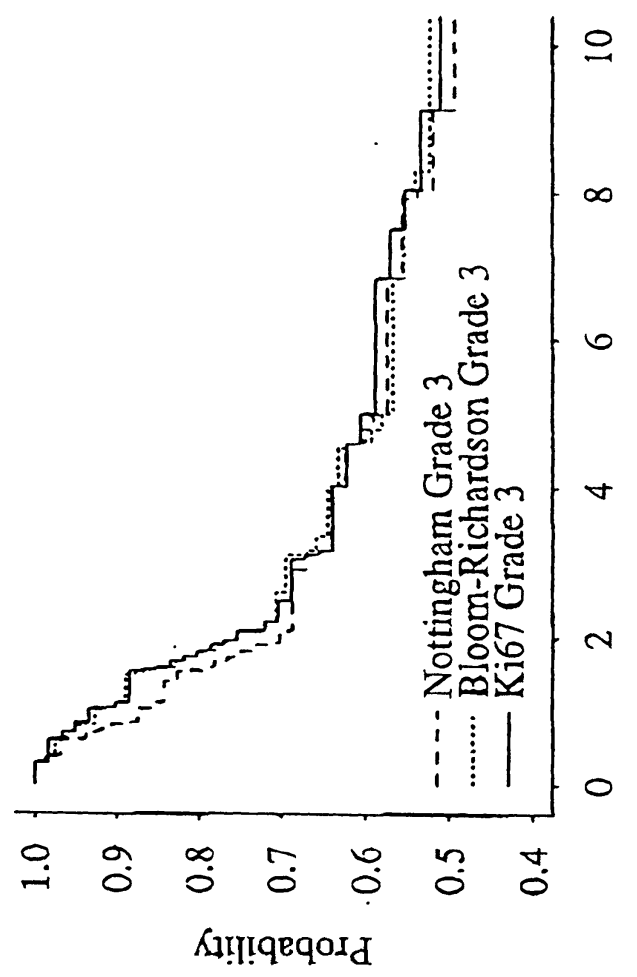
Grade 2: Node - Disease Free Survival



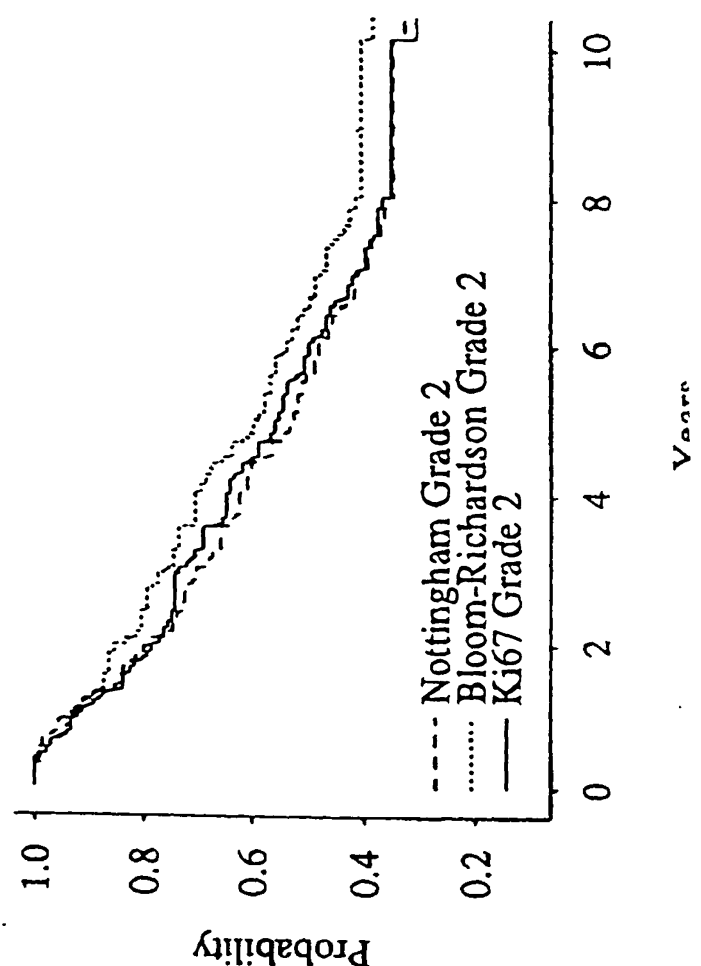
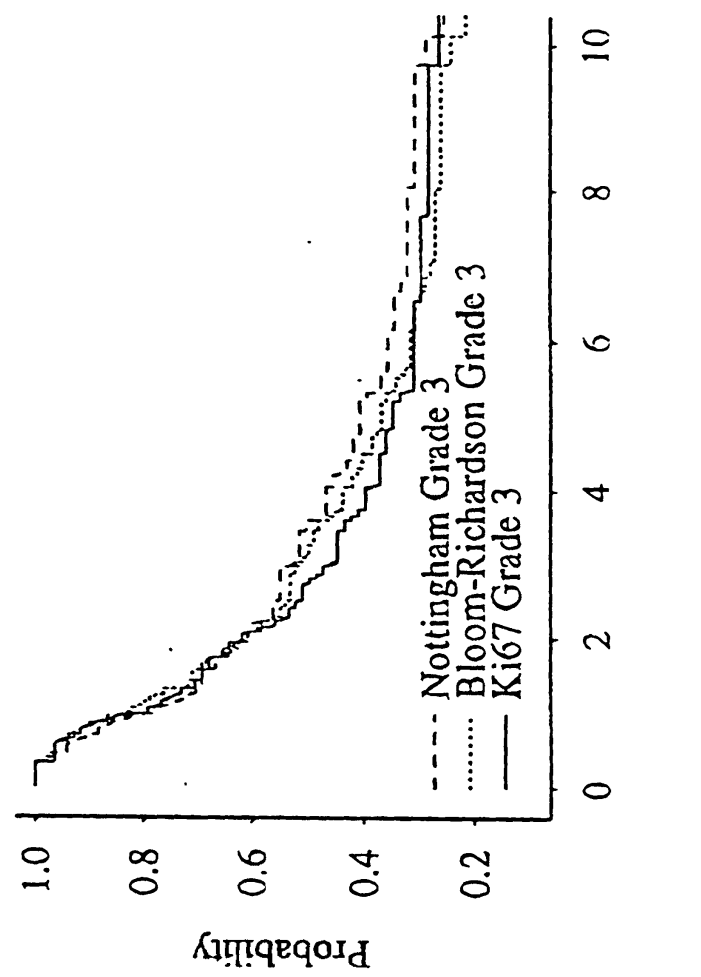
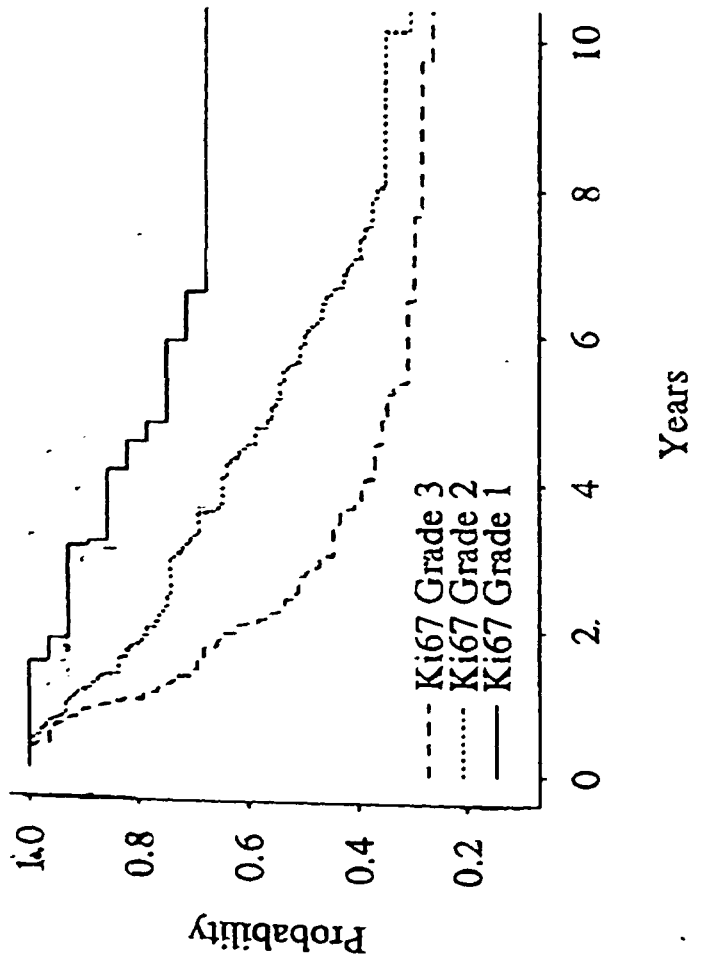
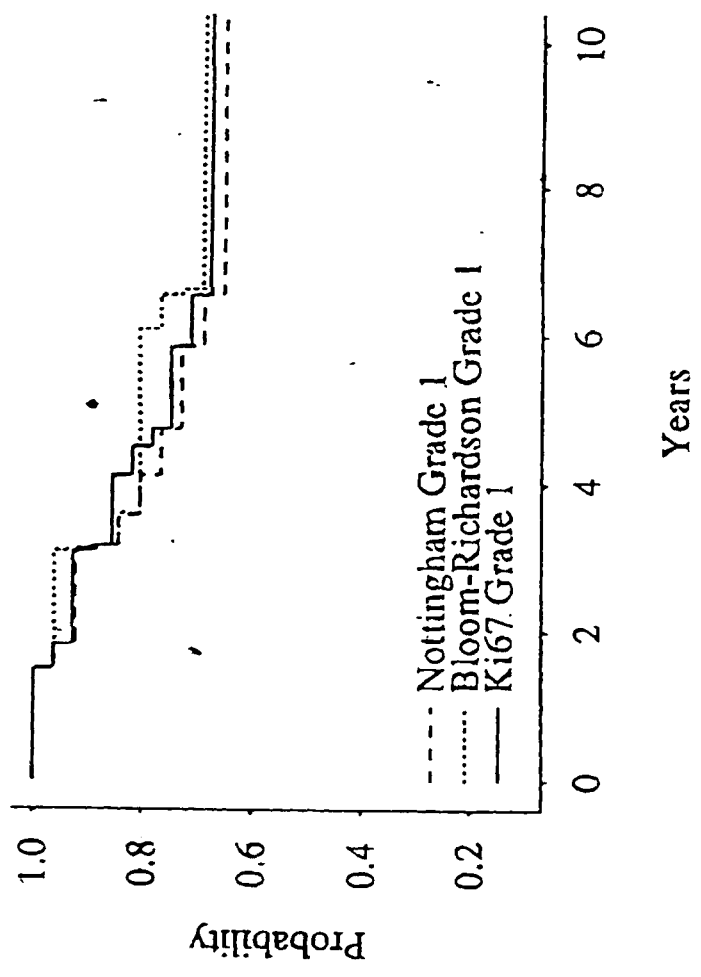
Grade 3: Node - Disease Free Survival

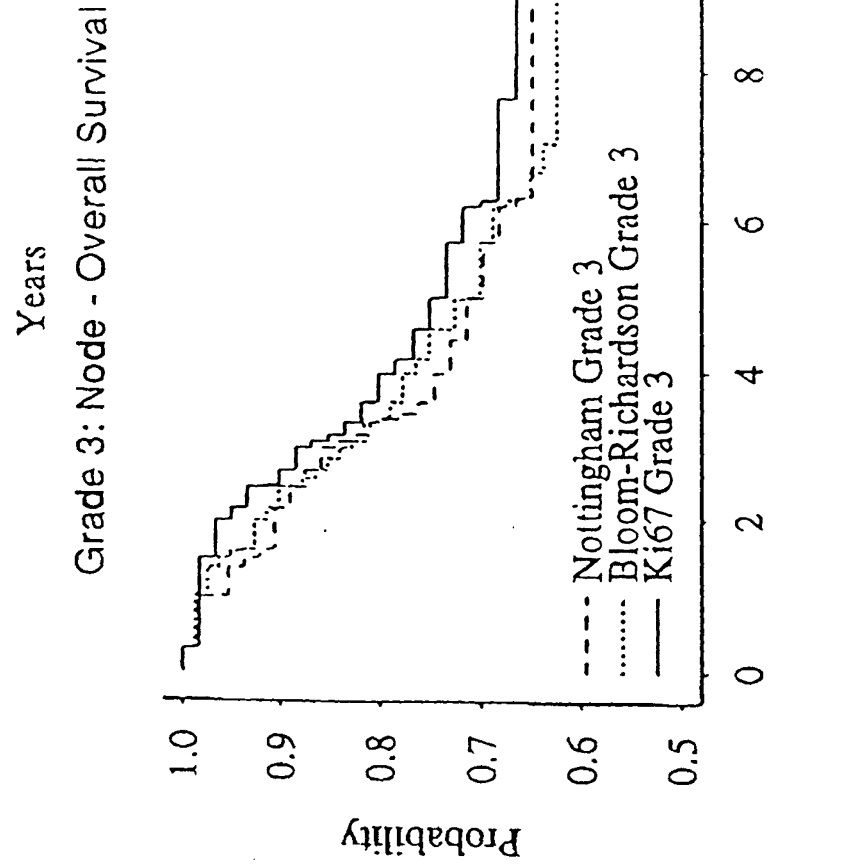
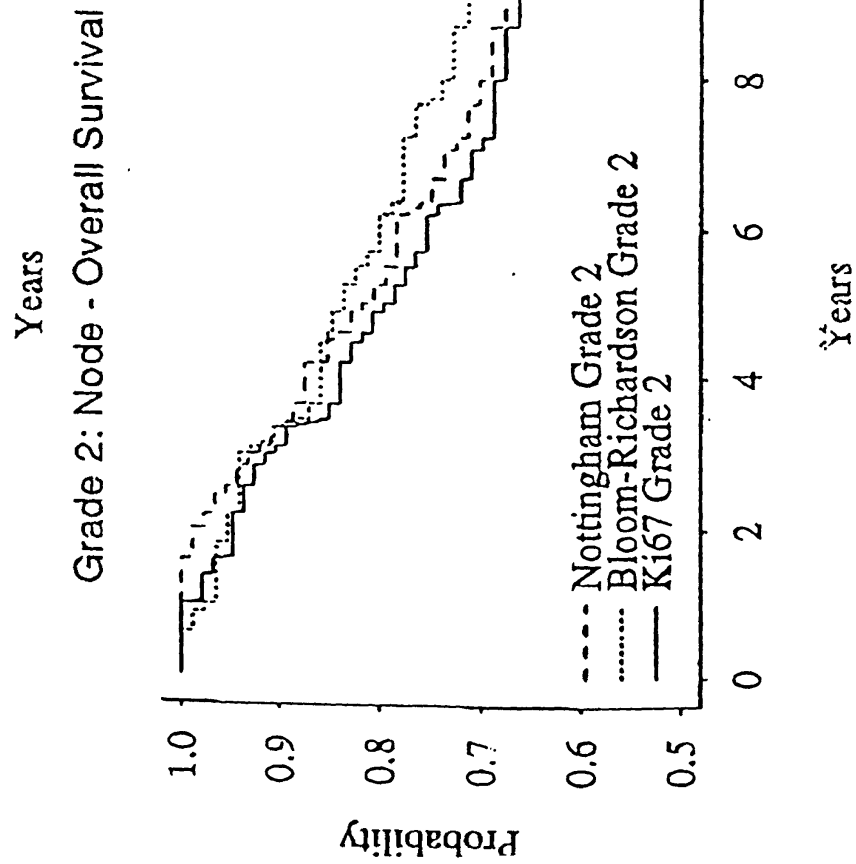
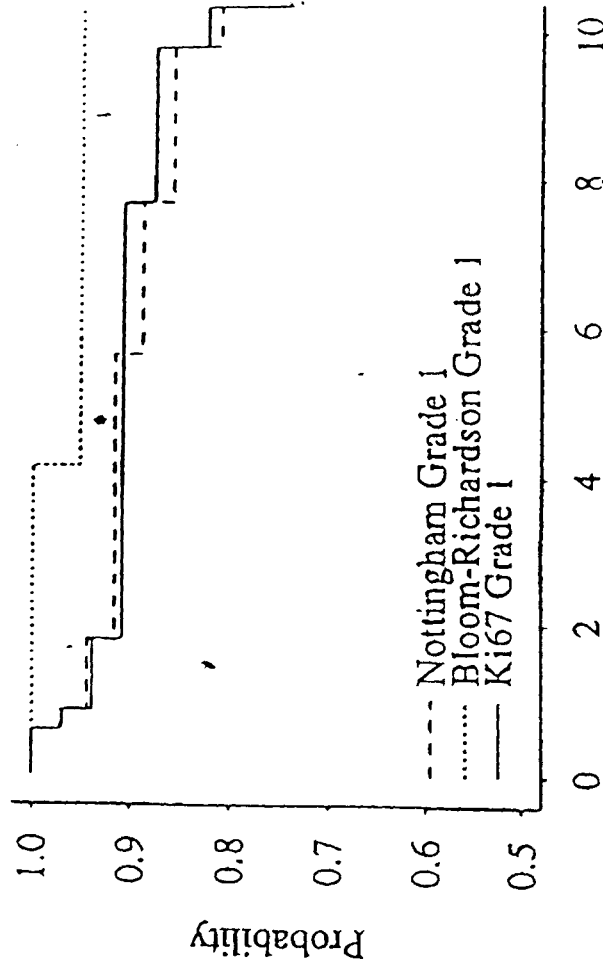
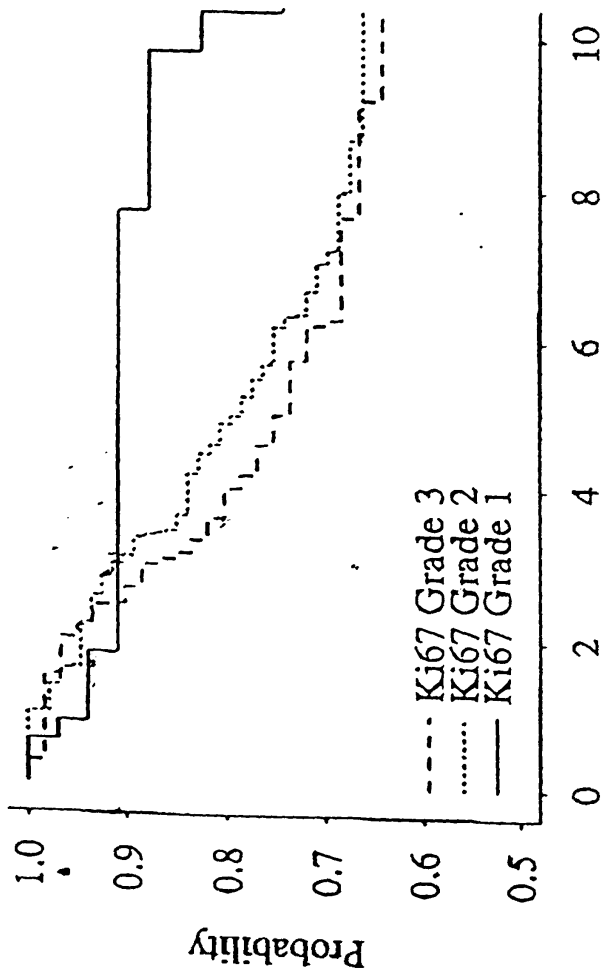


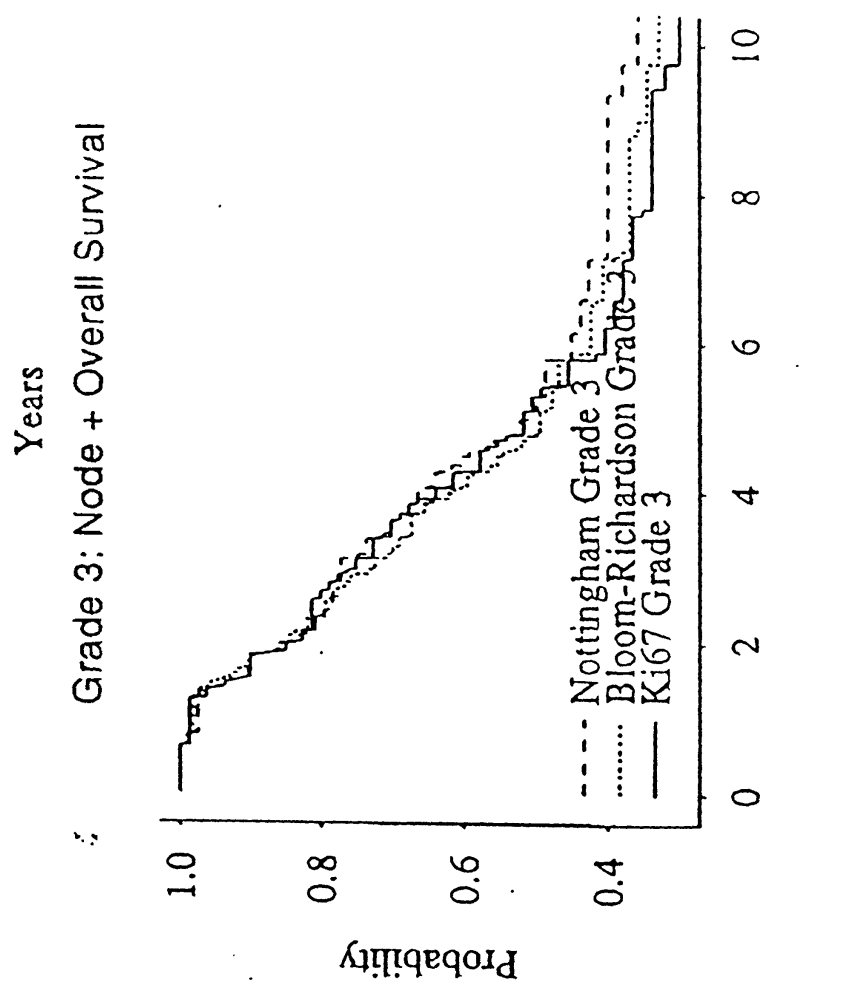
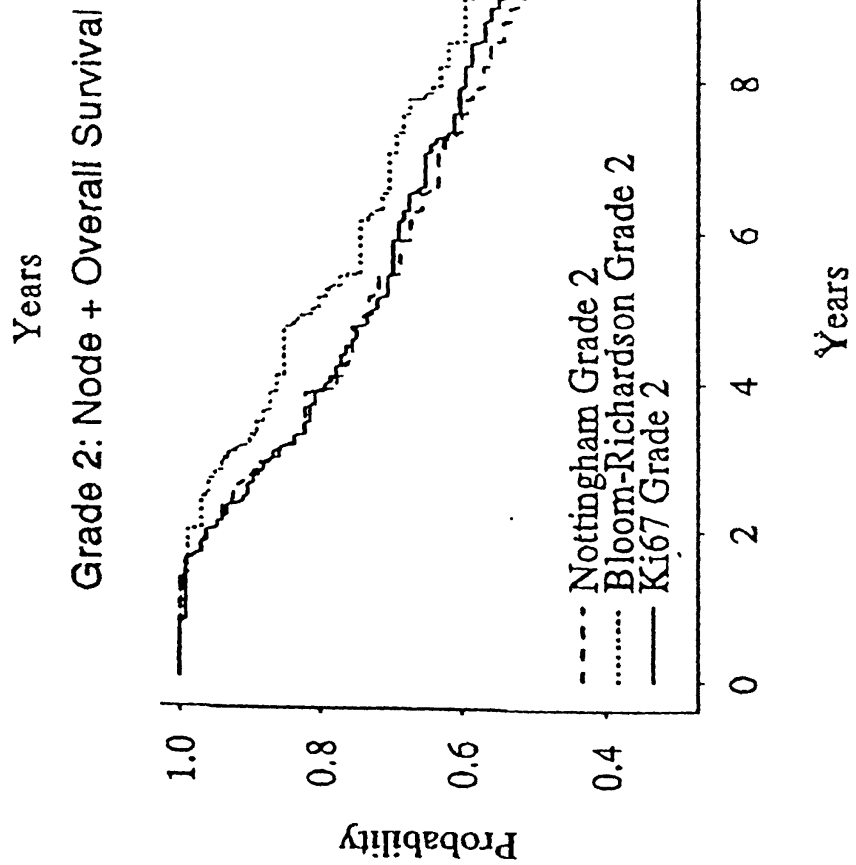
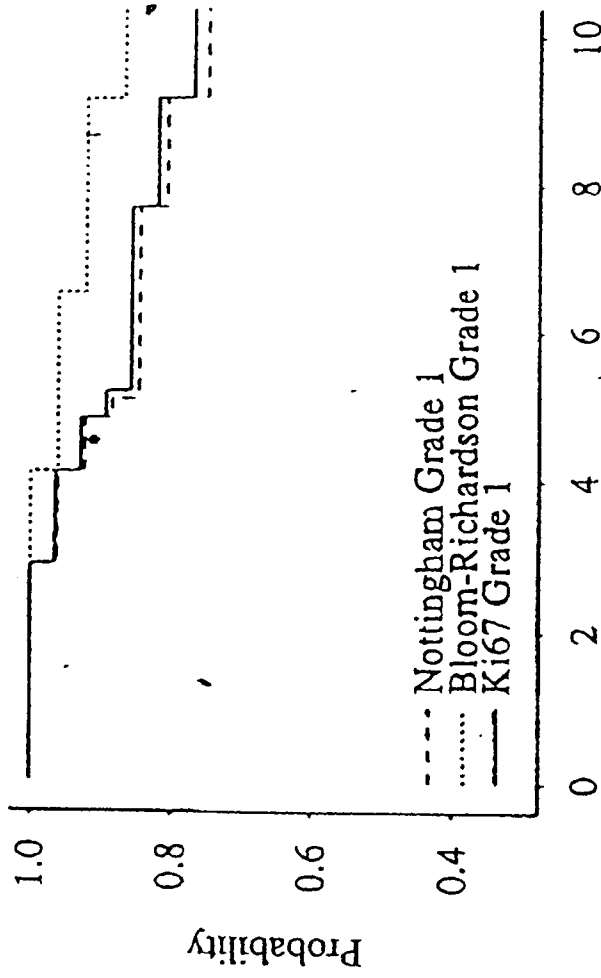
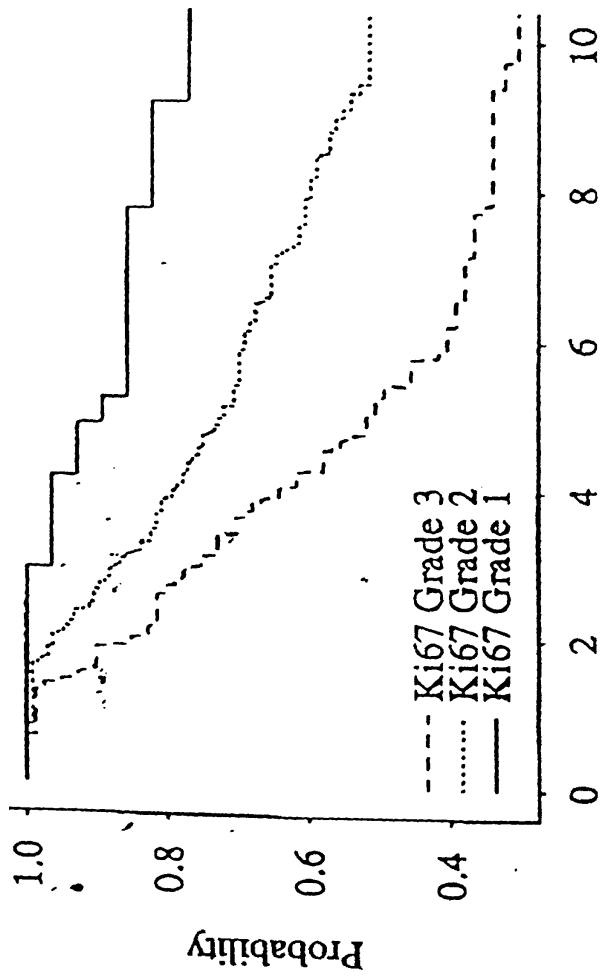
Years

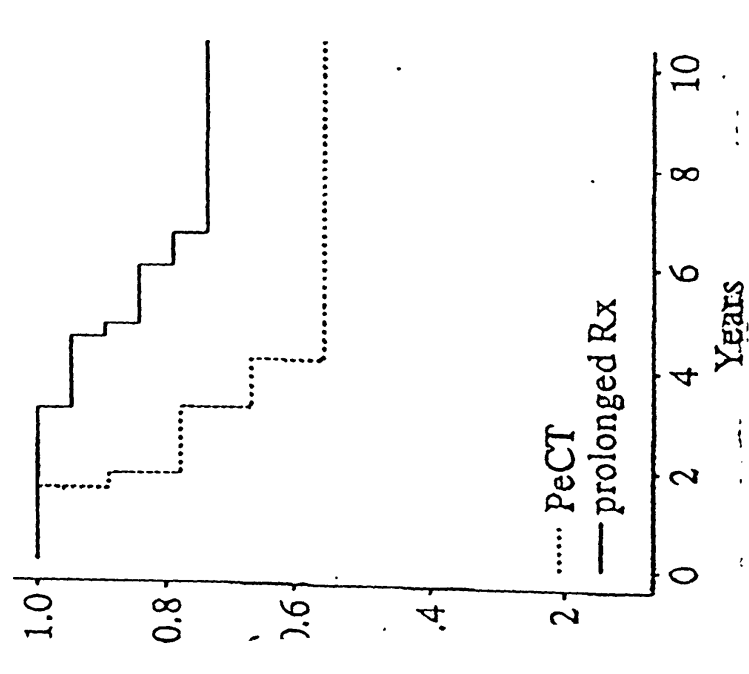
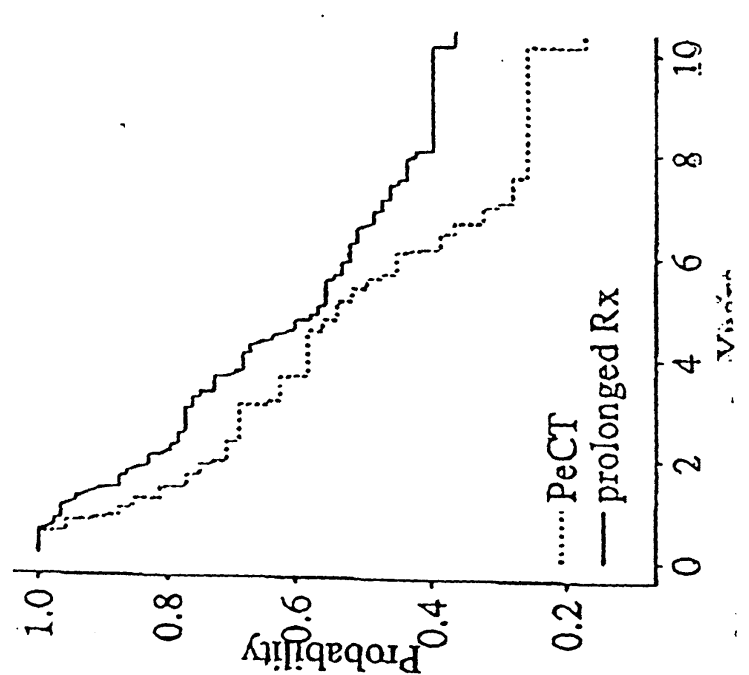
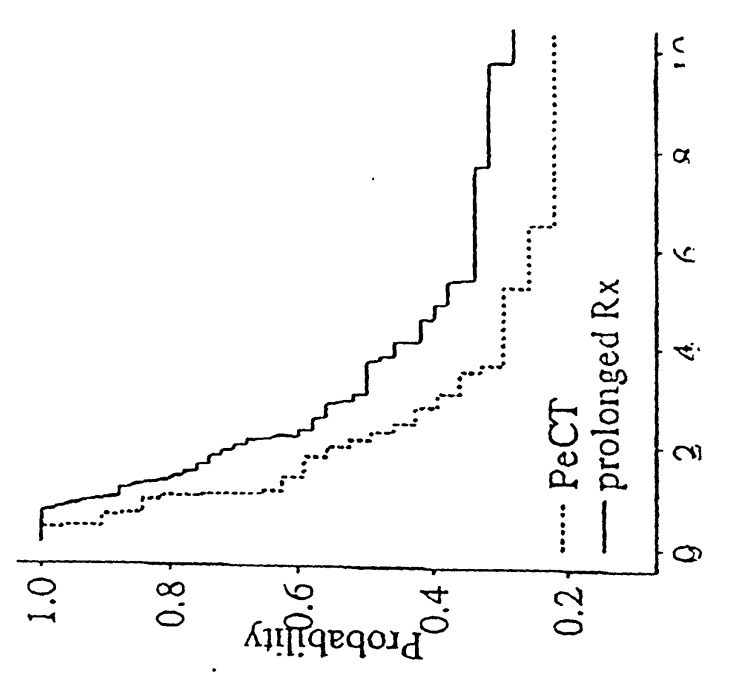
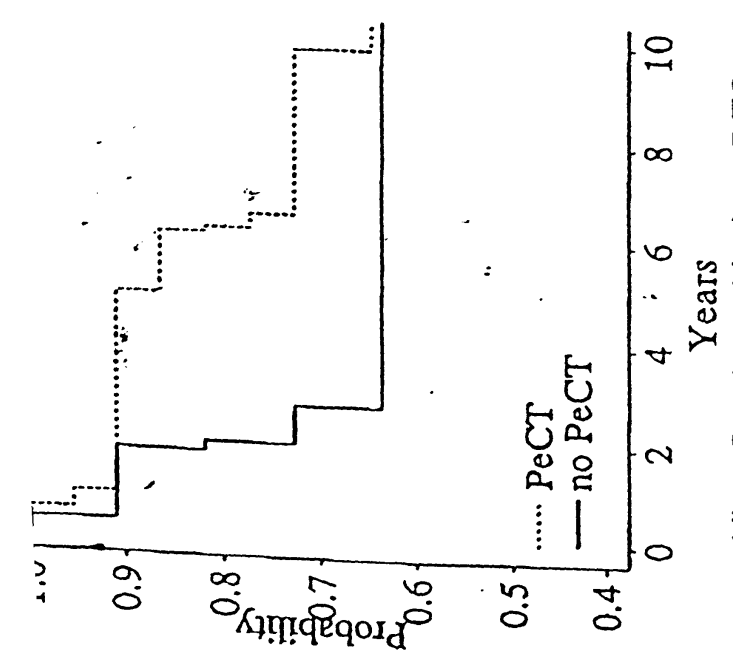
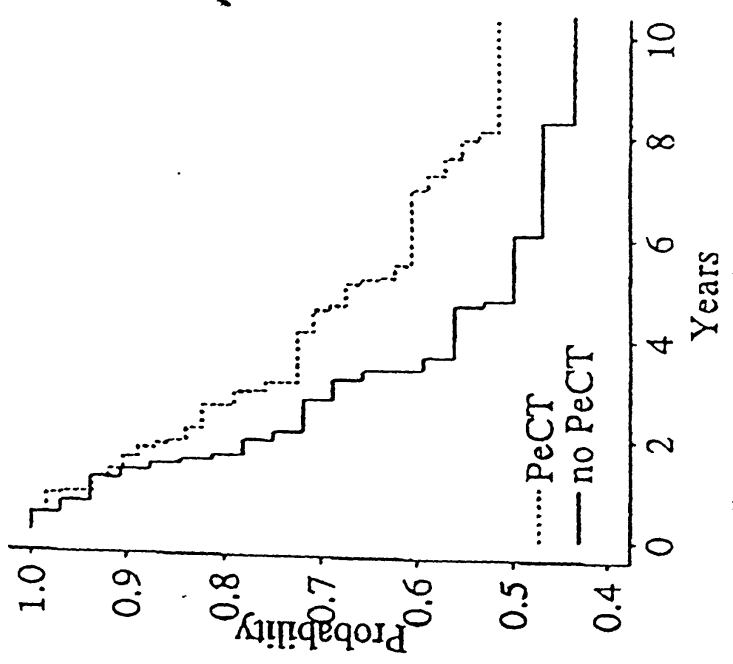
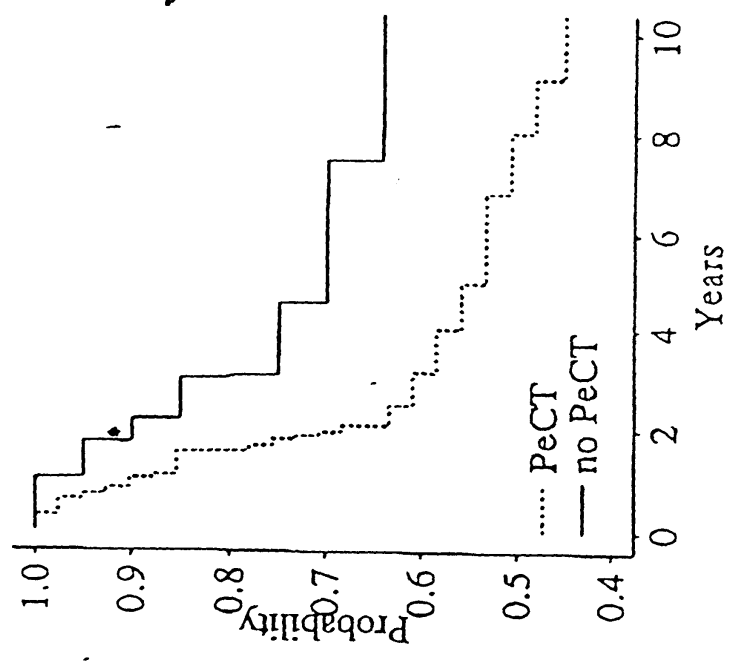


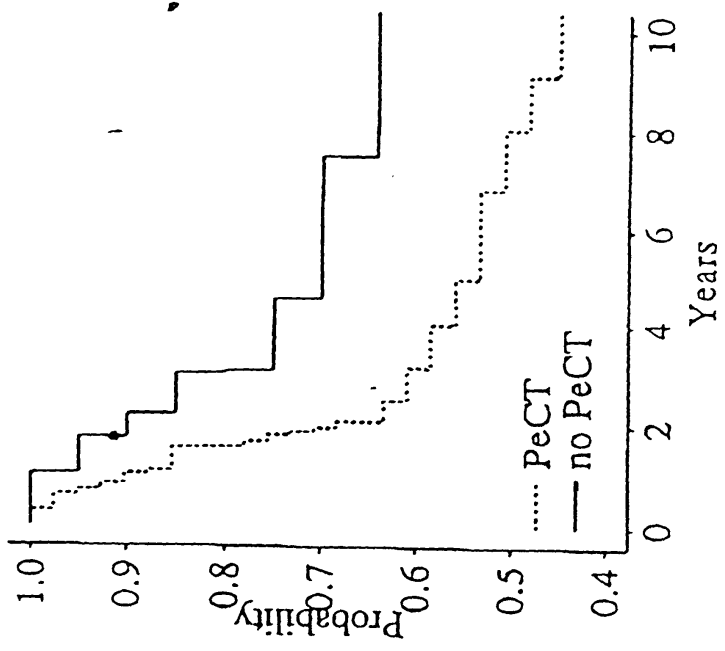
Years



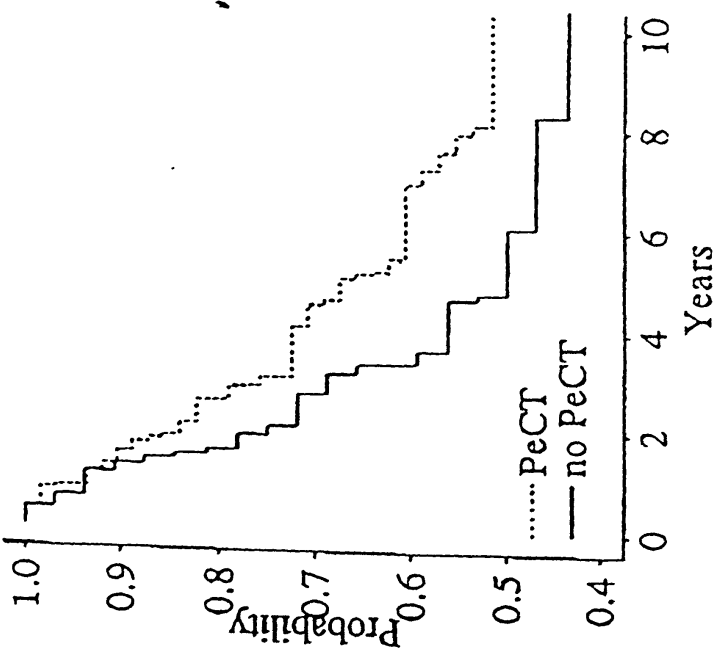
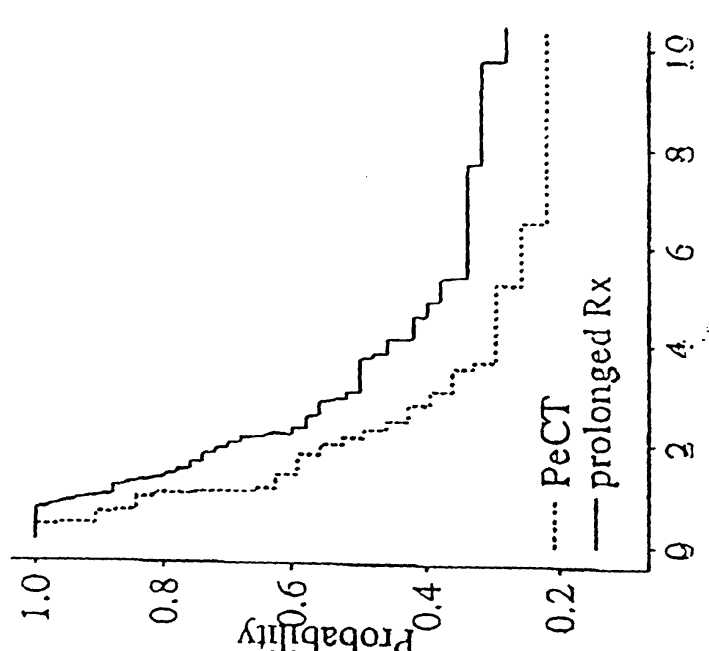




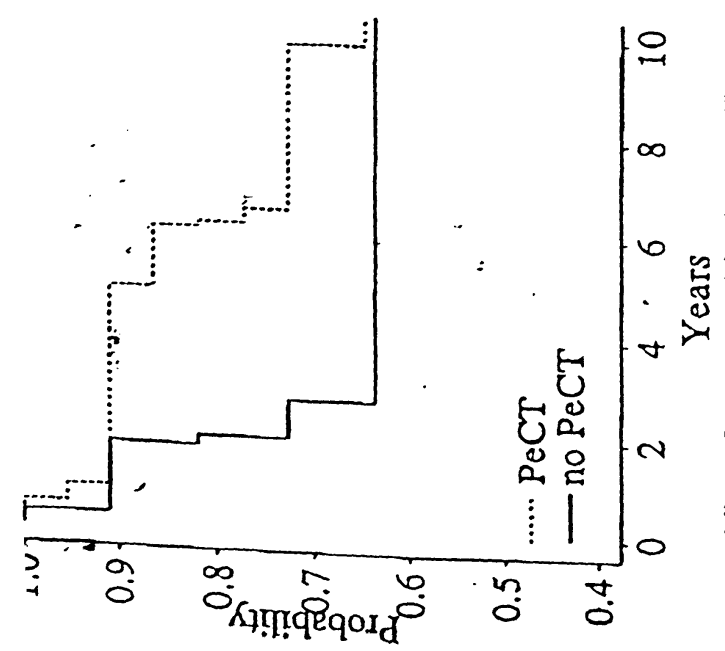
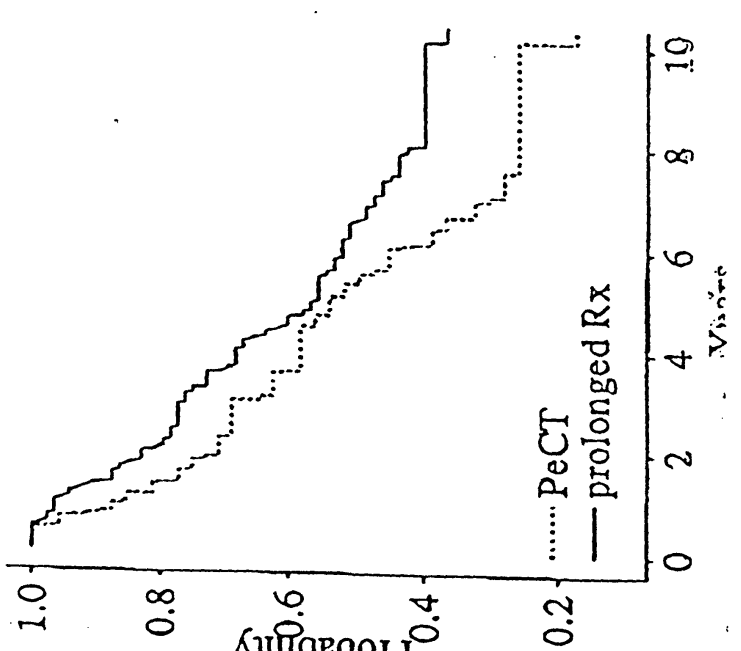




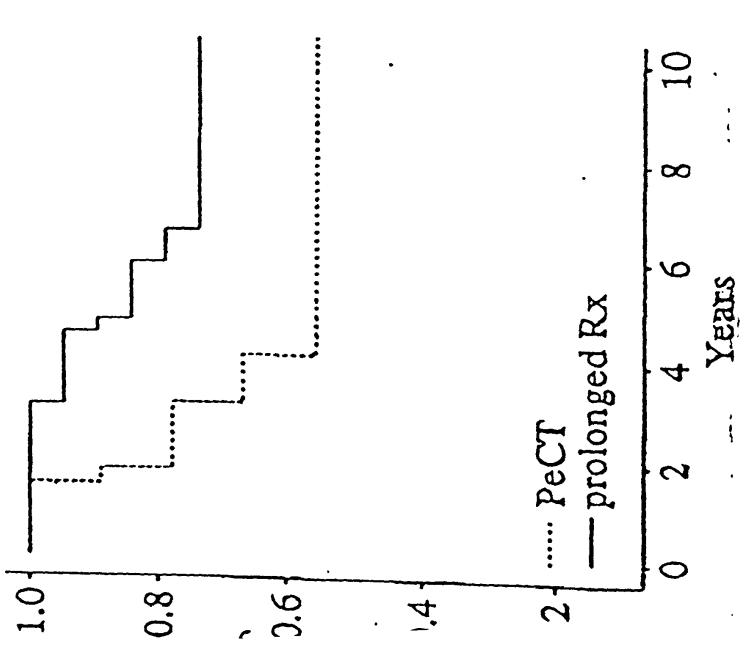
Ki67 Grade 3: Node + DFS

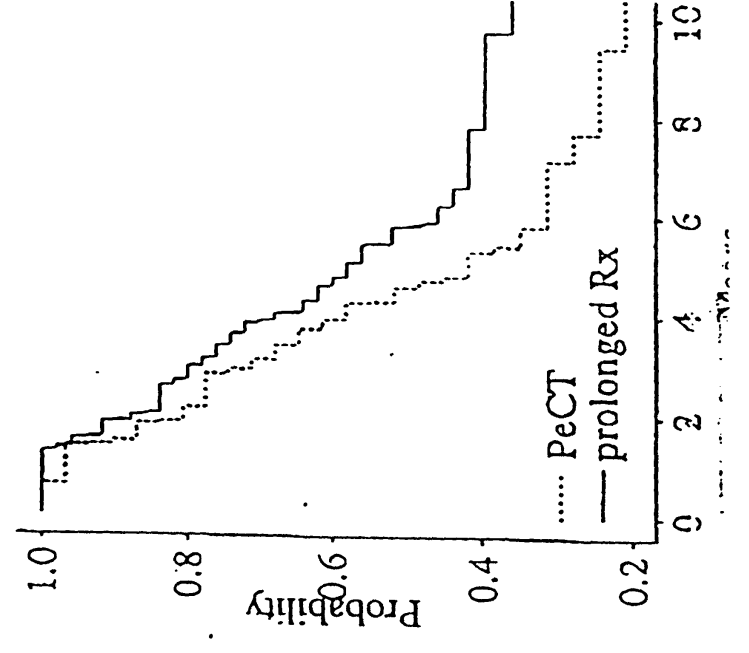
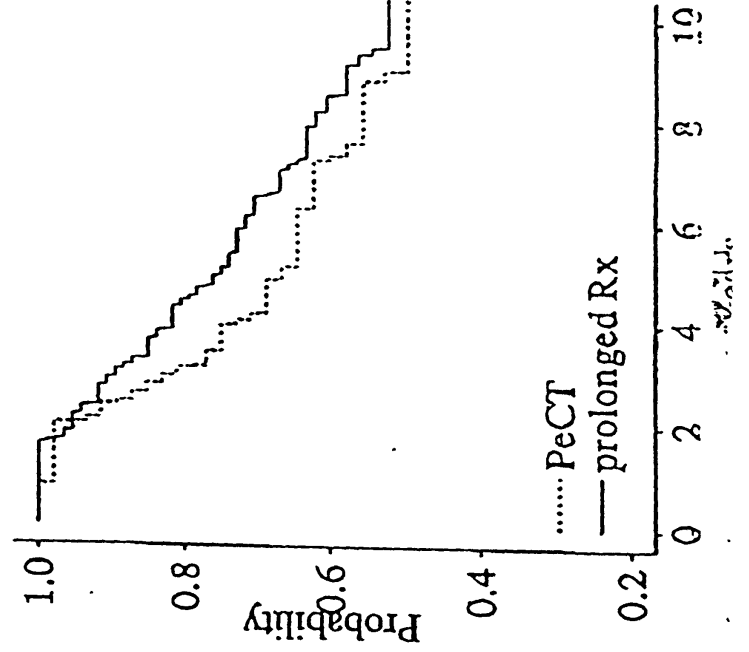
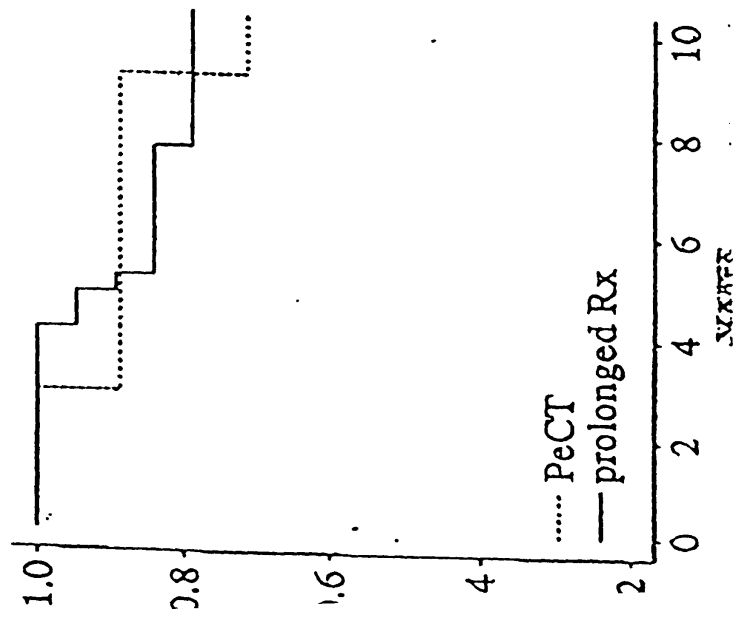
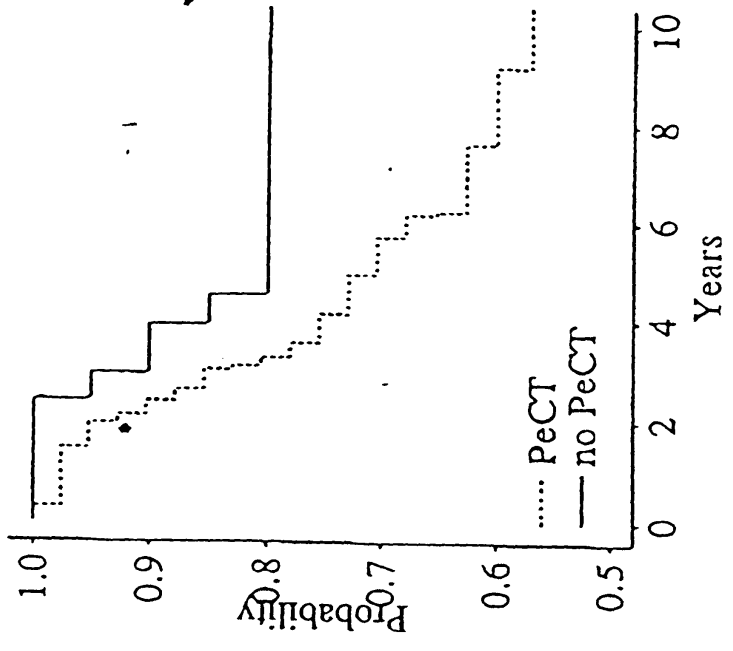
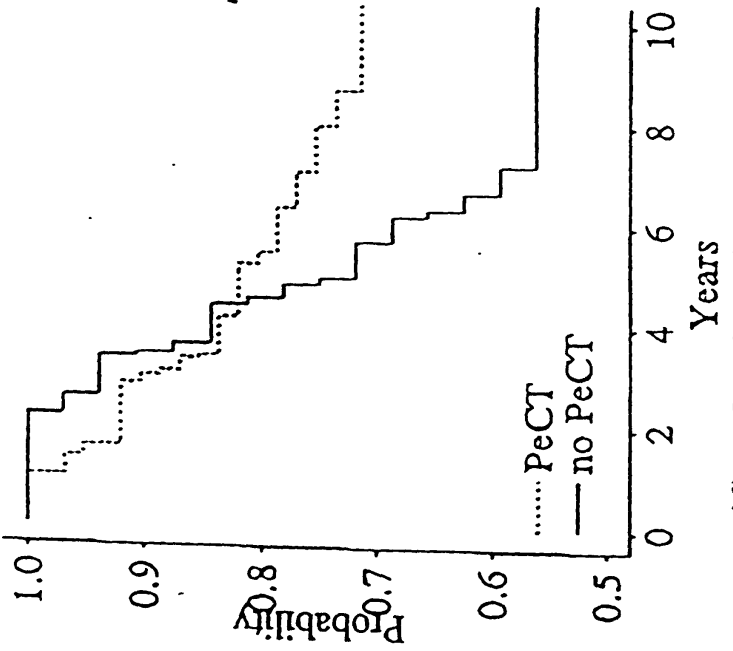
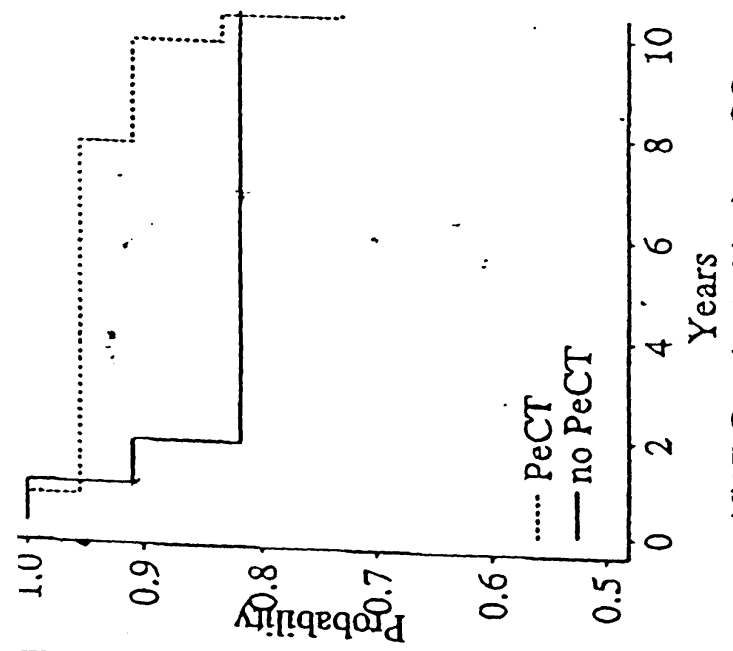


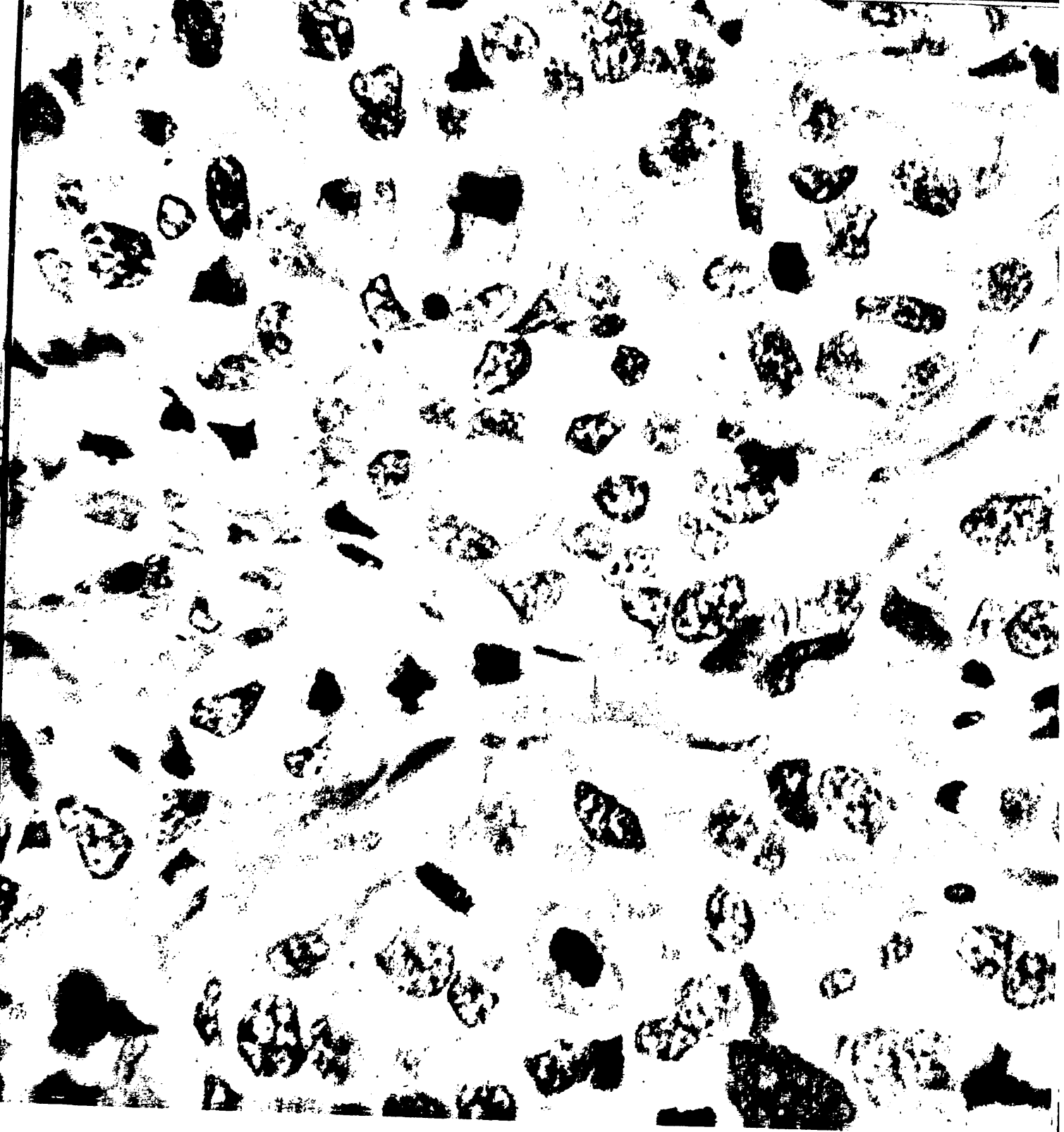
Ki67 Grade 2: Node + DFS



Ki67 Grade 1: Node + DFS







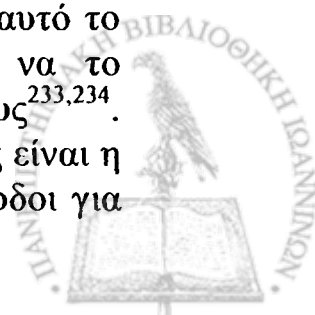
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μορφολογική εκτίμηση της διαφοροποίησης, παρέχει προγνωστικές πληροφορίες στο καρκίνο του μαστού^{23,226,227}, όπως έχει δειχθεί σε πολλές μελέτες.

Η αντίληψη ότι η μορφολογία του πυρήνα των νεοπλαστικών κυττάρων μπορεί να ενέχεται στη βιολογική τους συμπεριφορά αποδίδεται στο von Hansemann (1890)²²⁸, και οι μελέτες του αποτέλεσαν το εναρκτήριο σημείο για πολλά συστήματα αξιολόγησης του βαθμού κακοηθείας του καρκινώματος. Θεωρούσε ότι το ποσοστό μιτωτικής δραστηριότητας του όγκου και η παρουσία ανώμαλων πυρηνοκινήσιων είναι σημαντικά χαρακτηριστικά (Hansemann 1892)²²⁹ και συμπέρανε ότι 'όσο μεγαλύτερος είναι ο βαθμός της αναπλασίας, τόσο μεγαλύτερη είναι η τάση του όγκου να μεθίσταται'. Ο Salomon (1913)²³⁰ μελέτησε τη σχέση ανάμεσα στη κλινική πορεία του καρκίνου του μαστού και τις μορφολογικές διαφορές και βρήκε ότι ο βαθμός της αναπλασίας ήταν μεγάλης προγνωστικής σημασίας. Ο Greenough (1925)²³¹ επισήμανε τη σημασία τόσο των κυτταρολογικών όσο και των ιστολογικών μεταβολών του όγκου, και αυτή η μέθοδος τροποποιήθηκε από τους Patey και Scharff (1928)²³² και Bloom και Richardson (1957)¹⁷.

Από τότε, προτάθηκαν πολλές τροποποιήσεις, τονίζοντας το γεγονός ότι η ιστολογική αξιολόγηση του βαθμού κακοηθείας (grading) του καρκίνου του μαστού είναι μία υποκειμενική εκτίμηση και γι'αυτό στερείται αναπαραγωγιμότητας. Η μέθοδος των Bloom και Richardson τροποποιήθηκε²⁵, σε τρόπο ώστε τα κριτήρια να γίνουν πιο αντικειμενικά. Η πιο αξιοσημείωτη βελτίωση ήταν η εισαγωγή βαθμών για τον αριθμό των πυρηνοκινήσιων, σύμφωνα με την οπτική περιοχή (field area) του χρησιμοποιούμενου οπτικού μικροσκοπίου. Οι συγγραφείς ισχυρίστηκαν ότι αν το προτεινόμενο πρωτόκολλο ακολουθηθεί σωστά, είναι δυνατή η παραγωγή αναπαραγωγίμων αποτελεσμάτων. Σε μία ακόλουθη μελέτη²⁶ η προτεινόμενη τροποποίηση του συστήματος εκτίμησης του βαθμού κακοηθείας των B&R, από την ομάδα του Νότιγγαμ (Nottingham modification), απέδειξε ότι μπορεί να είναι ένα κατάλληλο σύστημα για την αξιολόγηση του διηθητικού καρκινώματος του μαστού στη κλινική πράξη ρουτίνας.

Το ποσοστό κυτταρικού πολλαπλασιασμού ενός όγκου, από παλιά πιστευόταν, ότι έχει κάποια σχέση με τη κλινική του πορεία. Γι'αυτό το λόγο, οι παθολογοανατόμοι προσπάθησαν να βρουν τρόπο να το αξιολογήσουν, σαν ένα αναγκαίο συμπλήρωμα της διάγνωσής τους^{233,234}. Η απλούστερη από και η πιο καθιερωμένη από αυτές τις μεθόδους είναι η μέτρηση του αριθμού των πυρηνοκινήσιων. Άλλες γνωστές μέθοδοι για



την ακριβή μέτρηση του ποσοστού αυξητικότητας (growth rate) των όγκων, είναι η τριτωμένη θυμιδίνη¹¹⁸⁻¹²⁰, η ενσωμάτωση της βρωμοδεοξουριδίνης¹²³⁻¹²⁶, η κυτταρομετρία ροής¹⁹² και η ανοσοιστοχημεία²³⁵. Το μονοκλωνικό αντίσωμα Ki-67 είναι ένα αξιόπιστο και εύκολο μέσο για την ακριβή εκτίμηση του ποσοστού αυξητικότητας των νεοπλασμάτων του ανθρώπου. Έχει δειχθεί μία σχεδόν τέλεια συσχέτιση ανάμεσα στις τεχνικές οπτικής μέτρησης και τα συστήματα ανάλυσης εικόνας όσον αφορά τον υπολογισμό του ποσοστού των κυττάρων που χρωματίζονται με το αντίσωμα Ki-67²³⁶.

Το κλάσμα κυτταρικού πολλαπλασιασμού των όγκων μπορεί σήμερα ν'ανιχνευθεί σε τομές ιστών, μονιμοποιημένων σε παραφίνη με το μονοκλωνικό αντίσωμα MIB1, με μία μέθοδο 'αντιγονικής αποκάλυψης' (antigen retrieval), χρησιμοποιώντας φούρνο μικροκυμάτων. Αυτό το αντίσωμα φαίνεται να υπερέχει άλλων, για την εκτίμηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των νεοπλασμάτων σε μονιμοποιημένο υλικό ρουτίνας, όχι μόνο λόγω της απλότητας της μεθόδου, αλλά της καλής συσχέτισης με την έκφραση του Ki-67 σε τομές κρυοστάτη.

Στα καρκινώματα του μαστού, αν και μερικοί δε βρήκαν καμιά σχέση ανάμεσα στην ανοσο-δραστικότητα του Ki-67 και άλλους προγνωστικούς παράγοντες²³⁷, πολλοί συγγραφείς αναφέρουν συσχέτιση με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας^{147,153,155}, τη κατάσταση των λεμφαδένων¹⁵⁵, την ηλικία των ασθενών⁹², το μέγεθος του όγκου^{155,238}, τη κατάσταση των οιστρογονικών και προγεστερονικών υποδοχέων^{155,238-240}, τη πλοειδικότητα²⁴¹⁻²⁴³, το p53²⁴⁴ και την έκφραση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα²⁴⁵. Επίσης έχει αναφερθεί σχέση ανάμεσα στην έκφραση του Ki-67 με το μεσοδιάστημα ελεύθερο νόσου και την επιβίωση²⁴⁶.

Παρ'ολ'αυτά υπάρχουν λίγες μελέτες στις οποίες έχει εξεταστεί το ποσοστό των νεοπλασματικών κυττάρων που εκφράζουν το αντιγόνο Ki-67 σε ασθενείς με μακροχρόνια παρακολούθηση, εξαιτίας της αδυναμίας λήψης επαρκούς φρέσκου ιστού αρχείου.

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη στην οποία εξετάστηκε η ανοσο-δραστικότητα του Ki-67 σε σύγκριση με τα δύο συστήματα αξιολόγησης του ιστολογικού βαθμού κακοηθείας, των B&R και Νόττιγγαμ, σε μία μεγάλη σειρά καλά χαρακτηρισμένων ασθενών με αρνητικούς και θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες, κατανενημένες σε καθορισμένα θεραπευτικά πρωτόκολλα και με διαθέσιμες κλινικές πληροφορίες μετά από μακροχρόνια παρακολούθηση.



Η έκφραση του Ki-67 μελετήθηκε κατά κατηγορίες και υποκαθιστώντας τις μετρήσεις των πυρηνοκινησιών στα κριτήρια του Νότιγγαμ, καταλήγοντας έτσι στο σύστημα 'Ki-67 grade'.

Το σύστημα αξιολόγησης του βαθμού κακοηθείας βασιζόμενο στο 'Ki-67 grade' παρουσίαζε στατιστικά σημαντική σχέση με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας και το μέγεθος του όγκου στις ασθενείς με αρνητικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες και με τον ιστολογικό βαθμό κακοηθείας, την ορμονική κατάσταση του όγκου και την έκφραση του c-erb-B2 στις ασθενείς με θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες.

Στις ασθενείς και των δύο κατηγοριών, η συμφωνία ανάμεσα στο Ki-67 grade, στο Nottingham grade και το B&R grade ήταν υψηλή, σε τρόπο ώστε η συμφωνία ανάμεσα σε οποιοδήποτε από τα δύο συστήματα να είναι σημαντικά υψηλότερη, απ'ότι θα μπορούσε να δικαιολογηθεί μόνο από τύχη ($p < 0.0001$).

Η προγνωστική αξία και των τριών συστημάτων για την επιβίωση και το μεσοδιάστημα ελεύθερο νόσου, σύμφωνα με το τύπο της θεραπείας και τη κατάσταση των λεμφαδένων, ήταν παρόμοια.

Η παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει την αξία της εκτίμησης της έκφρασης του Ki-67, ως ενός αντικειμενικού μέσου για την εκτίμηση του ιστολογικού βαθμού κακοηθείας και της πρόγνωσης στις ασθενείς με καρκίνο του μαστού.

Καθώς η προεγχειρητική χημειοθεραπεία παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, με το δυνητικό πλεονέκτημα της ελάττωσης του μεγέθους του όγκου η έλλειψη προγνωστικών πληροφοριών, που θα μπορούσε να αποκτηθεί από τον εξαιρεθέντα ιστό κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης, αποτελεί ένα από τα δυνητικά μειονεκτήματά της. Επιπλέον, καθώς ολοένα πιο συντηρητικές χειρουργικές μέθοδοι και τεχνικές σταδιοποίησης χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, πολλές από τις χρήσιμες προγνωστικές πληροφορίες, όπως το μέγεθος του όγκου, ο βαθμός διαφοροποίησης του όγκου, η αγγειακή διήθηση και η προσβολή των μασχαλιαίων λεμφαδένων, δε θα είναι δυνατό να εκτιμηθούν. Γι'αυτό, καινούργιοι δείκτες που θα μπορούν να εφαρμοστούν σε μικρά δείγματα και θα είναι υψηλής προγνωστικής σημασίας θα είναι ανεκτίμητοι.

Το σχετιζόμενο με το Ki-67 αντιγόνο, μπορεί εύκολα να εκτιμηθεί σε νεοπλασματικά υλικά, που λαμβάνονται με πολλαπλές βιοψίες με βελόνη και σε κυτταρολογικά επιχρίσματα, πρίν και μετά τη θεραπεία.



Συμπερασματικά, η ανίχνευση του Ki-67 είναι ένα χρήσιμο εργαλείο, που σε συνδυασμό με άλλες κλινικές, παθολογοανατομικές και βιολογικές παραμέτρους, πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψη για το πιο λεπτομερή σχεδιασμό των θεραπευτικών πρωτοκόλλων.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το παθολόγοανατομικό Εργαστήριο του Πανεπιστημίου των Ιωαννίνων και το Ινστιτούτο Αντικαρκινικής Έρευνας του Ηνωμένου Βασιλείου, κατά το χρονικό διάστημα 1/2/1997 έως 1/2/2000. Ο σκοπός της εργασίας ήταν να μελετηθεί η προγνωστική σημασία της έκφρασης του δείκτη Ki-67 στο καρκίνο του μαστού, σε σύγκριση με συστήματα αξιολόγησης του ιστολογικού βαθμού κακοηθείας, κλινικές και άλλες προγνωστικές παραμέτρους, καθώς επίσης και η προγνωστική αξία του όσον αφορά την απαντητικότητα στη θεραπεία.

Με την εισαγωγή της προεγχειρητικής χημειοθεραπείας, θα είναι απαραίτητη η ανακάλυψη δεικτών που θα μπορούν να δώσουν χρήσιμες προγνωστικές πληροφορίες σε μικρές βιοψίες ή παρακεντήσεις με λεπτή βελόνα, όπου η αξιολόγηση του βαθμού διαφοροποίησης δεν είναι δυνατή. Ο αριθμός των πυρηνοκινησιών, και επομένως η αυξητική ικανότητα ενός όγκου έχειδειχθεί ότι αποτελεί έναν από τους πιο κρίσιμους παράγοντες για την αξιολόγηση του βαθμού κακοηθείας του. Το αντιγόνο έναντι του Ki-67 σχετίζεται με το κυτταρικό πολλαπλασιασμό και εκφράζεται καθ'όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (φάσεις G1, S, G2, M) με την εξαίρεση των μη πολλαπλασιαζομένων κυττάρων. Ο δείκτης επομένως Ki-67 είναι χρήσιμος για την εκτίμηση της αυξητικότητας ικανότητας των νεοπλασμάτων.

Σ' αυτή τη μελέτη, ο δείκτης Ki-67 εξετάζεται σε σχέση με ένα μεγάλο αριθμό παραμέτρων, διαθέσιμων από τη Διεθνή Μελέτη για το καρκίνο του μαστού, γνωστής με την επωνυμία Λούντβιχ V. Ο αντικειμενικός σκοπός ήταν α) να εκτιμηθούν οι μετρήσεις του Ki-67 ως ένα αντικειμενικό υποκατάστατο των μετρήσεων των μιτώσεων στην αξιολόγηση του ιστολογικού βαθμού κακοηθείας και β) να εκτιμηθεί η χρησιμότητά του ως υποκατάστατου του ιστολογικού βαθμού κακοηθείας και ως προγνωστικού παράγοντα της βιολογικής συμπεριφοράς του όγκου και της απαντητικότητας στη θεραπεία. Οι μετρήσεις του Ki-67 σε υλικό παρακεντήσεων με λεπτή βελόνα έχειδειχθεί ότι είναι αντιπροσωπευτικό των τιμών που εκτιμήθηκαν στο υλικό των βιοψιών.

Γι' αυτό και αυτή η μελέτη αποτελεί μία σημαντική εκτίμηση μίας παραμέτρου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε παρακεντήματα με λεπτή βελόνα και μικρές βιοψίες.



Ασθενείς και μέθοδοι: Το αντίσωμα MIB1 έναντι του πυρηνικού αντιγόνου Ki-67 εφαρμόστηκε σε 434 παρασκευάσματα ασθενών με καρκίνο του μαστού, εκ των οποίων 188 με αρνητικούς- και 246 με θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες. Οι ασθενείς ήταν μέλη της Διεθνούς Μελέτης για τον καρκίνο του μαστού (IBCSG, πρώην Λούντβιχ αριθμός V). Τα αποτελέσματα σχετίζονταν στατιστικά σημαντικά με τα συστήματα βαθμοποίησης του ιστολογικού βαθμού κακοηθείας κατά B&R και Nottingham και άλλους προγνωστικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων του μεγέθους και ιστολογικού τύπου του νεοπλασματος, της κατάστασης των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης, της αγγειακής διήθησης και της έκφρασης του c-erb-B2. Ο δείκτης Ki-67 επίσης εκτιμήθηκε ως προς την ικανότητά του να προβλέπει την συνολική επιβίωση και το μεσοδιάστημα ελεύθερο νόσου.

Αποτελέσματα: Στατιστικά σημαντική συσχέτιση βρέθηκε ανάμεσα στην έκφραση του Ki-67 και του συστήματος B&R ($p < 0.001$), του συστήματος Nottingham ($p < 0.001$) και του τύπου κατά Nottingham ($p < 0.008$) στην ομάδα των ασθενών με αρνητικούς και θετικούς μασχαλιαίους λεμφαδένες.

Σε πολυπαραγοντικές αναλύσεις σύμφωνα με τη κατάσταση των λεμφαδένων και το τύπο της θεραπείας, όπου συμπεριλαμβάνονταν επιπλέον πληροφορίες για το μέγεθος του όγκου, τη κατάσταση της εμμήνου ρύσεως, την ορμονική κατάσταση, τη διήθηση αγγείων και την έκφραση του c-erb-B2, τα δύο συστήματα (B&R και Nottingham grade) συνεισέφεραν σημαντικά πέραν των πληροφοριών από τη κατηγοριοποίηση του Ki-67, στην εκτίμηση της ολικής επιβίωσης και το μεσοδιάστημα ελεύθερο νόσου για όλες τις ομάδες, εκτός αυτής των ασθενών με αρνητικούς λεμφαδένες που δεν έλαβαν περιεγχειρητική χημειοθεραπεία. Στη τελευταία ομάδα, το μέγεθος του όγκου ήταν το μοναδικό προγνωστικό παθολογοανατομικό χαρακτηριστικό που παρατηρήθηκε στη μελέτη.



SUMMARY

Background: With the introduction of neo-adjuvant chemotherapy it will be essential to identify markers that can give useful prognostic and predictive information on small biopsies or needle aspirates where grading is not possible. The number of mitoses, and thus the proliferative capacity of a tumour has been demonstrated to be one of the most crucial variables for tumour grading. The Ki-67 nuclear antigen is associated with cell proliferation and is expressed throughout the cell cycle (G1, S, G2 and M phases), with the exception of resting (G0) cells. Expression of Ki-67 is therefore useful in establishing the growth fraction of neoplasms. Ki-67 is assessed here against a large number of existing parameters in the International Breast Cancer Study Group (IBCSG) Trial V data base. The objective was a) to assess Ki-67 measurements as an objective substitute for mitotic counts in tumour grading and b) to assess its utility as a surrogate of tumour grade and as a predictor of tumour behaviour and response to therapy.

Ki-67 measurements in fine-needle aspirates have been shown to be representative of values obtained in biopsy specimens. This study is therefore an important assessment of one parameter that can be used in fine-needle aspirates and small biopsies.

Patients and methods: Immunohistochemistry using the anti-Ki-67-antibody MIB1 was performed on 434 breast cancer specimens (188 node-negative and 246 node-positive) from the International Breast Cancer Study Group (IBCSG, formerly Ludwig) Trial V. The results were correlated with the Bloom-Richardson and Nottingham tumour grading systems and other prognostic factors, including tumour size and type, oestrogen and progesterone receptor status, vessel invasion and c-erb-B2 expression. Ki-67 was also assessed for its ability to predict overall survival (OS) and disease free survival (DFS).

Results: A significant correlation has been demonstrated between Ki-67 expression and Bloom-Richardson grade ($p < 0.001$), Nottingham grade ($p < 0.001$) and Nottingham type ($p < 0.008$) among node-negative and node-positive patients. In multivariate analyses stratified by nodal status and treatment regimen where additional pathological information including tumour size, menopausal status, hormonal status, vessel invasion and c-erb-B2 expression were also investigated, Bloom-Richardson and Nottingham grade were shown to contribute significantly



beyond categorical Ki-67 information in the estimation of OS and DFS for all groups except node-negative patients on the PeCT regimen. In this last group, tumour size was the single most prognostic pathological feature observed in our database.

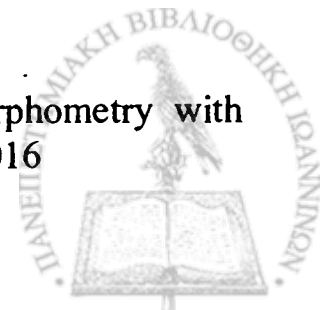


ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Page DL, Anderson TJ.** Diagnostic Histopathology of the Breast, 1987, Edinburgh, London, Melbourne and New York
2. **Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW.** Pathological prognostic factors in breast cancer.II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long term follow-up. *Histopathology* 1992; 20:479-489
3. **Nemoto T, Vana J, Bedwani RN, Baker HW, Mc Gregor FH, Murphy GP:** Management and survival of female breast cancer. Results of a national survey by the American College of Surgeons.*Cancer* 1980; 45: 2917-2924
4. **Adami H-O, Malaker B, Holmberg L, Persson I, Stone B:** The relation between survival and age at diagnosis in breast cancer. *N Engl J Med* 1986; 315: 559-563
5. **Rosen PP, Lesser ML, Kinne DW, Beattie EJ:** Breast carcinoma in women 35 years of age or younger. *Ann Surg* 1984; 199: 133-142
6. **Nixon AJ, Neuberg D, Hayes DF, Gelman R, Connolly JL, Schnitt S, Abner A, Recht A, Vicini F, Harris JR:** Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol* 1994; 12: 888-894
7. **Peters MV:** The effect of pregnancy on breast cancer. In Forrester APM, Kunkler PB, eds: *Prognostic factors in breast carcinoma.* Baltimore, 1968, Williams and Wilkins
8. **Gallenberg MM, Loprinzi CL:** Breast cancer and pregnancy. *Semin Oncol* 1989; 16: 369-376
9. **Rosner D, Lane WW:** Oral contraceptive use has no adverse effect on the prognosis of breast cancer. *Cancer* 1986; 57: 591-596
10. **Seidman H, Gelb SK, Silverberg E, La Verda N, Lubera JA:** Survival experience in the breast cancer detection demonstration project. *Cancer J Clin* 1987; 37: 258-290



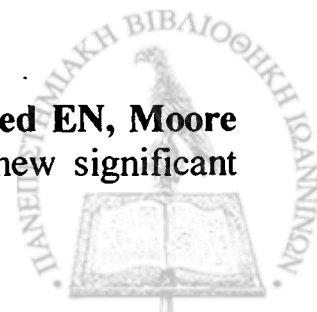
11. **Lagios MD, Westdahl PR, Margolin FR, Rose MR:** Duct carcinoma in situ. Relationship of extent of noninvasive disease to the frequency of occult invasion, multicentricity, lymph node metastases, and short term treatment failures. *Cancer* 1982; 50: 1309-1314
12. **Lash RH, Bauer TW, Hermann RE, Esselstyn CB:** Partial mastectomy. Pathologic findings and prognosis. *Hum Pathol* 1986; 17: 813-822
13. **Carter CL, Allen C, Henson DE:** Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63: 181-187
14. **Russo J, Frederick J, Ownby HE, Fine G, Hussain M, Kirckstein HI, Robbins TO, Rosenberg B:** Predictors of recurrence and survival of patients with breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1987; 88: 123-131
15. **Quiet CA, Ferguson DJ, Weichselbaum RR, Hellman S:** Natural history of node-negative breast cancer. A study of 826 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1144-1151
16. **Dawson PJ, Ferguson DJ, Karrison T:** The pathologic findings of breast cancer in patients surviving 25 years after radical mastectomy. *Cancer* 1982; 50: 2131-2138
17. **Bloom HJG, Richardson WW:** Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 1957; 11: 359-377
18. **Black MM, Barclay THC, Hankey BF:** Prognosis in breast cancer utilizing histologic characteristics of the primary tumor. *Cancer* 1975; 36: 2048-2055
19. **Baak JPA, Kurver PHJ, de Snoo-Niwlaat AJE, de Graef S, Makkink B, Boon ME:** Prognostic indicators in breast cancer. Morphometric methods. *Histopathology* 1982; 6: 327-339
20. **Baak JPA, Van Dop H, Kurver PHJ, Hermans J:** The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. *Cancer* 1987; 56: 374-382
21. **Pienta KJ, Coffey DS:** Correlation of nuclear morphometry with progression of breast cancer. *Cancer* 1991; 68: 2012-2016



22. **Van Diest PJ, Baak JP:** The morphometric prognostic index is the strongest prognosticator in premenopausal lymph node-negative and lymph node-positive breast cancer patients. *Hum Pathol* 1991; 22: 326-330
23. **Davis BW, Gelber R, Goldhirsh A, Hartmann WH, Locher GW, Reed R, Golouh R, Save-Soderbergh J, Holloway L, Russell I, Rudenstam CM:** Prognostic significance of tumor grade in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis. *Cancer* 1986; 58: 2662-2670
24. **Lash RH, Bauer TW, Hermann RE, Esselstyn CB:** Partial mastectomy. Pathologic findings and prognosis. *Hum Pathol* 1986;17: 813-822
25. **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 a long term follow-up. *Histopathology* 1991;19: 403-410
26. **Frierson HF Jr, Wolber RA, Berean KW, Franquemont DW, Gaffey MJ, Boyd JC, Wilbur DC:** Interobserver reproducibility of the Nottingham modification of the Bloom and Richardson histologic grading scheme for infiltrating ductal carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1995;103: 195-198
27. **Fisher ER, Redmond C, Fisher B, Bass G:** Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Projects (NSABP). Prognostic discriminants for 8-year survival for node-negative invasive breast cancer patients. *Cancer* 1990; 65: 2121-2128
28. **Garne JP, Aspegren K, Linell F, Rank F, Ranstam J:** Primary prognostic factors in invasive breast cancer with special reference to ductal carcinoma and histologic malignancy grade. *Cancer* 1994; 73: 1438-1448
29. **Henson DE, Ries L, Freedman LS, Carriaga M:** Relationship among outcome, stage of disease and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. The basis for a prognostic index. *Cancer* 1991; 68: 2142-2149



30. **Simpson JF, Page DL:** Cellular proliferation and prognosis in breast cancer. Statistical purity versus clinical utility. *Hum Pathol* 1994; 25: 331-332
31. **Page DL, Ellis IO, Elston CW:** Histologic grading of breast cancer. Let's do it (editorial). *Am J Clin Pathol* 1995;103: 123-124
32. **Dalton LW, Page DL, Dupont WD:** Histologic grading of breast carcinoma. A reproducibility study. *Cancer* 1994; 73: 2765-2770
33. **Robbins P, Pinder S, de Klerk N, Dawkins H, Harvey J, Sterrett G, Ellis IO, Elston CW:** Histological grading of breast carcinomas. A study of interobserver agreement. *Hum Pathol* 1995; 26: 873-879
34. **Carter D, Pipkin RD, Shepard RH, Elkins RC, Abbey H:** Relationship of necrosis and tumor border to lymph node metastases and 10-year survival in carcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol* 1978; 2: 39-46
35. **Hultborn KA, Tornberg B:** Mammary carcinoma . The biologic character of mammary carcinoma studied in 517 cases by a new form of malignancy grading. *Acta Radiol (Stoch)* 1960; 196: 1-143
36. **Kouchouk NT, Ackerman LV, Butcher HR Jr:** Prediction of axillary node metastases from the morphology of the primary mammary carcinomas. A guide to operative therapy. *Cancer* 1967; 20: 948-960
37. **Gilchrist KW, Gray R, Fowble B, Tormey DC, Taylor SG 4th:** Tumor necrosis is a predictor for early recurrence and death in lymph node-positive breast cancer. A 10-year follow-up study of 728 Eastern Cooperative Oncology Group patients. *J Clin Oncol* 1993;11: 1929-1935
38. **Fisher ER, Kotwal N, Hermann C, Fisher B:** Types of tumor lymphoid response and sinus histiocytosis. *Arch Pathol Lab Med* 1983;107: 222-227
39. **Weidner N:** Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 1995;147: 9-19
40. **Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G:** Tumor angiogenesis. A new significant



and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1885-1887

41. **Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J:** Tumor angiogenesis and metastasis- correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8
42. **Baak JPA, Van Dop H, Kurver PHJ, Hermans J:** The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. *Cancer* 1985; 56: 374-382
43. **Bosari S, Lee AK, De Lellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML:** Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol* 1992;23: 755-761
44. **Gasparini G, Weidner N, Bevilaqua P, Maluta S, Dalla Palma P, Caffo O, Barbareschi M, Borrachi P, Marubini E, Pozza F:** Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1994;12: 454-466
45. **Axelsson K, Ljung B-M, Moore DH II, Thor AD, Chew KL, Edgerton SM, Smith HS, Mayall BH:** Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 997-1008
46. **Page DL, Dupont WD:** Breast cancer angiogenesis. Through a narrow window. *JNCI* 1992; 84: 1850-1851
47. **Siitonen SM, Haapasalo HK, Rantala IS, Helin HJ, Isola JJ:** Comparison of different immunohistochemical methods in the assessment of angiogenesis. Lack of prognostic value in a group of 77 selected node-negative breast carcinomas. *Mod Pathol* 1995; 8: 745-752
48. **Masters JRW, Millis RR, King RJB, Rubens RD:** Elastosis and response to endocrine therapy in human breast cancer. *Br J Cancer* 1979; 39: 536-539
49. **Bogomoletz WV:** Elastosis in breast cancer. *Pathol Annu* 21(Pt2): 1986, 345-366



50. **Glaubitz LC, Bowen JH, Cox EB, Mc Carty KS Jr:** Elastosis in human breast cancer. Correlation with sex steroid receptors and comparison with clinical outcome. *Arch Pathol Lab Med* 1984;108: 27-30
51. **Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Chirgwin JM, McGuire WL:** Cathepsin D and prognosis in breast cancer. *N Engl J Med* 1990;322: 297-302
52. **Armas OA, Gerald WL, Lesser ML, Arroyo CD, Norton L, Rosen PP:** Immunohistochemical detection of cathepsin D in T2NOMO breast carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1994;18: 158-166
53. **Domagala W, Striker G, Szadowska A, Dukowicz A, Weber K, Osborn M:** Cathepsin D in invasive ductal NOS breast carcinoma as defined by immunohistochemistry. No correlation with survival at 5 years. *Am J Pathol* 1992;141: 1003-1012
54. **Kandalaf PL, Chang KL, Ahn CW, Traweek ST, Mehta P, Battifora H:** Prognostic significance of immunohistochemical analysis of cathepsin D in low stage breast cancer. *Cancer* 1993;71: 2756-2763
55. **Ravdin PM, Tandon AK, Alred DC, Clark GM, Fuqua SA, Hilsenbeck SH, Chamness GC, Osborne CK:** Cathepsin D by Western blotting and immunohistochemistry. Failure to confirm correlations with prognosis in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 1994;12: 467-474
56. **Sahin AA, Sneige N, Ordonez NG, Singletary SE, Ro jy, El Naggat AK, Ayala AG:** Immunohistochemical assessment of Cathepsin D in stage I and II node-negative breast cancer. *Appl Immunohistochem* 1994; 2: 15-21
57. **Dawkins HJ, Robbins PD, Smith KL, Sarna M, Harvey JM, Sterrett GF, Papadimitriou JM:** What's new in breast cancer? Molecular perspectives of cancer development and the role of the oncogene c-erb-B2 in prognosis and disease. *Pathol Res Pract* 1993;189: 1233-1252
58. **De Potter CR, Shelfhout A-M:** The neu protein and breast cancer. *Virchows Archiv* 1995; 426: 107-115



59. **Battifora H, Gaffey M, Esteban J, Mehta P, Bailey A, Faucett C, Niland J:** Immunohistochemical assay of neu/c-erb-B2 oncogene product in paraffin-embedded tissue in early breast cancer. Retrospective follow-up study of 245 stage I and II cases. *Mod Pathol* 1991; 4: 466-474
60. **Ellis GK, Gown AM:** New applications of monoclonal antibodies to the diagnosis and prognosis of breast cancer. *Pathol Annu* 1990;25(Pt 2):193-235
61. **Heintz NH, Leslie KO, Rogers LA, Howard PL:** Amplification of the c-erb-B2 oncogene and prognosis of breast adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 1990;114: 160-163
62. **Baak JP, Chin D, van Diest PJ, Ortiz R, Matze-Cok, Bacus SS:** Comparative long-term prognostic value of quantitative HER-2/neu protein expression, DNA ploidy, and morphometric and clinical features in paraffin-embedded invasive breast cancer. *Lab Invest* 1991; 64: 215-223
63. **Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD, Cranor M, Borgen P, Norton L:** Immunohistochemical detection of HER2/neu in patients with axillary node-negative breast carcinoma. A study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis. *Cancer* 1995;75: 1320-1326
64. **Tsuda H, Hirobashi S, Shimosato Y, Hirota T, Tsugane S, Watanabe S, Terada M, Yamamoto H:** Correlation between histologic grade of malignancy and copy number of c-erb-B2 gene in breast carcinoma. A retrospective analysis of 176 cases. *Cancer* 1990; 65: 1794-1800
65. **Muss HB, Thor AD, Berry DA, Kute t, Liu ET, Koerner F, Cirrincione CT, Budman dr, Wood DC, Barcos M et al:** c-erb-B2 expression and response to adjuvant chemotherapy in women with node-positive early breast cancer. *N Engl J Med* 1994;330: 1260-1266
66. **Barnes DM, Dublin EA, Fisher CJ, Levison DA, Millis RR:** Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma. An important new independent indicator of prognosis? *Hum Pathol* 1993;24: 469-476



67. **Barnes R, Masood S, Barker E, Rosengard AM, Coggin DL, Crowell T, King CR, Porter-Jordan K, Wargotz ES, Liotta LA, et al:** Low nm3 protein expression in infiltrating ductal breast carcinomas with reduced patient survival. *Am J Pathol* 1991;139: 245-250
68. **Hurlimann J:** Prognostic value of p53 protein expression in breast carcinomas. *Pathol Res Pract* 1993;189: 996-1003
69. **Rosen PP, Lesser ML, Aroyo CD, Cranor M, Borgen P, Norton L:** p-53 in node-negative breast carcinoma. An immunohistochemical study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis. *J Clin Oncol* 1995;13:821-830
70. **Hurlimann J, Larrinaga B, Vala DLM:** bcl-2 protein in invasive ductal breast carcinomas. *Virchows Archiv* 1995; 426: 163-169
71. **Dogliani C, Dei Tos AP, Laurino L, Charelli C, Barbareschi M, Viale G:** The prevalence of bcl-2 immunoreactivity in breast carcinomas and its clinicopathological correlates with particular reference to oestrogen receptor status. *Virchows Archiv* 1994; 424: 47-52
72. **Sears HF, Janus C, Levy W, Hopson R, Creech R, Grotzinger P:** Breast cancer without axillary metastases. Are there high-risk biologic subpopulations? *Cancer* 1982; 50: 1820-1827
73. **Wertheim U, Ozezillo L:** Neoplastic involvement of nipple and skin flap in carcinoma of the breast . *Am J Surg Pathol* 1980; 4: 543-549
74. **Davis BW, Gelber R, Goldhirsch A, Hartmann WH, Hollaway L, Russell I, Rudenstam CM:** Prognostic significance of peritumoral vessel invasion in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis. *Hum Pathol* 1985;16: 1212-1218
75. **Nime FA, Rosen PP, Thaler HT, Ashikari R, Urban JA:** Prognostic significance of tumor emboli in intrammary lymphatics in patients with mammary carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1977;1: 25-30
76. **Breast Cancer Study Group:** Identification of breast cancer patients with high risk of early recurrence after radical mastectomy. II. Clinical and pathological correlations. *Cancer* 1978; 42: 2809-2826



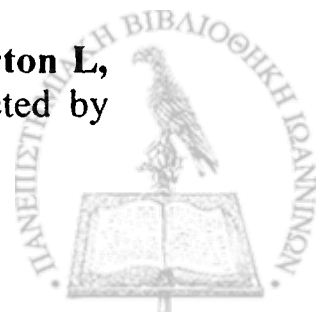
77. **Kister SJ, Sommers SC, Haagensen CD, Cooley E:** Re-evaluation of blood vessel invasion as a prognostic factor in carcinoma of the breast. *Cancer* 1966;19: 1213-1216
78. **Lee AKC, DeLellis RA, Silverman ML, Wolfe HJ:** Lymphatic and blood vessel invasion in breast carcinoma. A useful prognostic indicator? *Hum Pathol* 1986;17: 984-987
79. **Pinder SE, Ellis IO, Galea M, O'Rourke S, Blamey RW, Elston CW:** Pathological prognostic factors in breast cancer.III. Vascular invasion. Relationship with recurrence and survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1994;24: 41-47
80. **Aamdal S, Bormer O, Jorgensen O, Host H, Eliassen G, Kaalhus O, Pihl A:** Estrogen receptors and long-term prognosis in breast cancer. *Cancer* 1984; 53: 2525-2529
81. **Butler JA, Bretsky S, Menendez-Botet C, Kinne DW:** Estrogen receptor protein of breast cancer as a predictor of recurrence. *Cancer* 1985; 55: 1178-1181
82. **Hilf R, Feldstein ML, Gibson SL, Savlov ED:** The relative importance of estrogen receptor analysis as a prognostic factor for recurrence or response to chemotherapy in women with breast cancer. *Cancer* 1980; 45: 1993-2000
83. **Auer G, Eriksson E, Azavedo E, Caspersson T, Wallgren A:** Prognostic significance of nuclear DNA content in mammary adenocarcinoma in humans. *Cancer Res* 1984; 44: 394-396
84. **Frierson HF Jr:** Ploidy analysis and S-phase fraction determination by flow cytometry of invasive adenocarcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol* 1991;15: 358-367
85. **Keyhani-Rofagha S, O'Toole RV, Farrar WB, Sickie-Santanello B, De Cenzo J, Young D:** Is DNA ploidy an independent prognostic indicator in infiltrative node-negative breast adenocarcinoma? *Cancer* 1990; 65: 1577-1582
86. **Toikkanen S, Joensuu H, Klemi P:** Nuclear DNA content as a prognostic factor in T1-2NO breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1990; 93: 471-479



87. **Witzig TE, Gonchoroff NJ, Therneau T, Gilbertson DT, Wold LE, Grant C, Grande J, Katzmann JA, Ahmann DL, Ingle JN:** DNA content flow cytometry as a prognostic factor for node-positive breast cancer. The role of multiparametric ploidy analysis and specimen sonication. *Cancer* 1991;68: 1781-1788
88. **Biesterfeld S, Noll I, Noll E, Wohltmann D, Blocking A:** Mitotic frequency as a prognostic factor in breast cancer. *Hum Pathol* 1995; 26: 47-52
89. **Kujari HP, Collan YUI, Atkin NB:** Use of the mitotic counts for the prognosis and grading of breast cancer. *Pathol Res Pract* 1994;190: 593-599
90. **Laroye GJ, Minkin S:** The impact of mitotic index on predicting outcome in breast carcinoma. A comparison of different counting methods in patients with different lymph node status. *Mod Pathol* 1991; 4: 456-460
91. **Mauri FA, Girlando S, Dalla Palma P, Buffa G, Perrone G, Doglioni C, Kreipe H, Barbareschi M:** Ki-67 antibodies (Ki-S5, MIB-1, and Ki-67) in breast carcinomas. A brief quantitative comparison. *Appl Immunohistochem* 1994; 2: 171-176
92. **Sahin AA, Ro J, Ro JY, Blick MB, el-Naggar AK, Ordonez NG, Fritsche HA, aSmith TL, Hortobagyi GN, Ayala AG:** Ki-67 immunostaining in node-negative stage i/ii breast carcinoma. Significant correlation with prognosis. *Cancer* 1991;68: 549-557
93. **Viehl P, Chevillard S, Mosseri V, Donatini B, Magdelenant H:** Ki-67 index and S-phase fraction in human breast carcinomas. Comparison and correlations with prognostic factors. *Am J Clin Pathol* 1990; 94: 681-686
94. **Weidner N, Moore DH, Vartanian R:** Correlation of Ki-67 antigen expression with mitotic figure index and tumor grade in breast carcinomas using the novel "paraffin"-reactive MIB-1 antibody. *Hum Pathol* 1994;25: 337-342
95. **Wintzer HO, Zipfel I, Schulte-Monting J, Hellerich U, von Kleist S:** Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer* 1991;67: 421-428



96. **Sigurdsson H, Baldetorp B, Borg A, Dalberg M, Ferno M, Killander D, Olsson H:** Indicators of prognosis in node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1990; 322: 1045-1053
97. **Vischer DW, Zarbo RJ, Greenawald KA, Crissman JD:** Prognostic significance of morphological parameters and flow cytometric DNA analysis in carcinoma of the breast. *Pathol Annu* 1990;25(Pt1): 171-210
98. **Berg JW, Robbins GF:** Factors influencing short- and long-term survival of breast cancer patients. *Surg Gynecol Obstet* 1966;122: 1311-1316
99. **Fisher B, Bauer M, Wickerham , Redmand CK, Fisher ER:** Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* 1983;52: 1551-1557
100. **Fisher ER, Gregorio R, Redmond C, Dekker A, Fisher B:** Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol No.4).II. The significance of regional node histology other than sinus histiocytosis in invasive mammary cancer. *Am J Clin Pathol* 1976; 65: 21-30
101. **Smith JA III, Gamec- Araujo J, Gallager HS, White EC, McBride CM:** Carcinoma of the breast. Analysis of total lymph node involvement versus level of metastasis. *Cancer* 1977; 39: 527-532
102. **Huvos AG, Hutter RVP, Berg JW:** Significance of axillary macrometastases and micrometastases in mammary cancer. *Ann Surg* 1971;173: 44-46
103. **Rosen PP, Saigo PP, Braun DW, Weathers E, Fracchia AA, Kinne DW:** Axillary micro- and macrometastases in breast cancer. Prognostic significance of tumor size. *Ann Surg* 1981;196: 585-591
104. **Goldstein NS:** The significance of extracapsular axillary lymph node extension by metastatic breast cancer. *Int J Surg Pathol* 1995; 3: 65-66
105. **Leonard C, Corkill M, Tompkin J, Zhen B, Waitz D, Norton L, Kinzie J:** Are axillary recurrence and overall survival affected by



axillary extranodal tumor extension in breast cancer? Implications for radiation therapy. *J Clin Oncol* 1995;13: 47-53

106. **Mambo NC, Gallager HS:** Carcinoma of the breast The prognostic significance of extranodal extension of axillary disease. *Cancer* 1977; 39: 2280-2285
107. **Hartveit F, Skjaerven R, Maehle BO:** Prognosis in breast cancer patients with tumor cells in the efferent vessels of their axillary nodes. *Pathology* 1983;139: 379-382
108. **Fisher ER, Swamidoss S, Lee CH, Rockette H, Redmond C, Fisher B:** Detection and significance of occult axillary node metastases in patients with invasive breast cancer. *Cancer* 1978; 42: 2025-2031
109. **Pickren JW:** Significance of occult metastases. A study of breast cancer. *Cancer* 1961;14: 1266-1273
110. **Ellis GK, Gown AM:** New applications of monoclonal antibodies to the diagnosis and prognosis of breast cancer. *Pathol Annu* 1990;25(Pt 2): 193-235
111. **Gilliland MD, Barton RM, Copeland EM III:** The implications of local recurrence of breast cancer as the first site of therapeutic failure. *Ann Surg* 1983;197: 284-287
112. **Lewis EF, Montague ACW, Kuller L:** Breast Cancer treated at the Johns Hopkins Hospital 1951-1956. Review of international ten-year survival rates. *Cancer* 1966;19: 1359-1368
113. **Elston CW, Gresham GA, Rao GS, Zebro T, Haybittle JL, Houghton J.** The Cancer Research Campaign (Kingw/Cambridge) trial for early breast cancer- pathological aspects. *Br J Cancer* 1982; 45: 655-669
Haybittle JL, Blamey RW, Elston CW et al: A prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1982; 45: 361-366
114. **Costa A, Banadonna G, Villa E, Valagussa P, Silvestrini R:** Labeling index as a prognostic marker in non-Hodgkin's lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 1981; 66:1-5
115. **Meyer JS:** Cell kinetic measurements of human tumors. *Hum Pathol* 1982;13:874-877



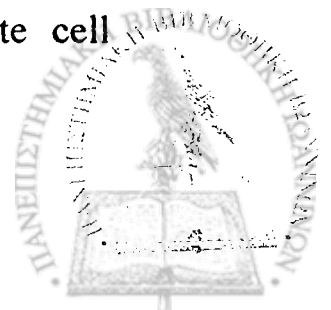
116. **Chauvel P, Courdi A, Gioanni J, Vallicioni J, Santini J, Denard F.** The labeling index: a prognostic factor in head and neck carcinoma. *Radiother Oncol* 1989;14: 231-237
117. **Ellis PSJ, Whitehead R.** Mitosis counting-a need for reappraisal. *Hum Pathol* 1981; 12: 3-4
118. **Johnson HA, Bond VP.** A method of labelling tissues with tritiated thymidine in vitro and its use in comparing rates of cellular proliferation in duct epithelium, fibroadenoma and carcinoma of the human breast. *Cancer* 1961;14: 639-650
119. **Meyer JS, Hixon B.** Advanced stage and early relapse of breast carcinomas associated with high thymidine labelling indices. *Cancer Res* 1979; 39: 4042-4047
120. **Meyer JS, Friedman E, Mc Crate M, Bauer WC.** Prediction of early course of breast carcinoma by thymidine labelling. *Cancer* 1983; 51: 1879-1886
121. **Silvestrini R, Daidone MG, Del Bino G, Selvi C, Canova S.** Tumor cell kinetics and clinical outcome in resectable breast cancer (Abstract). European Study Group for Cell Proliferation. Milan, 1989
122. **Hery M, Gianni J, Lalanne CM, Nam er M, Courdi A.** The DNA labelling index: a prognostic factor in node negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1987;9: 207-211
123. **Gratzner HG.** Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iodo-deoxyuridine; a new reagent for detection of DNA replication. *Science* 1982; 218: 474-475
124. **Morstyn G, Hsu SM, Kinsella T, Gratzner A, Russo A, Mitchell JB.** Bromodeoxyuridine in tumors and chromosomes detected with a monoclonal antibody. *J Clin Invest* 1983; 72: 1844-1850
125. **Roberts CG, deFazio A, Tattershall MH.** A simple and rapid method for the identification of cycling cells in freshly excised tumours. *Cytobios* 1985; 43: 313-318



126. **Kikujama S, Kubota T, Watanabe M, Ishibiki K, Abe O.** Cell kinetic study of human carcinomas using bromodeoxyuridine. *Cell Kinet* 1988; 20: 1-6
127. **Clevenger CV, Epstein AL, Bauer KD.** Modulation of the nuclear antigen p105 as a function of cell cycle progression. *J Cell Physiol* 1987;130: 336-343
128. **Wong WSF, Mann CJ, Tattershall MHN.** Identification of non-proliferating B16 melanoma cells using monoclonal antibody (AD203) against the M1 subunit of ribonucleotide reductase. *Cell Tissue Kinet.* 1988;21: 353-361
129. **Mushika M, Miwa T, Suzuoki Y, Hayashi K, Masaki S, Kaneda T.** Detection of proliferative cells in dysplasia, carcinoma in situ, and invasive carcinoma of the uterine cervix by a monoclonal antibody against DNA polymerase alpha. *Cancer* 1988;61: 1182-1186
130. **Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H.** Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated cell proliferation. *Int J Cancer* 1983;31: 13-20
131. **Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H.** Cell cycle analysis of cell proliferation associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133: 1710-1715
132. **Baisch H, Gerdes J.** Simultaneous staining of exponentially growing versus plateau phase cells with the proliferation associated antibody Ki-67 and propidium iodide: analysis by flow cytometry. *Cell Tissue Kinet* 1987;20: 387-391
133. **Verheijen R, Kuipers HJH, Schlingeman RO et al.** Ki-67 detects a nuclear matrix associated proliferation antigen. I. Intracellular localization during interphase. *J Cell Sci* 1988;92: 123-130
134. **Verheijen R, Kuipers HJH, Van Driel R et al.** Ki-67 detects a nuclear matrix associated proliferation antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci* 1989;92: 531-540



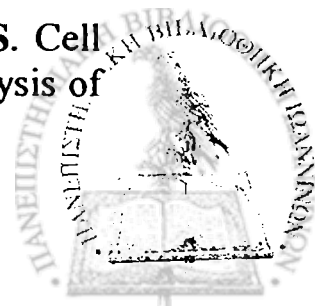
135. **Scott CS, Fey SJ, Larsen PM.** Cytoplasmic Ki-67 expression: A reply to Dario Campana, Elaine Coustan-Smith, and George Janossy. *Leukemia* 1989; 3: 397
136. **Gerdes J, Li L, Schlueter C, et al.** Immunobiochemical and microbiologic characterization of the cell proliferation-associated antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991;138: 867-873
137. **Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H et al.** Assignment of the Ki-67 gene (MK167) to 10q-25-qter. *Genomics* 1991;11: 476-481
138. **Schonk DM, Kuijpers HJH, van Drunen E et al.** Assignment of the gene(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10. *Hum Genet* 1989;83: 297-299
139. **Sawney N, Hall PA.** Ki-67-structure, function and new antibodies. *J Pathol* 1992;168: 161-162 **Key G, Becker MHG, Baron B et al.** New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 66bp repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope. *Lab Invest* 1993;68: 629-635
140. **McCormick D, Chong H, Hobbs C, Datta C, Hall PA.** Detection of the Ki-67 antigen in fixed wax embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. *Histopathology* 1993;22:355-360
141. **Schwarting R, Gerdes J, Baisch H, Niehus J, Jaeschke, Stein H.** Determination of the growth fraction in cell suspensions by flow cytometry using the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol Methods* 1986; 90: 65-70
142. **Brown DC, Gatter KC.** Monoclonal antibody Ki-67: its use in pathology. *Histopathology* 1990;17: 489-503
143. **Kamel OW, Franklin WA, Ringus JC, Meyer JS.** Thymidine labeling index and Ki-67 growth fraction in lesions of the breast. *Am J Pathol* 1989; 134: 107-113
144. **Silvestrini R, Costa A, Veronesi S, Del Bino G, Prsici P.** Comparative analysis of different approaches to investigate cell kinetics. *Cell Tissue Kinet* 1988;21:13-131



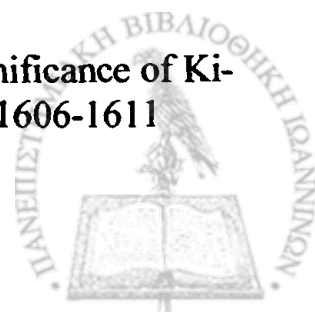
145. **Magaud J-P, Sargent I, Clarke PJ, French M, Rimokh R, Mason DY.** Double immunocytochemical labeling of cell and tissue samples with monoclonal anti-bromodeoxyuridine. *J Histochem Cytochem* 1989; 37: 1517-1527
146. **Sasaki K, Matsumura K, Tsuji T, Shinozaki F, Takahashi M.** Relationship between labelling indices of Ki-67 and BrdUrd in human malignant tumors. *Cancer* 1988;62:989-993
147. **Walker RA, Camplejohn RS.** Comparison of monoclonal antibody Ki-67 reactivity with grade and DNA flow cytometry of breast carcinomas. *Br J Cancer* 1988;57: 281-283
148. **Zuber P, Hamou M-F, de Trinbolet N.** Identification of proliferating cells in human gliomas using the monoclonal antibodies Ki-67. *Neurosurgery* 1988;22: 364-368
149. **Due W, Dieckmann K-L, Loy V.** Immunohistological determination of proliferative activity in seminomas. *J Clin Pathol* 1988;41: 304-307
150. **Brown DC, Gatter KC, Mason DY.** Proliferation in non-Hodgkin's lymphoma: a comparison of Ki-67 staining on fine-needle aspiration and cryostat sections. *J Clin Pathol* 1990; 43: 325-328
151. **Porschen R, Lohe B, Claus-Jurgen H, Borschard F.** Assessment of cell proliferation in colorectal carcinomas using the monoclonal antibody Ki-67. *Cancer* 1989;64: 2501-2505
152. **Barnard NJ, Hall PA, Lemoine NR, Kadar N.** Proliferative index in breast carcinoma determined in situ by Ki-67 immunostaining and its relationship to clinical and pathological variables. *J Pathol* 1987;152: 287-295
153. **Bouzubar N, Walker KJ, Griffiths K et al.** Ki-67 immunostaining in primary breast cancer: pathological clinical associations. *Br J Cancer* 1989;59: 943-947
154. **McGurrin JF, Dorria Jr MI, Dawson PJ, Karrison T, Stein HO, Franklin WA.** Assessment of tumor cell kinetics by immunohistochemistry in carcinoma of the breast. *Cancer* 1987;59: 1744-1750



155. **Wrba F, Reiner A, Markis- Ritzinger E, Holzner JH, Reiner G, Spona J.** Prognostic significance of immunohistochemical parameters in breast carcinomas. *Pathol Res Pract* 1988;183: 277-283
156. **Gerdes J, Lelle RJ, Pickartz H et al.** Growth fraction in breast cancers determined in situ with monoclonal antibody Ki-67. *J Clin - Pathol* 1986;39: 977-980
157. **Lelle RJ, Heidenreich W, Stauch G, Gerdes J.** The correlation of growth fraction with histologic grading and lymph node status in human mammary carcinoma. *Cancer* 1987;59: 83-88
158. **Raymond WA, Leong AS-Y.** The relationship between growth fractions and oestrogen receptors in human breast carcinoma, as determined by immunohistochemical staining. *J Pathol* 1989;158: 203-211
159. **Charpin C, Andrac L, Vacheret H et al.** Multiparametric evaluation (SAMBA) of growth fraction (monoclonal Ki-67) in breast carcinoma tissue sections. *Cancer Res* 1988;48: 4368-4374
160. **Gerdes J, Pickartz H, Brotherton J, Hammerstein J, Weitzel H, Stein H.** Growth fractions and estrogen receptors in human breast cancers as determined in situ by monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1987;129: 486-492
161. **Horny H-P, Horst H-A.** Proliferation of invasive breast carcinomas and colorectal adenocarcinomas: an immunohistochemical in situ investigation with the monoclonal antibody Ki-67. *Zentralbl Allg Pathol Pathol Anatom* 1988;134:547-554
162. **Crawford LV, Pim DC, Lamb P.** The cellular protein p53 in human tumors. *Mol Biol Med* 1984;2: 261-272
163. **Cattoretto G, Rilke F, Andreola S, D'Amato L, Delia D.** p53 expression in breast cancer. *Int J Cancer* 1988;41: 178-183
164. **Walker RA, Wilkinson N.** p21 RAS protein expression in benign and malignant human breast. *J Pathol* 1988;156:147-153
165. **Schwartz BR, Pinkus G, Bacus S, Toder M, Weinberg DS.** Cell proliferation in non-Hodgkin's lymphomas. Digital image analysis of Ki-67 antibody staining. *Am J Pathol* 1989;134: 327-336



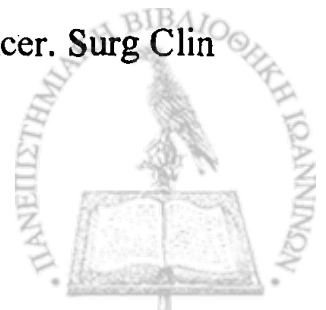
166. **Charpin C, Andrac L, Habib M-C, Vacheret H, Xerri L, Devictor B, Lavaut MN, Toga M.** Immunodetection in fine-needle aspirates and multiparametric (SAMBA) image analysis. *Cancer* 1989;63: 863-871
167. **Souchier C, French M, Berger F, Scoazec, Bryon PA.** Image analysis applied to proliferating cells in malignant lymphoma. *Cytometry* 1988;9: 201-205
168. **Franklin WA, Bibbo M, Doria MI et al.** Quantitation of oestrogen receptor content and Ki-67 staining in breast carcinoma by the MicroTICAS image analysis system. *Anal Quant Cytol Histol* 1987;9: 279-286
169. **Palutke M, Kukuruga D, Tabaczka P.** A flow cytometric method for measuring lymphocyte proliferation directly from tissue culture plates using Ki-67 and propidium iodide. *J Immunol Methods* 1987;105: 97-105
170. **Palutke M, Tabaczka PM, Kukuruga DL, Kantor NL.** A method for measuring lymphocyte proliferation in mixed lymphocyte cultures using a nuclear proliferation antigen, Ki-67, and flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 1989;91: 417-421
171. **Schwarting R, Gerdes J, Niehus J, Jaeschke, Stein H.** Determination of growth fraction in cell suspensions by flow cytometry using the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol Methods* 1986;90: 65-70
172. **Brown DC, Cole D, Gatter KC, Mason DY.** Carcinoma of the cervix uteri: an assessment of tumour proliferation using the monoclonal antibody Ki-67. *Br J Cancer* 1988;57: 178-181
173. **Brown DC, Cole D, Gatter KC, Mason DY.** Carcinoma of the cervix uteri: an assessment of tumour proliferation using the monoclonal antibody Ki-67. *Br J Cancer* 1988;57: 178-181
174. **Hall PA, Richards MA, Gregory WM, d' Ardenne AJ, Lister TA, Stansfeld AG.** The prognostic value of Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *J Pathol* 1988;154: 223-235
175. **Ueda T Aozasa K, Tsujimoto M et al.** Prognostic significance of Ki-67 reactivity in soft tissue sarcomas. *Cancer* 1989;63: 1606-1611



176. **Gatter KC, Dunnill MS, Gerdes J, Stein H, Mason DY.** New approach to assessing lung tumours in man. *J Clin Pathol* 1986;39: 590-593
177. **Ostertag CB, Volk B, Shibata T, Burger P, Kleihues P.** The monoclonal antibody Ki-67 as a marker for proliferating cells in stereotactic biopsies of brain tumours. *Acta Neurochir* 1987;89: 117-121
178. **Scott CS, Ramsden W, Limbert HJ, Master PS, Roberts BE.** Membrane transferrin receptor (TfR) and nuclear proliferation-associated Ki-67 expression in haemopoietic malignancies. *Leukemia* 1988;2: 438-442
179. **Cantu-Rajnoldi A, Banfi P, Castagni M, Vallengio C, Masera G.** Ki-67 expression in childhood acute lymphoblastic leukemia and relation with L2 morphology. *Br J Haematol* 1989;71:302-303
180. **Brown DC, Gatter KC, Mason DY.** Proliferation in non-Hodgkin's lymphoma: a comparison of Ki-67 staining on fine-needle aspiration and cryostat sections. *J Clin Pathol* 1990;43: 325-328
181. **Brown DC, Gatter KC, Dunnill MS, Mason DY.** Immunocytochemical analysis of cytocentrifuged preparations. A study based on lung tumours aspirated in vitro. *Anal Quant Cytol Cytol Histol* 1989;11:140-145
182. **Brown DC, Gatter KC.** Use of bronchial brushings in the immunocytochemical assessment of human lung tumours. *Acta Cytol* 1989;32: 432
183. **Scott CS, Fey SJ, Larsen PM.** Cytoplasmic Ki-67 expression: A reply to Dario Campana, Elaine Coustan-Smith, and George Janossy. *Leukemia* 1989; 3:397
184. **Braun N, Papadopoulos T, Muller-Hermelink HK.** Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells. *Virchows Archiv* 1988;56: 25-33
185. **Ostmeier H, Suter L.** The Ki-67 antigen in primary human melanomas-its relationship to mitotic rate and tumor thickness and its stability. *Arch Dermatol Res* 1989;281: 173-177



186. **Campana D, Coustan-Smith E, Janossy G.** 'Cytoplasmic' expression of nuclear antigens. *Leukemia* 1989;3: 239-241
187. **Raymond WA, Leong AS-Y.** Nucleolar organizer regions relate to growth fractions in human breast carcinoma. *Hum Pathol* 1989;20: 741-746
188. **Trere D, Pession A, Derenzini M.** The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. *Exp Cell Res* 1989;184: 131-137
189. **Derenzini M, Pession A, Trere D.** Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. *Lab Invest* 1990;63: 137-140
190. **Griffiths AP, Butler CW, Roberts P, Dixon MF, Quirke P.** Silver-stained structures (AgNORs), their dependence on tissue fixation and absence of prognostic relevance in rectal adenocarcinoma. *J Pathol* 1989;159: 121-127
191. **Ruschorff J, Plate KH, Contractor H, Kern S, Zimmermann R, Thomas C.** Evaluation of nucleolus organizer region by automatic image analysis: a contribution to standardization. *J Pathol* 1990;161: 113-118
192. **Quirke P, Dyson JED.** Flow cytometry: methodology and applications in pathology. *J Pathol* 1986;149: 79-87
193. **Iseki S, Mori T.** Methyl green-pyronin stain distinguishes proliferating from differentiated nonproliferating cell nuclei after acid denaturation of DNA. *J Histochem Cytochem* 1986;34: 683-687
194. **Potmesil M, Goldfeder A.** Nucleolar morphology, nucleic acid synthesis, and growth rates of experimental tumors. *Cancer Res* 1971; 31: 789-797
195. **Chou MY, Chang ALC, McBride J, Donoff B, Gallagher GT, Wong DTW.** A rapid method to determine proliferation patterns of normal and malignant tissues by H3 mRNA in situ hybridization. *Am J Pathol* 1990;136: 729-733
196. **Swain SM.** Selection of therapy for stage III breast cancer. *Surg Clin North Am*, 1990, 70, 1061

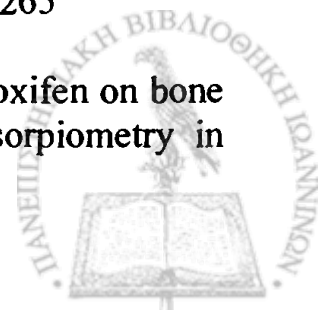


197. **Fisher B, Gunduz N and Saffer EA.** Influence of the interval between primary tumor removal and chemotherapy on kinetics and growth of metastases. *Cancer Res*, 1983, 43, 1488
198. **Brain E, Garrino C, Misset J-L et al.** Long term prognostic and predictive factors in 107 stage II-III breast cancer patients treated with anthracycline based neoadjuvant chemotherapy. *Br J Cancer* 1997, 75, 1360
199. **Fisher B, Bryant J, Wolmark N et al.** Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol* 1998, 16, 2672
200. **Jacquillat C, Weil M, Bailet F et al.** Results of neoadjuvant chemotherapy and radiation therapy in the breast-conserving treatment of 250 patients with all stages of infiltrative breast cancer. *Cancer* 1990, 66, 119
201. **Powels TJ, Hickish TF, Makris A et al.** Randomized trial of chemoendocrine therapy started before or after surgery for treatment of primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1995, 13, 547
202. **Scholl SM, Asselain B, Beuzeboc P et al.** Neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy in premenopausal patients with tumours considered too large for breast conserving surgery. An update. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 1995, 14, Abstract 200
203. **Eisen T, Smith IE, Johnston S et al.** Randomized phase II trial of infusional fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide versus infusional fluorouracil, epirubicin and cisplatin in patients with advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 1998, 16, 1350
204. **Honkoop AH, van Diest PJ, de Jong JS et al.** Prognostic role of clinical, pathological and biological characteristics in patients with locally advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1998, 77, 621
205. **Semiglazov VF, Topuzov EE, Bavli JL et al.** Primary (neoadjuvant) chemotherapy and radiotherapy compared with radiotherapy alone in stage IIb-IIIa breast cancer. *Ann Oncol* 1994, 5, 591
206. **Mauriac L, Durand M, Avril A and Dilhuydy JM.** Effects of primary chemotherapy in conservative treatment of breast cancer



patients with operable tumors larger than 3cm. Results of a randomized trial in a single centre. *Ann Oncol* 1991, 2, 347

207. **Fisher B, Bryant J, Wolmark N et al.** Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J Clin Oncol* 1998, 16, 2672
208. **Jordan V.** Effect of tamoxifen (ICI 46,474) on initiation and growth of DMBA-induced rat mammary carcinomata. *Eur J Cancer*, 1976, 12, 419
209. **Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group E.** Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 1998, 351, 1451
210. **Powels TJ, Jones AL, Ashley SE et al.** The Royal Marsden Hospital pilot tamoxifen chemoprevention trial. *Breast Cancer Res Treat*, 1994, 31,73
211. **Powels T, Hardy J, Ashley S, et al.** A pilot trial to evaluate the acute toxicity and feasibility of tamoxifen for prevention of breast cancer. *Br J Cancer* 1989, 60, 126
212. **McDonald C, Alexander F, Whyte B, et al.** Cardiac and vascular morbidity in women receiving adjuvant tamoxifen for breast cancer in a randomised trial. *Scott Cancer Trials Breast Group*, 1995, 311, 977
213. **Fisher B, Constantino J, Redmond C et al.** A randomised clinical trial evaluating tamoxifen in the treatment of patients with node-negative breast cancer who have estrogen-receptor-positive tumours. *N Engl J Med*, 1989, 320, 479
214. **Thangaraju M, Kumar K, Gandhirajan R et al.** Effect of tamoxifen on plasma lipids and lipoproteins in postmenopausal women with breast cancer. *Cancer*, 1994, 73, 659
215. **Morales M, Santana N, Soria A et al.** Effects of tamoxifen on serum lipid and apolipoprotein levels in postmenopausal patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1996, 40, 265
216. **Powels TJ, Hickish T, Kanis JA et al.** Effect of tamoxifen on bone mineral density measured by dual-energy-X-ray absorptiometry in

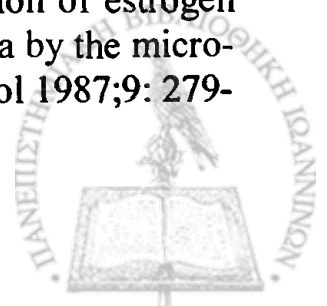


healthy premenopausal and postmenopausal women. *J Clin Oncol*, 1996;14, 78

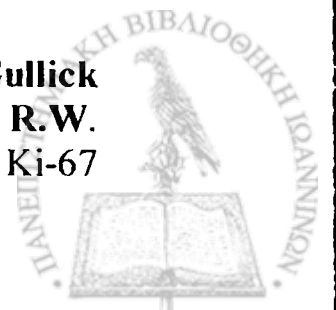
217. **Powels T, Bourne T, Athanasiou S et al.** The effects of norethisterone on endometrial abnormalities identified by transvaginal ultrasound screening of healthy postmenopausal women on tamoxifen or placebo. *Br J Cancer* 1998; 78, 272
218. **Fisher B, Constantino JP, Redmond CK et al.** Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *J Nat Cancer Inst* 1994; 86, 527
219. **Andersson M, Storm H, Mouridsen H.** Incidence of new primary cancers after adjuvant tamoxifen and radiotherapy for early breast cancer. *J Nat Cancer Inst* 1991; 83, 1013
220. **Fornander T, Rutqvist LE, Cedermark B et al.** Adjuvant tamoxifen in early breast cancer: occurrence of new primary cancers. *Lancet* 1989; I, 117
221. **Karp S, Tonin P, Begin L et al.** Influence of BRCA1 mutations on nuclear grade and estrogen receptor status of breast carcinoma in Ashkenazi Jewish women. *Cancer* 1997; 80, 435
222. **Verhoog LC, Brekelmans CTM, Seynaeve C et al.** Survival and tumour characteristics of breast-cancer patients with germline mutations of BRCA1. *Lancet* 1998; 351, 316
223. **Ludwig Breast Cancer Study Group.** Randomized trial of chemoendocrine therapy, endocrine therapy and mastectomy alone in postmenopausal patients with operable breast cancer and axillary node metastases. *Lancet*, 1984;1: 1256-1260
224. **Ludwig Breast Cancer Study Group.** A randomized trial of adjuvant combination chemotherapy, with or without prednisolone in premenopausal breast cancer patients with metastases in one to three axillary lymph nodes. *Cancer Res* 1985; 45: 4454-4459
225. **Ludwig Breast Cancer Study Group.** Chemotherapy with or without oophorectomy in high-risk premenopausal patients with operable breast cancer. *J Clin Oncol* 1985; 3: 1059-1067



226. **Contesso G., Mouriessse H., Friedman S., et al.** The importance of histologic grade in long-term prognosis of breast cancer: A study of 1010 patients, uniformly treated at the Institute Gustave-Roussy. *J Clin Oncol* 1987;5: 1378-1386
227. **Le Doussal V., Tubiana-Hulin M., Friedman S., et al.** Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR): An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer* 1989;64: 1914-1921
228. **Hanseman D.** Ueber assymetrische Zelltheilung in Epithelkrebsen und deren histologische Beteudung. *Virchow Archiv fur Pathologische Anatomie.*1890;119:299-326
229. **Hanseman D.** Ueber die Anaplasie der Geschwulstzellen und die assymetrische Mitose. *Virchows Archiv fur Pathologische Anatomie.*1892;129: 426-449
230. **Salomon A.** Beitrage zur Pathologie und klinik der Mammacarcinome. *Archiv fur klinischen Chirurgie.*1913;101: 573-668
231. **Greenough R.B.** Varying degrees of malignancy in cancer of the breast. *J of Cancer Research* 1925;9: 453-463
232. **Patey D.H. and Scharff R.W.** The position of histology in the prognosis of carcinoma of the breast. *Lancet* 1928;1:801-804
233. **Quinn CM, Wright NA.** The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J Pathol* 1990;160: 93-102
234. **Hall PA, Levison DA.** Review: assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol* 1990;43: 184-192
235. **Mason DY, Gatter KC.** The role of immunohistochemistry in diagnostic pathology. *J Clin Pathol* 1987;40: 1042-1054
236. **Franklin WA, Bibbo M, Doria MI et al.** Quantitaion of estrogen receptor content and Ki-67 staining in breast carcinoma by the micro-TICAS image analysis system. *Anal Quant Cytol Histol* 1987;9: 279-283



237. **Stumpp J., Dietl J. and Geppert M.** Growth fraction in breast carcinoma determined by Ki-67 immunostaining: correlation with pathological and clinical variables. *Gynaecol Obstet Invest* 1992;33: 47-50
238. **Veronese S.M. and Gambacorta M.** Detection of Ki-67 - proliferation rate in breast cancer. Correlation with clinical and pathologic features. *Am J Clin Pathol* 1991;95: 30-34
239. **Campani D., De-Negri F., Fabri R., Martini L., Giani C., Squartini F. and Sarnelli R.** Estrogen, progesterone receptors and proliferation activity evaluated by immunohistochemistry in breast cancer. *Int J Biol Markers* 1991;6: 144-150
240. **Di-Stefano D., Mingazzini P.L., Scucchi L., Donnetti M. and Marinozzi V.** A comparative study of histopathology, hormone receptors, peanut lectin binding, Ki-67 immunostaining, and nucleolar organizer region-associated proteins in human breast cancer. *Cancer* 1991;67: 463-471
241. **Dawson A.E., Norton J.A. and Weinberg D.S.** Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast carcinoma by image analysis and flow cytometry. *Am J Pathol* 1990; 136: 1115-1124
242. **Isola J.J., Helin H.J., Helle M.J. and Kallioniemi O.P.** Evaluation of cell proliferation in breast carcinoma. Comparison of Ki-67 immunohistochemical study, DNA flow cytometric analysis, and mitotic count. *Cancer* 1990;65: 1180-1184
243. **Lee A.K., Wiley B., Loda M., Rosari S., Dugan J.M., Hamilton W., Heatley G.J., Cook L. and Silverman M.L.** DNA ploidy, proliferation and neu-oncogene protein overexpression in breast carcinoma. *Mod Pathol* 1992;5:61-67
244. **Barbareschi M., Leonardi E., Mauri F.A., Serio G. and Palma O.** p53 and c-erb-B2 protein expression in breast carcinomas. An immunohistochemical study including correlation with receptor status, proliferating markers, and clinical stage in human breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1992;98: 408-418
245. **Nicholson R.I., McLelland R.A., Finlay P., Easton C.L., Gullick W.J., Dixon A.A., Robertson J.F.R., Ellis I.O. and Blamey R.W.** Relationship between EGF-R, c-erb-B2 protein expression and Ki-67



immunostaining in breast cancer and hormone sensitivity. *Br J Cancer* 1993;29A: 1018-1023

246. **Veronese S.M., Gambacorta M., Gottardi O., Scanzi F., Ferrari M. and Lambertico P.** Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer. *Cancer* 1993;71: 3926-3931
247. **Grem J.L.** Fluorinated pyrimidines. In: B.A. Chabner and J.M. Collins (eds.), *Cancer Chemotherapy, Principles and Practice*, pp. 180-224. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1990
248. **Danenbergh P.V.** Thymidylate synthase. A target enzyme in cancer chemotherapy. *Biochem Biophys Acta* 1977;473: 73-92
249. **Pinedo H.M., Peters G.F.** Fluorouracil: Biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol* 1988;6: 16753-16764
250. **Washtein W.L.:** Increased levels of thymidylate synthase in cells exposed to 5-fluorouracil. *Mol Pharmacol* 1984;25: 171-177
251. **Berger S.H., Chung-Her J., Johnson L.F., Berger F.G.:** Thymidylate synthase overproduction and gene amplification in fluorodeoxyuridine-resistant human cells. *Mol Pharmacol* 1987;28: 461-467
252. **Clark J.L., Berger S.L., Mittelman A., Berger F.G.:** Thymidylate synthase gene amplification in a clon tumour resistant to fluoropyrimidine chemotherapy. *Cancer Treat Rep* 1987;71: 261-265
253. **Johnston P.G., Drake J.C., Trepel J., Allegra C.J.** Immunological quantitation of thymidylate synthase using the monoclonal antibody TS 106 in 5-fluorouracil-sensitive and -resistant human cancer cell lines. *Cancer Res* 1992;52: 4306-4312
254. **Swain S.M., Lippman M.E., Egan E.F., Drake J.C., Steinberg S.M., Allegra C.J.** 5-Fluorouracil and high-dose leucovorin in previously treated patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1989;7: 890-899
255. **Chu E., Zinn S., Boarman D., Allegra C.J.** The interaction of gamma interferon and 5-fluorouracil in the H630 human colon carcinoma cell line. *Cancer Res* 1990;50: 5834-5840

