

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



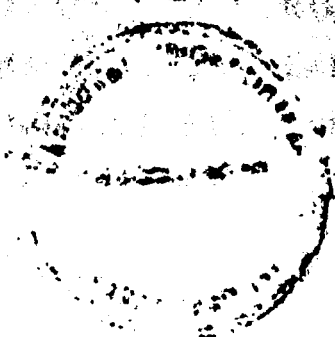
026000199798



610
AHM
2002

A

242





Αρ. π.σ.: 429.....1004

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ - ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

Διευθυντής: Η Καθηγήτρια Ν.Ι. Αγνάντη

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

ΜΕΛΕΤΗ ΝΕΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΩΣ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΩΝ
ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Ευθύμιος Σ. Δημητριάδης
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2002



Handwritten text at the top left of the page.



Rectangular box containing several lines of text, likely a header or title block.

26/2002

Rectangular box containing text and a circular stamp. The stamp has text around its perimeter and a central emblem.



Two lines of text located below the middle stamp.

Two lines of text located in the lower middle section of the page.

One line of text located below the lower middle text.

One line of text located at the bottom center of the page.



" Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα"

N.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2.



Σύνθεση της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

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

Πανδής Νικόλαος : Αναπληρωτής Καθηγητής
Ιατρικής Γενετικής
Πανεπιστημίου Lund Σουηδίας
Μέλος

Γεωργίου Ιωάννης : Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μέλος



Σύνθεση της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

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

Πανδής Νικόλαος : Αναπληρωτής Καθηγητής
Κλινικής Γενετικής
Πανεπιστημίου Lund Σουηδίας

Γεωργίου Ιωάννης : Επίκουρος Καθηγητής
Μαιευτικής-Γυναικολογίας
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καναβάρος Παναγιώτης : Καθηγητής
Ανατομίας Ιστολογίας Εμβρυολογίας
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Βαράκης Ιωάννης : Καθηγητής
Ανατομίας Ιστολογίας Εμβρυολογίας
Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Πατρών

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

Τράγκα Θεώνη : Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (ΠΔ 407/90)
Μοριακής Βιολογίας
Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής
Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης



*Στη σύζυγο μου Ελένη
και στις κόρες μου Μαριάνα και Δανάη*



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο καρκίνος του μαστού, η συχνότητα του οποίου αυξάνεται ραγδαία, είναι ο πλέον κοινός καρκίνος στις γυναίκες, και η δεύτερη αιτία θανάτου από γυναικολογικό καρκίνο.

Σε αντίθεση με τη μεγάλη σημασία του, ζητήματα που αφορούν την κατανόηση και αντιμετώπιση του παραμένουν ανοικτά. Παρά τις σημαντικές προόδους των ερευνητικών προσπαθειών, ιδιαίτερα κατά την τελευταία δεκαετία, που φωτίζουν ολοένα και περισσότερο τη βιολογική του συμπεριφορά και τη μοριακή και γενετική της βάση, ορισμένα από τα βασικά χαρακτηριστικά του δεν έχουν αποσαφηνισθεί πλήρως.

Δυο από τα χαρακτηριστικά των όγκων του μαστού που φαίνεται ότι έχουν μεγάλη σημασία για την πρόγνωση της νόσου, είναι η μεταστατική ικανότητα και ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κύτταρων του όγκου.

Για τον προσδιορισμό αυτών των χαρακτηριστικών έχουν προταθεί μια σειρά δείκτες που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα της βιολογίας των όγκων. Από αυτούς ορισμένοι μόνο καλύπτουν τα απαιτούμενα κριτήρια για την καθιέρωση της χρήσης τους στην κλινική εφαρμογή, ενώ για τους υπόλοιπους απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση.

Η παρούσα εργασία φιλοδοξεί να συμβάλει προς αυτή την κατεύθυνση με τη μελέτη ενός νέου προγνωστικού δείκτη -του ενζύμου πολυ(Α)πολυμεράση που συμμετέχει στη διαδικασία ωρίμανσης των mRNA- και μπορεί να συνεισφέρει στην εκτίμηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού και πιθανά και της μεταστατικής ικανότητας των όγκων. Παράλληλα μελετήθηκαν μια σειρά γνωστοί μοριακοί δείκτες και οι παρατηρήσεις που προέκυψαν είναι μια συμβολή στην προσπάθεια εκτίμησης της χρησιμότητας αυτών των δεικτών στον καρκίνο του μαστού

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του ερευνητικού προγράμματος ΥΠΕΡ (9427/13/9/96) της Γενικής Γραμματείας Έρευνας και Τεχνολογίας με Επιστημονικό υπεύθυνο τη Δρ. Θεώνη Τράγκα και ανάδοχο φορέα και φορέα



υλοποίησης το Κέντρο Ογκολογικής Ερευνάς «Γ. Παπανικολάου» του ΠΑΟΝΑ « Ο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ».

Από τη θέση αυτή ευχαριστώ θερμά :

Την επιβλέπουσα της διατριβής και Πρόεδρο της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Νίκη Αγνάντη, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής και Πρόεδρο της Ιατρικής Σχολής του Παν/ου Ιωαννίνων, τόσο για την ανάθεση του θέματος όσο και για τις εποικοδομητικές συμβουλές και τη βοήθειά της σε όλη τη διάρκεια της παρούσης εργασίας. Η ευρυμάθειά της γενικά, αλλά και ιδιαίτερα στον καρκίνο του μαστού σε συνδυασμό με την κατανόηση, την ευγένεια και την ευρεία αντίληψη που τη διακρίνει υπήρξαν πολύτιμος αρωγός στην προώθηση και ολοκλήρωση αυτής της ερευνητικής εργασίας.

Την Δρ. Θεώνη Τράγκα, ερευνήτρια στο τμήμα Γενετικής του Κέντρου Ογκολογικής Ερευνάς «Γ. Παπανικολάου» που σχεδίασε, οργάνωσε και επέβλεψε άμεσα αυτή την εργασία προσφέροντας πολύτιμη βοήθεια τόσο κατά την εκπόνηση-εκτέλεση όσο και κατά τη συγγραφή της διατριβής. Η διαρκής και ουσιαστική συμπαράστασή της καθώς και η θεωρητική και πρακτική βοήθεια που σε καθημερινή βάση μου προσέφερε ήταν καθοριστική για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, αλλά και για την επιτυχία σε κάθε μου προσπάθεια όλο αυτό το διάστημα.

Τον Νικόλαο Πανδή, Αναπληρωτή Καθηγητή του Παν/ου της Lund, διευθυντή του τμήματος Γενετικής και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τη βοήθειά του στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και τη συγγραφή αυτής της εργασίας. Το συνεχές ενδιαφέρον του σε συνδυασμό με τις γνώσεις και τη γενικότερη παιδεία του επηρέασαν θετικά τη συνολική ερευνητική μου προσπάθεια. Τον ευχαριστώ επίσης για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκτελέσω μέρος αυτής της εργασίας στο εργαστήριο Γενετικής.

Τον Δρ. Ιωάννη Γεωργίου, Επίκουρο Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, καθώς και όλα τα μέλη της επταμελούς επιτροπής για την προθυμία τους να κρίνουν τη διατριβή αυτή.

Την Δρ. Νέλλη Κούρτη, ερευνήτρια στο εργαστήριο Βιοχημείας του Κέντρου Ογκολογικής Ερευνάς «Γ. Παπανικολάου» για την ολόψυχη, πολύτιμη, διαρκή και καθοριστική βοήθειά της για την πραγματοποίηση αυτής της εργασίας.



Τον Δρ. Χρήστο Τσιαπάλη, διευθυντή του εργαστηρίου Βιοχημείας, που μου προσέφερε τη δυνατότητα να φέρω σε πέρας το μεγαλύτερο μέρος της εργασίας αυτής στο ως άνω εργαστήριο, όπως επίσης και για την αμέριστη υποστήριξή του.

Την Υπεύθυνη του Τμήματος Ορμονικών Υποδοχέων βιολόγο Ιουλία Γιώτη, για την προσφορά ενός σημαντικού μέρους του βιολογικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εργασία.

Την υπεύθυνη του Διαγνωστικού κέντρου ΠΡΟΛΗΨΙΣ Δρ. Ντόροθυ Βασίλαρου, για την προθυμία της να συνεργαστεί και να διαθέσει στοιχεία και υλικό για την εκτέλεση μέρους αυτής της εργασίας.

Το συνάδελφο και φίλο Δρ. Παναγιώτη Ιωαννίδη, για τη διαρκή συμπαράσταση και βοήθειά του όλα αυτά τα χρόνια.

Την Δρ. Γεωργία Μπάρδη, για τις πολύτιμες συμβουλές της και όλους τους συνάδελφους του τμήματος Γενετικής Ογκολογίας του Κέντρου Ογκολογικής Έρευνας «Γ. Παπανικολάου» που με τον ένα ή τον άλλο τρόπο βοήθησαν για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Τέλος ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Γρηγόρη Κουτούφαρη, υπεύθυνο της διαχείρισης των ερευνητικών προγραμμάτων και όλους τους συναδέλφους των υπόλοιπων τμημάτων του νοσοκομείου ΠΑΟΝΑ "Ο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ" που βοήθησαν για την ολοκλήρωση αυτού του ερευνητικού έργου.



ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	Σελίδα
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ	
A. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	1
B. ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	3
1. Οικογενειακό ιστορικό	3
2. Ορμονικοί παράγοντες	3
3. Καλοήθεις νόσοι του μαστού	4
4. Διατροφικοί παράγοντες	4
5. Περιβαλλοντικοί παράγοντες	5
Γ. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ	6
α) Ιστολογικοί τύποι	6
β) Σταδιοποίηση της νόσου	6
γ) Ο καρκίνος ως γενετική νόσος	7
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ	16
ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ	16
A. ΓΕΝΙΚΑ	16
B. ΚΛΑΣΙΚΟΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	17
1 Μέγεθος όγκου	17
2. Βαθμός ιστολογικής κακοήθειας	17
3. Διήθηση λεμφαδένων	17
4. Ορμονικοί υποδοχείς	18
5. Μιτωτικός Δείκτης	19
Γ. ΝΕΟ-ΕΦΑΡΜΟΖΟΜΕΝΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	20
1. Ρυθμός πολλαπλασιασμού	20
2. P53	21
3. c-erbB-2	22
Γ. ΔΕΙΚΤΗΣ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ	23
1. Πολυ(Α)πολυμεράση (PAP)	23



ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	25
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	26
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
1. Δείγματα όγκων και φύλαξη	26
2. Καλλιέργεια κυτταρικής σειράς MCF-7	26
3. Ομογενοποίηση δειγμάτων και συλλογή κυτταρικού εκχυλίσματος	26
4. Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεϊνών	27
5. Western blot	28
6. Μέθοδος ανίχνευσης μεταλλαγμένης P53 με ELISA	30
7. Μέτρηση της ειδικής ενεργότητας του ενζύμου πολυ(A)πολυμεράση	32
8. Μέτρηση ενεργότητας της Τελομεράσης	34
9. Προσδιορισμός Κλινικών δεικτών	36
10. Στατιστική ανάλυση	37
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	38
A. ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ	38
1. Περιγραφή του δείγματος	38
2. Έκφραση του PCNA και σχέση του με άλλες παραμέτρους στους όγκους του μαστού	39
3. Έκφραση της μεταλλαγμένης P53 και σχέση της με άλλες παραμέτρους στους όγκους του μαστού	40
4. Έκφραση της Τελομεράσης και σχέση της με άλλες παραμέτρους στους όγκους του μαστού.	41
5. Έκφραση της PAP και σχέση της με άλλες παραμέτρους στους όγκους του μαστού.	42
6. Μελέτη της PAP στην κυτταρική σειρά MCF-7. Συσχέτιση της ενεργότητας με τα επίπεδα έκφρασης	43
B. ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ	44
1. Περιγραφή του δείγματος	44
2. Έκφραση του c-erbB-2	45



3. Έκφραση της P53	46
4. Έκφραση του Bcl-2	47
5. Έκφραση του PCNA	48
6. Έκφραση της PAP	49
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	50
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	60
ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	62
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	64
SUMMARY	68
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	71
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι : ΕΙΚΟΝΕΣ	95
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ: ΠΙΝΑΚΕΣ	101
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ: ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ	123



ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

Α. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η σημασία του μαστού για τη γυναίκα και γενικότερα για τον άνθρωπο είναι πιθανόν η αιτία που από πολύ νωρίς οι παθήσεις του απασχόλησαν τους γιατρούς - ερευνητές. Έτσι το καρκίνωμα του μαστού αναφέρεται στους αιγυπτιακούς παπύρους ήδη από το 3000 π.Χ. Είναι όμως ο Ιπποκράτης και στη συνέχεια ο Γαληνός που το περιγράφουν και ασχολούνται με την αιτιολογία, πρόγνωση και θεραπεία του (1).

Στα τέλη του 17ου αιώνα ο Henri Francois Le Drog περιγράφει το καρκίνωμα του μαστού σαν εντοπισμένη νόσο, στα αρχικά της στάδια με δυνατότητα όμως μετάστασης μέσω της λεμφικής οδού, πράγμα που θεωρούσε στοιχείο κακής πρόγνωσης.

Οι πιο σημαντικές όμως παρατηρήσεις που χαρακτηρίζουν τον καρκίνο του μαστού σαν ξεχωριστό τύπο όγκου γίνονται στα τέλη του 19ου αιώνα, όταν σχετίζεται ο καρκίνος του μαστού με τη λειτουργία των ωοθηκών. Το 1889 ο Albert Schinzer προτείνει τη χρήση της ωοθηκεκτομής πριν τη μαστεκτομή, βασιζόμενος στην εκτίμηση ότι η μετεμμηνοπαυσιακή μορφή της νόσου είχε καλύτερη πρόγνωση από ότι η προεμμηνοπαυσιακή (1).

Αυτές οι πρώιμες παρατηρήσεις πάνω στην αλληλεπίδραση ωοθηκών - μαστού εξακολουθούν και σήμερα να αποτελούν ένα από τα βασικά στοιχεία πάνω στα οποία αναπτύσσεται η διάγνωση, πρόγνωση, πρόληψη και θεραπεία του καρκίνου του μαστού.

Ο καρκίνος του μαστού αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας κυρίως για τις ανεπτυγμένες χώρες, όπου εμφανίζεται σαν η συχνότερη μορφή καρκίνου στις γυναίκες και αποτελεί το 26-28% όλων των μορφών καρκίνου (2,3,4).



Σε 1/2 εκατομμύριο υπολογίζονται τα νέα κρούσματα κάθε χρόνο παγκόσμια, πράγμα που οδηγεί στην εκτίμηση ότι η ασθένεια θα έχει προσβάλει περίπου 5 εκατομμύρια γυναίκες μέσα στα επόμενα 10 χρόνια (5).

Η συχνότητα της νόσου αυξάνεται στις ανεπτυγμένες, αλλά και στις υπανάπτυκτες χώρες (3,6). Στις Η.Π.Α για παράδειγμα, η συχνότητα αυξάνεται με ποσοστά 1-2% κάθε χρόνο από το 1960, ενώ αντίστοιχα ποσοστά ισχύουν και για τις περισσότερες χώρες της Ευρώπης (3,7). Στην Ιαπωνία, που είχε και εξακολουθεί να έχει χαμηλά ποσοστά καρκίνου του μαστού, η συχνότητα της νόσου σε γυναίκες ηλικίας 35-44 χρονών διπλασιάστηκε από το 1960 ως το 1985 (8).

Παρά την αυξανόμενη συχνότητα των κρουσμάτων η θνησιμότητα από τον καρκίνο του μαστού εμφανίζεται σταθερή για τα τελευταία 50 χρόνια (7,9) με τάσεις μείωσης το τελευταίο διάστημα (10). Εξακολουθεί όμως ο καρκίνος του μαστού να αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου στις ανεπτυγμένες χώρες για τις γυναίκες ηλικίας 40-55 χρονών (9).

Η Ελλάδα - παρ' ότι τα στατιστικά στοιχεία δε θεωρούνται πλήρη - χαρακτηρίζεται μαζί με τις υπόλοιπες χώρες της Νότιας Ευρώπης (Ιταλία, Ισπανία, Γαλλία, Πορτογαλία) από χαμηλά ποσοστά καρκίνου του μαστού, που βρίσκονται περίπου στο 24%, με δείκτη θνησιμότητας περίπου 22% (11,12,13).

Γενικά σε παγκόσμιο επίπεδο, τα δεδομένα δείχνουν ότι στις ανεπτυγμένες βιομηχανικά χώρες της Δύσης τα ποσοστά εμφάνισης καρκίνου του μαστού είναι υψηλότερα από ότι στις υπανάπτυκτες χώρες, στοιχείο που παρατηρείται και στην εσωτερική κατανομή κάθε χώρας με τα αστικά βιομηχανικά κέντρα να χαρακτηρίζονται από υψηλότερα ποσοστά σε σχέση με τις αγροτικές περιοχές.



B. ΠΡΟΔΙΑΘΕΣΙΑΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

1. Οικογενειακό Ιστορικό

Η παρουσία οικογενειακού ιστορικού είναι γνωστό πως αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα προδιάθεσης για τον καρκίνο του μαστού (14).

Παρ' ότι το 1/3 των γυναικών με καρκίνο του μαστού εμφανίζεται να έχει ένα οικογενειακό ιστορικό, με έναν ή και περισσότερους συγγενείς πρώτου βαθμού με καρκίνο του μαστού, το ποσοστό των κρουσμάτων που σχετίζονται με κληρονομούμενη προδιάθεση είναι μόλις το 10% του συνολικού αριθμού των κρουσμάτων (15,16). Μέχρι σήμερα μεταλλάξεις σε 2 κυρίως γονίδια (BRCA 1 και 2 που καλύπτουν όμως μόνο τα 2/3των περιστατικών) έχουν συσχετισθεί με κληρονομούμενη προδιάθεση για καρκίνο του μαστού, ενώ έχουν περιγραφεί και μια σειρά σπάνια κληρονομούμενα καρκινικά σύνδρομα, που εμφανίζουν μεγάλο ποσοστό συσχέτισης με τον καρκίνο του μαστού (17,18,19,20).

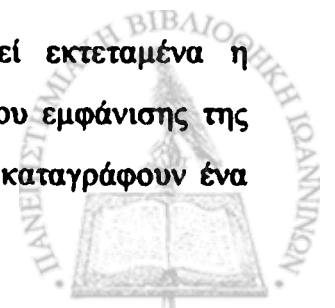
Ένα 10-20% των συνολικών κρουσμάτων στον καρκίνο του μαστού εμφανίζεται να είναι οικογενής. Τα χαρακτηριστικά που υποδεικνύουν αυξημένο κίνδυνο για οικογενή καρκίνο του μαστού είναι οι πολλαπλοί πρώτου βαθμού συγγενείς με καρκίνο του μαστού (συνήθως > 3), ιστορικό καρκίνου μαστού και ωοθηκών, ή/και ιστορικό εμφάνισης καρκίνου σε νεαρή ηλικία, ή/και ιστορικό αμφοτερόπλευρου καρκίνου του μαστού (14).

2. Ορμονικοί Παράγοντες

Είναι γνωστό ότι οι ορμόνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία του καρκίνου του μαστού (21) και ιδιαίτερα η συσσωρευτική έκθεση του μαστού στα οιστρογόνα και πιθανά και στις προγεστίνες.

Από τους παράγοντες που φαίνεται ότι σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου, επειδή επηρεάζουν τα επίπεδα, τους ρυθμούς και τη διάρκεια έκκρισης των ενδογενών ορμονών είναι: η όψιμη εμμηνόπαυση (μετά τα 55) (22), ή πρόωμη εμμηναρχή (23), η ατεκνία και η μεγάλη ηλικία (> 35) της πρώτης εγκυμοσύνης (24).

Από τους εξωγενείς ορμονικούς παράγοντες έχει μελετηθεί εκτεταμένα η πιθανότητα συμβολής των αντισυλληπτικών στην αύξηση του κινδύνου εμφάνισης της νόσου. Τα πρόσφατα στοιχεία, σε αντίθεση με παλαιότερες έρευνες, καταγράφουν ένα



υψηλότερο κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου του μαστού σε γυναίκες που έκαναν μακροχρόνια λήψη πριν από τον πρώτο τοκετό (25,26).

Οι μελέτες επίσης πάνω στη μακροχρόνια θεραπεία υποκατάστασης με οιστρογόνα αναφέρουν μικρό μεν αλλά στατιστικά σημαντικό ποσοστό αύξησης του κινδύνου (27,28).

3. Καλοήθεις νόσοι του μαστού

Οι καλοήθεις νόσοι του μαστού αντιπροσωπεύουν περίπου το 65% όλων των νοσημάτων του μαστού, με πιο συχνή την ινοκυστική μαστοπάθεια (29).

Η ινοκυστική μαστοπάθεια, σαν όρος, περιγράφει μια ποικιλία καλοήθων νοσημάτων του μαστού και η σχέση της με τον καρκίνο του μαστού έχει συζητηθεί επί χρόνια (30). Σήμερα γίνεται δεκτό ότι η επιθηλίωση των πόρων (υπερπλασία) που δε συνοδεύεται με ατυπία αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου κατά 1,9 φορές. Στην περίπτωση εμφάνισης άτυπης υπερπλασίας ο κίνδυνος αυξάνεται κατά 5,3 φορές και σε άτομα με οικογενειακό ιστορικό αυξάνεται κατά 11 φορές (31,32).

Το ινοαδένωμα, ο πιο συχνός καλοήθης όγκος του μαστού ιστορικά είχε γίνει δεκτό ότι δεν σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου του μαστού. Ωστόσο σε σπάνιες περιπτώσεις έχει συσχετισθεί με καρκίνωμα και ορισμένες μελέτες έχουν δείξει μικρό μεν αλλά στατιστικά σημαντικό κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου του μαστού (30).

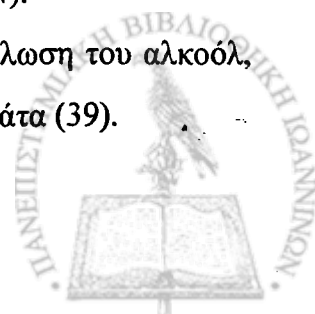
4. Διατροφικοί Παράγοντες

Οι έρευνες για τη σχέση διατροφής με τον καρκίνο του μαστού άρχισαν ήδη από τη δεκαετία του '60.

Η πιο σημαντική ένδειξη σχέσης της διατροφής με το καρκίνο του μαστού προέρχεται από μελέτες μεταναστευτικών πληθυσμών και κυρίως από την αυξανόμενη συχνότητα καρκίνου του μαστού σε Ιαπωνίδες που μετανάστευσαν στις ΗΠΑ (33).

Οι επιδημιολογικές μελέτες ενοχοποιούν την πλούσια σε θερμίδες και λίπη διαίτα χωρίς όμως να καταλήγουν σε σαφή συμπεράσματα για το ρόλο της (34).

Αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα μελετών για την κατανάλωση του αλκοόλ, καθώς και τροφών πλουσίων σε μεθυλξανθίνη όπως τσάι, καφές, σοκολάτα (39).



Ένας από τους παράγοντες που σχετίζονται με τη διατροφή και ταυτόχρονα θεωρείται ότι προδιαθέτει για καρκίνο του μαστού είναι η παχυσαρκία στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η κύρια πηγή ενδογενών οιστρογόνων μετά την εμμηνόπαυση είναι η μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρόνη στο λιπώδη ιστό (36).

5. Περιβαλλοντικοί Παράγοντες

Από τα στοιχεία του περιβάλλοντος αυτά που φαίνεται να προδιαθέτουν για καρκίνο του μαστού είναι η ιονίζουσα ακτινοβολία και η έκθεση σε χημικά ανάλογα των οιστρογόνων όπως τα εντομοκτόνα DDT και PCB, χωρίς ωστόσο να λείπουν οι αντιφάσεις από τα ευρήματα των διαφόρων ερευνών (37,38,39,40).

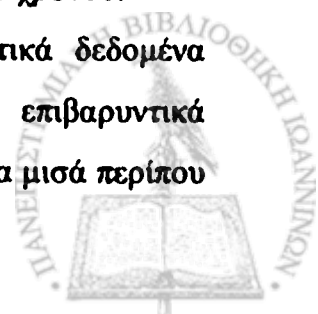
Γενικά, η διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού ανάμεσα στις αστικές - βιομηχανικές περιοχές και τις αγροτικές, οδηγεί στην εκτίμηση πως πιθανά μια σειρά περιβαλλοντολογικοί παράγοντες των αστικών περιοχών, αλλά και γενικά του τρόπου ζωής στις πόλεις αυξάνουν τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού (41).

Τα τελευταία χρόνια ένας αριθμός ερευνών έχει εστιαστεί στην αξιολόγηση πρώιμων γεγονότων, συμπεριλαμβανομένης και της ενδομήτριας έκθεσης, οι οποίοι θα μπορούσαν να αυξήσουν τον κίνδυνο για καρκίνο του μαστού στη μετέπειτα ζωή. Έτσι έχει προκύψει ότι υπάρχει σχέση ανάμεσα στην ηλικία της μητέρας κατά τον τοκετό και τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού στις θυγατέρες (42).

Παρά τη συνεχιζόμενη έρευνα, ο ακριβής ρόλος και η συμβολή όλων των προδιαθεσικών παραγόντων στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού δεν έχει αξιολογηθεί σε βαθμό που θα επέτρεπε μια συστηματική και επιλεγμένη πρόληψη. Πολύ λιγότερο κατανοητή είναι η αλληλεπίδραση και ο συνδυασμός αυτών των παραγόντων.

Η πλειοψηφία των γυναικών εκτίθεται σε ένα συνδυασμό παραγόντων που άλλοι είναι επιβαρυντικοί και άλλοι προστατευτικοί. Ταυτόχρονα η συμβολή των επιβαρυντικών παραγόντων δεν είναι γνωστό αν δρα αθροιστικά ή πολλαπλασιαστικά. Ένα άλλο στοιχείο είναι πως μια σειρά παράγοντες εμφανίζονται σαν επιβαρυντικοί για μια ομάδα γυναικών, ενώ για άλλες όχι, ενώ δεν εμφανίζουν σταθερή συσχέτιση στη διάρκεια του χρόνου.

Τέλος, η πλειοψηφία των γυναικών που με βάση τα ερευνητικά δεδομένα εμφανίζονται να ανήκουν σε μια ή περισσότερες κατηγορίες με επιβαρυντικά χαρακτηριστικά, δεν πρόκειται να αναπτύξουν καρκίνο του μαστού, ενώ τα μισά περίπου



κρούσματα εμφανίζονται σε γυναίκες που δε φαίνεται να έχουν εκτεθεί σε κανένα επιβαρυντικό παράγοντα (43,44).

Γ. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

α) Ιστολογικοί τύποι

Ο καρκίνος του μαστού είναι μια ετερογενής νόσος κλινικά, ιστοπαθολογικά και γενετικά.

Δύο μεγάλες κατηγορίες καρκινωμάτων του μαστού αναγνωρίζονται ιστολογικά σήμερα: τα μη διηθητικά *in situ* καρκινώματα και τα διηθητικά. Τα *in situ* χωρίζονται σε *in situ* πορογενή (DCIS) και *in situ* λοβιακά (LCIS).

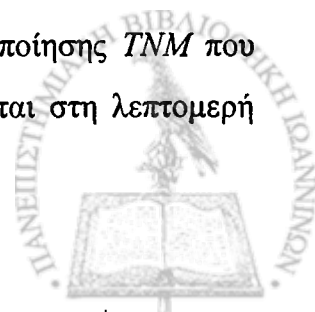
Τα τελευταία χρόνια έχουν προταθεί πάνω από 6 μέθοδοι ταξινόμησης για τα DCIS (45).

Τα διηθητικά καρκινώματα ταξινομούνται σε μια σειρά διαφορετικούς ιστολογικούς τύπους (46). Η μεγάλη πλειοψηφία τους ταξινομείται στα πορογενή, ενώ ακολουθούν με πολύ μικρότερη συχνότητα (5%) τα λοβιακά. Αυτοί οι δύο ιστολογικοί τύποι αποτελούν το 90% περίπου όλων των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού (47). Οι υπόλοιποι ιστολογικοί τύποι (ηθμοειδές, μυελοειδές, θηλώδες, σωληνώδες και βλεννώδες) είναι πιο σπάνιοι και ορισμένοι από αυτούς όταν εμφανίζονται σε αμιγή μορφή έχουν καλή πρόγνωση (48).

β) Σταδιοποίηση της νόσου

Οι μέχρι σήμερα προσπάθειες σταδιοποίησης της νόσου έχουν να κάνουν περισσότερο με την προσπάθεια εύρεσης μιας κοινής γλώσσας επικοινωνίας ανάμεσα στους ειδικούς - όσον αφορά την πρόγνωση, θεραπεία, σύγκριση των αποτελεσμάτων - και λιγότερο με τα στάδια φυσικής εξέλιξης της νόσου.

Έτσι από το 1961 και μετά υιοθετήθηκε το σύστημα σταδιοποίησης *TNM* που πρότεινε η Διεθνής Ένωση κατά του Καρκίνου (UICC) και στηρίζεται στη λεπτομερή



περιγραφή του πρωτογενούς όγκου, των επιχώριων λεμφαδένων και των απομακρυσμένων μεταστάσεων (49).

Έτσι τα καρκινώματα του μαστού κατατάσσονται σε 4 στάδια και καθένα από αυτά έχει διαφορετική πρόγνωση καθώς και διαφορετική θεραπευτική προσέγγιση (50).

Όσον αφορά τα στάδια φυσικής εξέλιξης της νόσου από τις μέχρι σήμερα παρατηρήσεις φαίνεται πως δεν υπάρχει ένα γενικό μοντέλο που να περιγράφει την εξέλιξη για όλες τις περιπτώσεις καρκίνου του μαστού. Η ετερογένεια της νόσου έχει ως ένα βαθμό σχέση και με τους διαφορετικούς τρόπους εξέλιξής της (51). Έτσι παρ' ότι υπάρχει το μοντέλο:

άτυπη υπερπλασία → καρκίνωμα *in situ* → διηθητικό → μεταστατικό υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν πως μπορεί να έχουμε - φαινοτυπικά τουλάχιστον - μετάβαση από το φυσιολογικό ιστό στο διηθητικό καρκίνωμα ή περιπτώσεις όπου άτυπες υπερπλασίες δεν μετεξελίσσονται σε καρκίνωμα (52,53,54).

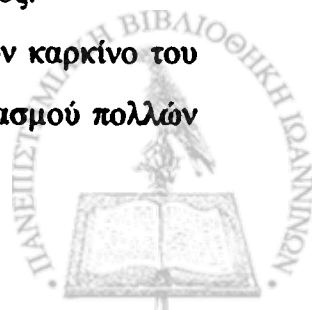
-γ) Ο καρκίνος ως γενετική νόσος

Σήμερα είναι δεδομένο πως ο καρκίνος είναι μία γενετική νόσος στο επίπεδο των σωματικών κυττάρων (55).

Μια πληθώρα δεδομένων όμως επιτρέπει μια κατ' αρχήν προσέγγιση του είδους, του αριθμού αλλά και της διαδοχής των γενετικών βλαβών που έχουν σαν συνέπεια την καρκινογένεση. Πολλές από αυτές τις γενετικές βλάβες φαίνεται να είναι κοινές στην πλειοψηφία των διαφορετικών τύπων καρκινικών κυττάρων, ενώ υπάρχουν και γενετικές βλάβες που εμφανίζονται με αυξημένη συχνότητα σε συγκεκριμένους τύπους. Οι μεταλλάξεις, είτε κληρονομούμενες είτε επίκτητες, έχουν σαν αποτέλεσμα μικρές ή μεγάλες αλλαγές στα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των κυττάρων. Το είδος και το εύρος των φαινοτυπικών αλλαγών εξαρτάται από το είδος των κυττάρων, το στάδιο διαφοροποίησης τους και το "περιβάλλον" τους.

Υπάρχουν μεταλλάξεις που μπορεί να συνδέονται με τα αρχικά στάδια της καρκινογένεσης, ενώ άλλες με πιο προχωρημένα. Ένας τέτοιος διαχωρισμός ειδικά στον καρκίνο του μαστού, με τα σημερινά τουλάχιστον δεδομένα δεν είναι εύκολος.

Η μεγάλη βιολογική και κλινική ετερογένεια που παρατηρείται στον καρκίνο του μαστού φαίνεται πως είναι συνέπεια του διαφορετικού κάθε φορά συνδυασμού πολλών



και ποικίλων γενετικών βλαβών που ενέχονται στην έναρξη και εξέλιξη της νόσου, σε συνάρτηση με το διαφορετικό περιβάλλον στο οποίο αυτές εξελίσσονται (56).

Έτσι, ενώ έχει μια κάποια εφαρμογή το γενικό μοντέλο της συνεχούς συσσώρευσης μεταλλάξεων που συμβαδίζει με την εξέλιξη της νόσου, πρέπει να τονιστεί, πως στον καρκίνο του μαστού αυτή η εικόνα εμφανίζεται πιο σύνθετη και οι εξαιρέσεις είναι συχνές.

Όσο αφορά τις κληρονομούμενες γενετικές βλάβες, που ενέχονται στο 5-10% περίπου όλων των κρουσμάτων καρκίνου του μαστού, μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί 2 γονίδια -το BRCA1 και BRCA2 -στα οποία μια σειρά μεταλλάξεων ευθύνεται για το 40-60% όλων των κληρονομούμενων μορφών καρκίνου (57). Το υπόλοιπο ποσοστό αποδίδεται σε άλλα γονίδια στα οποία κληρονομούμενες μεταλλάξεις μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε εμφάνιση καρκίνου του μαστού (58).

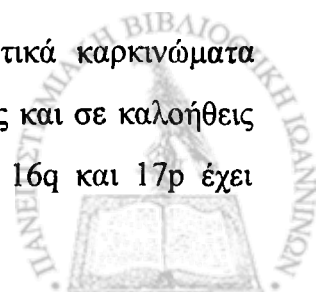
Οι πιο συχνές επίκτητες γενετικές βλάβες που παρατηρούνται στον καρκίνο του μαστού αφορούν μεγάλες ελλείψεις ή /και προσθήκες γενετικού υλικού. Η μεγάλη πλειοψηφία των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού εμφανίζει πολλαπλά παραδείγματα τέτοιων βλαβών.

Έχουν περιγραφεί 11 τουλάχιστον διαφορετικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες που παρατηρούνται επανειλημμένα στον καρκίνο του μαστού, είτε μεμονωμένες σαν μοναδικές ανωμαλίες, είτε ταυτόχρονα σαν τμήμα πιο σύνθετων ανωμαλιών (59,60).

Αυτές περιλαμβάνουν τις δομικές ανωμαλίες $der(1;16)(q10;p10)$, $i(1)(q10)$, $del(1)(q11-12)$, $del(1)(q42)$, $del(3)(p12-13 p14-21)$ και $de(16)(q21-22)$ και τις αριθμητικές αλλαγές +7,+8, +12, +18 και +20. Οι πιο συχνές χρωμοσωμικές ανισορροπίες είναι η εμφάνιση πρόσθετων χρωμοσωμάτων ή τμημάτων σκελών τους όπως των 19, 7, 8 και 20 και ελλείψεις του X, 1p, 1q, 3p, 6q, 8p, 11p, 11q, 13q, 16q, 17p, 19p, 19q, και 22.

Είναι φανερό, πως οι αλλαγές αυτές μαζί με άλλες, που δε γίνονται αντιληπτές με την κυτταρογενετική ανάλυση, έχουν σαν αποτέλεσμα τη μεταβολή της λειτουργίας ενός σημαντικού αριθμού γονιδίων, ορισμένα από τα οποία έχουν περιγραφεί (61). Τα γονίδια αυτά συμμετέχουν σε διάφορες λειτουργίες του κυττάρου π.χ. πολλαπλασιασμό, έλεγχο κυτταρικού κύκλου, μεταφορά μηνυμάτων κ.λ.π.

Μια σειρά από τις αλλαγές που παρατηρούνται στα διηθητικά καρκινώματα εμφανίζονται και σε στάδια της νόσου που θεωρούνται πρώιμα καθώς και σε καλοήθεις νόσους του μαστού (62,63,64,60). Για παράδειγμα η έλλειψη του 16q και 17p έχει



περιγραφεί στην άτυπη υπερπλασία (ADH) και οι ελλείψεις αυτές όπως και άλλες που είναι συχνές στο διηθητικό καρκίνωμα (6p, 7p, 8p, 9p, 11p, 17p) έχουν βρεθεί και σε *in situ* καρκινώματα(65). Υπάρχουν επίσης στοιχεία που δείχνουν πως αυτές όπως και άλλες γενετικές βλάβες εμφανίζονται στα πρώιμα στάδια της νόσου και διατηρούνται σ' όλη τη διάρκεια της εξέλιξής της(66). Για παράδειγμα η επέκταση του *c-myc* έχει διαπιστωθεί σε CDIS και σε παρακείμενο διηθητικό καρκίνωμα ή η υπερέκφραση του *c-erbB2* και της κυκλίνης D1 καθώς και μεταλλάξεις στο *P53* έχουν καταγραφεί σε DCIS, σε παρακείμενο διηθητικό καρκίνωμα και στη μετάσταση(67).

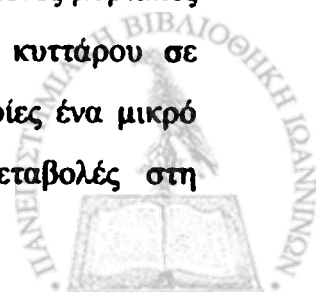
Αντίστοιχα συγκεκριμένες μεταλλάξεις του *P53* εμφανίζονται σ' όλα τα στάδια εξέλιξης της νόσου και ταυτόχρονα ο αριθμός των κυττάρων που τις φέρουν αυξάνει όσο εξελίσσεται σε διηθητική μορφή ενώ η έκφραση του *bcl-2* μειώνεται.

Σε επίπεδο χρωμοσωμικών αλλαγών υπάρχουν αλλοιώσεις που εμφανίζονται σε προκαρκινικές καταστάσεις και ταυτόχρονα και σε πιο εξελιγμένα στάδια της νόσου όπως οι *der(1;16)(q10;q10)*, *del(3p)*, *del(6p)* (68,69,70), ενώ υπάρχουν και αλλαγές που εμφανίζονται με μεγαλύτερη συχνότητα σ' ορισμένα στάδια όπως έλλειψη του 6q (10-21) και του 16q σε μη μεταστατικούς όγκους και η ελειψη του 18 σε μεταστατικούς όγκους(71).

Σε γενικές γραμμές οι γενετικές αλλαγές στο καρκίνο του μαστού συμβαίνουν αρκετά νωρίς -τα *in situ* καρκινώματα εμφανίζουν τις περισσότερες από τις αλλαγές που παρατηρούνται στα διηθητικά και μεταστατικά καρκινώματα , και οι αλλαγές αυτές διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα σε κλινικά όμοιους όγκους (72).

Είναι φανερό πως η διερεύνηση της καρκινογένεσης του μαστού απαιτεί πολύ περισσότερα δεδομένα, αλλά και επέκταση των μεθοδολογικών προσεγγίσεων. Η συνεχής εξέλιξη των τεχνικών μέσων (*microarrays*, *tissue chips*, *microdissection* κ.ά.) καθώς και η πιο εκτεταμένη χρήση της βιοπληροφορικής αναμένεται να συσσωρεύσουν την κρίσιμη μάζα δεδομένων και να επιτρέψουν στο μέλλον μια πιο ακριβή προσέγγιση του μοντέλου εξέλιξης στον καρκίνο του μαστού (73).

Ανεξάρτητα από τη μεγάλη ετερογένεια που παρατηρείται, ισχύει για τον καρκίνο του μαστού όπως και για την πλειοψηφία των καρκινωμάτων ότι συγκεκριμένες μοριακές γενετικές αλλαγές "ευθύνονται" για την εξαλλαγή ενός φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό. Η συσσώρευση αυτών των γενετικών αλλαγών -από τις οποίες ένα μικρό μέρος τους είναι γνωστό- έχουν σαν αποτέλεσμα συγκεκριμένες μεταβολές στη



φυσιολογία και δομή του κυττάρου που το καθιστούν καρκινικό. Οι μεταβολές αυτές θα μπορούσαν να συνοψιστούν στις εξής: "ανεξαρτησία" από αυξητικούς παράγοντες, έλλειψη ανταπόκρισης σε αντιπολλαπλασιαστικά μηνύματα, διαφυγή από την πορεία της απόπτωσης, δυνατότητα ατελείτητου πολλαπλασιασμού, προώθηση της αγγειογένεσης, διήθηση ιστών και μετάσταση (74).

1. "Ανεξαρτησία" από αυξητικούς παράγοντες

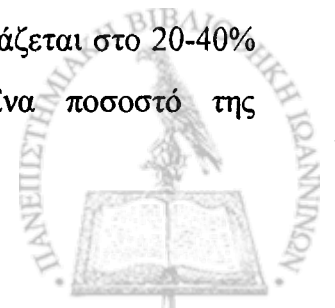
Τα φυσιολογικά κύτταρα εξαρτώνται από τη δράση αυξητικών παραγόντων πριν "μεταβούν" από την κατάσταση "ηρεμίας" (quiescence) σε μία κατάσταση ενεργού πολλαπλασιασμού. Η μετάδοση των μηνυμάτων στο κύτταρο γίνεται μέσω διαμεμβρανικών πρωτεϊνών - υποδοχέων που διεγείρονται από συγκεκριμένες ομάδες μορίων (διαλυτούς αυξητικούς παράγοντες, μόρια του εξωσκελετικού συμπλέγματος και από μόρια που διαμεσολαβούν στην πρόσδεση και αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων).

Σε μοριακό επίπεδο τρεις είναι οι γενικές μεταβολές που οδηγούν σε αυτάρκεια αυξητικών παραγόντων: αλλαγές στα επίπεδα και τη σύσταση των αυξητικών μηνυμάτων (75), αλλαγές στα επίπεδα και τη δομή των διαμεμβρανικών διακυτταρικών διαβιβαστών των μηνυμάτων (76) και αλλαγές στα μόρια που συμμετέχουν στα ενδοκυτταρικά δίκτυα που "μετατρέπουν" αυτά τα μηνύματα σε δράση (77).

Η μελέτη της δράσης των αυξητικών παραγόντων και των υποδοχέων τους στον καρκίνο του μαστού έχει δώσει μέχρι σήμερα ορισμένα στοιχεία για το σύνολο των γνωστών οικογενειών αυξητικών παραγόντων (EPGF, FGF, TGF, IGF) με πιο χαρακτηριστική ίσως την περίπτωση της δράσης των συγγενών προς τον παράγοντα αύξησης επιδερμικών κυττάρων (EGF) πεπτιδίων και των υποδοχέων τους.

Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί πάνω από 10 παράγοντες που ανήκουν σ' αυτήν την οικογένεια και 4 διαφορετικοί υποδοχείς (*erbB1-4*) (78). Η διέγερση των υποδοχέων αυτής της οικογένειας οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού **SOS-Ras-Raf-MAP** που είναι καθοριστική στην προώθηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (79).

Οι αλλαγές της έκφρασης των συγγενών προς τον EGF πεπτιδίων και των υποδοχέων τους στον καρκίνο του μαστού υποδηλώνει την συμμετοχή τους στην πορεία της καρκινογένεσης (80,81). Πιο χαρακτηριστική περίπτωση διαφορικής έκφρασης είναι αυτή των υποδοχέων c- *erbB-1* (82) και κυρίως *erbB-2* που υπερεκφράζεται στο 20-40% περίπου των σποραδικών καρκινωμάτων του μαστού (83). Ένα ποσοστό της



υπερέκφρασης του *erbB-2* οφείλεται σε επέκταση του γονιδίου ενώ το υπόλοιπο φαίνεται πως είναι αποτέλεσμα απορρύθμισης .

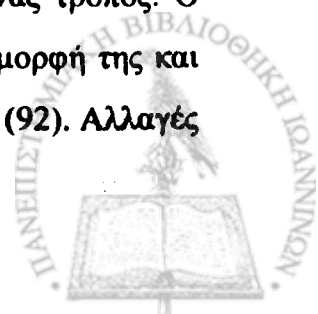
Ο υποδοχέας *erbB-2* δρα - με τα μέχρι σήμερα δεδομένα - μέσω του ετεροδιμερισμού με τους υπόλοιπους υποδοχείς της οικογένειας και κυρίως με τον *erbB-1*. Ο υποδοχέας *erbB-2* αυξάνει τη σταθερότητα του συμπλόκου και επιμηκύνει το χρόνο δράσης του που είναι η μεταφορά μηνυμάτων που οδηγούν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (84). Είναι χαρακτηριστικό επίσης πως η υπερέκφραση των *erbB-1* και *erbB-2* συνδυάζεται με φαινότυπο στον καρκίνο του μαστού ανεξάρτητο της δράσης των οιστρογόνων δηλαδή αυτόν που δεν εκφράζει υποδοχείς οιστρογόνων (85).

Οι πλέον πολύπλοκοι μηχανισμοί που οδηγούν σε ανεξαρτησία από πολλαπλασιαστικά μηνύματα σχετίζονται με αλλαγές στα κυτταροπλασματικά στοιχεία των μονοπατιών μετάδοσης των μηνυμάτων. Σε περίπου 25% των όγκων οι πρωτεΐνες Ras εμφανίζουν αλλαγές στην δομή και την έκφραση τους (86). Μεταλλάξεις αλλά και υπερέκφραση του *ras* έχουν αναφερθεί και στο καρκίνο του μαστού (87,88,89).

2. Έλλειψη ανταπόκρισης σε αντιπολλαπλασιαστικά μηνύματα

Ο πολλαπλασιασμός σε ένα φυσιολογικό ιστό ελέγχεται από μηχανισμούς με σκοπό τη διατήρηση της κυτταρικής ηρεμίας και ομοιόστασης. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν αντιπολλαπλασιαστικά μηνύματα (διαλυτά ή ενσωματωμένα στο εξωκυτταρικό σύμπλεγμα), που σταματούν τον πολλαπλασιασμό, είτε διατηρώντας τα κύτταρα σε κατάσταση ηρεμίας (G_0 φάση) είτε οδηγώντας στην τελική διαφοροποίηση. Τα καρκινικά κύτταρα για να πολλαπλασιάζονται και να εξελίσσονται πρέπει να παρακάμψουν αυτούς τους μηχανισμούς.

Σε μοριακό επίπεδο το σύνολο σχεδόν των αντιπολλαπλασιαστικών μηνυμάτων μεταδίδεται στο κύτταρο μέσω του μονοπατιού της Rb πρωτεΐνης και των ομολόγων της P107 και P130 (90). Η Rb πρωτεΐνη στην ενεργή της μορφή αναστέλλει τη μετάβαση των κυττάρων από την G_1 στην S φάση. Η διατάραξη της λειτουργίας του μονοπατιού αυτού στον καρκίνο του μαστού γίνεται με διάφορους τρόπους (91). Οι αλλαγές στην έκφραση και η ενεργοποίηση του TGF- β και του υποδοχέα του TGF-11R είναι ένας τρόπος. Ο TGF- β συντηρεί την Rb πρωτεΐνη στην υποφωσφορυλιωμένη και ενεργή μορφή της και αποτρέπει τη μετάβαση του κυττάρου από την G_1 στην S φάση του κύκλου (92). Αλλαγές



έχουν σημειωθεί και στην έκφραση της Rb πρωτεΐνης (LOH στο 13p14 στο 25% των όγκων), η έκταση όμως και η σημασία τους δεν έχει διερευνηθεί επαρκώς.

Σημαντικό ρόλο στην απορρύθμιση αυτού του μονοπατιού παίζουν οι κυκλίνες. Η κυκλίνη D1 σχηματίζει σύμπλοκα με τις κινάσες πρωτεϊνών Cdk4 και Cdk6 που φωσφορυλιώνουν την Rb πρωτεΐνη, την αδρανοποιούν και επιτρέπουν τη μετάβαση του κυττάρου από την G1 στην S φάση του κύκλου (93). Το γονίδιο της κυκλίνης D1 παρουσιάζει επέκταση (amplification) στο 15-20% των όγκων του μαστού, και υπερεκφράζεται στο 35-50% περίπου των όγκων. Η κυκλίνη E που έχει αντίστοιχο με την κυκλίνη D ρόλο, υπερεκφράζεται στο 25% περίπου των όγκων (94).

Στον καρκίνο του μαστού αλλαγές επίσης παρατηρούνται και στην έκφραση των αναστολέων των κινασών πρωτεϊνών Cdk, όπως της p16 (της οικογένειας των Ink4) (95) και p21, p27, p57 (της οικογένειας των Cip/kip) (96).

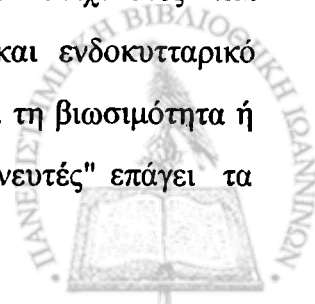
Η διαφυγή από την τελική διαφοροποίηση είναι ένας μηχανισμός που χρησιμοποιούν τα καρκινικά κύτταρα προκειμένου να διατηρήσουν τη δυνατότητα του πολλαπλασιασμού. Ένας από τους τρόπους αναστολής της διαφοροποίησης επιτυγχάνεται μέσω της δράσης του *c-myc* ογκογονιδίου, που κωδικοποιεί έναν παράγοντα μεταγραφής. Στη διάρκεια της φυσιολογικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης του κυττάρου η δράση του *c-myc* είναι αυστηρά ελεγχόμενη και συνδυάζεται με έναν άλλο παράγοντα τον Max (97). Στους όγκους του μαστού παρατηρείται έκτοπη έκφραση του *c-myc*, που στο 20-30% των καρκινωμάτων οφείλεται σε γονιδιακή επέκτασή του (98,99).

3. Διαφυγή από τη διαδικασία της απόπτωσης

Η ικανότητα του πληθυσμού των καρκινικών κυττάρων να αυξάνονται δεν είναι μόνο αποτέλεσμα της αύξησης του ρυθμού πολλαπλασιασμού αλλά και της μείωσης του ρυθμού φθοράς. Ο βασικός μηχανισμός φθοράς των φυσιολογικών κυττάρων είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος – απόπτωση (100).

Η διαφυγή από την απόπτωση είναι ένα βασικό χαρακτηριστικό όλων σχεδόν των τύπων καρκινικών κυττάρων.

Στο μοριακό μηχανισμό της απόπτωσης συμμετέχουν μόρια "ανιχνευτές" και μόρια "εκτελεστές". Οι "ανιχνευτές" ελέγχουν το εξωκυτταρικό και ενδοκυτταρικό περιβάλλον για αποκλίσεις από το φυσιολογικό που είναι κρίσιμες για τη βιωσιμότητα ή όχι του κυττάρου. Η μετάδοση "μηνυμάτων" δράσης από τους "ανιχνευτές" επάγει τα



μόρια "εκτελεστές" που με μια σειρά ενεργειών οδηγούν το κύτταρο στο θάνατο μέσω της απόπτωσης.

Στον καρκίνο του μαστού από τις πιο σημαντικές αλλαγές μορίων που αφορούν την ομάδα των "ανιχνευτών" είναι οι αλλαγές στην έκφραση και τη δομή της *P53*, μιας πρωτεΐνης με κεντρικό ρόλο στο μονοπάτι της απόπτωσης.

Στο καρκίνο του μαστού αλλαγές στα επίπεδα της πρωτεΐνης έχουν βρεθεί στο 25-50% των όγκων ενώ στη δομή - σαν αποτέλεσμα γονιδιακών μεταλλάξεων - στο 15-30% περίπου (101,102).

Η έκφραση της *bcl-2*, μιας μιτοχονδριακής πρωτεΐνης που συμμετέχει στον μηχανισμό καταστολής της απόπτωσης μέσω της συνεργασίας με άλλους παράγοντες (103) έχει στον καρκίνο του μαστού, μια ιδιαίζουσα σημασία, γιατί η έκφραση της τείνει να μειώνεται όσο εξελίσσεται η νόσος (από 79-91% στα *in situ* σε 45-79% στα διηθητικά καρκινώματα) (104).

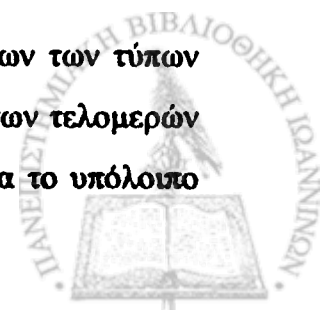
• 4. Δυνατότητα ατελείτητου πολλαπλασιασμού

Η έρευνα των τελευταίων 30 χρόνων έχει δείξει πως η πλειοψηφία (αν όχι το σύνολο) των κυττάρων φέρουν έναν εσωτερικό αυτόνομο μηχανισμό που περιορίζει τον αριθμό των διαιρέσεων που μπορούν να υποστούν. Η απορύθμιση αυτού του μηχανισμού είναι πιθανά προϋπόθεση για τη δημιουργία των όγκων (105).

Ένας από αυτούς τους μηχανισμούς λειτουργεί μέσω του ελέγχου του μήκους των τελομερών. Τα τελομερή αποτελούνται από αρκετές χιλιάδες επαναλήψεις μιας αλληλουχίας 6 βάσεων. Σε κάθε διπλασιασμό του κυττάρου 50-100 βάσεις χάνονται από τον αρχικό αριθμό με αποτέλεσμα την προοδευτική μείωση του μήκους των τελομερών. Αυτή η απώλεια οδηγεί τελικά σε αδυναμία των τελομερών να προστατέψουν τα άκρα του χρωμοσωμικού DNA.

Η απώλεια της προστασίας των χρωμοσωμικών άκρων οδηγεί σε αστάθεια των χρωμοσωμάτων και τελικά σε καρυοτυπική αποδιοργάνωση που σχετίζεται με μια κατάσταση του κυττάρου που ονομάζεται κρίση και χαρακτηρίζεται από μαζικό κυτταρικό θάνατο (106).

Η διατήρηση του μήκους των τελομερών είναι χαρακτηριστικό όλων των τύπων των καρκινικών κυττάρων (107). Στο 85%-90% η διατήρηση του μήκους των τελομερών επιτυγχάνεται με έκτοπη έκφραση του ενζύμου τελομεράσης (108) ενώ για το υπόλοιπο



ποσοστό φαίνεται πως λειτουργεί ένας μηχανισμός που επιτρέπει τη διατήρηση του μήκους των τελομερών, πάνω από ένα κρίσιμο όριο, μέσω χρωμοσωμικού ανασυνδυασμού (109).

Περίπου το 80-90% των διηθητικών όγκων του μαστού εμφανίζει αυξημένη ενεργότητα του ενζύμου της τελομεράσης, ενώ σπάνια ανιχνεύεται σε καλοήθεις όγκους και ακόμη σπανιότερα σε υπερπλασίες (110,111). Η παρατήρηση πως ένα 40-60% των *in situ* καρκινωμάτων εμφανίζει αυξημένη ενεργότητα της τελομεράσης συνηγορεί στην άποψη πως αυτό είναι ένα σχετικά πρώιμο γεγονός στην καρκινογένεση του μαστού (112).

5. Προώθηση της Αγγειογένεσης

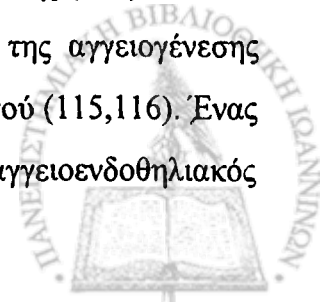
Η προμήθεια οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών μέσω των αιμοφόρων αγγείων είναι κρίσιμος παράγοντας για τη λειτουργία και επιβίωση όλων των κυττάρων. Το γεγονός αυτό καθιστά απαραίτητη τη γειννίαση (σε απόσταση μικρότερη από 100 μm) όλων σχεδόν των κυττάρων ενός ιστού με ένα τριχοειδές αιμοφόρο αγγείο. Στη διάρκεια της οργανογένεσης αυτή η γειννίαση επιτυγχάνεται με την συνδυασμένη ανάπτυξη των αγγείων και του παρεγχύματος. Μετά την τελική διαμόρφωση των ιστών η ανάπτυξη νέων αγγείων ελέγχεται και ρυθμίζεται αυστηρά.

Εξαιτίας αυτής της "εξάρτησης" από τα παρακείμενα αγγεία γίνεται φανερό πως τα καρκινικά κύτταρα που πολλαπλασιάζονται μέσα σ' έναν ιστό πρέπει να έχουν την ικανότητα να επάγουν και να προωθούν το σχηματισμό αγγείων έτσι ώστε να διευκολύνουν την εξάπλωσή τους(113).

Τα μέχρι σήμερα δεδομένα της έρευνας δείχνουν πως αυτή η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων είναι ένα πρώιμο σχετικά γεγονός στην καρκινογένεση και είναι αυτό που ουσιαστικά θα επιτρέψει τη γρήγορη αύξηση των κυττάρων και το σχηματισμό μακροσκοπικά ορατού όγκου.

Ο έλεγχος της αγγειογένεσης επιτυγχάνεται μέσω της δράσης παραγόντων που την προωθούν και παραγόντων που την αναστέλλουν. Η ανατροπή της ισορροπίας αυτών των παραγόντων μπορεί να οδηγήσει στην "ενεργοποίηση" της αγγειογένεσης (114).

Αρκετοί από τους παράγοντες που ενέχονται στον έλεγχο της αγγειογένεσης εμφανίζουν αλλαγμένη ή αλλοιωμένη έκφραση στον καρκίνο του μαστού (115,116). Ένας από τους πλέον μελετημένους αγγειογενετικούς παράγοντες είναι ο αγγειοενδοθηλιακός



παράγων VEGF. Η ανίχνευση του VEGF στους πορογενείς όγκους του μαστού αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα. Ανασταλτικός για την αγγειογένεση παράγοντας είναι η θρομβοσπονδίνη-1 (117) που ενεργοποιείται από το ογκοκατασταλτικό γονίδιο P53 (118). Στους καρκίνους παρατηρείται απώλεια έκφρασης της θρομβοσπονδίνης-1.

6. Διήθηση ιστών και Μετάσταση

Αργά ή γρήγορα στη διάρκεια της εξέλιξης των περισσότερων όγκων, κύτταρα από τον πρωτογενή όγκο διηθούν τους παρακείμενους ιστούς και στη συνέχεια μετακινούνται σε απομακρυσμένα σημεία όπου μπορεί να οδηγήσουν στη δημιουργία νέων όγκων - μεταστάσεων. Η απόκτηση από μέρους των καρκινικών κυττάρων αυτής της ικανότητας απαιτεί μια σειρά αλλαγές που μόνο ένα μικρό μέρος τους είναι κατανοητό με τα μέχρι τώρα δεδομένα.

Σε μηχανιστικό επίπεδο η διήθηση και η μετάσταση είναι στενά συνδεδεμένες διαδικασίες και απαιτούν παρόμοιες αλλαγές που σε γενικές γραμμές περιλαμβάνουν αλλαγές στη φυσική σύνδεση-συνοχή των κυττάρων με το μικροπεριβάλλον τους και στην ενεργοποίηση εξωκυτταρικών πρωτεασών.

Από τα μόρια που διαμεσολαβούν στη συνοχή των κυττάρων μεταξύ τους (CAMs, cell adhesion molecules) αλλαγές έχουν διαπιστωθεί σε μέλη της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών (119) και της οικογένειας των καντχερινών (cadherins) (120), ενώ στα μόρια σύνδεσης με το εξωκυτταρικό σύμπλεγμα, οι αλλαγές εντοπίζονται στις ιντεγκρίνες (integrins) (121). Οι πλέον μελετημένες αλλαγές αφορούν την έκφραση και λειτουργία της E-καντχερίνης, μιας πρωτεΐνης που απουσιάζει από την πλειοψηφία των επιθηλιακών όγκων (120).

Οι εξωκυτταρικές πρωτεάσες δρουν μεταβάλλοντας τη δομή διαφόρων παραγόντων, οι οποίοι με μια σειρά μηχανισμών επιτρέπουν τη διήθηση και την μετακίνηση των καρκινικών κυττάρων διαμέσου των αιμοφόρων αγγείων (122,123).



ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ

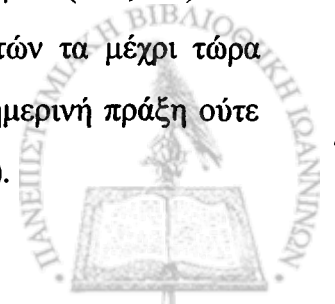
A. ΓΕΝΙΚΑ

Η μεγάλη ετερογένεια που εμφανίζει ο καρκίνος του μαστού κατέστησε αναγκαία την αναζήτηση και χρήση μιας σειράς παραμέτρων, που αφορούν τον όγκο αλλά και τους ασθενείς, και μπορούν να συνεισφέρουν στην πρόγνωση της κλινικής πορείας της νόσου - προγνωστικοί δείκτες - όσο και στην επιλογή της πλέον αποτελεσματικής θεραπευτικής προσέγγισης - προβλεπτικοί δείκτες.

Ένα μεγάλο κομμάτι της έρευνας στον καρκίνο του μαστού τις τελευταίες δεκαετίες έχει στραφεί στην αναζήτηση και μελέτη προγνωστικών και προβλεπτικών δεικτών. Ταυτόχρονα η εξέλιξη των θεραπευτικών προσεγγίσεων και η εκτεταμένη χρήση της συμπληρωματικής θεραπείας (adjuvant therapy) έχουν συμβάλλει στην αλλαγή του τρόπου προσέγγισης της χρησιμότητας των προγνωστικών δεικτών.

Έτσι εκτός από τις πληροφορίες που παρέχουν για την φυσική πορεία της νόσου σε τρεις τουλάχιστον περιπτώσεις ο προσδιορισμός των προγνωστικών δεικτών αποδεικνύεται σήμερα σημαντικός. Η πρώτη είναι στο να διαχωριστούν οι ασθενείς των οποίων η πρόγνωση είναι τόσο καλή, ώστε η συμπληρωματική θεραπεία να μην είναι γι' αυτούς ουσιαστικά ωφέλιμη. Η δεύτερη είναι στο να εντοπιστούν ασθενείς με τόσο αρνητική πρόγνωση ώστε να απαιτείται μια πιο επιθετική συμπληρωματική θεραπεία. Και τέλος, είναι η δυνατότητα να αναγνωρισθούν οι ασθενείς που μπορεί να έχουν καλύτερη ανταπόκριση ή να παρουσιάζουν αντοχή σε συγκεκριμένα θεραπευτικά σχήματα (124).

Εκτός από τους "κλασικούς" προγνωστικούς δείκτες που αφορούν την κλινική εικόνα και μορφολογία του καρκινώματος του μαστού (σύστημα TNM, ιστολογικός τύπος, βαθμός κακοήθειας, ιστορικό ασθενούς) υπάρχει μια μεγάλη σειρά νέων δεικτών από τους οποίους ορισμένοι μόνο έχουν σχεδόν καθολική χρήση όπως, οι ορμονικοί υποδοχείς, το ογκογονίδιο *c-erbB-2*, και οι δείκτες πολλαπλασιασμού (125,126). Για την πλειοψηφία των υπολοίπων προτεινόμενων προγνωστικών δεικτών τα μέχρι τώρα διαθέσιμα δεδομένα δεν επαρκούν για την εφαρμογή τους στην καθημερινή πράξη ούτε για τη συμμετοχή τους στη διαδικασία σχεδιασμού της θεραπείας (127).



B. ΚΛΑΣΙΚΟΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

1. Μέγεθος όγκου –ιστολογικός τύπος

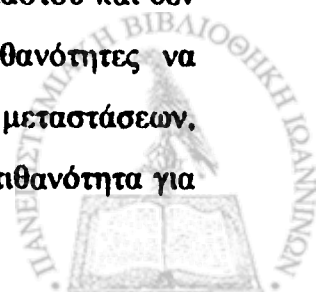
Το μέγεθος του πρωτογενή όγκου αντανακλά ως ένα βαθμό το χρόνο εξέλιξης της νόσου και παρότι συσχετίζεται με την κατάσταση και τον αριθμό των θετικών λεμφαδένων, αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη. Υπάρχει άμεση θετική συσχέτιση με την πιθανότητα ανάπτυξης μεταστάσεων, αλλά και με το χρόνο μέχρι την επιδείνωση ο οποίος βραχύνεται όσο αυξάνει το μέγεθος του όγκου (131). Ο ιστολογικός τύπος του καρκινώματος αποτελεί προγνωστικό παράγοντα. Τα ειδικού τύπου καρκινώματα (βλεννώδες, θηλώδες σωληνοειδές, μυελοειδές, αδενοκυστικό) σε αμιγή μορφή έχουν ευνοϊκή πρόγνωση (132).

2. Βαθμός ιστολογικής κακοήθειας

Ο βαθμός ιστολογικής κακοήθειας (Grading) αποτελεί αναγνωρισμένο παράγοντα προγνωστικής σημασίας στον καρκίνο του μαστού με κλινική εφαρμογή. Το σύστημα σύνθετης διαβάθμισης όπως προτάθηκε από τους Bloom και Richardson και βελτιώθηκε περαιτέρω από τους Elston και Ellis (133, 133α) βασίζεται σε συνδυασμένη εκτίμηση του βαθμού πυρηνικής ατυπίας, της μιτωτικής δραστηριότητας και της αρχιτεκτονικής διαμόρφωσης του όγκου. Σύμφωνα με αυτό οι όγκοι διακρίνονται σε καλής διαφοροποίησης (Grade I), μέτριας διαφοροποίησης (Grade II) και χαμηλής διαφοροποίησης (Grade III). Ο βαθμός διαφοροποίησης του όγκου αποτελεί σημαντικό προγνωστικό δείκτη ιδιαίτερα όταν συνδυάζεται με το μέγεθος του όγκου και την κατάσταση των λεμφαδένων (134).

3. Διήθηση λεμφαδένων

Ο καλύτερα τεκμηριωμένος και ευρύτερα χρησιμοποιούμενος προγνωστικός δείκτης στον καρκίνο του μαστού είναι η ύπαρξη ή όχι καθώς και ο αριθμός των διηθημένων επιχώριων λεμφαδένων. Οι γυναίκες που έχουν καρκίνο του μαστού και δεν εμφανίζουν διήθηση των μασχάλιαων λεμφαδένων έχουν 70-80% πιθανότητες να επιβιώσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα (10-15 χρόνια) χωρίς εμφάνιση μεταστάσεων, ενώ οι ασθενείς με θετικούς για διήθηση λεμφαδένες έχουν περίπου 80% πιθανότητα για



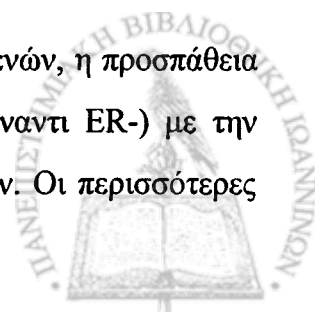
εμφάνιση απομακρυσμένων μεταστάσεων μέσα σε σύντομο διάστημα. Και στις δύο κατηγορίες εμφανίζονται διαφοροποιήσεις όσον αφορά το χρόνο επιβίωσης χωρίς μεταστάσεις και το συνολικό χρόνο επιβίωσης (128). Επίσης όσο μεγαλύτερος είναι αυτός ο αριθμός των διηθημένων λεμφαδένων τόσο αυξάνονται οι πιθανότητες υποτροπής και μειώνεται η συνολική επιβίωση (129,130).

4. Ορμονικοί υποδοχείς

Οι υποδοχείς οιστρογόνων ανήκουν στην υπερ-οικογένεια των στεροειδικών υποδοχέων και λειτουργικά αποτελούν στεροειδοεξαρτώμενους παράγοντες μεταγραφής (135). Έχουν βρεθεί δύο γονίδια που κωδικοποιούν την παραγωγή των οιστρογονικών υποδοχέων το ESRΑ (136) που κωδικοποιεί τον ERα και ESRB που κωδικοποιεί τον ERβ (137), ενώ έχουν βρεθεί άλλα 3 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με σημαντική ομολογία με τους υποδοχείς οιστρογόνων. Οι ERα και ERβ έχουν 96% ομολογία στην περιοχή σύνδεσης με το DNA και 58% στην περιοχή σύνδεσης με τα οιστρογόνα. Η έκφρασή τους στους διάφορους ιστούς αλληλοκαλύπτεται αλλά είναι διαφορετική. Στο φυσιολογικό μαστό αλλά και στον καρκίνο του μαστού έχουν βρεθεί και οι δύο μορφές αν και οι ERβ έχουν βρεθεί σε ποσοστό μικρότερο από τους ERα (138).

Πολλαπλές διαφορετικές παραλλαγές των ERα και ERβ έχουν βρεθεί στο φυσιολογικό μαστό, σε καρκινικές σειρές του μαστού και στους όγκους του μαστού. Οι παραλλαγές αυτές είναι λειτουργικές και συχνά έχουν ανταγωνιστική δράση μεταξύ τους, και ορισμένες από αυτές θεωρείται πιθανό ότι σχετίζονται με την ορμονοαπόκριση των όγκων (139). Μια σειρά μεταλλάξεις έχουν παρατηρηθεί στα γονίδια των οιστρογονικών υποδοχέων ορισμένες από τις οποίες έχουν σαν αποτέλεσμα τη σύνθεση υποδοχέων που είναι ενεργοί χωρίς τη σύνδεση των οιστρογόνων. Οι μορφές αυτές εμφανίζονται σε όγκους και γνωστές καρκινικές σειρές που με τις κλασικές μεθόδους ανίχνευσης εμφανίζονται να μην έχουν οιστρογονικούς υποδοχείς. Η δράση ορισμένων από αυτούς τους υποδοχείς αναστέλλεται από τα αντι-οιστρογόνα και έτσι πιθανά ερμηνεύεται το φαινόμενο της απάντησης σε αντι-οιστρογονική θεραπεία ενός ποσοστού από τους θεωρούμενους ως μη ορμονοεξαρτώμενους όγκους (140).

Παρά την εκτενή μελέτη που έχει γίνει σε μεγάλες σειρές ασθενών, η προσπάθεια συσχέτισης της κατάστασης των οιστρογονικών υποδοχέων (ER+ έναντι ER-) με την πρόγνωση δεν έχει δείξει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων. Οι περισσότερες



μελέτες σημειώνουν μια μικρή αλλά υπαρκτή διαφορά στο ελεύθερο νόσου διάστημα και στη συνολική επιβίωση υπέρ των ασθενών με θετικούς υποδοχείς.

Η κύρια χρησιμότητα του προσδιορισμού των ER είναι η σημασία τους ως προβλεπτικού παράγοντα για την ανταπόκριση στην ορμονική θεραπεία.

Η μέτρηση της συγκέντρωσης των υποδοχέων προγεστερόνης, που καθορίζουν την ανταπόκριση των κυττάρων του μαστού στις προγεστίνες, χρησιμοποιείται σαν συμπληρωματικός των υποδοχέων οιστρογόνων δείκτης σε σχέση με την πρόγνωση και την πρόβλεψη της ανταπόκρισης στην ορμονοθεραπεία (141). Έχει αναφερθεί πως οι όγκοι που είναι αρνητικοί για υποδοχείς προγεστερόνης έχουν χειρότερη πρόγνωση και μειωμένη ανταπόκριση στην ορμονοθεραπεία ιδίως αν είναι ταυτόχρονα αρνητικοί για υποδοχείς οιστρογόνων (142,143).

Η συγκεντρωτική ανάλυση των αποτελεσμάτων από 133 τυχαιοποιημένες μελέτες που έγινε από το Early Breast Cancer Trialists Colaborative Group (EBCTG) το 1992 (144), έδειξε ότι η χορήγηση του αντιοιστρογόνου ταμοξιφένη σε ασθενείς με θετικούς υποδοχείς οιστρογόνων μειώνει τις πιθανότητες υποτροπής κατά 26% και θανάτου κατά 25% ανά έτος. Αντίστοιχα ποσοστά μείωσης υποτροπών και θανάτου αναφέρονται και με την μαστεκτομή στους ασθενείς < 50 χρόνων. Επίσης διαπιστώθηκε ότι η ταμοξιφένη μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου στον άλλο μαστό κατά 39%.

Όσον αφορά την ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία η τελευταία αναδρομική ανάλυση του EBCTG το 1998(145) που αφορά όλες τις τυχαιοποιημένες μελέτες που ξεκίνησαν ως το 1990 δε διαπιστώνει σημαντικές διαφορές στην ανταπόκριση μεταξύ ασθενών με θετικούς και αρνητικούς υποδοχείς.

5. Μιτωτικός Δείκτης

Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων του όγκου θεωρείται σαν ένας σημαντικός προγνωστικός δείκτης στον καρκίνο του μαστού. Είναι όμως φανερό πως απόλυτη μέτρηση του ρυθμού αύξησης δεν είναι εφικτή και γι' αυτό έχουν προταθεί και εφαρμόζονται μια σειρά μεθοδολογικές προσεγγίσεις για την εκτίμησή του, χωρίς ωστόσο να λείπουν οι αντιφάσεις ανάμεσα στα ευρήματα αυτών των μεθόδων (146).

Η πιο παλιά, η πιο απλή και σχεδόν καθολικά εφαρμοζόμενη μέθοδος είναι η μέτρηση του αριθμού των μιτώσεων σε ιστοπαθολογικές τομές ρουτίνας. Ο αριθμός των μιτώσεων - που εκφράζεται σαν αριθμός ανά 10 μεγάλης μεγέθυνσης πεδία ή ανά 1000



κύτταρα - έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με την πρόγνωση (147). Η κριτική της μεθόδου εστιάζεται στην υποκειμενικότητα της αναγνώρισης των μιτώσεων, στις διαφορές στα πρωτόκολλα μέτρησης και σε τεχνικούς παράγοντες που επηρεάζουν το αποτέλεσμα (πάχος τομής, χρόνος μονιμοποίησης, ετερογένεια της κατανομής των μιτώσεων στον όγκο). Η ανάγκη για πιο αντικειμενική και επαναλήψιμη μέθοδο οδήγησε στην αναζήτηση και άλλων προσεγγίσεων που θα μπορούσαν να εκτιμήσουν τον ρυθμό πολλαπλασιασμού του όγκου, που θα αναφερθούν διεξοδικά στην επόμενη ενότητα.

Γ. ΝΕΟ-ΕΦΑΡΜΟΖΟΜΕΝΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

1. Ρυθμός πολλαπλασιασμού

Μια μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε κυρίως σε ερευνητικά εργαστήρια είναι η μέτρηση της ενσωμάτωσης ραδιενεργού θυμιδίνης (TLI) ή του αναλόγου της - βρομοδεοξουριδίνης - στα κύτταρα του όγκου. Ο δείκτης ενσωμάτωσης (TLI) εμφανίζεται να έχει συσχέτιση με την πρόγνωση καθώς και με την ανταπόκριση στην πολυ-χημειοθεραπεία (148). Είναι όμως σαν μεθοδολογία δύσκολη και απαιτεί φρέσκο υλικό, πράγματα που την καθιστούν δυσκολοεφάρμοστη για εργαστήρια ρουτίνας.

Ο προσδιορισμός του κλάσματος του πληθυσμού κυττάρων που βρίσκεται στην συνθετική φάση (S-phase fraction, SPF) με κυτταρομετρία ροής, είναι μια μέθοδος που αναπτύχθηκε την τελευταία δεκαετία, και χρησιμοποιείται ως δείκτης του ρυθμού πολλαπλασιασμού. Σε γενικές γραμμές οι μελέτες δείχνουν πως υψηλό SPF σχετίζεται με υψηλό βαθμό κακοήθειας (Grade) απουσία ορμονικών υποδοχέων, μεγάλο μέγεθος όγκου και θετικούς επιχώριους λεμφαδένες. Υψηλό SPF σχετίζεται επίσης με κακή πρόγνωση όσον αφορά την εμφάνιση υποτροπών και την συνολική επιβίωση (149). Ωστόσο η κυτταρομετρία ροής απαιτεί ακριβό και ευαίσθητο εξοπλισμό και σύνθετα πρωτόκολλα, ενώ μπορεί να δώσει αποκλίνοντα αποτελέσματα, ανάλογα με το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων στο δείγμα. Ο υπολογισμός επίσης του SPF στην περίπτωση παρουσίας ανευπλοειδικών καρκινικών κυττάρων στο δείγμα είναι προβληματικός ενώ σε μερικές περιπτώσεις δεν είναι δυνατή η μέτρησή του (150).

Η ανίχνευση πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους είναι η πιο πρόσφατη εξέλιξη στις προσπάθειες μέτρησης του ρυθμού πολλαπλασιασμού των όγκων του μαστού.

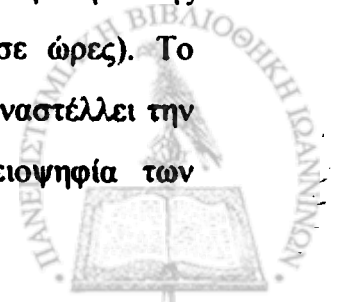


Το μονοκλωνικό αντίσωμα MIB1 ανιχνεύει μία όχι πλήρως χαρακτηρισμένη μη-ιστονική πρωτεΐνη την Ki67 η οποία είναι παρούσα σ' όλες τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου εκτός της G_0 και της πρώιμης G_1 (151). Η θετική για το Ki67 σήμανση των όγκων σχετίζεται σχετικά καλά με άλλους δείκτες του ρυθμού πολλαπλασιασμού όπως τον TLI, τον SPF και τον μιτωτικό δείκτη. Σχετίζεται επίσης και με ορισμένους από τους κλασικούς προγνωστικούς δείκτες όπως το Grade και τους ορμονικούς υποδοχείς. Μια σειρά εργασίες δείχνουν επίσης συσχέτιση της θετικότητας για Ki67 με αρνητική πρόγνωση (152).

Μια άλλη πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ανιχνεύεται και σε τομές παραφίνης είναι το proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Το PCNA είναι μια μη-ιστονική πρωτεΐνη που δρα σαν συν-παράγοντας της πολυμεράσης δ και τα επίπεδα σύνθεσής της σχετίζονται με το ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού και σύνθεσης του DNA (153). Στον κυτταρικό κύκλο εμφανίζεται να συσσωρεύεται στον πυρήνα στο τέλος της G_1 και την S φάση. Τα επίπεδα του PCNA έχει βρεθεί ότι σχετίζονται με τον TLI και ασθενώς με το SPF (146). Η συσχέτισή του με το Grade και τον μιτωτικό δείκτη είναι αμφισβητήσιμη. Όμως μια σειρά εργασίες έχουν δείξει συσχέτιση της παρουσίας PCNA και κακής πρόγνωσης (154,155).

2. P53

Το γονίδιο P53 κωδικοποιεί μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη, με μοριακό βάρος 53 kDa, της οποίας η βασική φυσιολογική λειτουργία είναι η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, μέσω του ελέγχου της δομικής ακεραιότητας του DNA (156). Εάν το DNA παρουσιάζει βλάβες τότε τα επίπεδα της P53 αυξάνονται και το κύτταρο "σταματά" στην G_1 φάση για την επιδιόρθωση των βλαβών. Μια σειρά εργασίες δείχνουν πως σε συγκεκριμένες περιπτώσεις, όπως ανεπιδιόρθωτες βλάβες στο DNA, υποξεία ή ενεργοποίηση ογκογονιδίων, η P53 ενεργοποιεί τη διαδικασία της απόπτωσης (157,158). Το P53 θεωρείται ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Στον καρκίνο του μαστού έχει καταγραφεί εκτός της ετερόζυγης έλλειψης του P53 και μεγάλο ποσοστό μεταλλάξεων (20-25%). Η πλειοψηφία αυτών των μεταλλάξεων έχει βρεθεί πως αυξάνουν τη σταθερότητα της μεταλλαγμένης P53 (ο χρόνος ημιζωής αυξάνεται από μερικά λεπτά σε ώρες). Το αποτέλεσμα είναι να συσσωρεύεται μεταλλαγμένη P53 στο κύτταρο που αναστέλλει την δράση της φυσιολογικής (101,102). Ταυτόχρονα φαίνεται πως η πλειοψηφία των



μεταλλάξεων έχει την ίδια - παρόμοια επίδραση στη δομή του μορίου της P53 πράγμα που επιτρέπει την αναγνώριση της μεταλλαγμένης μορφής με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων.

Δεν είναι διευκρινισμένο σε ποια χρονική στιγμή κατά την πορεία της καρκινογένεσης επισυμβαίνουν οι μεταλλάξεις στο P53 (όπως δεν είναι γνωστό και αρκετές άλλες γενετικές αλλοιώσεις). Θεωρείται όμως ότι συμβάλλουν στην αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων του όγκου (159,160).

Η έκφραση μεταλλαγμένης P53 έχει βρεθεί πως είναι ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης και σχετίζεται με μικρότερο χρόνο επιβίωσης και - μικρότερη - επιβίωση ελεύθερη συμπτωμάτων ανεξαρτήτως κλινικού σταδίου (161). Ταυτόχρονα μια σειρά μελέτες δείχνουν συσχέτιση με άλλα χαρακτηριστικά των όγκων όπως μέγεθος, βαθμός κακοήθειας και έκφραση ορμονικών υποδοχέων καθώς και συσχέτιση με συγκεκριμένα θεραπευτικά σχήματα (96).

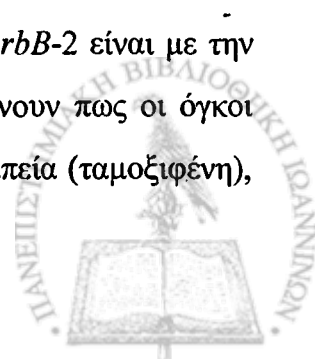
3. *c-erbB-2*

Το γονίδιο *c-erbB-2*, γνωστό και ως neu ή HER-2/neu κωδικοποιεί την παραγωγή μια διαμεμβρανικής πρωτεΐνης που ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων του EGF (epidermal growth factor).

Στους διηθητικούς όγκους του μαστού έχει βρεθεί πως υπερεκφράζεται σε περίπου 20-30% όγκων και ένα μέρος ($\approx 40\%$) της υπερέκφρασης οφείλεται σε γονιδιακή επέκταση. Η υπερέκφραση του *c-erbB-2* συναντάται στο 50% περίπου των DCIS και ιδιαίτερα στον φαγεσωρικό υπότυπο (comedo) καθώς και στη νόσο Paget της θηλής (78).

Σε ορισμένες εργασίες αναφέρεται ότι η υπερέκφραση του *c-erbB-2* σχετίζεται με το μέγεθος του όγκου, τη θετικότητα των λεμφαδένων και την ύπαρξη μεταστάσεων καθώς επίσης και με την απουσία έκφρασης ορμονικών υποδοχέων (162,163). Έχει βρεθεί επίσης συσχέτιση με αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού (SPF - Ki67 - μιτωτικό δείκτη), καθώς και με το Grade (164,165). Ένα μέρος επίσης των εργασιών (50%) δείχνουν συσχέτιση της υπερέκφρασης του *c-erbB-2* με κακή πρόγνωση (166).

Η πιο σημαντική όμως συσχέτιση της υπερέκφρασης του *c-erbB-2* είναι με την ανταπόκριση σε συμπληρωματική θεραπεία (167). Τα δεδομένα δείχνουν πως οι όγκοι που υπερεκφράζουν το *c-erbB-2* δείχνουν αντίσταση στην ορμονοθεραπεία (ταμοξιφένη),



ενώ δείχνουν σημαντική ανταπόκριση στη θεραπεία με το αντι-*c-erbB-2* μονοκλωνικό αντίσωμα trastuzumab (168,169).

Δ. ΔΕΙΚΤΗΣ ΥΠΟ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ

Πολυ (Α) πολυμεράση (ΡΑΡ)

Το ένζυμο πολυ(Α)πολυμεράση (poly(A)polymerase, ΡΑΡ) είναι ένας από τους παράγοντες του πολυ-πρωτεϊνικού συμπλόκου που ρυθμίζει την προσθήκη της πολυαδενυλικής ουράς του mRNA. Η προσθήκη μιας επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας AMP (πολύαδενυλική ουρά) στο 3' άκρο του προδρόμου ετερογενούς RNA (hnRNA) είναι μια γενικευμένη διαδικασία στην ωρίμανση του mRNA των ευκαρυωτικών κύτταρων. Η πολυαδενυλική ουρά του mRNA συνεισφέρει στη σταθερότητα του mRNA, στη μεταφορά του - μετακίνησή του από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, και τη μεταφρασιμότητά του (170).

Ο σχηματισμός της πολυαδενυλικής ουράς περιλαμβάνει την ενδονουκλεολυτική πέψη του προδρόμου RNA σε συνδυασμό με τη σύνθεση του πολυ(Α), μια διαδικασία που απαιτεί τη δράση μιας σειράς πρωτεϊνικών παραγόντων(171). Δύο διαφορετικά συμπλέγματα (multi-subunit) παραγόντων απαιτούνται για την ειδική αναγνώριση του σημείου έναρξης σύνθεσης της πολυαδενυλικής ουράς και το σχηματισμό ενός σταθερού συμπλόκου RNA-πρωτεϊνών. Στη συνέχεια δύο επιπλέον πρωτεϊνικοί παράγοντες μαζί με την πολυμεράση ενσωματώνονται στο σύμπλοκο και επάγουν την πέψη του προδρόμου mRNA και τη σύνθεση της πολυαδενυλικής ουράς. (172,173)

Η δράση ορισμένων από τους παράγοντες που συμμετέχουν στη διαδικασία της πολυαδενυλίωσης ρυθμίζεται στη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και της διαφοροποίησης (174). Ένας από αυτούς τους παράγοντες είναι και η πολυ(Α)πολυμεράση (ΡΑΡ) που υπερφωσφορυλιώνεται από την P34 (*cdc2*)/cyclin B (MPF), στη διάρκεια της Μ φάσης του κύκλου, με αποτέλεσμα σ' αυτή τη φάση να εμφανίζει χαμηλή ενεργότητα (175).

Η ενεργότητα της ΡΑΡ εμφανίζεται να αυξάνεται σε ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα ηρεμούντα κύτταρα (176). Επίσης η διέγερση λεμφοκυττάρων με ΡΗΑ οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων ενεργότητας της ΡΑΡ



→ (177,178). Παροδική αύξηση της ενεργότητας της PAP παρατηρείται κατά την επαγωγή προς διαφοροποίηση (179,180). Στη φάση όμως της τελικής διαφοροποίησης, όπου ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων μειώνεται, η ενεργότητά της εμφανίζεται και αυτή μειωμένη (181).

Στις οξείες λεμφοβλαστικές λευχαιμίες παρατηρούνται επίπεδα ενεργότητας της PAP υψηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα στις χρόνιες λεμφοκυτταρικές λευχαιμίες και στα φυσιολογικά περιφερικά λεμφοκύτταρα (182). Στη Β-χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία βρέθηκε ότι όσο υψηλότερα ήταν τα επίπεδα ενεργότητας της PAP τόσο δυσμενέστερη ήταν η πρόγνωση, βάση κλινικών και εργαστηριακών κριτηρίων (183). Αντίστοιχα, στις χρόνιες μυελογενείς λευχαιμίες η υψηλότερη τιμή ενεργότητας της PAP μετρήθηκε στη βλαστική φάση της νόσου σε σχέση με τις άλλες φάσεις (184).

Στον καρκίνο του μαστού βρέθηκε πως τα επίπεδα ενεργότητας της PAP σχετίζονται με το στάδιο της νόσου (TNM stage) και με τη διήθηση των λεμφαδένων. Ταυτόχρονα βρέθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ της PAP και της υπερέκφρασης του *c-ErbB-2*, καθώς και με τους ορμονικούς υποδοχείς, ενώ δε βρέθηκε συσχέτιση με το μέγεθος του όγκου, την ηλικία των ασθενών και τον ιστολογικό τύπο (185).

Στον τομέα της πρόγνωσης σε ένα δείγμα 228 ασθενών με μέσο χρόνο παρακολούθησης 58 μήνες βρέθηκε πως τα επίπεδα ενεργότητας της PAP αποτελούν ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη για την ομάδα ασθενών με αρνητικούς για διήθηση λεμφαδένες (186).



ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχοι μας ήταν :

A. Να συμβάλουμε στην αξιολόγηση νέο-εφαρμοζόμενων (PCNA, P53, bcl-2 και *c-erbB-2*) καθώς και νέων παραμέτρων (τελομεράση και PAP) ως προγνωστικών δεικτών στον καρκίνο του μαστού.

B. Να διερευνήσουμε περαιτέρω τον προγνωστικό χαρακτήρα της PAP και να αξιολογήσουμε αν τα μέχρι τώρα δεδομένα που δείχνουν συσχέτιση των επιπέδων της ενεργοτητάς της με το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων ισχύουν στον καρκίνο του μαστού, καθώς και αν σχετίζονται με άλλα στοιχεία της βιολογίας των όγκων.

Γ. Και τέλος να συνεισφέρουμε στην κατανόηση της βιολογίας του καρκίνου του μαστού, διερευνώντας πιθανούς μηχανισμούς που ενέχονται στην πορεία της καρκινογένεσης, τους οποίους αντανακλούν οι συσχετίσεις και διακυμάνσεις των τιμών των εξεταζομένων παραμέτρων.

Η επίτευξη αυτών των στόχων επιχειρήθηκε με:

- 1). Τη μέτρηση των υπό εξέταση παραγόντων σε κυτταρικά εκχυλίσματα 211 όγκων μαστού και την στατιστική συσχέτισή τους με καθιερωμένες κλινικές και βιολογικές παραμέτρους που μετρήθηκαν επίσης σ' αυτούς τους όγκους.
- 2) Την μελέτη της ρύθμισης της ενεργότητας της PAP σε συνάρτηση με την έκφραση σε κυτταρική σειρά μαστού (MCF-7) και σε κλινικά δείγματα.
- 3) Την μέτρηση και συσχέτιση με την επιβίωση μιας σειράς παραμέτρων που με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία θεωρούνται προγνωστικοί παράγοντες σε 78 ασθενείς με καρκίνο του μαστού.



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΓΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗ ΑΥΤΩΝ

Για την εκτέλεση αυτής της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν 289 δείγματα από όγκους μαστού. Τα 78 από αυτά προέρχονταν από το Νοσοκομείο "Έλενα Βενιζέλου", ενώ τα υπόλοιπα 211 προέρχονταν από το Νοσοκομείο "Ο Άγιος Σάββας", από ασθενείς που χειρουργήθηκαν στο διάστημα 1994-98. Τα δείγματα παραλαμβάνονταν από τα χειρουργεία και τοποθετούνταν αμέσως για φύλαξη σε υγρό άζωτο μέχρι την επεξεργασία τους

2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ MCF-7

Η κυτταρική σειρά MCF-7 (American Type Culture Collection, ATCC), που προέρχεται από καρκίνο μαστού, αναπτύσσεται σε καλλιεργητικό μέσο RPMI-1640 (Gibco) ενισχυμένο με 10% αδρανοποιημένο εμβρυϊκό ορό μόσχου και αντιβιοτικά μέχρι του σχηματισμού πλήρους ταπητίου. Κατόπιν τα κύτταρα αποκολλούνται με διάλυμα θρυψίνης και μοιράζονται σε δυο φιάλες καλλιέργειας (ανά 2-3 μέρες).

3. ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ

Η ομογενοποίηση των δειγμάτων των όγκων γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολουθείται για την παραλαβή του κυτταρικού εκχυλίσματος για τον προσδιορισμό των ορμονικών υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης.
Αναλυτικά:

100mg όγκου ομογενοποιούνται σε 0.5 ml ρυθμιστικού διαλύματος: 10mM Tris pH=7.4, 1.5mM EDTA, 5mM Na-molybdate, 5mM DTT. Οι σωλήνες όπου γίνεται η ομογενοποίηση βρίσκονται μέσα σε μείγμα πάγου και υγρού αζώτου. Η

ομογενοποίηση γίνεται με ομογενοποιητή Polytron (Sorvall). Στη συνέχεια το ομογενοποιημένο μίγμα φυγοκεντρείται στα 40000 rpm για 1h στους 4° C. Το υπερκείμενο φυλάσσεται στους -80° C μέχρι τη χρήση του.

Η συλλογή του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από τις κυτταροκαλιέργιες έγινε σύμφωνα με διεθνώς ακολουθούμενα πρωτόκολλα (187).

Τα καλλιεργούμενα κύτταρα MCF-7 αποκολλώνται και κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση στους 4°C, επαναδιαλύονται σε φυσιολογικό ορό και επανακατακρημνίζονται. Στο ίζημα προστίθενται 450μl από το εξής διάλυμα: 50μl 10% SDS, 50λ γλυκερόλης, 40μl 1M Tris-HCL pH 6,8, 0,31ml H₂O. Το κολλώδες μείγμα που σχηματίζεται αναροφάται (10 φορές για κάθε βελόνα) σε σύριγγα με βελόνες αρχικά 19G, μετά 21G και τελικά 23G. Το διάλυμα φυγοκεντρείται για 15' στους 4° C στη μικροφυγόκεντρο Eppendorf και το υπερκείμενο φυλάσσεται στους -80° C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

4. ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Η μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης έγινε με τα αντιδραστήρια D_c Protein Assay (Biorad) με μια βελτίωση της κλασικής μεθόδου Lowry, (188) που επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης ακόμα και παρουσία απορρυπαντικών (όπως το SDS).

Υλικά:

Αντιδραστήριο A : αλκαλικό διάλυμα τρυγικού χαλκού

Αντιδραστήριο B :Folin

Πρότυπο διάλυμα BSA

Προετοιμάζουμε 3-5 αραιώσεις του πρότυπου διαλύματος πρωτεΐνης BSA (από 0,2mg/ml μέχρι 1,5mg/ml) προκειμένου να προσδιορίσουμε την καμπύλη αναφοράς. Αναμιγνύουμε 100λ πρότυπου ή δείγματος με 500λ αντιδραστηρίου A και 4ml αντιδραστηρίου B. Το μείγμα παραμένει 15' σε θερμοκρασία δωματίου και η μέτρηση απορρόφησης στο φωτόμετρο γίνεται στα 750nm. Το χρώμα παραμένει σταθερό για 1 ώρα περίπου.



5. WESTERN BLOT

I. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμίδης.

Η ανάλυση των πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης σε αποδιατακτικές συνθήκες (189). Η σύσταση της φάσης στοίβαξης (stacking gel) του πηκτώματος είναι 3,9% acrylamide-bisacrylamide (29:1) σε 125mM Tris-HCl pH 6.8 και 0.1% SDS και της φάσης διαχωρισμού 12% (σε ορισμένες περιπτώσεις 8%) acrylamide-bisacrylamide σε 375mM Tris-HCl, pH 8.8 και 0.1%SDS.

Τση ποσότητα πρωτεΐνης από τα δείγματα ανάγεται σε τελικό όγκο 15λ με SDS-PAGE sample buffer (500λ 10% SDS, 500λ γλυκερόλης, 400λ 1M Tris-HCL pH 6.8, 3.1ml H₂O), προστίθενται 1,5λ 2-μερκαπτοαιθανόλης και 0,1λ μπλε της βρομοφαινόλης (1% σε 1M Tris-HCl pH 6.8). Τα δείγματα βράζονται για 5' και ηλεκτροφορούνται σε διάλυμα 1x ηλεκτροφόρησης (10x διάλυμα ηλεκτροφόρησης: 30.3gr Tris-base, 144.2gr glycine, 10gr SDS, διαλυμένα σε τελικό όγκο 1lt, pH 8.3) αρχικά στη φάση στοίβαξης στα 80 V, 50mA και τελικά στη φάση διαχωρισμού στα 150 V, 60mA για 2-3hrs.

II. Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη

Η μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη γίνεται με ηλεκτρομεταφορά (189) με τη συσκευή της Bio-Rad σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Χρησιμοποιήθηκαν οι μεμβράνες Immobilon-P (Millipore) και η μεμβράνη μετά το πέρας της μεταφοράς της φυλάσσεται στους -20 C⁰. Η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς εκτιμάται από την ποσοτική μεταφορά των βαμμένων πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται ως δείκτες μοριακού βάρους (Bio-Rad : Prestained SDS-PAGE Standards)



III. Ανοσοπροσδιορισμός των ακινητοποιημένων στη μεμβράνη πρωτεϊνών με χημειοφωταύγεια

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην ειδική αντίδραση της πρωτεΐνης (αντιγόνου) που βρίσκεται ακινητοποιημένη στη μεμβράνη, με ειδικό μονοκλωνικό ή πολυκλωνικό αντίσωμα (1^ο αντίσωμα) που την αναγνωρίζει. Το αντίσωμα αυτό αναγνωρίζεται από δεύτερο μη ειδικό αντίσωμα (2^ο αντίσωμα), το οποίο και φέρει προσδεμένο ένζυμο. Το ένζυμο είναι υπεροξειδάση (horseradish peroxidase) και καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης, που έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή χημειοφωταύγειας. Χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια ECL Western Blotting detection (Amersham) και η διαδικασία αναλυτικά έχει ως εξής:

α) Επώαση της μεμβράνης για 10-14 h σε Blotto/Tween (5% BSA (fraction V) , 0.1% Tween 20 σε PBS) στους 4 C^ο. Στο στάδιο αυτό γίνεται “μπλοκάρισμα” των κενών θέσεων της μεμβράνης για να αποτραπεί η μη ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων στη μεμβράνη.

β) Πλύσιμο της μεμβράνης για 1x15' και 2x5' με 0.1% Tween 20 σε PBS, σε θερμοκρασία δωματίου.

γ) Προσθήκη 1^{ου} αντισώματος (ειδικού για κάθε μελετούμενο παράγοντα και στις αραιώσεις που φαίνονται στον πίνακα κατωτέρω) διαλυμένου σε 0.1% Tween 20 σε PBS και επώαση για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου.

δ) Πλύσιμο της μεμβράνης για 1x15' και 2x5' με 0.1% Tween 20 σε PBS, σε θερμοκρασία δωματίου.

ε) Προσθήκη 2^{ου} αντισώματος (μη-ειδικού, anti-mouse ή anti-rabbit κατά περίπτωση, προσδεμένου με υπεροξειδάση) διαλυμένου 1:10000 σε 0.1% Tween 20 σε PBS και επώαση για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου.

στ) Πλύσιμο της μεμβράνης για 1x15' και 4x5' με 0.1% Tween 20 σε PBS, σε θερμοκρασία δωματίου.

ζ) Προσθήκη της λουμινόλης και ενισχυτικών της αντίδρασης και επώαση για 1' σε θερμοκρασία δωματίου.

η) Αποτύπωση σε φιλμ (Hyperfilm-ECL, Amersham) της εκλυόμενης φωτεινής ακτινοβολίας.



.. Το Western blotting χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των παραμέτρων που αναφέρονται κατωτέρω μαζί με τα αντίστοιχα 1^ο αντισώματα:

Παράμετρος	1 ^ο αντίσωμα	Αραίωση	Εταιρία
<i>bcl-2</i>	mouse monoclonal (Ab-1)	1:1000	Oncogene
<i>c-erbB-2</i>	mouse monoclonal	1:1000	Serotek
PCNA	mouse monoclonal (clone PC10)	1:1000	Boehringer Mannheim
Ki67	mouse monoclonal (clone Ki67)	1:1000	Boehringer Mannheim
PAP	rabbit polyclonal	1:2500	<u>ευγενική προσφορά</u> Dr W.Keller

(Ο Dr. W. Keller είναι Διευθυντής του Τμήματος Κυτταρικής Βιολογίας στο Biozentrum, του Πανεπιστημίου της Βασιλείας της Ελβετίας).

6. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗΣ P53 ΜΕ ELISA

Χρησιμοποιήθηκε το kit της Oncogene “mutant P53 selective quantitative Elisa”. Η τεχνική βασίζεται σε ανοσοενζυμική μέθοδος “σάντουιτς” κατά την οποία χρησιμοποιούνται μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού και πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού. Τα μονοκλωνικά αντισώματα, ειδικά για την πλειοψηφία των γνωστών

μεταλλαγμένων P53 των θηλαστικών, είναι ακινητοποιημένα στην επιφάνεια των 96 πηγαδιών μιας πλάκας. Το δείγμα προς εξέταση επωάζεται μέσα στο πηγάδι και οποιαδήποτε μεταλλαγμένη μορφή P53 προσκολλάται. Το μη δεσμευμένο υλικό απομακρύνεται με διαδοχικά ξεπλύματα και προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα (polyclonal anti-mouse). Το τρίτο αντίσωμα που προστίθεται φέρει προσδεμένη υπεροξειδάση (horseradish peroxidase). Η υπεροξειδάση καταλύει την οξείδωση ενός άχρωμου διαλύματος 2,2'azino-bi-[3-ethyl-benzthiazoline sulfonate] (ABTS) σε μπλε/πράσινο διάλυμα. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της ποσότητας της προσδεμένης P53. Το προϊόν της αντίδρασης μετράται ποσοτικά σε φωτόμετρο. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται με τη βοήθεια μίας καμπύλης αναφοράς, χρησιμοποιώντας αραιώσεις γνωστών συγκεντρώσεων, καθαρής ανθρώπινης μεταλλαγμένης P53.

Αναλυτικά η μέθοδος έχει ως εξής:

- α) Πλύσιμο της πλάκας χρησιμοποιώντας 200λ διαλύματος πλυσίματος ανά πηγάδι.
- β) Προσθήκη 100λ δείγματος ή προτύπου ανά πηγάδι και επώαση για όλη τη νύχτα στους 4° C. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούμε από το πρότυπο είναι 4, 2, 1, 0.5, 0.25 και 0 ng/ml για την δημιουργία καμπύλης αναφοράς.
- γ) Πλύσιμο με 200λ διαλύματος πλυσίματος ανά πηγάδι.
- δ) Προσθήκη 100λ διαλύματος από το 2° αντίσωμα και επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.
- ε) Πλύσιμο 4 φορές με 200λ διαλύματος έκπλυσης ανά πηγάδι.
- στ) Προσθήκη 100λ διαλύματος συμπλόκου υπεροξειδάσης και επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
- ζ) Πλύσιμο 4 φορές με 200λ διαλύματος έκπλυσης ανά πηγάδι.
- η) Προσθήκη 100λ από το μίγμα χρωμογόνου υποστρώματος και H₂O₂ και επώαση για 30' σε θερμοκρασία δωματίου.
- θ) Μέτρηση της απορρόφησης στα 405nm.



7. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΙΔΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΠΟΛΥ(Α) ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗ

Υλικά:

-Διάλυμα Α

20λ Tris HCL 1M pH=8,3 (4C)

2λ MnCl₂ 50mM

1λ 400mM β-μερκαπτοαιθανόλη

5,6λ 18mM poly(A)

10λ 10mM [³H] ATP, 10 cpm/pmol

-Διάλυμα Β

5% TCA τριχλωροξικό οξύ

-Διάλυμα σπινθηρισμού

3g PPO και 0,3g POPOP /lt τολουόλιου

-Χαρτί Whatman GF/C

Περιγραφή μεθόδου

Δείγματα από τα κυτταρικά εκχυλίσματα των όγκων αραιώθηκαν, έτσι ώστε στο τελικό διάλυμα (60μl) να υπάρχουν 20μg πρωτεΐνης. Σε όλα τα κυτταρικά εκχυλίσματα είχε γίνει πριν προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry.

Σε 40μl διαλύματος Α που βρίσκεται σε σωλήνα Eppendorf στον πάγο, προστίθενται 60μl κυτταρικού εκχυλίσματος. Μετά από ανάδευση ο σωλήνας τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 37°C. Μετά το πέρασμα του κατάλληλου χρόνου (1, 2, 3 και 3.5 h) τοποθετούνται 20μl από κάθε δείγμα σε χαρτί GF/C που εμβαπτίζεται σε δοχείο με διάλυμα αναστολής της αντίδρασης (Β) υπό μερική ανάδευση στον πάγο. Τα χαρτιά των δειγμάτων ξεπλένονται 3 φορές με TCA 5% για 5 λεπτά στον πάγο, υπό ανάδευση. Στη συνέχεια αφήνονται να στεγνώσουν όλη νύχτα σε θερμοκρασία δωματίου.



Την επόμενη μέρα το κάθε δείγμα τοποθετείται σε σωλήνα που περιέχει 5ml διαλύματος σπινθηρισμού και γίνεται μέτρηση σε β-μετρητή σπινθηρισμού για 5λεπτά/δείγμα.

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος προσδιορισμού της ενεργότητας της πολυ(Α)πολυμεράσης στηρίζεται στην παρακάτω αντίδραση:



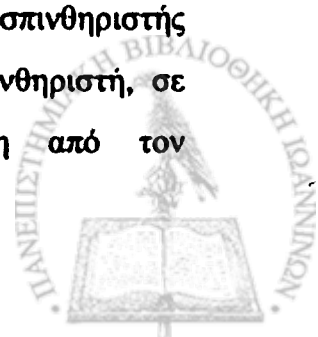
Το πολυ(Α) ή πολυαδενυλικό οξύ είναι ένα ομοπολυμερές που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες AMP. Η πολυ(Α)πολυμεράση καταλύει παρουσία δισθενών μεταλλικών ιόντων την αντίδραση συνέχισης πολυμερισμού ${}^3\text{H}$ -ATP στο πολυ(Α) (στο άκρο 3'-OH) ελευθερώνοντας πυροφωσφορικό οξύ (PPi).

• Ανάλογα με την ποιότητα και την ποσότητα της πολυ(Α)πολυμεράσης στο δείγμα, έχουμε μεγαλύτερη ή μικρότερη ενσωμάτωση ραδιενεργού τριτίου στο πολυ(Α) σε ορισμένο χρόνο.

Στο διάλυμα αναστολής της αντίδρασης το τριχλωροξικό οξύ χρησιμοποιείται για να κατακρημνίσει το πολυμερές, ενώ το πυροφωσφορικό νάτριο για να μην επιτρέψει την συνέχιση της αντίδρασης προς τα δεξιά.

Μετά το σταμάτημα της αντίδρασης γίνεται ξέπλυμα των χαρτιών GF/C ώστε να απομακρυνθούν τα ραδιενεργά μόρια ATP, που δεν ενσωματώθηκαν στο πολυ(Α).

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



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

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

όπου

V_s = ο τελικός όγκος διαλύματος αντίδρασης σε μl

cpm = αριθμός μετρουμένων κτύπων ανα λεπτό από τον μετρητή σπινθηρισμού

V_x = όγκος διαλύματος αντίδρασης στο GF/C σε μl

r_A = ειδική ενεργότητα του ^3H -ATP σε cpm/pmol

t = χρόνος επώασης σε ώρες

V_K = αρχικός όγκος κυτταρικού εκχυλίσματος σε μl

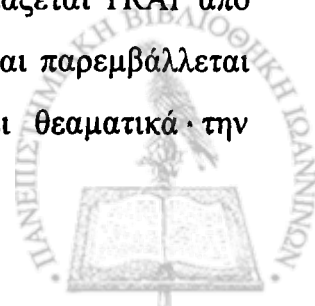
c = συγκέντρωση πρωτεΐνης κυτταρικού εκχυλίσματος δείγματος όγκου σε mg/ml

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

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

8. ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΤΕΛΟΜΕΡΑΣΗΣ

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



Στάδιο α) 100mg ιστού όγκου ομογενοποιούνται σε 200ml διάλυμα λύσης. Ο ομογενοποιημένος ιστός φυλάσσεται σε πάγο για 30' και στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε 16000 x g για 20' στους 4° C. Περισυλλέγεται το υπερκείμενο και μεταφέρεται σε καινούργια σωληνάρια. Μετράται η συγκέντρωση πρωτεΐνης και αν τα δείγματα των κυτταρικών εκχυλισμάτων δε χρησιμοποιηθούν αμέσως φυλάσσονται στους -80° C. Σε δείγμα τελικής πρωτεΐνης 0.5-10μg/σωληνάριο προστίθενται 25 μl μείγματος αντίδρασης τελομεράσης και επωάζονται για 30' στους 25° C. Η αντίδραση σταματά με θέρμανση των δειγμάτων για 5' στους 94° C.

Στάδιο β) πολλαπλασιασμός του προϊόντος της αντίδρασης της τελομεράσης με PCR.

Πρόγραμμα PCR

ΣΤΑΔΙΟ	ΧΡΟΝΟΣ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (° C)	ΚΥΚΛΟΙ
1	30''	94	30
2	30''	50	
3	90''	72	
4	10'	72	1
συντήρηση	Όσο χρειαστεί	4	1

Ο ένας από τους δυο εκκινητές (primers) που χρησιμοποιούνται για το PCR είναι βιοτινιλωμένος.

Στάδιο γ) προσδιορισμός της ποσότητας του προϊόντος με ELISA. Τα προϊόντα δεσμεύονται μέσω της βιοτινής που περιέχουν σε στρεπταβιδίνη ακινητοποιημένη σε πλάκα ELISA (96 πηγαδιών). Οι ιχνηθέτες είναι σημασμένοι με διγοξυγενίνη και ο εντοπισμός τους γίνεται με αντίσωμα για την διγοξυγενίνη. Το αντίσωμα φέρει



υπεροξειδάση η οποία οξειδώνει το υπόστρωμα της TMB και παράγεται χαρακτηριστικό χρώμα του οποίου η απορρόφηση μετράται στα 450nm .

Τα επίπεδα ενεργότητας της τελομεράσης σε ένα δεδομένο δείγμα προσδιορίζονται με τη σύγκριση του σήματος του δείγματος με αυτό δειγμάτων αναφοράς που περιέχονται στο kit. Οι τιμές ενεργότητας εκφράζονται είτε σαν μονάδες οπτικής πυκνότητας (OD units) είτε σαν μονάδες σχετικής ενεργότητας.

9. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

Οι ορμονικοί υποδοχείς των οιστρογόνων και προγεστερόνης (για τα 211 δείγματα) μετρήθηκαν στο εργαστήριο Ορμονικών Υποδοχέων της Κλινικής Μαστού του Νοσοκομείου "ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ" στα πλαίσια των εργαστηριακών εξετάσεων ρουτίνας. Για τα 78 δείγματα της δεύτερης ομάδας ασθενών οι μετρήσεις έγιναν από το εργαστήριο Ορμονικών Υποδοχέων του ΕΙΕ. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανθρακούχου δεξτρόζης και οι τιμές των ορμονικών υποδοχέων εκφράζονται σε fmol/mg πρωτεΐνης (190). Βάσει στατιστικών μελετών αρνητικοί ως προς τους ορμονικούς υποδοχείς θεωρούνται όγκοι με τιμές <5fmol/mg πρωτεΐνης ,οριακοί από 5-10 fmol/mg και θετικοί με τιμές >10 fmol/mg (191).

Εκτός από τους ορμονικούς υποδοχείς για όσους ασθενείς ήταν διαθέσιμα καταγράφηκαν : το μέγεθος του όγκου (με βάση την μέγιστη διάμετρο), ο βαθμός ιστολογικής κακοήθειας (Grade) , αν υπήρχε ή όχι διήθηση στους λεμφαδένες και ο αριθμός τους, και η ηλικία των ασθενών. Για το δείγμα των 78 ασθενών καταγράφηκαν επίσης : η πλοϊδία των όγκων (που προσδιορίστηκε με κυτταρομετρία ροής), τα θεραπευτικά σχήματα συμπληρωματικής θεραπείας που έλαβαν, αν υπήρξαν υποτροπές η μεταστάσεις και τέλος ο χρόνος ολικής επιβίωσης και επιβίωσης ελεύθερης υποτροπής των ασθενών για διάστημα περίπου 3 χρόνων.

Τα παραπάνω δεδομένα πάρθηκαν από το αρχείο της Κλινικής Μαστού και το αρχείο του Παθολογοανατομικού τμήματος του Νοσοκομείου "ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ", και τα αρχεία του Διαγνωστικού Κέντρου Μαστού "ΠΡΟΛΗΨΙΣ".



10. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

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

Για την εύρεση σχέσεων μεταξύ ποσοτικών μεταβλητών, με κανονική κατανομή (κατά προσέγγιση) χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής Pearson. Ενώ στην περίπτωση της συσχέτισης μεταβλητών με διαβαθμίσεις χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής Spearman.

Για τη σύγκριση των μέσων τιμών δυο ομάδων χρησιμοποιήθηκε η στατιστική δοκιμασία του Student (t-test). Στην περίπτωση που οι συγκρινόμενες κατηγορίες ήταν πάνω από δύο χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διακύμανσης προς μία διεύθυνση (ANOVA). Στην στατιστική ανάλυση για την εύρεση σχέσεων μεταξύ ποιοτικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκαν μη παραμετρικές στατιστικές δοκιμασίες. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν το κριτήριο του χ^2 , το κριτήριο του Fisher, και ο συντελεστής Spearman.



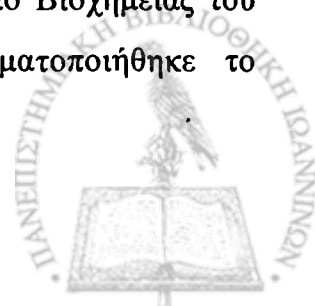
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το κεφάλαιο των Αποτελεσμάτων διαιρείται σε δυο μέρη. Το Πρώτο Μέρος αναφέρεται στις συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στις παραμέτρους που μελετήθηκαν και δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στη συσχέτιση ανάμεσα στην PAP και τους δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Στο Δεύτερο Μέρος διερευνάται η συσχέτιση αυτή περαιτέρω και μάλιστα σε δείγματα για τα οποία ήταν γνωστή η κλινική πορεία των ασθενών σε χρονικό διάστημα πενταετίας. Όλες οι εικόνες οι πίνακες και τα διαγράμματα βρίσκονται στα παραρτήματα I, II, και III αντίστοιχα.

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

A. 1. Περιγραφή του δείγματος

Μελετήθηκαν 211 κακοήθεις όγκοι μαστού από ισάριθμους ασθενείς. Η πλειοψηφία τους χειρουργήθηκε στο νοσοκομείο " Άγιος Σάββας" στο διάστημα 1997-1998. Το υλικό στο οποίο έγιναν οι μετρήσεις προερχόταν από το εργαστήριο ορμονικών υποδοχέων και οι μετρήσεις των παραμέτρων πραγματοποιήθηκαν μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα από τη λήψη τους έτσι ώστε να διασφαλιστεί η δυνατότητα αξιόπιστης μέτρησης της ενζυμικής ενεργότητας (PAP, τελομεράσης). Οι μετρήσεις όλων των παραμέτρων επιδιώχθηκε να είναι ποσοτικές με σκοπό να μην υπόκεινται σε υποκειμενικές εκτιμήσεις. Η χρήση των μεθόδων Western blot και Elisa επιλέχθηκε γιατί διευκολύνει την ποσοτική μέτρηση των παραμέτρων και γιατί οι μέθοδοι αυτοί είχαν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στο εργαστήριο Βιοχημείας του Ερευνητικού Κέντρου "Γ. Παπανικολάου" όπου και πραγματοποιήθηκε το μεγαλύτερο μέρος αυτής της μελέτης.



Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται συνοπτικά τα στοιχεία που αφορούν τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των 211 όγκων.

Η ηλικία των ασθενών κυμαίνεται από 30-82 χρόνων με μέση τιμή τα 57,6 χρόνια. Η πλειοψηφία των ασθενών ανήκει στην ηλικιακή κατηγορία άνω των 45 χρόνων (87,4%), ενώ κάτω των 45 χρόνων είναι το 12,6%.

Η πλειοψηφία των όγκων ανήκει στον ιστολογικό τύπο του πορογενούς καρκινώματος του μαστού - το 79,4% - στο λοβιακό τύπο καρκινώματος μόνο το 16% ενώ 4,6% των όγκων εμφανίζει χαρακτηριστικά μικτού τύπου. Στο δείγμα δεν υπάρχουν αμιγώς DCIS, ενώ όπου αυτά βρίσκονται συνυπάρχουν με εστίες διηθητικού καρκινώματος. Δεν υπάρχουν επίσης όγκοι άλλου ιστολογικού τύπου σε αμιγή μορφή (π.χ. βλεννώδη).

Το μέγεθος των όγκων κυμαίνεται από 0,01cm έως 14cm με βάση την αναγραφόμενη μέγιστη διάμετρο στην ιστολογική έκθεση, με μέση τιμή τα 2,4cm. Η πλειοψηφία των όγκων έχουν μέγεθος μεγαλύτερο του 1cm - μόλις 7 όγκοι βρέθηκαν μικρότεροι του 1cm - ενώ η ποσοστιαία κατανομή τους κατά μέγεθος είναι: έως 2cm το 42,2% από 2-5cm το 55,9% και πάνω από 5cm το 1,8% (3 όγκοι).

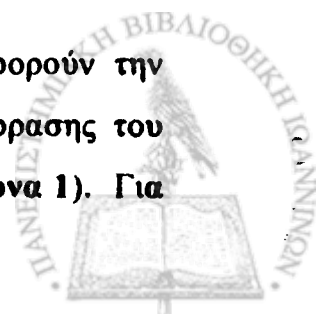
Η ύπαρξη μεταστάσεων στους επιχώριους λεμφαδένες διερευνήθηκε στο 69,7% των όγκων και από αυτούς το 53,1% ήταν θετικοί για διήθηση ενώ το 46,9% αρνητικοί. Ο αριθμός των διηθημένων λεμφαδένων κατανέμεται από 1 έως 25 με μέση τιμή το 5.

Η κατανομή των όγκων με βάση το βαθμό ιστολογικής κακοήθειας (grade) είναι: grade I 9,8%, grade II 55,5% και grade III 34,8%.

Σε σχέση με την παρουσία ορμονικών υποδοχέων και με βάση το όριο των 10fmol/mg πρωτεΐνης κυτταρικού εκχυλίσματος το 68,7% των όγκων βρέθηκαν θετικοί για υποδοχείς οιστρογόνων και το 69,7% για υποδοχείς προγεστερόνης.

A.2. Έκφραση PCNA και σχέση με άλλες παραμέτρους στους όγκους του μαστού

Στους Πίνακες 2 και 3 δίνονται συνοπτικά τα στοιχεία που αφορούν την έκφραση του PCNA σε 123 όγκους του δείγματος. Η μέτρηση της έκφρασης του PCNA έγινε με western blot και με τη χρήση ηλεκτρονικού σαρωτή (Εικόνα 1). Για



τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν είτε οι μέσες τιμές έκφρασης του PCNA ανά κατηγορία (βλ. Α.2.α.), είτε οι τιμές σαν συνεχή μεταβλητή (βλ. Α.2.β.).

Α.2.α. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές έκφρασης του PCNA σε σχέση με κατηγοριοποιημένες παραμέτρους.

Στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα του $P=0,022$ παρατηρήθηκε ανάμεσα στους διάφορους ιστολογικούς τύπους με τα πορογενή και τα μικτά να εμφανίζουν υψηλότερη μέση τιμή, (1378,3 και 1410,0 αντίστοιχα) έναντι των λοβιακών με μέση τιμή 640,3.

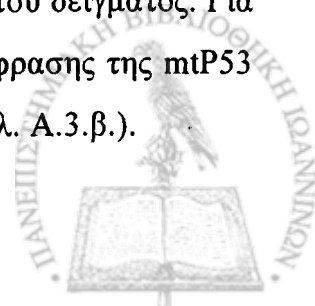
Από τη σύγκριση των μέσων τιμών έκφρασης του PCNA στις διάφορες κατηγορίες των όγκων δε βρέθηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις διάφορες ηλικιακές κατηγορίες, στους όγκους με διαφορετικό μέγεθος (<2 , >2), στους θετικούς και αρνητικούς ως προς τη διήθηση των λεμφαδένων, ως προς τους οιστρογονικούς υποδοχείς και τους υποδοχείς προγεστερόνης καθώς και στις τρεις κατηγορίες βαθμού κακοήθειας. Παρατηρείται όμως διαφορά στις μέσες τιμές του PCNA μεταξύ grade I (μέση τιμή 873,8) και grade II και III, όταν τα δύο τελευταία ομαδοποιηθούν σε μια κατηγορία (μέση τιμή 1290,0)

Α.2.β. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται οι σχέσεις μεταξύ τιμών έκφρασης PCNA ως συνεχούς μεταβλητής με παραμέτρους που μελετώνται επίσης ως συνεχείς μεταβλητές. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την PAP ($r=0,414$, $P<0,000$) καθώς επίσης και οριακά στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($P=0,059$) με τις τιμές των οιστρογονικών υποδοχέων.

Καμία άλλη στατιστικά σημαντική συσχέτιση δεν παρατηρείται με τις υπόλοιπες παραμέτρους, δηλαδή την ηλικία, το μέγεθος, τον αριθμό των θετικών λεμφαδένων, τις τιμές της mtP53, τελομεράσης και υποδοχέων προγεστερόνης.

Α.3. Έκφραση μεταλλαγμένης P53 και σχέση με άλλες παραμέτρους στους όγκους του μαστού

Στους Πίνακες 4 και 5 παρουσιάζονται τα στοιχεία που αφορούν την έκφραση της μεταλλαγμένης P53 πρωτεΐνης (mtP53) σε 73 από τους όγκους του δείγματος. Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν είτε οι μέσες τιμές έκφρασης της mtP53 ανά κατηγορία (βλ. Α.3.α.), είτε οι τιμές σαν συνεχή μεταβλητή (βλ. Α.3.β.).



A.3.α. Από την ανάλυση των μέσων τιμών της miP53 στις διάφορες κατηγορίες όγκων παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στους όγκους που ήταν θετικοί για υποδοχείς οιστρογόνων (μέση τιμή 1,4313 μονάδες) και αρνητικοί για υποδοχείς οιστρογόνων (μέση τιμή 0,6276) στα επίπεδα $P=0,018$.

Για όλες τις υπόλοιπες κατηγορίες όγκων που χρησιμοποιήθηκαν σ' αυτή την ανάλυση - ηλικία, μέγεθος όγκου, ιστολογικός τύπος, κατάσταση λεμφαδένων, Grade και υποδοχείς προγεστερόνης - δε βρέθηκε να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις μέσες τιμές της miP53.

A.3.β. Από την ανάλυση των συσχετίσεων κατά Pearson των τιμών της miP53 με τις άλλες συνεχείς παραμέτρους των όγκων - ηλικία, μέγεθος, αριθμός θετικών λεμφαδένων, υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης - δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις.

A.4. Έκφραση Τελομεράσης και σχέση με άλλες παραμέτρους στους όγκους του μαστού

Στους Πίνακες 6 και 7 δίνονται συνοπτικά τα στοιχεία που αφορούν την ενεργότητα της τελομεράσης σε 55 όγκους μαστού. Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν είτε οι μέσες τιμές έκφρασης της Τελομεράσης ανά κατηγορία (βλ. A.4.α.), είτε οι τιμές σαν συνεχή μεταβλητή (βλ. A.4.β.).

A.4.α. Η ανάλυση των μέσων τιμών ενεργότητας της τελομεράσης στις διάφορες κατηγορίες όγκων έδωσε στατιστικά σημαντική διαφορά ($P=0,030$) ανάμεσα στις διάφορες ηλικιακές κατηγορίες. Έτσι οι όγκοι που προέρχονται από γυναίκες ηλικίας <45 ετών εμφανίζουν την υψηλότερη τιμή (0,8155 μονάδες OD) και ακολουθούν η ομάδα των 45-60 ετών με μέση τιμή 0,3952 μονάδες OD και τέλος οι >60 ετών με μέση τιμή 0,2686 μονάδες OD. Από τις υπόλοιπες αναλύσεις δεν προέκυψαν στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα.

A.4.β. Κατά την ανάλυση συσχέτισης κατά Pearson η ενεργότητα της τελομεράσης έδειξε και πάλι να έχει στατιστικά σημαντική ($P=0,004$) αρνητική συσχέτιση $r = -0,421$ με την ηλικία. Επίσης καταγράφηκε θετική στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τις τιμές της PAP ($r=0,306$, $P=0,023$). Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση με τις υπόλοιπες παραμέτρους.



A.5. Έκφραση της PAP και σχέση με άλλες παραμέτρους στους όγκους του μαστού

Στους **Πίνακες 8 και 9** δίνονται συνοπτικά τα στοιχεία που αφορούν την έκφραση της PAP στο σύνολο των δειγμάτων. Η κατανομή των παρατηρούμενων τιμών της PAP στο δείγμα των 211 όγκων δίνεται στο **Διάγραμμα 1**. Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν είτε οι μέσες τιμές έκφρασης της PAP ανά κατηγορία (βλ. A.5.α.), είτε οι τιμές σαν συνεχής μεταβλητή (βλ. A.5.β.).

A.5.α. Όπως φαίνεται από τον **Πίνακα 8**, στατιστικά σημαντικές διαφορές προκύπτουν από τη σύγκριση των μέσων τιμών της PAP ανάμεσα στους όγκους που είναι θετικοί για λεμφαδένες (μέση τιμή 14,7 μονάδες/mg) και αρνητικοί (μέση τιμή 11,2 μονάδες/mg) σε επίπεδο $P < 0,05$ (**Διάγραμμα 2**). Δε βρέθηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων τιμών της PAP ανάμεσα στις διάφορες ηλικιακές κατηγορίες (<45, 45-60, 60>ετών), ή ανάμεσα στους όγκους με διαφορετικό μέγεθος ($\leq 2\text{cm}$ και $> 2\text{cm}$), ή διαφορετικό βαθμό ιστολογικής κακοήθειας (grade I, II, III), ή στους διάφορους ιστολογικούς τύπους, ή ανάμεσα στους θετικούς και αρνητικούς για υποδοχείς ορμονών όγκους.

A.5.β. Στον **Πίνακα 9** δίνονται συνοπτικά τα δεδομένα που αφορούν τη συσχέτιση της PAP (ως συνεχούς παραμέτρου) με άλλες ποσοτικές (συνεχείς) παραμέτρους των όγκων. Για τη στατιστική αξιολόγηση των συσχετίσεων χρησιμοποιήθηκε η συσχέτιση κατά Pearson.

Βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της PAP με τις τιμές των οιστρογονικών υποδοχέων και των υποδοχέων προγεστερόνης, με πιο ισχυρή αυτής των υποδοχέων οιστρογόνων $r=0,241$, $P<0,000$ (**Διάγραμμα 3**) και $r=0,158$, $P=0,045$ αντίστοιχα. Επίσης παρατηρήθηκε ισχυρή στατιστική σημαντική συσχέτιση της PAP με τις τιμές του PCNA ($r = 0,414$) στα επίπεδα του $P < 0,000$ (**Διάγραμμα 4**). Τέλος η συσχέτιση της PAP με τις τιμές της ενεργότητας της Τελομεράσης βρέθηκε να είναι στατιστικά σημαντική με $r = 0,306$ και $P = 0,023$ (**Διάγραμμα 5**). Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της PAP με την ηλικία των ασθενών, ούτε και με το μέγεθος των όγκων, ή με τον αριθμό των διηθημένων λεμφαδένων.



A.5.γ. Η μελέτη της PAP αξιολογήθηκε και σε δύο διαφορετικές κατηγοριοποιήσεις των όγκων, που πιθανά αντιπροσωπεύουν διαφορετικές βιολογικές ομάδες: μια σε σχέση με την κατάσταση των λεμφαδένων (μεταστατική ικανότητα) και η άλλη όσον αφορά τους υποδοχείς οιστρογόνων (φάση διαφοροποίησης). Στον **Πίνακα 10** δίνονται συνοπτικά τα δεδομένα των συσχετίσεων σ' αυτές τις κατηγορίες. Παρατηρήθηκαν πάλι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις της ενεργότητας της PAP με την έκφραση του PCNA και την ενεργότητα Τελομεράσης. Όταν τα αποτελέσματα του Πίνακα 10 συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα του Πίνακα 9, προέκυψαν ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις:

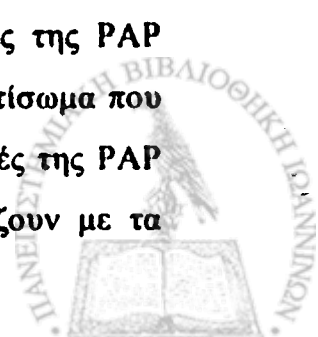
α) Στην κατηγορία των ασθενών με διηθημένους λεμφαδένες δεν υπήρχε πλέον συσχέτιση της PAP ούτε με την έκφραση του PCNA (**Διάγραμμα 6**), ούτε με την ενεργότητα της Τελομεράσης και τους υποδοχείς. Αντίθετα, στους όγκους που δεν είχαν διηθήσει τους επιχώριους λεμφαδένες η συσχέτιση της PAP με το PCNA ήταν ενισχυμένη (**Διάγραμμα 7**), ενώ δεν υπήρχε πλέον σημαντική συσχέτιση με την Τελομεράση και τους υποδοχείς.

β) Η συσχέτιση της PAP με το PCNA διατηρήθηκε και στους θετικούς και στους αρνητικούς για υποδοχείς οιστρογόνων όγκους. Η συσχέτιση της PAP με την ενεργότητα της Τελομεράσης διατηρήθηκε μόνο στους αρνητικούς όγκους.

A.6. Μελέτη της PAP στην κυτταρική σειρά MCF-7. Συσχέτιση της ενεργότητας με τα επίπεδα έκφρασης

Με σκοπό τη διερεύνηση της διακύμανσης των τιμών ενεργότητας της PAP σε σχέση με τις φάσεις ανάπτυξης -πολλαπλασιασμού των κυττάρων, ελέγχθηκε η ενεργότητα της PAP στη κυτταρική σειρά MCF-7. Η ενεργότητα μετρήθηκε σε κύτταρα που βρίσκονταν σε κατάσταση ηρεμίας και σε κύτταρα που βρίσκονταν σε φάση λογαριθμικής ανάπτυξης. Οι τιμές ενεργότητας της PAP στα ηρεμούντα κύτταρα ήταν 1,8 units/mg ενώ στη φάση λογαριθμικής αύξησης ήταν 70,0 units/mg (μέσοι όροι τριών μετρήσεων).

Ταυτόχρονα διερευνήθηκε το κατά πόσο τα επίπεδα ενεργότητας της PAP συμβαδίζουν με διαφορές στα επίπεδα έκφρασής της. Το πολυκλωνικό αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε αναγνωρίζει τρεις διαφορετικού μοριακού βάρους μορφές της PAP (110, 90 και 77 kd). Διαπιστώθηκε ότι οι τιμές ενεργότητας συμβαδίζουν με τα



επίπεδα έκφρασης μιας μορφής της PAP που είναι 77kd. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε και σε δείγματα που προέρχονταν από 10 όγκους μαστού με τιμές ενεργότητας της PAP από 1,7-40 units/mg (Εικόνα 2 και 3).

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

B.1. Περιγραφή του δείγματος

Το υλικό αυτό ήταν 78 πρωτοπαθείς κακοήθεις όγκοι μαστού που προέρχονταν από ισάριθμους ασθενείς που χειρουργήθηκαν στο διάστημα 1995-96. Για ένα αριθμό αυτών των ασθενών ήταν διαθέσιμα στοιχεία που αφορούσαν την υποτροπή της νόσου και την επιβίωση.

Στον Πίνακα 11 δίνονται συνοπτικά τα στοιχεία που αφορούν τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά αυτών των όγκων καθώς και των παραμέτρων που μετρήθηκαν σε αυτά.

Η ηλικία των ασθενών κυμαίνεται από 35 έως 84 χρονών με μέση τιμή τα 58,4 χρόνια. Το 15,4% των ασθενών είναι μικρότερο των 45 χρόνων και το 84,6% μεγαλύτερο.

Η πλειοψηφία των όγκων (89,7%) κατατάσσεται στον ιστολογικό τύπο του πορογενούς καρκινώματος ενώ το 10,3% είναι λοβιακού τύπου.

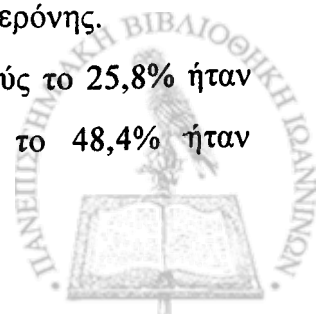
Το μέγεθος των όγκων κυμαίνεται από 0,8cm έως 8cm με μέση τιμή τα 2,4cm. Η πλειοψηφία των όγκων (66,7%) έχει μέγεθος πάνω από 2cm.

Η ύπαρξη μεταστάσεων στους επιχώριους λεμφαδένες διερευνήθηκε στους 76 όγκους και το 59,5% αυτών ήταν θετικοί για μεταστάσεις στους λεμφαδένες ενώ το 40,5% ήταν αρνητικοί. Ο αριθμός των θετικών λεμφαδένων κυμαίνεται από 1 έως 39 με μέση τιμή τους 6.

Σε σχέση με το βαθμό ιστολογικής κακοήθειας (grade) το 7,7% των όγκων κατατάχθηκαν στο grade I, το 70% στο grade II και το 21,3% στο grade III.

Σε σχέση με την παρουσία ορμονικών υποδοχέων το 80,5% είναι θετικοί για τους οιστρογονικούς υποδοχείς και το 76,6% για τους υποδοχείς προγεστερόνης.

Η πλοϊδία των όγκων αξιολογήθηκε σε 30 όγκους και από αυτούς το 25,8% ήταν ευπλοϊδείς, το 16,1% διπλοϊδείς, το 9,7% τετραπλοϊδείς και το 48,4% ήταν ανευπλοϊδείς.



Το 59% των ασθενών υποβλήθηκε σε ακτινοθεραπεία, το 67,9% σε συμπληρωματική θεραπεία με Ταμοξίφεν, ενώ το 48,7% σε θεραπεία με CAF, CMF. Το 11,5% των ασθενών υποβλήθηκε και στις τρεις μορφές θεραπείας, το 26,9% σε ακτινοθεραπεία και Ταμοξίφεν, το 20,5% σε ακτινοθεραπεία και CAF, CMF, το 5,1% σε Ταμοξίφεν και CAF, CMF το 24,4% μόνο σε Ταμοξίφεν και το 11,5% μόνο σε CAF, CMF.

Το 65,1% των ασθενών δεν παρουσίασε υποτροπή μέσα στο διάστημα παρακολούθησης (μέσος χρόνος παρακολούθησης 45 μήνες). Το 34,9% (22 ασθενείς) παρουσίασαν υποτροπή. Το 12,7% (8 ασθενείς) κατέληξε μέσα σε αυτό το διάστημα σαν αποτέλεσμα υποτροπής και επιδείνωσης της νόσου.

Όσο αφορά την έκφραση των *c-erbB-2*, P53 και *bcl-2* το 33,3% ήταν θετικοί για την παρουσία του *c-erbB-2*, το 60,3% παρουσίαζαν υπερέκφραση του *miP53* και το 40,8% υπερέκφραση του *bcl-2*. Ανάμεσα στους όγκους που χαρακτηρίστηκαν θετικοί για *c-erbB-2*, P53 και *bcl-2* υπήρχαν διαφορές όσο αφορά τα επίπεδα έκφρασης, οι οποίες και αποδόθηκαν σαν διαβαθμίσεις με τιμές από 1 έως 3. Οι τιμές αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τη διερεύνηση των κατά Spearman συσχετίσεων μεταξύ των παραμέτρων.

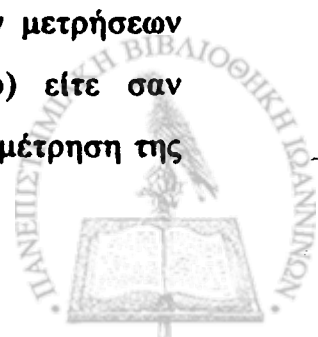
Σε σχέση με την παρουσία του PCNA το 76,6% κατατάσσονται σε όγκους με υψηλή τιμή PCNA, ενώ το 23,4% σε όγκους με χαμηλή τιμή.

Σε σχέση με την έκφραση της PAP το 55,6% των όγκων εμφανίζουν υψηλή τιμή έκφρασης, ενώ το 44,4% χαμηλή. Ο προσδιορισμός των χαμηλών και υψηλών τιμών της PAP και του PCNA είναι σχετικός και έγινε με βάση την απόδοση διαβαθμίσεων (από 0 έως 4) στα επίπεδα έκφρασης. Έτσι οι τιμές 0 και 1 ορίσθηκαν χαμηλές και από 2 και πάνω υψηλές.

Κατωτέρω αναφέρονται αναλυτικά οι παρατηρήσεις που έγιναν στις παραμέτρους που μετρήθηκαν στο εργαστήριο.

B.2. Έκφραση του *c-erbB-2*

Για την ανάλυση της έκφρασης του *c-erbB-2* τα αποτελέσματα των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκαν είτε σαν διχότομη μεταβλητή (θετικό/ αρνητικό) είτε σαν μεταβλητή με 4 διαβαθμίσεις (αρνητικό-0, θετικό με τιμές από 1-3). Η μέτρηση της έκφρασης του *c-erbB-2* έγινε με western blot (Εικόνα 4).



Στον **Πίνακα 12** δίνονται συνοπτικά τα στοιχεία που αφορούν την ανάλυση της έκφρασης του *c-erbB-2* (ως διχότομης μεταβλητής) σε σχέση με τις άλλες παραμέτρους που εξετάστηκαν.

Βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το μέγεθος των όγκων ($p=0,05$). Το 20% των όγκων με μέγεθος μικρότερο από 2cm είναι θετικοί για την έκφραση του *c-erbB-2*, ενώ οι όγκοι με μέγεθος μεγαλύτερο ή ίσο με 2cm είναι θετικοί κατά 42,9%.

Το ποσοστό των όγκων που είναι θετικοί για *c-erbB-2* και παρουσιάζουν χαμηλή έκφραση της PAP είναι 22,2%, ενώ σε αυτούς που έχουν υψηλή PAP το ποσοστό είναι 41,7%.

Στους όγκους με αρνητικούς λεμφαδένες το ποσοστό των θετικών για *c-erbB-2* είναι 28,6%, ενώ στους θετικούς για λεμφαδένες είναι 41,9%.

Τάσεις αρνητικής συσχέτισης παρατηρούνται σε σχέση με την έκφραση του *bcl -2*, όπου το 40% των αρνητικών για *bcl -2* είναι θετικοί για *c-erbB-2*, ενώ στους θετικούς για *bcl -2* το ποσοστό των θετικών για *c-erbB-2* είναι 27,3%. Η έκφραση του *c-erbB-2* δε βρέθηκε να έχει σχέση με την υποτροπή (χ^2 test, $p=0,795$) ή με την επιβίωση ($p=0,847$).

Κατά την ανάλυση κατά Spearman στατιστικά σημαντική βρέθηκε μόνο η συσχέτιση με την PAP ($r=0,278$ $p=0,040$). (**Πίνακας 13**)

B.3. Έκφραση της mtP53

Για την ανάλυση της έκφρασης της mtP53 τα αποτελέσματα των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκαν είτε σαν διχότομη μεταβλητή (θετικό/ αρνητικό) είτε σαν μεταβλητή με 4 διαβαθμίσεις (αρνητικό-0, θετικό με τιμές από 1-3).

Στον **Πίνακα 14** δίνονται συνοπτικά τα στοιχεία που αφορούν την έκφραση της μεταλλαγμένης P53 (ως διχότομης μεταβλητής) σε σχέση με τις υπόλοιπες παραμέτρους που εξετάστηκαν.

Στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε σε σχέση με το Grade ($p=0,012$). Η μεγαλύτερη διαφορά παρατηρήθηκε στους όγκους με grade III όπου το ποσοστό των αρνητικών για την mtP53 όγκων είναι 6,7% ενώ των θετικών 93,3%.



Διαφορές (όχι στατιστικά σημαντικές) παρατηρούνται σε σχέση με το μέγεθος του όγκου όπου τα ποσοστά των θετικών για miP53 όγκων είναι 73% στους όγκους με μέγεθος <2cm και 53% στους όγκους ≥2cm.

Διαφορές επίσης παρατηρήθηκαν σε σχέση με την κατάσταση διήθησης των λεμφαδένων με το 50% των αρνητικών για διήθηση όγκων να είναι θετικοί για miP53 ενώ στους θετικούς το ποσοστό είναι 65,9%.

Η έκφραση της miP53 εμφάνισε στατιστικά σημαντική, θετική συσχέτιση με την υποτροπή της νόσου ($p=0,034$) και η συσχέτιση αυτή αν και όχι στατιστικά σημαντική ($p=0,256$) εμφανίζεται και σε σχέση με την επιβίωση.

Όταν οι παράμετροι εξετάστηκαν με διαβαθμίσεις (Πίνακας 15) η έκφραση της miP53 παρουσίασε συσχέτιση με το grade ($r=0,321$, $p=0,007$) , την έκφραση του bcl-2 ($r=0,249$, $p=0,028$) την έκφραση του PCNA ($r=0,335$, $p=0,003$) και την πλοϊδία των κύτταρων του όγκου ($r=0,387$, $p=0,035$).

B.4. Έκφραση του Bcl-2

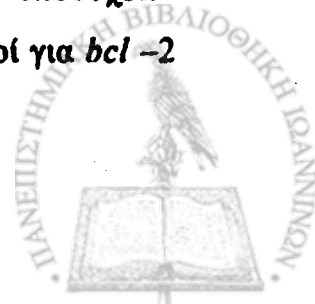
Για την ανάλυση της έκφρασης του bcl-2 τα αποτελέσματα των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκαν είτε σαν διχότομη μεταβλητή (θετικό/ αρνητικό) είτε σαν μεταβλητή με 4 διαβαθμίσεις (αρνητικό-0, θετικό με τιμές από 1-3). Η μέτρηση της έκφρασης του bcl-2 έγινε με western blot (Εικόνα 5)

Στον Πίνακα 16 δίνονται συνοπτικά τα στοιχεία που αφορούν την έκφραση του bcl-2 (ως διχότομης μεταβλητής) σε σχέση με τις υπόλοιπες παραμέτρους που εξετάστηκαν.

Διαφορές, χωρίς να είναι στατιστικά σημαντικές, παρατηρήθηκαν σε σχέση με την ηλικία, όπου το 50% των όγκων που προέρχονται από ασθενείς <45 ετών είναι θετικοί για bcl -2, ενώ στους όγκους από ασθενείς >45 ετών το ποσοστό είναι 26,6%.

Στους όγκους που είναι grade I το ποσοστό των θετικών για bcl -2 είναι 0%, στους grade II 29,8% και στους grade III 40%.

Διαφορές παρατηρήθηκαν επίσης σε σχέση με την παρουσία των υποδοχέων προγεστερόνης, με το 17,6% των αρνητικών για υποδοχείς να είναι θετικοί για bcl -2 ενώ στους θετικούς το ποσοστό είναι 34,5%.



– Τάσεις αρνητικής συσχέτισης της έκφρασης του *bcl-2* παρατηρήθηκαν σε σχέση με την έκφραση της PAP. Το ποσοστό των *bcl-2* θετικών είναι στους όγκους με χαμηλή έκφραση της PAP 47,1% και 22,2% στους όγκους με υψηλή έκφραση.

Η υπερέκφραση του *bcl-2* εμφάνισε στατιστικά σημαντική, θετική συσχέτιση με την επιβίωση ($p=0,035$).

Κατά την ανάλυση κατά Spearman (Πίνακας 17) η έκφραση του *bcl-2* παρουσίασε αρνητική συσχέτιση με την ηλικία ($r=-0,315$, $p=0,005$), και θετική συσχέτιση με την έκφραση της mtP53 ($r=0,249$, $p=0,026$).

B.5. Έκφραση του PCNA

Για την ανάλυση της έκφρασης του PCNA τα αποτελέσματα των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκαν είτε σαν διχότομη μεταβλητή (χαμηλή/υψηλή) είτε σαν μεταβλητή με 4 διαβαθμίσεις (από 0-3)

Στον **Πίνακα 18** δίνονται συνοπτικά τα στοιχεία που αφορούν την έκφραση του PCNA (ως διχότομης μεταβλητής) σε σχέση με τις υπόλοιπες παραμέτρους που εξετάστηκαν.

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με την έκφραση της PAP ($p=0,010$). Έτσι στους όγκους με χαμηλή έκφραση της PAP το ποσοστό των όγκων με χαμηλή έκφραση του PCNA είναι 35,3% και των όγκων με υψηλή έκφραση του PCNA 64,7%. Αντιστοίχα στους όγκους με υψηλή έκφραση της PAP τα ποσοστά είναι 7,7% χαμηλή έκφραση PCNA και 92,3% υψηλή.

Μικρή διάφορα παρατηρείται και σε σχέση με την κατάσταση διήθησης των λεμφαδένων, με το 72,4% των αρνητικών για διήθηση να έχουν υψηλή έκφραση του PCNA ενώ στους θετικούς για διήθηση το ποσοστό είναι 81,8%.

Η έκφραση του PCNA δεν εμφάνισε συσχέτιση ούτε με την υποτροπή ούτε με την επιβίωση.

– Στην ανάλυση των παραμέτρων κατά Spearman (Πίνακας 19) η έκφραση του PCNA εμφάνισε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με την έκφραση της PAP ($r=0,466$, $p=0,000$), με την πλοϊδία των όγκων ($r=0,474$, $p=0,008$), την έκφραση της mtP53 καθώς και με την κατάσταση των λεμφαδένων ($r=0,231$, $p=0,049$).



B.6. Έκφραση της PAP

Για την ανάλυση της έκφρασης της PAP τα αποτελέσματα των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκαν είτε σαν διχότομη μεταβλητή (χαμηλή /υψηλή) είτε σαν μεταβλητή με 4 διαβαθμίσεις (από 0-3).

Στον Πίνακα 20 δίνονται συνοπτικά τα στοιχεία που αφορούν την έκφραση της PAP (ως διχότομης μεταβλητής) σε σχέση με τις υπόλοιπες παραμέτρους που εξετάστηκαν.

Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με την έκφραση του PCNA ($p=0,010$)(Διάγραμμα 8) και με την κατάσταση διήθησης των λεμφαδένων ($p=0,035$). Στους αρνητικούς για διήθηση των λεμφαδένων όγκους το ποσοστό των όγκων με υψηλή PAP είναι 54,5% ενώ στους θετικούς για διήθηση είναι 81,3%.(Διάγραμμα 9)

Διαφορές, χωρίς να είναι στατιστικά σημαντικές, παρατηρήθηκαν (α) σε σχέση με το μέγεθος του όγκου στους όγκους που είναι μικρότεροι των 2cm το ποσοστό των όγκων με υψηλή PAP ήταν 56% ενώ σε αυτούς που είναι μεγαλύτεροι των 2cm το ποσοστό ήταν 75.7% και (β) σε σχέση με το grade στους όγκους που είναι grade I το ποσοστό των όγκων με υψηλή PAP ήταν 50% ενώ στους όγκους με grade II, III ήταν 76,5% και 63,6% αντίστοιχα.

Η έκφραση της PAP παρουσίασε τάσεις θετικής συσχέτισης με την έκφραση του *erbB-2* (Διάγραμμα 10) και αρνητικής συσχέτισης σε σχέση με την ηλικία και την έκφραση του *hcl -2* (Διάγραμμα 11).

Η ανάλυση κατά Spearman (Πίνακας 21) επιβεβαίωσε τη θετική συσχέτιση της έκφρασης της PAP με την έκφραση του PCNA ($r=0,460$, $p=0,000$) και με την κατάσταση των λεμφαδένων ($r=0,030$, $p=0,027$). Εμφάνισε επίσης στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με την έκφραση του *c-erbB -2* ($r=0,278$, $p=0,040$).

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της PAP με την υποτροπή ούτε με την επιβίωση.

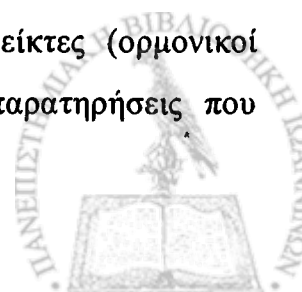


ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο καρκίνος του μαστού, ο πιο συχνός τύπος καρκίνου στις γυναίκες, χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια τόσο όσο αφορά την βιολογία του όγκου όσο και την κλινική του εξέλιξη. Έχει καταγραφεί ένας μεγάλος αριθμός γονιδίων των οποίων η απόκλιση από τη φυσιολογική λειτουργία συνδέεται με την έναρξη και την εξέλιξη της νόσου και οι πληροφορίες αυτές συνεισφέρουν στην κατανόηση των διαδικασιών που οδηγούν στον καρκίνο του μαστού. Παρ' όλα αυτά δεν έχει γίνει εφικτό μέχρι σήμερα να διατυπωθεί ένα γενικευμένο μοντέλο της καρκινογένεσης στο μαστό ούτε και να επιτευχθεί μια πλήρης ταξινόμηση και χαρακτηρισμός των όγκων κυρίως σε σχέση με την πρόγνωση και την ανταπόκριση στη θεραπεία.

Πέρα από την εφαρμογή των κλασικών προγνωστικών παραγόντων, που σε σημαντικό βαθμό συνδέονται με διαφορετικά βιολογικά χαρακτηριστικά των όγκων, ένας αριθμός μοριακών δεικτών μελετώνται ως προς την χρησιμότητά τους στη πρόγνωση και στην επιλογή θεραπευτικών σχημάτων. Η προσπάθεια για την τεκμηρίωση η όχι της χρήσης τους είναι διαρκής, ενώ ταυτόχρονα αναζητούνται νέοι δείκτες που θα μπορούσαν πιο αποτελεσματικά να προσδιορίσουν εκείνα τα χαρακτηριστικά των όγκων που είναι κρίσιμα για την ταξινόμηση και αντιμετώπισή τους.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να επεκτείνουμε προηγούμενες παρατηρήσεις που δείχνουν ότι οι μετρήσεις της ενεργότητας του ενζύμου πολυ(A)πολυμεράση μπορούν να συνεισφέρουν στην κατανόηση ορισμένων βιολογικών χαρακτηριστικών των όγκων του μαστού (ρυθμός κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μεταστατική ικανότητα) και έχουν προγνωστική αξία ειδικά για ασθενείς οι οποίοι δεν εμφανίζουν μεταστάσεις στους επιχώριους λεμφαδένες (186). Μελετήθηκαν επίσης μια σειρά γνωστοί μοριακοί-βιολογικοί δείκτες (ορμονικοί υποδοχείς, PCNA,τελομεράση, c-erbB-2, P53, bcl-2,) και οι παρατηρήσεις που



προέκυψαν για αυτούς πιστεύουμε πως είναι μια συμβολή στην προσπάθεια που γίνεται για τη διερεύνηση του ρόλου τους και της προγνωστικής τους αξίας.

Η μελέτη μας έγινε σε δυο φάσεις και εξετάσαμε δυο ομάδες ασθενών. Η πρώτη και μεγαλύτερη ομάδα (211 περιπτώσεις) αποτελούνταν από υλικό προερχόμενο από ασθενείς που είχαν νοσηλευθεί πρόσφατα - άρα το υλικό ήταν κατάλληλο για ανάλυση παραγόντων που είναι ευαίσθητοι στο χρόνο όπως π.χ. ενζυματική ενεργότητα. Η δεύτερη ομάδα αποτελούνταν από 78 δείγματα από ασθενείς που είχαν νοσηλευθεί παλαιότερα και ενώ ήταν δυνατή η αξιολόγηση των παραμέτρων που μελετήσαμε σε σχέση με την πορεία της νόσου, η παλαιότητα του υλικού περιόριζε τις μεθοδολογικές μας προσεγγίσεις.

Οι παρατηρήσεις μας ταξινομήθηκαν σε τρία κεφάλαια, ώστε να αξιολογηθούν:

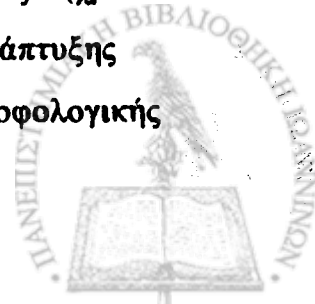
- Α. Συσχετίσεις των μοριακών-βιολογικών δεικτών τόσο μεταξύ τους και όσο και με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους
- Β. Συσχετίσεις της PAP με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους, και
- Γ. Συσχετίσεις της PAP με τους μοριακές-βιολογικές δείκτες.

A. Συσχετίσεις των μοριακών-βιολογικών δεικτών μεταξύ τους και με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους

Οι μοριακοί-βιολογικοί δείκτες που διερευνήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν το PCNA, το c-erbB-2, η miP53, το bcl-2, η τελομεράση, η PAP και οι υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης.

Οι κλινικοπαθολογικές παράμετροι που καταγράφηκαν παράλληλα στα ίδια δείγματα ήταν :

- Η ηλικία των ασθενών, που σχετίζεται σε πολλές περιπτώσεις με ιδιαίτερες κατηγορίες ασθενών (προεμμηνοπαυσιακές, φορείς μεταλλάξεων στο BRCA 1&2) και με διαφορετική πρόγνωση
- Το μέγεθος του όγκου, που δεν είναι ενδεικτικό μόνον της " ηλικίας " (χρόνο εξέλιξης) του όγκου, αλλά και αντανακλά διαφορετικούς ρυθμούς ανάπτυξης
- Ο ιστολογικός τύπος-βασικό κριτήριο βιολογικής και μορφολογικής ταξινόμησης



- Ο βαθμός ιστολογικής κακοήθειας (Grade) που συνυπολογίζει στοιχεία που αφορούν το βαθμό διαφοροποίησης, την πυρηνική ατυπία και την μιτωτική δράση
- Η κατάσταση των επιχωρίων λεμφαδένων που αποτελεί το πιο ισχυρό προγνωστικό δείκτη και χαρακτηρίζει τη δυνατότητα των κυττάρων του όγκου να μεθίστανται

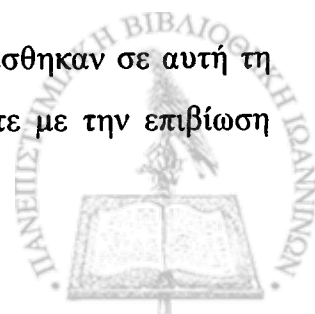
Έγινε προσπάθεια ώστε όλες οι μετρήσεις βιολογικών παραμέτρων να είναι ποσοτικές και όχι απλά ποιοτικές, ώστε να μην υπεισέρχονται υποκειμενικοί παράγοντες στην εκτίμηση και αξιολόγηση των δεδομένων. Επίσης οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο ίδιο υλικό (κυτταρικά εκχυλίσματα όγκων). Η προσέγγιση αυτή διασφαλίζει τη δυνατότητα άμεσων συγκρίσεων και συσχετισμών και παρακάμπτει το πρόβλημα της ετερογένειας του υλικού στο οποίο πραγματοποιούνται οι μετρήσεις.

Το σύνολο των παρατηρήσεων που προέκυψαν από αυτή τη μελέτη για τις συσχετίσεις των βιολογικών παραμέτρων μεταξύ τους αλλά και με τις καθιερωμένες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους συμβαδίζουν με όσα αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία. Κάποιες αποκλίσεις που παρατηρήθηκαν είναι πιθανό να οφείλονται στο γεγονός ότι στην πλειοψηφία οι μετρήσεις αυτών των παραγόντων στη βιβλιογραφία προσεγγίζονται με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους.

1. Η έκφραση του **PCNA**, στο σύνολο των δημοσιευμένων μελετών βρέθηκε να έχει θετική συσχέτιση με τον με το Grade (192,193) το μέγεθος του όγκου (155) με τον TLI (Thymidine Labeling Index) και SPF (S phase fraction) (194).

Στην παρούσα μελέτη η έκφραση του PCNA που προσδιορίσθηκε ποσοτικά μετά από ανάλυση με ανοσοαποτύπωση (Western blot) παρουσίασε διαφορές μεταξύ των όγκων που είχαν χαρακτηριστεί Grade I και των όγκων της κατηγορίας Grade II και III που χαρακτηριζόταν από υψηλότερες τιμές. Δεν βρέθηκε όμως συσχέτιση μεταξύ επιπέδων έκφρασης του PCNA και το μεγέθους του όγκου. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση της έκφρασης του PCNA με την έκφραση της mtP53 και την πλοϊδία των κυττάρων του όγκου.

Η έκφραση του PCNA στους όγκους των ασθενών που εξετάσθηκαν σε αυτή τη μελέτη δε βρέθηκε να έχει σχέση με τη συνολική επιβίωση ούτε με την επιβίωση



χωρίς υποτροπή. Αυτό το δεδομένο συμφωνεί με προηγούμενες παρατηρήσεις που αμφισβητούν ως ένα βαθμό την προγνωστική αξία του PCNA (195,196,197).

2. Η υπερέκφραση του c-erbB-2 έχει μελετηθεί εκτεταμένα στον καρκίνο του μαστού (78). Η πιο σημαντική εφαρμογή του προσδιορισμού της υπερέκφρασης του c-erbB-2 είναι για το χαρακτηρισμό των όγκων, οι οποίοι έχουν πιθανότητα ανταπόκρισης σε συμπληρωματική θεραπεία με το μονοκλωνικό αντίσωμα trastuzumab (HERCEPTIN) (198,168,169).

Η έκφραση του c-erbB-2 έχει μελετηθεί σε σχέση με άλλες παραμέτρους όπως η κατάσταση διήθησης των λεμφαδένων (199,81,164), η έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων, ο ιστολογικός τύπος και ο βαθμός ιστολογικής κακοήθειας (200). Τα αποτελέσματα όμως των μελετών είναι πολλές φορές αντιφατικά.

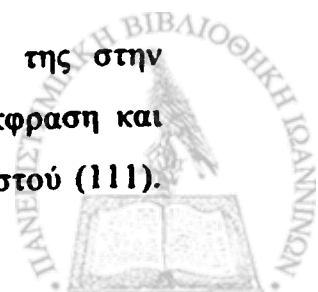
Στην παρούσα μελέτη η υπερέκφραση του c-erbB-2 εμφάνισε θετική συσχέτιση με το μέγεθος του όγκου, τάση θετικής συσχέτισης με την κατάσταση των λεμφαδένων, και αρνητικής συσχέτισης με την έκφραση του bcl-2.

• Η συσχέτιση της έκφρασης του με μειωμένη επιβίωση είναι αμφιλεγόμενη και παρατηρείται κυρίως σε ασθενείς με διηθημένους λεμφαδένες (198,201). Στην παρούσα μελέτη δεν διαπιστώθηκε να υπάρχει κάποια σχέση μεταξύ υπερέκφρασης του c-erbB-2 και της επιβίωσης των ασθενών.

3. Η έκφραση της μεταλλαγμένης P53 πρωτεΐνης έχει μελετηθεί εκτεταμένα στον καρκίνο του μαστού και έχει συσχετισθεί με μια σειρά κλινικοπαθολογικές και βιολογικές παραμέτρους (202,159), την ανταπόκριση σε συγκεκριμένα θεραπευτικά σχήματα (203) και με το χρόνο επιβίωσης (204,205).

Η έκφραση της μεταλλαγμένης P53 που σε αυτή τη μελέτη προσδιορίστηκε ποσοτικά με τη μέθοδο Elisa, διαπιστώθηκε να έχει αρνητική συσχέτιση με την έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων και θετική συσχέτιση με το μέγεθος το Grade, την έκφραση του bcl-2, του PCNA και τη πλοϊδία επιβεβαιώνοντας προηγούμενες παρατηρήσεις (204,206,207). Η έκφραση της μεταλλαγμένης P53 φάνηκε να είναι αρνητικός προγνωστικός παράγοντας όσο αφορά την υποτροπή και η τάση αυτή ισχύει για τη συνολική επιβίωση.

4. Η τελομεράση έχει διερευνηθεί κυρίως σε σχέση με το ρόλο της στην καρκινογένεση (208) και στη διαδικασία γήρανσης των κυττάρων. Η έκφραση και ενεργότητά της έχουν ως ένα βαθμό μελετηθεί και στον καρκίνο του μαστού (111).

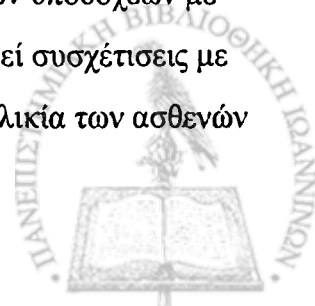


Τουλάχιστον μέχρι στιγμής δεν έχει αποδοθεί ιδιαίτερη προγνωστική σημασία στην έκφραση της, ούτε έχει διαπιστωθεί σαφής σχέση με άλλες κλινικοπαθολογικές παραμέτρους, πέρα από την αρνητική συσχέτιση με την ηλικία (209,210) και θετική με την κατάσταση των λεμφαδένων (211). Η δική μας μελέτη επιβεβαίωσε την παρατήρηση ύπαρξης αρνητικής συσχέτισης με την ηλικία, αλλά όχι και την αντίστοιχη παρατήρηση που αφορά την κατάσταση διήθησης των λεμφαδένων.

5. Οι μελέτες που αφορούν την έκφραση του bcl-2 στον καρκίνο του μαστού δείχνουν ότι όπως και σε άλλες περιπτώσεις η παρουσία της σχετίζεται αρνητικά με τους ρυθμούς απόπτωσης (212). Η έκφραση του bcl-2 σχετίζεται θετικά με τα με τα επίπεδα των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης (213,214) και πιθανά το βαθμό ιστολογικής διαβάθμισης (Grade) (215).

Στη μελέτη μας διαπιστώθηκε ότι η έκφραση της bcl-2 σχετίζεται αρνητικά με την ηλικία, εύρημα που συνηγορεί με την παρατήρηση μεγαλύτερου αριθμού αποπτωτικών κυττάρων σε όγκους από ηλικιωμένους ασθενείς (212). Έδειξε επίσης τάσεις θετικής συσχέτισης με το Grade και την έκφραση των υποδοχέων προγεστερόνης. Παρά το γεγονός ότι η έκφραση της bcl-2 σχετίζεται με μειωμένη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία (216,217) σαν προγνωστικός παράγοντας είναι θετικός, δείχνοντας μειωμένο κίνδυνο επανεμφάνισης της νόσου (212,218,219). Αυτό το εύρημα επιβεβαιώθηκε τουλάχιστον σαν τάση και στην παρούσα μελέτη.

6. Οι υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης έχουν μελετηθεί εκτεταμένα στο καρκίνο του μαστού. Η παρατηρούμενη συσχέτιση της παρουσίας των ορμονικών υποδοχέων με την ανταπόκριση στην αντί-οιστρογονική θεραπεία, τους καθιέρωσε σαν ένα σημαντικό προβλεπτικό δείκτη στο καρκίνο του μαστού. Η διαφορά ανταπόκρισης στη θεραπεία αυτή υποδηλώνει και όγκους με διαφορετικά χαρακτηριστικά γεγονός που ενισχύεται με τα πιο πρόσφατα δεδομένα μελετών που στηρίζονται στην τεχνολογία των *microarrays*. Στις μελέτες αυτές φαίνεται πως ανάμεσα στα αλλά η παρουσία η όχι των ορμονικών υποδοχέων είναι ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά που διαχωρίζουν του όγκους σε ομάδες με διαφορετικό προφίλ έκφρασης μεγάλου αριθμού γονιδίων. (220,221,73). Όσο αφορά την συσχέτιση της παρουσίας των ορμονικών υποδοχέων με άλλες κλινικοπαθολογικές και βιολογικές παραμέτρους έχουν αναφερθεί συσχετίσεις με το μέγεθος του όγκου, το Grade, το SPF (222) καθώς επίσης και την ηλικία των ασθενών (223).



Στην παρούσα μελέτη η μόνη συσχέτιση των ορμονικών υποδοχέων που παρατηρήθηκε (εκτός από τις συσχετίσεις με την έκφραση του c-erbB2, bcl-2 και miP53 που αναφέρθηκαν πιο πάνω) ήταν η αρνητική συσχέτιση με το Grade , παρατήρηση που αναφέρεται σε μια σειρά εργασίες (224,225).

B. Συσχετίσεις της PAP με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους

Από τις συσχετίσεις της ενεργότητας και έκφρασης της PAP με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους που ήταν διαθέσιμες και για τις δύο ομάδες ασθενών φαίνεται πως υψηλές τιμές της PAP εμφανίζονται πιο συχνά σε όγκους με μέγεθος μεγαλύτερο των 2cm , καθώς και σε όγκους χαμηλής διαφοροποίησης (Grade II και III συνεκτιμωμένων). Επίσης υψηλότερες τιμές καταγράφηκαν σε όγκους που προέρχονται από ασθενείς μικρότερης ηλικίας (<45 χρόνων). Σε σχέση με τον ιστολογικό τύπο τα πορογενή καρκινώματα εμφανίζουν την τάση να έχουν πιο υψηλές τιμές της PAP σε σχέση με τα λοβιακά.

Οι τάσεις συσχέτισης της PAP με αυτές τις παραμέτρους έδειξε πως υψηλές τιμές της PAP πιθανά σχετίζονται με δείκτες κακής πρόγνωσης όπως το μεγάλο μέγεθος , το υψηλό Grade και η μικρή ηλικία των ασθενών. Η παρατηρούμενη επίσης τάση αρνητικής συσχέτισης της υπερέκφρασης της PAP με την υπότροπη και την επιβίωση ενισχύει αυτή την εκτίμηση.

Η παρατήρηση αυτή ενισχύεται επιπλέον και από το γεγονός πως υψηλότερες τιμές της PAP παρατηρήθηκαν στους όγκους που είναι θετικοί για διηθημένους λεμφαδένες. Οι δια φορές των τιμών της PAP σε σχέση με την κατάσταση των λεμφαδένων ήταν οι πιο σημαντικές στατιστικά από όλες τις παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των κλινικοπαθολογικών παραμέτρων που εξετάστηκαν. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνει προηγούμενες εργασίες που δείχνουν πως υψηλές τιμές της PAP σχετίζονται με τη διήθηση στους λεμφαδένες και επόμενα και με κακή πρόγνωση (185).

Από αυτές τις παρατηρήσεις προκύπτει η πιθανότητα οι τιμές της PAP να σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς και με τη μεταστατική



ικανότητα των όγκων . Αυτή η υπόθεση ενισχύεται και από τις παρατηρούμενες συσχετίσεις της PAP με άλλους μοριακές-βιολογικές δείκτες.

Γ. Συσχετίσεις της PAP με τους μοριακούς-βιολογικούς δείκτες

Οι μοριακοί-βιολογικοί δείκτες που εξετάστηκαν καλύπτουν ένα εύρος χαρακτηριστικών που προσδιορίζουν τους όγκους του μαστού δίνοντας έτσι τη δυνατότητα διερεύνησης του ρόλου της PAP μέσω των πιθανών συσχετίσεων της με κάποια από αυτά τα χαρακτηριστικά . Έτσι εξετάστηκαν παράγοντες που ενέχονται στην απόπτωση (P53, Bcl-2), καθώς και παράγοντες που επάγουν (c-erbB-2, ορμονικοί υποδοχείς), επιτρέπουν (τελομεράση), η απλά συνδέονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (PCNA).

Η έκφραση της μεταλλαγμένης **P53** σχετίζεται με τη δυνατότητα διαφυγής από τη διαδικασία της απόπτωσης, θεωρείται δυσμενής προγνωστικός παράγοντας και σχετίζεται θετικά με δείκτες πολλαπλασιασμού. Στην παρούσα μελέτη δε βρέθηκε συσχέτιση των τιμών της PAP με την έκφραση της μεταλλαγμένης P53. Με δεδομένο πως η έκφραση της μεταλλαγμένης P53 σχετίζεται με την αποφυγή της απόπτωσης και όχι με την επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα πως η PAP δε σχετίζεται με την διαδικασία αποφυγής της απόπτωσης, αλλά ούτε και με τη "βιωσιμότητα" των κυττάρων.

Η έκφραση του αντιαποπτωτικού παράγοντα **Bcl-2** που αν και προσδίδει στα κύτταρα χημειοαντοχή θεωρείται ευνοϊκός προγνωστικός παράγοντας στον καρκίνο του μαστού. Από τη μελέτη μας προέκυψε ότι η έκφραση του Bcl-2 σχετίζεται αρνητικά με την έκφραση της PAP ενισχύοντας το δυσμενή προγνωστικό της χαρακτήρα. Η συσχέτιση αυτή της PAP προσομοιάζει με αυτήν του ErbB-2 που η έκφραση του στους όγκους του μαστού σχετίζεται αρνητικά με την έκφρασή της Bcl-2 (217).

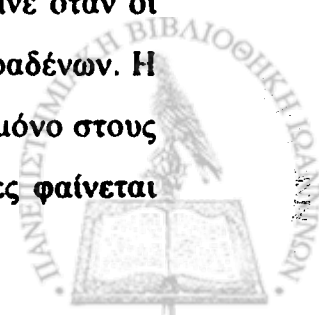
Η υπρέκφραση του **c-erbB-2** σχετίζεται με τη δυνατότητα των καρκινικών κυττάρων να ανταποκρίνονται με διαφορετικό από τα φυσιολογικά κύτταρα τρόπο σε εξωγενή αυξητικά μηνύματα (226,227). Η υπερέκφραση του c-erbB-2 αποτελεί δυσμενή προγνωστικό δείκτη σχετίζεται με ανεξάρτητο των οιστρογόνων φαινότυπο,

με δείκτες πολλαπλασιασμού, με αυξημένη μεταστατική ικανότητα (228). Η έκφραση του c-erbB-2 βρέθηκε πως συσχετίζεται θετικά με την έκφραση της PAP. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την πιθανότητα η έκφραση της PAP να σχετίζεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ο οποίος επάγεται μέσω του c-erbB -2.

Η ενεργότητα του ενζύμου τελομεράση δίνει στα κύτταρα τη δυνατότητα για ατελεύτητο πολλαπλασιασμό. Αν και ο προγνωστικός χαρακτήρας της τελομεράσης αμφισβητείται, η έκφρασή της αντανakλά το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων. Διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση της ενεργότητας της PAP με την ενεργότητα της τελομεράσης, σχέση που αντανakλά την επιβεβαιωμένη επίδραση της τελευταίας στον κυτταρικό κύκλο (230).

Μια έντονα θετική συσχέτιση καταγράφηκε μεταξύ ενεργότητας της πολύ(Α)πολυμεράσης και των υποδοχέων οιστρογόνων. Οι παρουσία υποδοχέων οιστρογόνων στον καρκίνο του μαστού είναι ένας σημαντικός προβλεπτικός δείκτης καλής ανταπόκρισης σε αντιορμονική θεραπεία, αλλά είναι χαμηλής σημασίας σαν προγνωστικός δείκτης. Υπάρχουν ωστόσο δεδομένα τα οποία συνδέουν πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις ορμονικών υποδοχέων με κακή πρόγνωση (229). Έχει διαπιστωθεί ότι, ενώ σε κύτταρα από φυσιολογικό επιθήλιο μαστού που πολλαπλασιάζονται οι υποδοχείς οιστρογόνων και το αντιγόνο Ki- 67 (δείκτης πολλαπλασιασμού) ποτέ δεν συνυπάρχουν, σε ένα ποσοστό των όγκων του μαστού εκφράζονται ταυτόχρονα (231). Η παρατήρηση αυτή δείχνει πως στους όγκους αυτούς έχει διαταραχθεί ο φυσιολογικός τρόπος επαγωγής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού μέσω των ορμονικών υποδοχέων. Είναι πιθανό η συσχέτιση της PAP με τα επίπεδα των οιστρογονικών υποδοχέων να καταγράφει τους όγκους που εμφανίζουν αυτή την διαταραχή.

Η έκφραση του PCNA σχετίζεται με την ύπαρξη κυττάρων που βρίσκονται σε φάσεις ενεργού πολλαπλασιασμού. Ισχυρή θετική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ των τιμών της PAP και της έκφρασης του PCNA. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η PAP αντανakλά ως ένα βαθμό το ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων του όγκου. Πρέπει επίσης να σημειωθεί η παρατήρηση που έγινε όταν οι όγκοι εξετάστηκαν χωριστά ανάλογα με την κατάσταση διήθησης των λεμφαδένων. Η θετική συσχέτιση των τιμών της PAP με την έκφραση του PCNA υπάρχει μόνο στους όγκους με αρνητικούς λεμφαδένες. Στους όγκους με θετικούς λεμφαδένες φαίνεται



πως ελαχιστοποιείται ή παύει να υπάρχει, και αυτό πιθανά υποδηλώνει πως οι υψηλές τιμές της PAP που παρατηρούνται σε αυτή την κατηγορία σχετίζονται και με άλλα, εκτός του ρυθμού πολλαπλασιασμού, χαρακτηριστικά των όγκων.

Από τις συσχετίσεις που αναφέρθηκαν προκύπτει ότι η έκφραση της PAP που αντικατοπτρίζεται στην ενζυματική της ενεργότητα είναι μια παράμετρος που:

α) Συνδέεται με μια σειρά προγνωστικούς δείκτες και επόμενα είναι πιθανό η μέτρησή της να έχει προγνωστική αξία στον καρκίνο του μαστού.

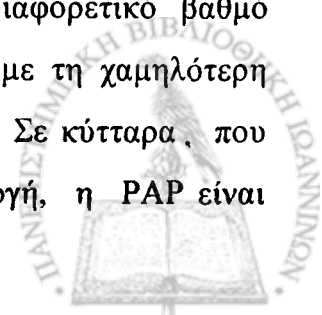
β) Αντανακλά τον ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού κυρίως στους όγκους ασθενών που δεν παρουσιάζουν μεταστάσεις στους λεμφαδένες και αυτό ίσως είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για την πρόγνωση της εξέλιξης των όγκων αυτής της κατηγορίας.

γ) Όταν δε συνδέονται με το ρυθμό πολλαπλασιασμού οι αυξημένες τιμές της PAP πιθανά να χαρακτηρίζουν τους όγκους με αυξημένη μεταστατική ικανότητα.

Παλαιότερα η αυξημένη δραστηριότητα της PAP στον καρκίνο είχε αποδοθεί στην φωσφορυλίωση του ενζύμου. Τα πιο πρόσφατα όμως δεδομένα(232) καθώς και τα ευρήματα αυτής της μελέτης, που αφορούν την σύγκριση ενεργότητας και έκφρασης σε μια σειρά όγκων μαστού, δείχνουν ότι η αυξημένη ενεργότητα αντανακλά υψηλά επίπεδα του αντιγόνου της PAP και όχι το βαθμό φωσφορυλίωσης της. Δηλαδή, η PAP υπερεκφράζεται στον καρκίνο του μαστού.

Είναι δύσκολο να διακρίνει κανείς κατά πόσο η υπερέκφραση της PAP είναι αποτέλεσμα της αποδιοργάνωσης μιας σειράς μηχανισμών του καρκινικού κυττάρου ή εάν η υπερέκφραση αυτή καθ'εαυτή συντελεί στην αποδιοργάνωση αυτή.

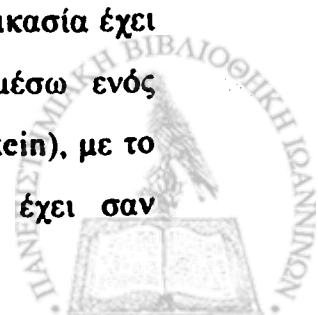
Προηγούμενα δεδομένα και τα δεδομένα αυτής της μελέτης, που αφορούν την επαγωγή σε πολλαπλασιασμό της κυτταρικής σειράς MCF-7, συνδέουν υψηλά επίπεδα ενεργότητας της PAP με κύτταρα που πολλαπλασιάζονται γρήγορα. Τα τελευταία δεδομένα αναφέρουν ότι η ενεργότητα της PAP ρυθμίζεται στη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου μέσω της φωσφορυλίωσής της. Μεταξύ των διαφόρων μορφών της πολυμεράσης, οι οποίες χαρακτηρίζονται από διαφορετικό βαθμό φωσφορυλίωσης η υπέρ φωσφορυλιωμένη μορφή είναι εκείνη με τη χαμηλότερη ενεργότητα (176). Η PAP φωσφορυλιώνεται από την κυκλίνη B. Σε κύτταρα, που βρίσκονται στην μιτωτική φάση κι όπου η κυκλίνη B είναι ενεργή, η PAP είναι



υπερφωσφορυλιωμένη και ανενεργή. Η μειωμένη ενεργότητα της PAP σε αυτήν τη φάση συντελεί στη μείωση της σύνθεσης πολυαδενυλιωμένων mRNA και πρωτεϊνών. Επομένως κάτω από ορισμένες συνθήκες η αυξημένη ενεργότητα και υπερέκφραση της PAP, είναι αντανάκλαση του αριθμού των κυττάρων που βρίσκονται σε συνθετική φάση. Οι αυξημένοι ρυθμοί πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, λόγω της απορύθμισης των μηχανισμών που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο, μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένη έκφραση της PAP. Η παρατήρηση πως η ενεργοποίηση του συμπλοκου VIIa/TF (clotting factor VIIa/tissue factor), έχει σαν αποτέλεσμα την υπερέκφραση της PAP (242) δείχνει και άλλους εκτός του πολλαπλασιασμού μηχανισμούς που μπορεί να οδηγήσουν σε υπερέκφραση της PAP. Αρκετές εργασίες δείχνουν πως οι TF receptors συμμετέχουν και σε άλλες διαδικασίες εκτός της αιμόστασης όπως στην αγγειογενεση και την διαδικασία μετάστασης των όγκων.

Η πολυ(A) πολυμεράση συμμετέχει στη διαμόρφωση του 3' ακρου του mRNA των ευκαρυωτικών κυττάρων (233). Άρα το ένζυμο πολυ(A) πολυμεράση συμμετέχει σε κρίσιμες διαδικασίες της γονιδιακής έκφρασης γιατί η ουρά του πολυ(A) -της οποίας καταλύει τη σύνθεση -συνεισφέρει και στην σταθερότητα του mRNA στο κυτταρόπλασμα και στην μεταφορά του από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και στη μεταφρασιμότητά του (234).

Η διαμόρφωση της 3' δομής του mRNA προϋποθέτει ενδονουκλεολυτική πέψη του πρόδρομου RNA σε συνδυασμό με τον πολυμερισμό του πολυαδενυλικού οξέος και απαιτεί την συνεργασία αρκετών πρωτεϊνικών παραγόντων. Όλοι οι παράγοντες αυτοί ελέγχονται αυστηρά και κατά τον κυτταρικό κύκλο και κατά τη διαφοροποίηση (175,235,236). Η σωστή και επακριβής διεξαγωγή της διαδικασίας της πολυαδενυλίωσης είναι κρίσιμη για το κύτταρο και υπάρχουν μηχανισμοί που το εξασφαλίζουν. Ένας τέτοιος μηχανισμός φαίνεται πως δρα στην διάρκεια της διαδικασίας μεταγραφής του DNA. Έχει διαπιστωθεί ότι στη διάρκεια της μεταγραφής λειτουργεί ένας μηχανισμός επιδιόρθωσης των βλαβών που εντοπίζονται στο DNA (transcription coupling repair) (237). Κεντρικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία έχει η πρωτεΐνη του γονιδίου BRCA1 (238,239). Η BRCA1 συνδέεται μέσω ενός παράγοντα, την πρωτεΐνη BRAD 1 (BRCA1 Associated RING Domain protein), με το σύμπλοκο της πολυαδενυλίωσης (240). Η συνεργιστική δράση τους έχει σαν



αποτέλεσμα την αναστολή της πολυαδενυλίωσης των νεο-μεταγραφόμενων μηνυμάτων. Η αναστολή της πολυαδενυλίωσης σε αυτή τη φάση πιστεύεται πως προστατεύει το κύτταρο από τη μετάφραση σε πρωτεΐνη μηνυμάτων RNA που θα έχουν λάθη η δεν θα είναι πλήρη (241). Η υπερέκφραση της PAP ίσως έχει σαν αποτέλεσμα την απορύθμιση αυτού του μηχανισμού και τη συσσώρευση λανθασμένων γονιδιακών προϊόντων. Η πιθανή απορύθμιση, μέσω αυτής της οδού, κρίσιμων για την φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου γονιδίων μπορεί να οδηγήσει το καρκινικό κύτταρο σε μια πιο επιθετική (και ως προς την μετάσταση) συμπεριφορά .

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

A. Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης που αφορούν την έκφραση των μοριακών δεικτών PCNA, P53, c-erbB-2, bcl-2 και τελομεράσης βρίσκονται σε συμφωνία με τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως :

1. Η έκφραση της mtP53, η υπερέκφραση του PCNA και του c-erbB-2 συσχερίζονται με παραμέτρους δυσμενούς πρόγνωσης.
2. Η υπερέκφραση του bcl-2 σχετίζεται με παραμέτρους καλύτερης πρόγνωσης, ενώ για την ενεργότητα της τελομεράσης δεν προκύπτει κάποιο ιδιαίτερο στοιχείο.

B. Τα αποτελέσματα που αφορούν την ενζυματική ενεργότητα και έκφραση της PAP δείχνουν ότι :

1. Η PAP υπερεκφράζεται σε ένα ποσοστό των καρκινομάτων του μαστού (περίπου στο 50%) και η υπερέκφραση της αντικατοπτρίζεται και στην ενζυματική της ενεργότητα.
2. Η PAP (έκφραση και ενεργότητα) σχετίζεται με μια σειρά προγνωστικών δείκτες και επομένως ενισχύεται η παρατήρηση πως η μέτρηση της έχει προγνωστική αξία στον καρκίνο του μαστού.



3. Η PAP αντανακλά τον ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού κυρίως στους όγκους ασθενών που δεν παρουσιάζουν μεταστάσεις στους λεμφαδένες, και αυτό ίσως είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για την πρόγνωση της εξέλιξης των όγκων αυτής της κατηγορίας.
4. Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι αυξημένες τιμές της PAP όταν δεν συνδέονται με το ρυθμό πολλαπλασιασμού πιθανά να χαρακτηρίζουν όγκους με αυξημένη μεταστατική ικανότητα.

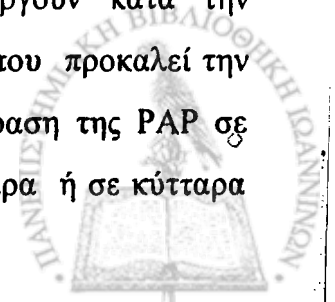


ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

1. Τα δεδομένα που προέκυψαν από τη μελέτη μας δείχνουν ότι η PAP μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο προγνωστικό δείκτη ιδιαίτερα για ασθενείς που δεν εμφανίζουν μεταστάσεις στους λεμφαδένες. Δεν είναι σαφές εάν η χρησιμότητα της PAP κυρίως σε αυτή την ομάδα οφείλεται στο ότι αντιπροσωπεύει δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή ότι αντανακλά το μεταστατικό δυναμικό των κυττάρων που όμως δεν έχει ακόμη εκδηλωθεί. Αυτό το τελευταίο υποστηρίζεται από το γεγονός ότι στους ασθενείς που έχουν ήδη εμφανίσει μεταστάσεις στους λεμφαδένες προσμετρούνται υψηλότερες τιμές PAP που επιπλέον εμφανίζονται ανεξάρτητες από άλλους δείκτες πολλαπλασιασμού. Αυτό είναι μια υπόθεση που πρέπει να διερευνηθεί στο μέλλον.

2. Η καθιέρωση της PAP σαν δείκτη πρόγνωσης προϋποθέτει εκτός των απαιτούμενων νέων μελετών σε ανεξάρτητες ομάδες ασθενών, τη βελτίωση της μεθοδολογικής προσέγγισης του προσδιορισμού της. Εφόσον η ενζυμική ενεργότητα αντανακλά τα επίπεδα έκφρασης της PAP πιθανά αυτή μπορεί να προσδιορίζεται με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους και για τον ποσοτικό προσδιορισμό της μπορεί να σχεδιασθεί και εφαρμοσθεί η τεχνική ELISA. Χρήσιμο επίσης θα ήταν να διερευνηθεί η σχέση της πολυ(Α)πολυμεράσης με την ανταπόκριση σε συγκεκριμένα θεραπευτικά σχήματα.

3. Ένα ερώτημα είναι το κατά πόσον η υπερέκφραση της PAP είναι αποτέλεσμα της αποδιοργάνωσης του κύτταρου ή μπορεί να συντελεί στην αποδιοργάνωση αυτή. Πειράματα στα οποία η PAP υπερεκφράζεται σε φυσιολογικά κύτταρα (DT 40 κύτταρα πτηνών) έδειξαν ότι η υπερέκφραση της PAP οδηγεί στη συσσώρευση κυττάρων στην G0-G1 φάση (236). Αυτό πιθανά να οφείλεται στην ενεργοποίηση μηχανισμών ανάδρασης παρόμοιων με αυτούς που λειτουργούν κατά την υπερέκφραση ογκογονιδίων όπως π.χ η υπερέκφραση του c-myc που προκαλεί την συσσώρευση κυττάρων στην G2 φάση (243). Όμως η υπερέκφραση της PAP σε ατελεύτητες κυτταρικές σειρές σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα ή σε κύτταρα



όπου οι μηχανισμοί ανάδρασης δεν λειτουργούν, έχουν π.χ. αλλοιωθεί τα μονοπάτια του Rb ή του P53, μπορεί να έχει το αντίθετο αποτέλεσμα και να συντελεί στην προώθηση του καρκινικού φαινοτύπου.

Εφόσον αποδειχθεί ότι η υπερέκφραση της PAP συντελεί στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και προωθεί την καρκινογένεση πιθανόν να αποτελέσει κατάλληλο στόχο για εστιασμένη φαρμακευτική αγωγή και θα είχε αξία ο σχεδιασμός ειδικών αναστολέων της ενζυμικής της δράσης.



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος του μαστού, ο πιο συχνός καρκίνος στις γυναίκες, εμφανίζει μεγάλη βιολογική και κλινική ετερογένεια. Η ανάγκη για πιο ολοκληρωμένο χαρακτηρισμό της νόσου οδήγησε στην αναζήτηση και χρήση μιας σειράς δεικτών που χαρακτηρίζουν βιολογικά τον όγκο, το στάδιο της νόσου και την πιθανή ανταπόκριση σε συγκεκριμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις.

Εκτός από τους καθιερωμένους δείκτες, των οποίων η χρησιμότητα έχει γίνει αποδεκτή έχει προταθεί μια σειρά νέων δεικτών που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης. Στην προσπάθεια αυτή φιλοδοξεί να συμβάλει η παρούσα μελέτη κυρίως μέσω της διερεύνησης του προγνωστικού χαρακτήρα του ενζύμου πολύ(Α)πολυμεράση (PAP), και ταυτόχρονα με την επί μέρους διερεύνηση μιας σειράς άλλων δεικτών στους οποίους έχει αποδοθεί προγνωστική η προβλεπτική σημασία σε μεγαλύτερο η μικρότερο βαθμό όπως των c-erbB-2, PCNA, P53, bcl2 και Τελομεράσης.

Το ένζυμο πολύ(Α)πολυμεράση είναι ένας από τους παράγοντες που συμμετέχουν στο σχηματισμό της ουράς του πολυ(Α). Η δομή αυτή βρίσκεται στο 3' άκρο των ευκαρυωτικών μηνυμάτων RNA και συμμετέχει στη μεταφορά τους στο κυτταρόπλασμα από τον πυρήνα, στην ακεραιότητα και μεταφρασιμότητά τους. Συμμετέχει δηλαδή στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης. Προηγούμενες μελέτες έχουν αποδώσει στην PAP προγνωστικό χαρακτήρα σε συγκεκριμένου τύπου λευχαιμίες και στον καρκίνο του μαστού. Αυξημένες τιμές του ενζύμου αυτού σε κυτταρικά εκχυλίσματα όγκων μαστού σχετίζονται με μειωμένη συνολική και ελεύθερα νόσου επιβίωση.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια αποσαφήνισης του προγνωστικού ρόλου της στον καρκίνο του μαστού κυρίως μέσω της διερεύνησης της σχέσης της PAP με μια σειρά κλινικοπαθολογικές και βιολογικές παραμέτρους.



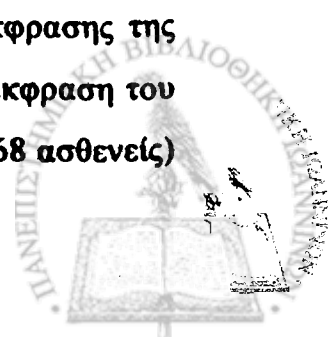
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μελέτη αποτελείται από δύο ενότητες. Στην πρώτη ενότητα διερευνάται η συσχέτιση της ενεργότητας της PAP με μια σειρά παραμέτρους (ηλικία, μέγεθος όγκου, ιστολογικός τύπος, Grade, κατάσταση λεμφαδένων, υποδοχείς οιστρογόνων και προγεστερόνης, έκφραση του δείκτη πολλαπλασιασμού PCNA, του μεταλλαγμένου ογκοκατασταλτικού ογκογονιδίου P53, και την ενεργότητα του ενζύμου Τελομεράσης) σε 211 πρόσφατα δείγματα όγκων μαστού. Στη δεύτερη ενότητα διερευνάται η συσχέτιση της έκφρασης της PAP και με ορισμένες επί πλέον παραμέτρους (c-erbB-2, bcl-2, πλοΐδια) σε 78 δείγματα, για το μεγαλύτερο μέρος των οποίων υπήρχαν διαθέσιμα στοιχεία της πορείας των ασθενών για περίπου τρία χρόνια.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψαν οι ακόλουθες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις:

1. Η ενεργότητα και η έκφραση της PAP σχετίζονται θετικά με την έκφραση του PCNA.
2. Η συσχέτιση αυτή ενισχύεται στην ομάδα των όγκων με αρνητικούς λεμφαδένες, ενώ δεν υφίσταται στην ομάδα των όγκων με διηθημένους λεμφαδένες.
3. Η ενεργότητα και έκφραση της PAP είναι πιο υψηλή στους όγκους με διηθημένους λεμφαδένες.
4. Η ενεργότητα της PAP σχετίζεται θετικά με τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνων και προγεστερόνης.
5. Η ενεργότητα της PAP σχετίζεται θετικά με την ενεργότητα της Τελομεράσης.
6. Η έκφραση της PAP σχετίζεται θετικά με την έκφραση του c-erbB-2 και αρνητικά με την έκφραση του bcl-2.

Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της ενεργότητας ή έκφρασης της PAP με την ηλικία, το μέγεθος, το Grade, τον ιστολογικό τύπο, και την έκφραση του p53. Για τις περιπτώσεις για τις οποίες υπήρχαν διαθέσιμα στοιχεία (68 ασθενείς)



δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση της έκφρασης της PAP με την υποτροπή και την επιβίωση.

Για τις υπόλοιπες παραμέτρους στατιστικά σημαντικές ($P < 0.05$) προέκυψαν οι ακόλουθες συσχετίσεις:

1. Η έκφραση του PCNA σχετίζεται θετικά με την πλοΐδια των όγκων, την έκφραση του μεταλλαγμένου P53 και εμφανίζεται υψηλότερη στα πορογενή καρκινώματα και στους όγκους χαμηλής διαφοροποίησης.

2. Η έκφραση της mtP53 σχετίζεται αρνητικά με τους υποδοχείς οιστρογόνων και την πιθανότητα υποτροπής, και σχετίζεται θετικά με το Grade.

3. Η έκφραση του c-erbB-2 σχετίζεται με το μέγεθος του όγκου

4. Η έκφραση του bcl-2 σχετίζεται αρνητικά με την ηλικία των ασθενών και την πιθανότητα θανάτου.

5. Η ενεργότητα της τελομεράσης σχετίζεται αρνητικά με την ηλικία των ασθενών.

Τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με τα δεδομένα της διεθνούς βιβλιογραφίας.

Επίσης έγινε μια προσπάθεια να διερευνηθεί ο μηχανισμός στον οποίο οφείλονται οι αυξομειώσεις της ενεργότητας της PAP τις οποίες παρατηρούμε στον καρκίνο του μαστού. Για αυτό μελετήθηκαν τα επίπεδα ενεργότητας του ένζυμου σε συνάρτηση με τα επίπεδα έκφρασης και τις μορφές του ενζύμου σε όγκους μαστού και στην προερχόμενη από καρκίνο του μαστού κυτταρική σειρά MCF-7. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι στον καρκίνο του μαστού η αυξημένη ενεργότητα του ενζύμου PAP οφείλεται σε υπερέκφραση της αντίστοιχης πρωτεΐνης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα που δείχνουν ότι η ενεργότητα της PAP έχει θετική συσχέτιση με παραμέτρους που αφορούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό όπως το PCNA, την τελομεράση που αντανακλά το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των κυττάρων και τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων οιστρογόνων, υποδεικνύουν ότι η PAP συνδέεται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.



Κάποιες από τις συσχετίσεις αυτές ενισχύονται όταν εξετασθούν τα δείγματα σε ασθενείς των οποίων οι επιχώριοι λεμφαδένες δεν έχουν διηθηθεί από τη νόσο και σε αυτή την κατηγορία η PAP αποτελεί έναν δείκτη που συνδέεται άμεσα με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό επιβεβαιώνοντας προηγούμενες παρατηρήσεις. Αντίθετα σε αυτά τα δείγματα που προέρχονται από ασθενείς στους οποίους ανιχνεύεται διήθηση στους λεμφαδένες, η συσχέτιση αυτή χάνεται. Επομένως η αυξημένη ενεργότητα της PAP που οφείλεται σε αυξημένη έκφραση της αντίστοιχης πρωτεΐνης, αποδεσμευμένη από τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό πιθανά αποτελεί ένα χαρακτηριστικό των όγκων με μεταστατικό δυναμικό.

Περαιτέρω διερεύνηση της έκφρασης της PAP σε όγκους περισσότερων ασθενών καθώς και των μηχανισμών που οδηγούν στην υπερέκφρασή της στον καρκίνο του μαστού θα δώσουν τη δυνατότητα αποσαφήνισης του προγνωστικού χαρακτήρα της PAP στον καρκίνο του μαστού και πιθανά τη σχέση της με την μετάσταση.



SUMMARY

Title: Study of Novel Parameters as Prognostic Markers in Breast Cancer

Introduction

Breast cancer the most frequent type of cancer among women, is characterised by biological and clinical heterogeneity. The need for accurate characterisation of the disease has promoted the search and application of a series of markers which describe the biology of the tumour, the stage of the disease and predict the response to adjuvant therapy.

Next to the established markers that are widely accepted there is a number of recently introduced markers that require further investigation. The main goal of this study is to investigate the prognostic potential of the enzyme poly(A) polymerase (PAP) and at the same time evaluate in parallel a few other markers to whom a varying degree of prognostic or predictive value has been attributed, such as c-erbB-2, PCNA, P53, bcl-2 and telomerase.

The enzyme poly(A)polymerase is one of the components participating in the formation of the poly (A) tail. This structure is found in the 3'end of the eukaryotic mRNA and it contributes to the transport from the nucleus to the cytoplasm, to the stability and the translatability of mRNAs. Thus, it participates in the control of gene expression. Previous studies have attributed prognostic value to PAP in certain types of leukaemia and in breast cancer as well. Increased PAP enzymatic activity in tumour cytosols from breast cancer patients was associated with decreased overall and disease free survival.

The present study attempts to further investigate and delineate the prognostic potential of PAP through the examination of the relation of PAP to a number of clinical and biological parameters.



Results

The study comprises of two sections. In the first section the relation of PAP activity to a number of parameters was investigated in 211 recently operated breast cancer tumour samples. The parameters studied were: age, tumour size, histology, lymph node involvement, steroid receptors, the expression of the proliferation marker PCNA, the expression mutant P53, and the activity of the enzyme telomerase.

In the second section PAP and few additional parameters (c-erbB-2, bcl-2, ploidy) were studied in 78 frozen samples for which survival data were available for a time period of three years.

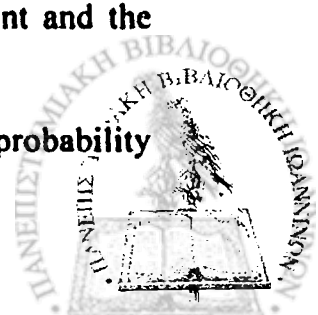
The following statistically significant correlation's were obtained:

1. PAP activity and expression have a positive correlation to PCNA.
2. The above correlation is stronger in tumours of node negative patients but is lost in those of node positive patients.
3. PAP activity and expression is higher in tumours of node positive patients.
4. PAP activity has a positive correlation to oestrogen and progesterone receptor expression.
5. PAP activity has a positive correlation to telomerase activity.
6. PAP expression has a positive correlation to c-erbB-2 and negative to bcl-2 expression

No statistically significant correlation was observed between PAP activity or expression and age, tumour size, grade, histologic type, and P53. For the 68 patients for whom survival data were available no statistically significant correlation could be observed between PAP expression and overall or disease free survival.

The following correlations were found statistically significant:

1. PCNA expression had a positive correlation with tumour ploidy, P53 expression and was increased in ductal carcinomas.
2. Telomerase activity has an inverse correlation to age.
3. C-erbB-2 expression correlatew with tumor size.
4. P53 expression was inversely related to oestrogen receptor content and the probability of disease recurrence and disease grade.
5. Bcl-2 expression had an inverse correlation to patient age and the probability of death.



The above results confirm previous reports.

Furthermore there was an effort to investigate the underlying mechanism leading to the variation of PAP activity in breast cancer. The levels of enzyme activity in relation to the levels and the isoforms of PAP expression were monitored in breast tumours and in the breast cancer cell line MCF-7. The results indicate that the increased PAP activity in breast tumours reflects overexpression of the corresponding protein.

Conclusions

The results indicate that PAP activity is closely related to parameters reflecting cell proliferation such as PCNA, telomerase and estrogen receptor content. Thus PAP activity is associated with the rate of cellular proliferation.

This attribute of PAP is enhanced when only tumours from node negative patients are investigated and in this category PAP can be considered a very accurate marker of cellular proliferation in accordance to previous observations. On the contrary in node positive patients this attribute is lost since PAP is dissociated from other proliferation markers. Thus increased activity due to increased expression of PAP dissociated from the proliferation rate of tumour cells may be a characteristic of tumours with metastatic potential.

Further studies of PAP with additional groups of patients, elucidation of the mechanisms leading to PAP overexpression in breast cancer and its relationship to processes leading to metastasis will contribute to the assessment of the prognostic character and value of PAP in breast cancer.

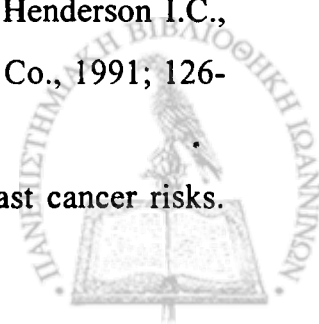


BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

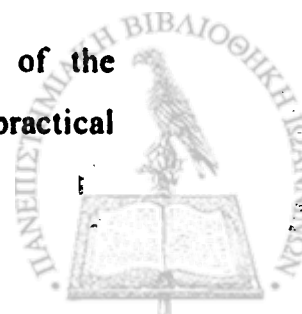
- 1 Coagner F.B. History of breast disease and its treatment. In: Bland K.I., Copeland E.M. (eds.). *The Breast*, Philadelphia, WB Saunders Company, 1991. pp 1-16.
- 2 Parkin D.M., Laara E., Muir C.S. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int. J. Cancer*. 1988;41: 184-197.
- 3 Miller A.B. Causes of breast cancer and high-risk groups: Incidence and demographics: radiation risk. In: Harris, JR, Hellmak S., Henderson I.C., Kinne D.W. (Eds.) *Breast Diseases*. Philadelphia: J.B. Lippincot Company, 1991. pp119-126.
- 4 Wingo P.A., Tong T., Bolden S. Cancer Statistics. *CA Cancer J. Clin.* 1995; 45:8.
- 5 Corry J.F., Lonning P.E. Systemic therapy in breast cancer: efficacy and cost utility. *Pharmaco Econom.* 1994;5: 198-212.
- 6 Levi F. Cancer incidence in five continents, Vol. VI *Eur. J. Cancer* 1993;29A: 2315-2319
- 7 Hortobagyi G.N., Buzdar A.U. Current status of adjuvant systemic therapy for primary breast cancer: progress and controversy. *CA Cancer J. Clin.* 1995;45: 199-226.
- 8 Ursin G., Bernstein L., Pike M.C. Breast cancer. *Cancer Surv* 1994; 19-20: 241-261
- 9 Harris JR, Lippman M.E., Veronesi U., Willet W. Breast Cancer, part 1, N. *Engl. J. Med.* 1992; 327. 319-328.
- 10 Ries L.A.G., Kosary C.L., Hankey B.F. et al. SEER cancer statistics review, 1973-1996. National Cancer Institute, Bethesda, Maryland USA, 1999.
- 11 Vlachonikolis I.G. and Georgoulis V. (Eds.) "Epidemiology of cancer in



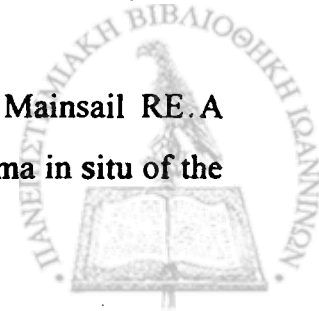
- Mediterranean" University of Crete, Heraklion, Greece, 1997.
- 12 Vlachonikolis I.G., Philalithis A.E. and Georgoulas V. "Cancer mortality in Crete: comparisons with other European countries". In Cancer control in the European Mediterranean, Balkans and Middle East Countries (Ed Pavlidis N., Kardamakis D., Consta A., Vlachonikolis I.G., and Kogevinas E.J. Eur. School of oncology (Balkans / Middle East office) Ioannina, Greece, 1998.
 - 13 Κορούκη - Γιαγλή Ε. Επιδημιολογία καρκινώματος του μαστού. Αρχαία Παθολογικής Ανατομικής 2000: Τόμος 14ος - Παράρτημα 2 .
 - 14 Weber B., Garber J. Familial breast cancer. In: Harris J., Lippman M., Morrow M., and Hellman S. (eds.). Diseases of the Breast. Lippincott - Raven, 1996. 168.
 - 15 Evans D.G., Fentiman I.S., Mc Pherson K., Asbury D., Ponder B.A., Howell A., Familial breast cancer. Br. Med. J. 1994; 308: 183-7.
 - 16 Ford D., Easton D.F. The genetics of breast and ovarian cancer. Br. J. Cancer 1995; 72: 51-5.
 - 17 Miki Y., Swensen J., Shattuck - Eidens D. et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1, Science 1994; 266: 66-71.
 - 18 Wooster R., Neuhausen S.L., Mangions J. et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA-2, to chromosome 13q: 12-13. Science 1994; 265:2088-2090.
 - 19 Malkin D. P 53 and the Li-Fraumeni syndrome. Cancer-Genet.Cytogenet 1993; 66: 83- 92
 - 20 Lynch H.T., Marcus J.N., Watson P., Lynch J: Familial breast (eds.). The cancer family cancer syndromes, and predisposition to breast neoplasia. In Blad KI, Copeland EM Breast. Philadelphia, WB Saunders Company, 1991. pp 262-291.
 - 21 Henderson B.E., Bernstein L. The role of endogenous and exogenous hormones in the aetiology of breast cancer. In: Harris J.R., Hellman S., Henderson I.C., Kinne D.N. (eds.). Breast Diseases. New York: J.B. Lippincott Co., 1991; 126-135.
 - 22 Trichopoulos D., Mac Mahon B., Cole P. Menopause and breast cancer risks.



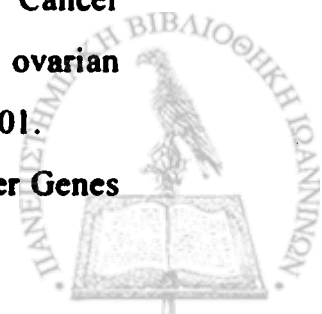
- J. Natl. Cancer Inst. 1972; 48: 605-613.
- 23 Kampert J.B., Whittemore A.S., Paffenbarger R.S., Jr. Combined effect of childbearing, menstrual events, and body size on age-specific breast cancer risk. *Am. J. Epidemiol.* 1988;128: 962-970
- 24 White E. Projected changes in breast cancer incidence due to the trend toward delayed childbearing. *Am. J. Public Health* 1987; 77: 495-497.
- 25 Malone K., Daling J., Weiss N. Oral contraceptives in relation to breast cancer. *Epidemiol Rev.* 1993; 15: 80-97.
- 26 Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53,297 women with breast cancer and 100,239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. *Lancet* 1996;347: 1713-1727.
- 27 Silleros-Arena M., Delgado-Rodriguez M., Rodrigues-Canteras R. et al. Menopausal hormone replacement therapy and breast cancer: A metaanalysis. *Obstet Gynecol* 1992; 79: 286-294.
- 28 Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet* 1997; 350: 1047-1059.
- 29 Leis H.P. The diagnosis of breast cancer. *CA Cancer J. Clin.* 1977; 27: 209-213.
- 30 Hansen N. Marrow M. Breast disease. *Med. Clin. North. Am.* 1988; 82: 203-222.
- 31 Dumont WD, Page DL Risk factors for breast cancer in women with Proliferative disease. *N. Eng. J. Med.* 1985; 312: 146-151.
- 32 Hutter R. Consensus meeting: Is fibrocystic disease of the breast precancerous? *Arch Pathol Lab Med.* 1986; 110: 171.
- 33 Buell P. Changing incidence of breast cancer in Japanese - American women. *J. Nat Cancer Inst.* 1973; 51: 1479-1483.
- 34 Prentice R.L., Sheppard L. Dietary fat and cancer: consistency of the epidemiological data, and disease prevention that may follow from a practical reduction in fat consumption. *Cancer causes Control.* 1990; 1: 81-97.



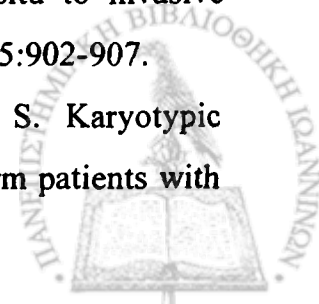
- 35 Hunter D.J., Willett W.C. Dietary factors in the aetiology and pathogenesis of breast cancer. In: Harris J.R., Lippman M.E., Morrow M., Hellman S. (eds.). *Diseases of the Breast*. Lippincott-Raven, 1996; 201.
- 36 Hsieh C.C., Trichopoulos D., Katsouyanni K., Yuasa S. Age at menarche and at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study. *Int. J. Cancer*. 1990; 46: 796-800.
- 37 Tokunaga M., Land C., Yamamoto T. et al. Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki. *Radiat. Res*. 1987;112: 243-272.
- 38 Miller A., Howe G., Sherman G. Mortality from breast cancer after irradiation of the thymus in infancy. *N. Eng. J. Med*. 1989;321: 146.
- 39 Krieger N., Wolf M.S., Hiatt R.A., Rivera M., Vogelman J., Orentreich N. Breast cancer and serum organochlorines: a prospective study among white, black, and Asian Women. *Natl Cancer Inst* 1994; 86: 589-99.
- 40 Hilakivi-Clarke L., Trock B. and Clarke R. The Estrogenicity of selected nutrients, phytochemicals, pesticide, and pollutants their potential roles in breast cancer. In Bowcock A.M. (ed.) *Breast Cancer*. Humana Press Inc. 1999. 537-567.
- 41 Ioannidou-Mouzaka L., Mantonakis J., Toufexi H., Tsiliakos S., Agnantis N.J. Is prolonged psychological stress an etiological factor in breast cancer. *J. Gynecol. Obstet. Biol.Reprod. (Paris)* 1986; 15(8): 1049-1053.
- 42 Ekbom, Trichopoulos D. Evidence of prenatal influences on breast cancer risk. *Lancet* 1992; 340: 1015-18.
- 43 Gail M., Brinton L., Byar D. et al. Projecting individualised probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Nat Can Inst* 1989; 81: 1899-1886.
- 44 Morrow M. Breast cancer: who and why? In: Jordan V.C. (ed.). *Tamoxifen for the treatment and prevention of breast cancer*. Melville New York: PRR, 1999. 187-205.
- 45 Douglas-Jones A.G., Guppy SK, Attains R.L., Morgan J.M., Mainsail RE. A critical appraisal of six modern classifications of ductal carcinoma in situ of the



- breast (DCIS): correlation with grade of associated invasive carcinoma. *Histopathology* 1996; 29: 397-409.
- 46 World Health Organisation (1981). Histological typing of breast tumours. In: Second International histological classification of tumours. Geneva: World Health Organisation.
- 47 Rosen P.P. (1996) Invasive mammary carcinoma. In: Harris, J.R., Lippman M.E., Marrow M., Hellman S. (Eds.) *Diseases of the Breast*. Philadelphia: Lippincot - Raven. p 393-444.
- 48 Ellis I.O., Galer M., Braughton N., Locer A., Blamey R.W., Elston C.W. 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.
- 49 Henson D.E. and Ries L. Relationship among outcome, stage of disease and histologic grade in 22,616 cases of breast cancer. *Cancer*. 1991; 68: 2142-2149.
- 50-Cancer Research Campaign Fact. Sheet. 6.2.1991.
- 51 Poten S., Holmberg L., Trichopoulos D., Kallioniemi O-P, Kvale G., Wallgren A. and Taylor - Papadimitriou J. Biology and natural history of breast cancer. *Int. J. Cancer Suppl.* 1990; 5: 5-21.
- 52 Page D.L., Dupont W.D. Anatomic markers of human premalignancy and risk of breast. *Cancer*. 1990; 66: 1326-35.
- 53 Rosen P.P. Proliferative breast "disease". An unresolved diagnostic dilemma. *Cancer* 1993; 71: 3798-807.
- 54 Lennington W.J., Jewen R.A., Dalton L.W., Page D.L. Ductal carcinoma in situ of the breast. Heterogeneity of individual lesions. *Cancer* 1994; 73: 118-24.
- 55 Weinberg R.A. Oncogenes, antioncogenes, and molecular basis of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.* 1989; 49: 3713-21.
- 56 King R.J.B. Estrogen and progesterin effects in human breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* 1993; 27: 3-15.
- 57 Easton D.F., Bishop D.T., Ford D., Grockford G.P, and the Breast Cancer Linkage Consortium. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. *Am. J. Human Genet.*1993; 52: 678-701.
- 58 Benneft L.B., Taurog J.D. and Bowcock A.M. Hereditary Breast Cancer Genes



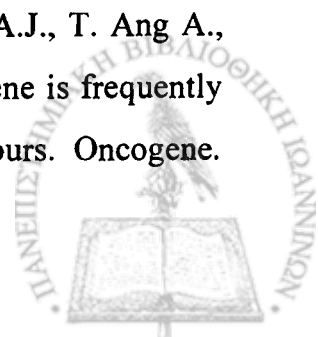
- in. Bowcock A.M. (ed.). Breast Cancer. Humana Press Inc. 1999. p 199-224.
- 59 Pandis N., Jin Y., Gorunova L., Peterson C., Bardi G., Idvall I., Johansson B., Ingvar C., Mandahl N., Mittelman F., Heim S. Chromosomal analysis of 97 primary breast carcinomas: Identification of eight karyotypic subgroups. *Genes Chromosome and Cancer* 1995; 12:173-185.
- 60 Heim S., Teixeira M.R. and Pandis N. Cytogenetic Approaches to Breast Cancer in Bowcock A.M. (ed.). Breast Cancer. Humana Press Inc. 1999.p 373-388.
- 61 Bieche I. and Lederean R. Genetic alterations in breast cancer. *Genes. Chromosomes Cancer*.1995; 14: 227-251.
- 62 Blaszyk H., Vaughn C.B., Hortmann A., Mc Govern R.M., Schroedr J.J., Gunningham J., Schajd D., Sommer S.S., Korach J.S. Novel pattern of *PS3* gene mutations in an American black cohort with high mortality from breast cancer. *Lancet*. 1994; 1: 1195-1197.
- 63 Larsson C., Bystrom C., Stoog L., Rostein S., Nordenskjold M. Genomic alterations in human breast Carcinomas. *Genes Chromosome Cancer* 1990; 2: 191-197.
- 64 Harada Y., Katagiri T., Ito I., Akiyama F., Sakamoto G., Kasumi F., Nakamura Y., Emi M. Genetic studies of 457 breast cancers. Clinicopathological parameters compared with genetic alterations. *Cancer* 1994; 74: 2281-2286.
- 65 Dietrich C.V., Pandis N., Texeira M.R., Bardi G., Gerdes A.M., Anderson J.A., Heim S. Chromosome abnormalities in benign hyperproliferative disorders of epithelial and stromal breast tissue. *Int. J. Cancer* 1995; 60:49-53.
- 66 Nishizaki T., De Vries J., Chew K., Goodson WH., Ljung B-M. Thor A., Woldman F.M. Genetic alterations in primary breast cancers and their metastases: Direct comparison using modified Comparative Genomic Hybridisation. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 19:267-272.
- 67 Watson P.H., Safneck J.R., Le K., Dubi K D., Shim R.P.C. Relationship of c-myc amplification to progression of breast cancer from in situ to invasive tumour and lymph node metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993; 85:902-907.
- 68 Texeira M.R., Pandis N., Bardi G., Anderson A., Heim S. Karyotypic comparisons of multiple tumours and normal tissue samples form patients with



- breast cancer. *Cancer Res.* 1996; 56:855-859.
- 69 Pandis N., Bardi G., Jin Y., Dietrich C., Johansson B., Anderson J. et al. Unbalanced t(1:16) as the sole karyotypic abnormality in a breast carcinoma and its lymph node metastasis. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1994; 75: 158-159.
- 70 Pandis N., Teixeira M.R., Adeyinka A., Rizou H., Bardi G., Mertens F. et al. Cytogenetic comparisons of primary tumours and lymph node metastases in breast cancer patients. *Genes Chrom Cancer.* 1998; 22:122-129.
- 71 Adeyinka A., Mertens F., Idvall I., Bondeson L., Ingvar C., Mittelman F., Pandis N. Different patterns of chromosomal imbalances in metastasising and non-metastasising primary breast carcinomas. *Int. J. Cancer* 1999; 84:370-375.
- 72 Gray J. W., and Collins C. Genome changes and gene expression in human solid tumors. *Carcinogenesis* 2000; 21:443-452.
- 73 Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B., Van de Rins M., Jeffrey S.S., Rees C.A., Pollack J.R., Ross D.T., Johnsen H., Akslen L.A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu Sx, Lanning P.E., Borresen Dale A-L, Brown P.O., Botstem D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747-752.
- 74 Hamahan D. and Weinberg R.A. Hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
- 75 Fedi P., Tronick S.R. and Aaronson S.A. (1997). Growth factors in cancer medicine, J.F. Holland, R.C. Bast, D.L. Morton, E. Frei, D.W. Kufe, and R.R. Weichselbaum, eds. (Baltimore, MD: Williams and Wilkins) pp 41-64.
- 76 Di Fiore P.P., Pierce J.H., Kraus M.H., Segatto O., King C.R. and Aaronson S.A. c-erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 1987; 237: 178-182.
- 77 Medema R.H. and Bos J.L. The role of p21-ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit. Rev. Oncol.* 1993; 4: 615-661.
- 78 Martinez - Lacaci I., Bianco C., Desantis M., and Salomon D.S. Epidermal growth factor - related peptides and their cognate receptors in breast cancer in Bowcock (ed.) *Breast Cancer.* Humana Press Inc. 1999 p. 31-57.
- 79 Hunter T. Oncoprotein networks. *Cell* 1997; 88: 333-346.
- 80 Normano N. and Ciardello F. EGF related peptides in the pathophysiology of the mammary gland. *J. Mam. Gland Biol. Neoplasia* 1997; 2(2): 143-151.



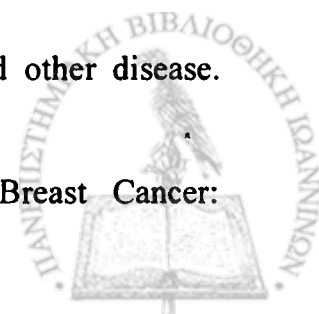
- 81 Ioachim E., Kamina S., Athanasiadou S., Agnantis N.J. The prognostic significance of epidermal growth factor receptor (EGFR), C-erbB-2, Ki-67 and PCNA expression in breast cancer. *Anticancer Res.* 1996; 16(B): 3141-3147.
- 82 Salomon D.S., Brandt R., Ciardiello F, and Normama N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Rev. Oncol. / Hematol.* 1995; 19: 183-232.
- 83 Salomon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.S., Ullrich A., Mc Guire W.L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the Her-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177-182.
- 84 Hynes N.H. and Stern D.F. The biology of erbB-2/neu/Her-2 and its role in cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1994; 198: 165-184.
- 85 Nicholson R.I., Mc Clelland R.A., Gee J.M., Manning D.L, Cannon P., Robertson J.F., Ellis I.O. and. Blamey R.W. (1994). Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer: association with response to endocrine therapy. *Breast Cancer Res. Treat.* 29: 117-125.
- 86 Medema R.H., and Bos J.L. The role of p21-ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit. Rev. Oncol.* 1993; 4:615-661.
- 87 Von Linting F.C., Dreinger A.D., Varki N.M., Wallace A.M., Catseel D.E., Boss G.R. Ras activation in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 2000; 62:51-62.
- 88 Agnantis N.J., Petraki C., Markoulatos P., Spandidos D.A. Immunohistochemical study of the ras oncogene expression in human breast lesions. *Anticancer Res.* 1986; 6:1157-1160.
- 89 Agnantis N.J., Apostolikas N.A., Zolotas V.G., Spandidos D.A. Immunohistochemical detection of ras p21 oncoprotein in breast cancer imprints. *Acta Cytol.* 1994; 38:335-340.
- 90 Weinberg R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. 1995; *Cell* 81: 323-330.
- 91 Varley J.M., Armour J., Swallow J.E., Jeffreys A.J., Ponder B.A.J., T. Ang A., Fung YKT, Brammar W.J., Walker R.A. The retinoblastoma gene is frequently altered leading to loss of expression in primary breast tumours. *Oncogene.* 1989; 4: 725-729.



- 92 Laiho M., De Caprio J.A., Ladlow S.W., Livingstone D.M and Massague. J. Growth inhibition by TGF- β linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. *Cell* 1990; 62: 175-185.
- 93 Walker R.A., J.L. Jones, S. Chappell, T. Walsh, and J.A. Show. Molecular pathology of breast cancer and its application to clinical management. *Cancer Metast. Rev.* 1997; 16: 5-27.
- 94 Landberg G., G. Roos The cell cycle in breast cancer. *APMIS* 1997; 105: 575-589.
- 95 Gerad J. and D.A. Wilson. High frequency of aberrant p16INK4A expression in human breast cancer. *Am. J. Pathol.* 1996; 149: 15-20.
- 96 Bergstein I. Molecular Alteration in Breast Cancer in Bowcock (ed.) *Breast Cancer*. Humana Press Inc. 1999 p. 143-170.
- 97 Foley K.P. and Eisenman R.N. Two MAD tails: what the recent knockouts of Mad1 and Max1 tell us about the MYC/MAX/MAD network. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999; 1423. 437-47.
- 98 Mariani-Constantini R.C. Escot. C. Theillet, A. Gentile, G. Merlo, R. Lidereau and R. Callahan. In situ c-myc expression and genomic status of the c-myc locus in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Cancer Res.* 1988; 48: 199-205.
- 99 Spandidos D.A., Pintzas A., Kakanas A., Yianisis M., Parta E., Agnantis N.J. Elevated expression of the c-myc gene in human benign and malignant breast lesions compared to normal tissue. *Anticancer Res.* 1987; 7:1299-12304.
- 100 Wyllie, A.H., Kerr, J.F. and Currie A.R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 1980; 68, 251-306.
- 101 Greenbalatt. M.S., Bennett W.P, Hollstein M., and Harris C.C. Mutations in the p53 tumour-suppressor gene: Clues to cancer aetiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 1994; 54: 4855-4878.
- 102 Chang, F., S. Syrjanen and K. Syrjanen. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology *J. Clin. Oncol.* 1995; 13: 1009-1022.
- 103 Couch F.J. and B.L. Weber (1998). Breast cancer, in *The Genetic Basis of Human Cancer* (Vogelstein B. and K.W. Kinzley, eds.) Mc Graw Hill, New York. NY, pp. 537-563.



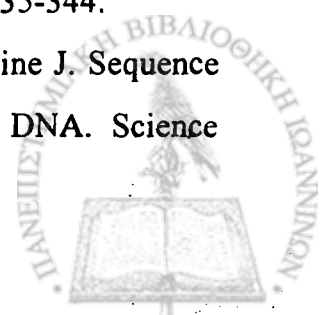
- 104 Zhang, G-J, Kimijima I., Abe R., Kanno M., Kataguta N., Hora K., Watanabe T. and Tsuchiya A. Correlation between the expression of apoptosis - related bcl-2 and p53 oncoproteins and the carcinogenesis and progression of breast carcinomas. *Clin. Cancer Res* 1997; 3: 2329-2335.
- 105 Hayflick L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry* 1997; 62: 1180-1190.
- 106 Counter C.M. Avilion A.A., Le Feuvre C.E., Stewart N.G., Greider C.W., Harley C.B. and Bacchetti S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity *EMBO J.* 1992; 11: 1921-1929.
- 107 Shay, J.W. and Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer.* 1997; 33: 787-791.
- 108 Bryan T.M. and Cech T.R. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1999; 11: 318-324.
- 109 Bryan T.M. and Englezou, A. Guptas J., Bacchettis S., and Reddel, R.R. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J.* 1995; 14: 4240-4248.
- 110 Tsao J.I., Zhao Y., Lukas J., Xang X., Shah A., Press M., Shibata D. Telomerase activity in normal and neoplastic breast. *Clin. Cancer Res.* 1997; 3: 627-631.
- 111 Hiyama E., Gollahon L., Kataoka T., Kuroi K., Yokohama T., Garzdav A.F., Hiyama K., Piatyszek M.A., Shay J.W. Telomerase activity in human breast tumours. *J. Natl. Cancer Inst.* 1996; 88: 116-122.
- 112 Bednarek A.K., Sahin A., Brenney A.J., Johnston D.A., Aldaz C.M. Analysis of Telomerase activity levels in breast cancer: positive detection at the in situ breast carcinoma stage. *Clin. Cancer Res.* 1997; 3: 11-16.
- 113 Folkman J. (1997). Tumor angiogenesis. In *Cancer Medicine*. J.F. Holland, R.C. Basf, D.L. Morton, F. Frei, D.W. Kafe and R.R. Weichselbaum, eds. Baltimore MD: Williams and Wilkins. pp. 181-204.
- 114 Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.* 1995;1: 27-31.
- 115 Gasparini G. (1999). Angiogenesis in Breast Cancer in *Breast Cancer*:



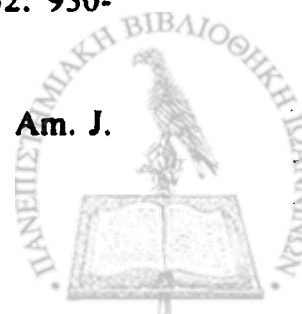
- Molecular Genetics, Pathogenesis and Therapeutics. Bowcock A.M. (ed). Humana Press inc. Totowa NS. p. 347-371.
- 116 Hanahan D. and Folkman J. Patterns of emerging mechanisms of the angiogenesis switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86: 353-364.
- 117 Bertin N., Clezardin P., Kubiok R. and Frappart. Trombospondin-1 and -2 messenger RNA expression in normal benign, and neoplastic human breast tissues: correlation with prognostic factors, tumour angiogenesis, and fibroblastic desmoplasia. *Cancer Res.* 1997; 57: 396-399.
- 118 Volpert O., Stellmach V. and Bouck N. The modulation of thrombospondin and other naturally occurring inhibitors of angiogenesis during tumour progression. *Breast Cancer Res. Treat.* 1995; 36: 119-126.
- 119 Johnson J.P. Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family, and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer. Metastasis Rev.* 1991; 10: 11-22.
- 120 Christofori G. and Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumor-suppressor gene. *Trend Biochem. Sci.* 1999; 24: 73-76.
- 121 Rosfjord E. and Dickson R. (1999). Role of integrins in the development and malignancy of the breast in breast cancer: Molecular Genetic, Pathogenesis and Therapeutics p. 285-304.
- 122 Mac Dougall J.R. and Martisian L.M. (1999). Matrix metalloproteinases in the pathogenesis of breast cancer in breast cancer: Molecular Genetic, Pathogenesis and Therapeutics Bowcock A.M. (ed.) Human Press Inc. Totowa N.J. p. 305-324.
- 123 Ioachim E., Athanassiadou SE., Kamina S., Carassavoglou K., Agnantis N.J. Matrix metalloproteinase expression in human breast cancer : an immunohistochemical study including correlation with cathepsin D, type IV collagen, laminin, fibronectin, EGFR, c-erbB-2 oncoprotein, p53, steroid receptor status and proliferative indices. *Anticancer Res* 1998; (3A); 1665-1670.
- 124 Clark G.M. Do we really need prognostic factors for breast cancer? *Breast. Cancer Res. Treat.* 1994; 30: 117-126.
- 125 Dhingra K. Hortobagyi G.N. Critical evaluation of prognostic factors. *Seminars*



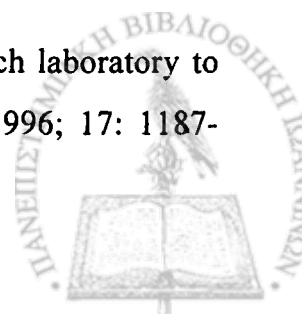
- in Oncology.1996; 234:436-445.
- 126 Page D.L., Jensen R. and Simpson J.F. S-phase fraction and breast cancer - a decade of experience. *Breast Cancer Res. Treat.* 1998; 51: 195-208.
- 127 Henderson C. and Patek A.J. The relationship between prognostic and predictive factors in the management of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 1998; 52: 261-288.
- 128 Carter C.L., Allen C., Henson D.E. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24,710-breast cancer cases. *Cancer* 1989; 63: 181-187.
- 129 Fisher B., Bauer M., Wicherham D.L., Redmoud C.K., Fisher E.R. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patient with primary breast cancer. *Cancer* 1983; 52: 1551-1557.
- 130 Apostolikas N., Petraki C., Agnantis N.J. The reliability of histologically negative axillary lymph nodes in breast cancer. Preliminary report. *Pathol Res Pract* 1988; 184:35-38.
- 131 Insa A., Lluch A., Prosper F., Marugon I., Mortinev-Agullo A. and Garcia-Conde J. Prognostic factors predicting survival from first recurrence in patients with metastatic breast cancer: analysis of 439 patients. *Breast Cancer Res. Treatm.* 1999; 56: 67-78.
- 132 Rosen P.P., Groshen S., Kinne D.W. et al. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patient with long-term follow-up. *J. Clin. Oncol.* 1993; 11: 2090-2100.
- 133 Bloom H.J. and Richardson W.W. Histologic grading and prognosis in breast cancer. *Br. J. Cancer.* 1957; 11: 359-377.
- 133α Elston C.W., Ellis I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer : experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;19:403-410.
- 134 Hensen D.E. Cancer patient staging: a perspective study *Arch. Pathol Lab Med.* 1991; 115: 120-121.
- 135 Beato M. Gene regulation by steroid hormones *Cell* 1989; 56: 335-344.
- 136 Green G.L., Gilna P., Waterfield M., Baker A., Hort Y. and Shine J. Sequence and expression of human oestrogen receptor complementary DNA. *Science* 1986; 231: 1150-1154.



- 137 Mosseelman S., Polman J. and Dijkema R.ER² :Identification and characterisation of a novel human estrogen receptor. FEBS Lett. 1996; 392: 49-53.
- 138 Dotzlaw H., Leyogue E., Watson P.H. and Murphy L.C. Expression of estrogen receptor - beta in human breast tumours. J. Clin. Endocrinol Metab.1997; 82: 2371-2374.
- 139 Hansen R.K. and Fuqua S.A.W. (1999). The Estrogen Receptor and Breast Cancer in: Breast Cancer: Molecular Genetics, Pathogenesis, and Therapeutics. Bowcock A.M. ed. Humana Press Inc. Totowa N.J. p. 1-30.
- 140 Tremblay GB., Tremblay A., Labrie F., Giguere V. Ligand-independent activation of the estrogen receptors alpha and beta by mutations of conserved tyrosine can be abolished by antiestrogens. Cancer Res. 1998; 38:877-81.
- 141 Osborne C.K. Steroid hormone receptors in breast cancer management. Breast Cancer Res. Treat. 1998; 5: 227-238.
- 142 Nomura Y., Miura S., Koyama H., Enomot K., Kasami F., Yamamoto H., Kimura M., Tominaga T., Iino H., Morimoto T. et al. Relative effect of steroid hormone receptors on the prognosis of patients with operable breast cancer. A univariate and multivariate analysis of 3089 Japanese patients with breast cancer from the Study Group for the Japanese Breast Cancer Society on Hormone Receptors and Prognosis in Breast Cancer. Cancer 1992; 69: 153-164.
- 143 Bernoux A., de Cremoux P., Laine-Bidron C., Martin E.C., Asselain B., Magdelenat H. Estrogen receptor negative and progesterone receptor positive primary breast cancer: pathological characteristic and clinical outcome. Institut Curie, Breast Cancer Study Group. Breast Cancer Res Treat.1998; 49:219-25.
- 144 Early Breast Cancer Trialists' collaborative Group. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal cytotoxic or immune therapy. Lancet. 1992; 339. 1-15, 71-85.
- 145 Early Breast Cancer Trialists' collaborative Group. Polychemotherapy for early breast cancer: An overview of the randomized trials. Lancet.1998; 352: 930-942.
- 146 Keshgegian A.A., Caan A. Proliferation markers in Breast Carcinoma. Am. J. Clin. Pathol. 1995; 104: 42-49.



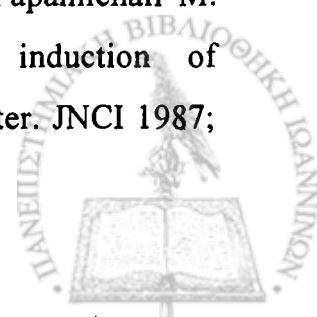
- 147 Baak J.P.A., Kurver P.H.J., De Snoo-Niewlaat A.J.E., De Graef S., Makkink B., Boon M. Prognostic indicators in breast cancer-morphometric methods. *Histopathology* 1982; 6: 327-339.
- 148 Rudas M., Gnant M. F.X., Mittlbock M., Neumayer R., Kammey A., Jakesz R., Reinev G., and Reinev A. Thymidine labelling index and Ki-67 growth fraction in breast cancer: comparison and correlation with prognosis. *Breast Cancer Res. Treatm.* 1994; 32: 165-175.
- 149 Fisher B, Gunduz N., Costantinos J., Fisher E., Redmand C., Mamounas E.P., Siderits R. DNA flow cytometric analysis of primary operable breast cancer. *Cancer* 1991; 68: 1465-1475.
- 150 Wenger C. and Clark G.M. S-phase fraction and breast cancer - a decade of experience. *Breast Cancer Res. Treat.* 1998; 51; 255-265.
- 151 Gerdes J., Lemke H., Baisch H., Wacker H.H., Schwab U. and Stain H. Cell cycle analysis of a cell proliferation associated human nuclear antigen by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.* 1984; 133: 1710-1715.
- 152 Deltmar P., Harbeck N., Thomssen C., Pache L., Ziffer P., Fizi K., Sanicke F., Nathath W., Schmitt M., Graelf H. and Hofler H. Prognostic impact of proliferation - associated factors MIBI (Ki-67) and S-phase in node-negative breast cancer. *Brit. J. Cancer.* 1997; 75: 1525-1533.
- 153 Mathews M.B., Bernstein R.M., Fronza B.R., Garrels J.I. Identity of the proliferating cells nuclear antigen and cyclin. *Nature* 1984; 309: 374-376.
- 154 Tahan S.R., Neuberg D.S. Diethepach A., Yacoub L. Prediction of early relapse and shortened survival in patients with breast cancer by proliferating cell nuclear antigen score. *Cancer* 1993; 71: 3552-3559.
- 155 Sheen-Chen S-M, Eng. H-L, Chou F-E, Chen W-S. The Prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen in patients with lymph node positive breast cancer. *Arch Surg.* 1997; 132: 264-267.
- 156 Levine A.J., Momand S., Finlay C.A. The p53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991; 351. 453-456.
- 157 Harris C.C. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic an abridged historical perspective. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1187-1198.



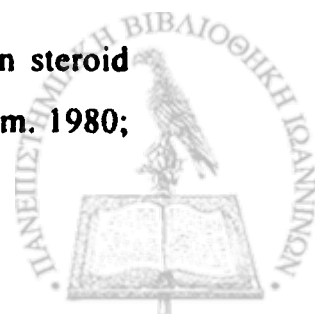
- 158 Levine A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88: 323-331.
- 159 Davidoff A.M., Kerns B.J.M., Iglahart J.D. and Marks J.R. Maintenance of p53 alterations throughout breast cancer progression. *Cancer Res.* 1995; 51: 2605-2610.
- 160 Ozbun M.A. and Butel J.S. Tumor suppressor p53 mutations and breast cancer, a critical analysis *Adv. Cancer Res.* 1995; 66: 71-141.
- 161 Isola J. Visakorpi T., Holli K., Kallioniemi O-P. Association of overexpression of tumor suppressor protein p53 with rapid cell proliferation and poor prognosis in node-negative breast cancer patients. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1992; 84: 1109-1114.
- 162 Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.J. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the Her-2/neu oncogene. *Science.* 1987; 235: 177-182.
- 163 Slamon D.J., Goldolphin W., Jones L.A. et al. Studies of the Her-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1984; 244: 707-712.
- 164 Goussia A., Agnantis N.J., Athanassiadou S., Stefanou D. Prognostic significance of c-erbB-2 and hormone receptor status in human benign and malignant breast lesions. *Anticancer Res* 1995; 15(5B): 2313-1318.
- 165 Press M.F., Pike M.C., Chazin V.R. et al. Her-2/neu expression in node-negative breast cancer: Direct tissue-quantitation by computerised image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. *Cancer Res.* 1993; 53: 4960-4970.
- 166 Gusterson B.A., Gelber R.D., Goldhirsch A. et al. Prognostic importance of c-erb-B2 expression in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 1992; 10: 1049-1056.
- 167 Muss H.B., Thor A.D., Berry D.A. et al. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer. *N. Eng. J. Med.* 1994; 330: 1260-1266.
- 168 Vogel C.L., Colbeight M.A., Tripathy D. et al. Efficacy and safety of Herceptin as a single agent in 1st line treatment in Her-2 overexpressing metastatic breast cancer. *Breast Cancer. Res. Treat.* 1998;50: 2329.



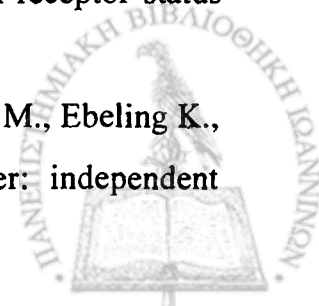
- 169 Bell R. Ongoing trials with Herceptin in metastatic breast cancer. Her-2 state-of-the-Art Conference Montreux 21-23/11/1999.
- 170 Clogan D.F. and Manley J.L. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes and Development*. 1997; 11:2755-2766.
- 171 Manley J.L. A complex protein assembly catalyzes polyadenylation of mRNA precursors. *Curv. Opin. Genet. Dev.* 1995; 5: 222-228.
- 172 Astrom J. Polyadenylation and deadenylation of mRNA in eukaryotic cells. *J.Biol.Chem.* 1995; 267:18154-9.
- 173 Wahle E. and Keller W. The biochemistry of 3' end cleavage and polyadenylation at messenger RNA precursors. *Ann. Rev. Biochem.* 1992; 61: 419-440.
- 174 Richter J.D. (1996). Dynamics of poly (A) addition and removal during development in translational control (M. Mathews, J. Herhey and N. Sonenberg eds.) pp. 481-503. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
- 175 Colgan D.F. Murthy K.G.K., Prives C. and Manley J.L. Cell cycle related regulation of poly (A) polymerase by phosphorylation. *Nature* 1996; 384: 282-285.
- 176 Kazazoglou T., Tsiapalis C.M., Harvedaki M. Polyadenylate polymerase activity in stationary and growing cell cultures. *Exp. Cell Biol.* 1987; 55: 164-172.
- 177 Coleman M.S. Hutton J.J. and Bollum F.J. Terminal riboadenylate transferase in human lymphocytes. *Nature* 1974; 248: 407-409.
- 178 Courtis N. Trangas T., Tsiapalis C.M. Increase in the levels of activity of polyadenylic acid metabolising enzymes following phytohaemagglutinin stimulation of human lymphocytes. *Mol Cell. Biochem.* 1987; 75: 33-42.
- 179 Simmantor R. and Sachs L. Induction of polyadenylate polymerase and differentiation in Neuroblastoma Cells. *Eur. J. Biochem.* 1975; 55: 9-14.
- 180 Perez S., Trangas T., Kokkinopoulos P., Tsiapalis C.M. and Papamichail M. Polyadenylic acid metabolising enzyme levels during induction of differentiation in a human leukemia T-cell line with phorbol ester. *JNCI* 1987; 78: 407-409.



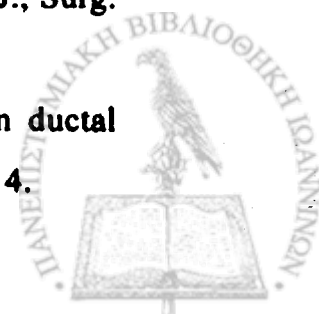
- 181 Adolf G.R. and Swetly P. Poly (A) polymerase activity during cell cycle and erythropoietic differentiation in erythroleukemic mouse spleen cells. *Biochim. Bioph. Acta* 1978; 518: 334-344.
- 182 Trangas T., Curtis N., Pangalis G.A., Gosmides H.V., Ionannide C., Papamichail M. and Tsiapalis C.M. Polyadenylic acid polymerase activity in normal and leukemic human leukocytes. *Cancer. Res.* 1984; 44: 3691-3697.
- 183 Pangalis G.A., Trangas T., Papanastasiou C.J., Roussou P.A., Tsiapalis C.M. Poly(A)-polymerase activity in chronic lymphocytic leukemia of the B cell type. *Acta haemat.* 1985; 73:31-34.
- 184 Sasaki R. Minawada J., Bollum F.J., Miura Y. Polydenylic and polymerase activity in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia Res.* 1990; 14. 273-278.
- 185 Scorilas A., Curtis N., Yotis J. Talieri M., Michailakis M., Trangas T. Poly (A) polymerase activity levels in breast tumor cytosols. *J. Exp. Clin. Cancer. Res.* 1998; 17: 511-518.
- 186 Scorilas A., Talieri M., Ardavanis A., Curtis N., Dimitriadis E., Yotis J. Tsiapalis C.M. and Trangas T. Poly (A) polymerase enzymatic activity in mammary tumor cytosols. A new independent prognostic marker in primary breast cancer. *Cancer Res.* 2000; 60: 5427-5433.
- 187 Harlow E., Lane D. (1988). *Antibodies: A laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 188 Lowry O.H., Rosebrough N. J., Fary A.I., Randolph R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 1951; 193:265-275
- 189 Burnette W.N. Western blotting. Electroforetic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radio iodinated protein A. *Anal. Biochem.* 1981; 112: 195-203
- 190 Mukharsi J., Zachariah N.V., Chakmakjiah Z., H. and Race G.J. A fast and convenient method for determining estrogen receptor using rabbit uterus as standard. *Cancer Res.* 1983; 43:3143-3146
- 191 Kute T.E., Huske M.S., Shore A. and Rhyme A. I. Improvements in steroid receptor assays including rapid computer analysis of data. *Anal.Biochem.* 1980; 103:279-280.



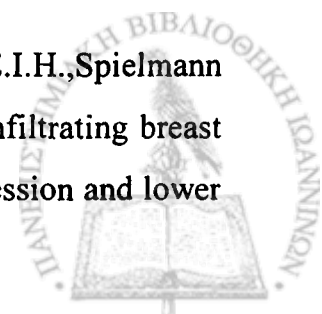
- 192 Bianchi S., Paglierani M., Zampi G., Cardona G., Cataliotti L. Bonardi R., Zappa M. Prognostic value of proliferating cells nuclear antigen in lymph node negative breast cancer patients. *Cancer*.1993; 72: 120-125.
- 193 Schonborn I., Zochiesche W., Minguillon C., Spitzer E., Mohner M., Ebelin K., Grosse R. Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen and C-erbB-2 compared with conventional histopathological factor in breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 1995; 121: 115-122.
- 194 Battersby S., Anderson T.J. Correlation of proliferative activity in breast tissue using PCNA/cyclin. *Human. Pathol.* 1990; 21: 781.
- 195 Kato T., Kimura T., Mixakawa R., Fujii A., Xamamoto K., Kameoka S., Nishikawa T., Kasajima T. Clinicopathologic study associated with long-term survival in Japanese patient with node-negative breast cancer. *Br. J. Cancer* 2000; 82: 404-411.
- 196 Leonardi E. Giraldo S., Serio G. et al. PCNA and Ki-67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables *J. Clin. Pathol.* 1992; 45: 416-419.
- 197 Thomas M., Noguchi M. Kitagawa H., Kinoshita K., Mizazaki S. Poor prognostic value of proliferating cell nuclear antigen labelling index in breast carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 1993; 46: 525-528.
- 198 Gusterson B.A., Gelber R.D., Goldhirsch A., Price K.N., Sare-Soderbor J., Anbazhagan R., Styles J., Rudenstam C.M., Colouh R., Reed R. et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwing) Breast Cancer Study Group. *J. Clin. Oncol.* 1992; 10: 1049-1056.
- 199 Gullic W.J. Love S.B., Wright C., Barne D.M., Gusterson B.A., Harris A.L. and Altman D.G. C-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. *Br. J. Cancer.* 1991; 63: 434-438.
- 200 McCann A.H., Dervan P.A., O'Regan M., Codd M.B., Gullick W.S., Tob B.M., Carney D.N. Prognostic significance of c-erb-B-2 and estrogen receptor status in human breast cancer. *Cancer Res.*1998; 51: 3296-3303.
- 201 Schonborn I., Zschiesche W., Spitzer E., Minguillon C., Mohrer M., Ebeling K., Grosse R. C-erbB-2 overexpression in primary breast cancer: independent



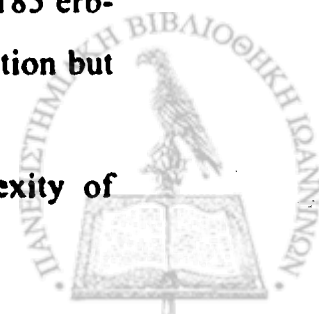
- prognostic factor in patients at high risk. *Breast. Cancer Res. Treat.* 1994; 29:287-295.
- 202 Gerad J., Ingram C.D. Abnormal expression of cell cycle regulatory proteins in ductal and lobular carcinoma of the breast. *Mol Pathol.* 2000; 13: 945-953.
- 203 Hamilton A., Piccart M. The contribution of molecular markers to the prediction of response in the treatment of breast cancer: a review of the literature on Her-Z, p53 and BCL-2. *Ann. Oncol.* 2000; 11: 647-663.
- 204 Ferrero J.M., Ramaioli A., Formento J.L., Francoual M., Etienne M.C., Peyrottes I., Ettore F., Leblanc-Talent P., Namer M. Milano G. P53 determination alongside classical prognostic factors in node-negative breast cancer: an evaluation at more than 10-year follow-up. *Ann. Oncol.* 2000; 11: 393-397.
- 205 Fitzgibbons P.L., Page D.L., Weaver P. Thor A.D., Allred D.C., Clark G.M., Rudy S.G., O'Malley F., Jimpsan J.F., Connolly J.L., Hayes D.F., Edge S.B., Lichter A., Schnitt S.J. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologist Consensus Statement 1999. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2000; 124: 966-978.
- 206 Gretasdottir S., Tryggradottir L., Jonasson J.G., Sigurdsson H., Olafsen I., Agnarsson B.A., Ogmandsdottir H., Eyfjord J.E. TP53 mutation analyses on breast carcinoma: a study of paraffin embedded archival material. *Br. J. Cancer.* 1996; 74: 555-61.
- 207 Fukushima T., Onda M., Abe R., Otake T., Kiminima I., Tsuchiya A. P53 mutations and overexpression in Japanese breast cancer patients. *Eur. J. Surg. Oncol.* 1995; 21: 595-600.
- 208 Artandi S.E., Chang S., Lee S.L., Alson S., Gottlieb G.J., Chin L., De Pinho R.A., Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocation and epithelial cancers in mice. *Nature* 2000; 406: 641-645.
- 209 Mokbel K.M., Parris C.N., Chilchik M., Amerasinghe C.N., Newbold R. Telomerase activity and lymphovascular invasion in breast cancer. *Eur. J., Surg. Oncol.* 2000; 26: 30-33.
- 210 Umbrecht C.B., Sherman M.E., Done J., et al. Telomerase activity in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *Oncogene* 1999; 18:3407-14.



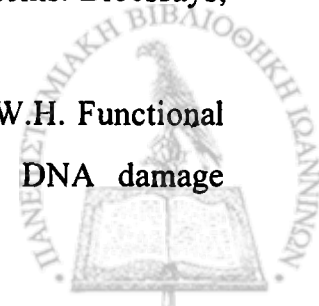
- 211 Rha S.Y., Park K.H., Kim T.S., Yoo N.C., Yang W.I., Roh J.K., Min J.S., Lee K.S., Kim B.S., Choi J.H., Lim H.Y., Chang H.C. Changes of telomerase and telomere lengths in paired normal and cancer tissues of breast. *Int.J. Oncol* 1999; 15:839-45.
- 212 Holmarist P., Lundstrom M., Stalo. Apoptosis and Bcl-2 expression in relation to age, tumour characteristics and prognosis in breast cancer. SouthEast Breast Cancer Group. *Int. J. Biol. Markers* 1999; 14: 84-1.
- 213 Ioachim E., Malamou-Mitsi V., Kamina S.A., Goussia A.C. Agnantis N.J. Immunohistochemical expretion of Bcl-2 protein I breast lesions : corelation with Bax, p53, C-erbB-2, EGFR, and proliferation indices. *Anticancer Res* 2000; 20(6B): 4221-4225.
- 214 Kumararel B., Arihiro K., Kaneko M., Fujii Ş., Inai K. Expression of bcl-2 Protein in Breast carcinoma with correlation to expression of P53 Protein and Clinicopathological factors. *Breast Cancer*. 1996; 3: 173-79.
- 215 Takei H., Oyama T., Iino Y., Horiguch J., Hikino T., Maemura M., Nagaoka H., Iijima K., Yokoe T., Nakajima T., Morishita Y. Clinical significance of immunohistochemical Bcl-2 expression in invasive breast carcinoma. *Oncol. Rep.* 1999; 6: 575-581.
- 216 Yang Q.F., Sakurai T., Voshimura G., Shan L., Suzuma T., Tamaki T., Umemura T., Kakawa Y., Nakamura Y., Nakamura M., Tang W., Utsunomiya H., Mori I., Kakudo K. Expression of bcl-2 but not Bax or P53 correlates with *in vitro* resistance to a series of anticancer drugs in breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.* 2000; 61: 211-216.
- 217 Zhagn G.J., Kimijima I., Tsuchiya A., Aber. The role of bcl-2 expression in breast carcinomas. *Oncol. Rev.* 1998; 5: 1211-1216.
- 218 Kobayashi S., Iwase H., Ito Y., Yamashita H., Iwata H., Yamashita T., Ito K., Toyama T., Nakamura T., Masaeoka A. Clinical significance of bcl-2 gene expression in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 1997; 42: 173-181.
- 219 Le M.G., Mathieu M.C., Douc-Rasy S., Le Bihan M.L., Adb E.I.H., Spielmann M., Riou G. c-myc,p53 ad bcl-2 , apoptosis –related genes in infiltrating breast carcinomas: evidence of a link between bcl-2 protein over-expression and lower



- risk of metastasis and death in operable patients. *Int. J. Cancer* 1999; 84:562-7.
- 220 Martin K.J., Kritzman B.M., Price L.M., Koh B., Kwan C.P., Zhong X., Mackay A., O'Hare M.J., Kaelin C.M., Muttev G.L., Pardee A.B., Sager S. Linking gene expression patterns to therapeutic groups in breast cancer. *Cancer Res.* 2000; 60:2232-38.
- 221 Bertucci F., Houlgatte R., Benziene A., Granjend S., Adelaide I., Tague R., Loriod B., Jacquemier J., Viens P., Jotdan B., Birnbaum D., Nguye C. Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. *Hum Mol Genet* 2000; 9:2981-91.
- 222 Zafrani B., Aubriot M.H., Mouret E., De Gremoux P., De Rycke Y., Nicolas A., Boudou E., Vincent-Salomou A., Magdelenat H., Sastre-Garau X. High sensitivity and specificity of immunohistochemistry for the detection of hormone receptors in breast carcinomas: comparison with biochemical determination in a prospective study of 793 cases. *Histopathology* 2000; 37:536-45.
- 223 Bernoux A., de Cremoux P., Laine-Bidron C., Martin E.C., Asselain B., Magdelenat H. Estrogen receptor negative and progesterone receptor positive primary breast cancer: pathological characteristics and clinical outcome Institute Curie Breast Cancer Study Group. *Breast Cancer Res. Treat.* 1998; 49: 219-225.
- 224 Anderson W.F., Chu K.C., Chatterjee N., Brawley O., Brintan L.A. Tumour variant by hormone receptor expression in white patients with node-negative breast cancer from the surveillance, epidemiology, and End Results Database. *J.Clin.Oncol.* 2001; 19:18-27.
- 225 Santeusano G., Mauriello A., Ventura L., Liberati F., Colantoni A., Lasorella R., Spagnoli L.G. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in breast carcinomas using monoclonal antibodies that recognize different domains of the receptor molecule. *Appl. Immunohistochem. Molec. Morphol.* 2000; 8:175-84.
- 226 Nowak F., Jacquemin-Sablou A., Pierre J. Expression of the activated p185 erb-B2 tyrosine kinase in human epithelial cells leads to MAP kinase activation but not confer oncogenicity. *Exp Cell Res* 1997; 231:251-259.
- 227 Nagy P., Jenci A., Damjanovich S., Jovim T.M., Szolosi J. Complexity of



- signal transduction mediated by c-erb-B2: clues to the potential of receptor-targeted cancer therapy. *Pathol Oncol Res* 1999; 5:255-271.
- 228 Carter W.B., Hoying J.B., Boswell C., Williams S.K. Her2/neu over-expression induces endothelial cell retraction 2001; 91:295-299.
- 229 Thorpe S.M., Christensen I.J., Rasmussen B.B., Rose C. Short recurrence-free survival associated with high oestrogen receptor levels in the natural history of postmenopausal, primary breast cancer. *Eur. J. Cancer* 1993; 29(A):971-977.
- 230 Landberg G., Nielsen N.H., Nilsson P., Emdin S.O., Cajander J., Roos G. Telomerase activity is associated with cell cycle deregulation in human breast cancer. *1997 Cancer Res.* 57; 549-554.
- 231 Shoker BS, Jarvis C, Clarke RB, Anderson E, Hewlett J Davies MP, Sibson DR, Sloane JP Estrogen receptor –positive proliferating cells in normal and precancerous breast. *Am J Pathol* 1999; 155: 1811-5.
- 232 Topalian S.L., Kaneko S., Gonzales M.I., Bond G.L., Ward Y., Manley J.L. Identification and functional characterization of Neo-poly(A) polymerase, and RNA processing Enzyme Overexpressed in human tumors. *Mol. Cell. Biol.*; 21:5614-5623.
- 233 Wahle E, Keller W. The biochemistry of polyadenylation. *Trends Biochem Sci* 1996; 21: 247-250.
- 234 Sachs A. and Wahle E. Poly (A) tail metabolism and function in eucaryotes. *J Biol Chem* 1993; 268: 22955-22958.
- 235 Takagaki Y, Manley JL. Levels of polyadenylation factor CstF-64 control IgM heavy chain mRNA accumulation and other events associated with B cell differentiation. *Mol. Cell* 1998; 2: 761-771.
- 236 Zhao W, Manley JL. Deregulation of poly (A)polymerase interferes with cell growth. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 5010-5020.
- 237 Hanawalt P.C. Transcription-coupled repair and Human Disease. *Science* 1994; 266:1957-58.
- 238 Deng C.X., Brodie S.G. Role of BRCA1 and its interacting proteins. *Bioessays*; 22(8): 728-37.
- 239 Li S., Ting N.S., Chen P.L., Ziu Y., Shiloh Y., Lee E.Y., Lee W.H. Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage



response, Nature 2000; 406:210-15.

- 240 Kleiman FE, Manley JL. Functional interaction of BRCA-1 associated BARD 1 with polyadenylation factor CstF-50. Science 1999; 285: 1576-1579.
- 241 Kleiman F.E. and Manley J.L. The BRAD1-cstF-50 interaction links mRNA 3' end formation to DNA damage and tumor suppression. Cell 2001; 104:743-753.
- 242 Peddruth U.R., Alok D., Rao V. M. Binding of factor VIIa to tissue factor induces alterations in gene expression in human fibroblast cells: Up-regulation of poly (A) polymerase. Proc. Natl. cad. Sci.USA 1997; 94:12598-12603.
- 243 Felsher D.W., Zetteberg A., Zhu J., Tlsty T., and Bishop J. M. Overexpression of MYC causes P53 dependent G2 arrest of normal fibroblasts. PNAS. 2000;97:10544-10548.

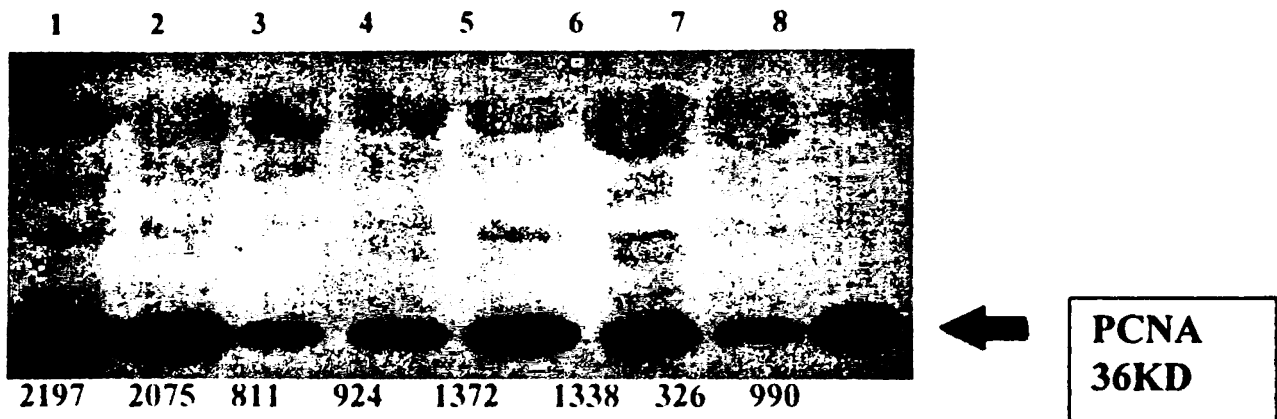


ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι : ΕΙΚΟΝΕΣ

ΕΚΔΟΣΗ
2000

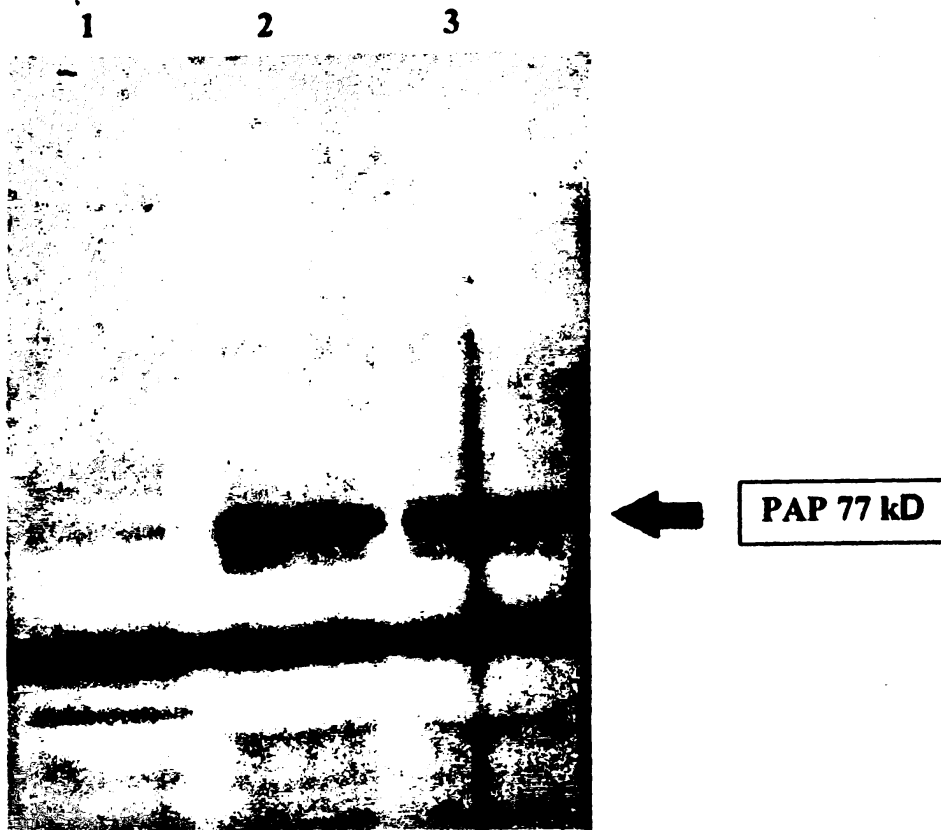


EIKONA 1



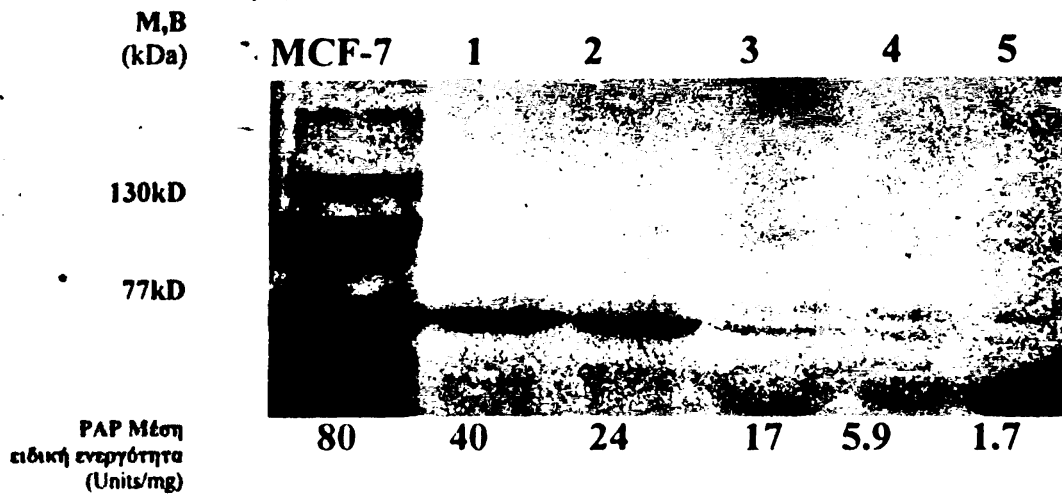
Εικόνα 1. Ανάλυση με Western blot της έκφρασης του PCNA σε όγκους μαστού. Οι συνθήκες εκτέλεσης του πειράματος περιγράφονται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Οι μονάδες οπτικής πυκνότητας που αναγράφονται στο κάτω μέρος της εικόνας μετρήθηκαν μετά από σάρωση των ζωνών που αντιστοιχούν στο PCNA σε ηλεκτρονικό σαρωτή (scanner) με τη χρήση του προγράμματος ανάλυσης Image NH 1.44.

ΕΙΚΟΝΑ 2



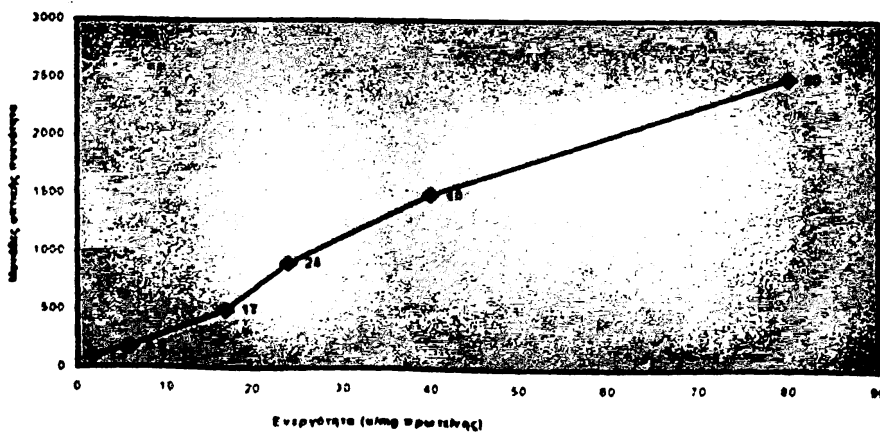
Εικόνα 2.Αναλυση με western blot της έκφρασης της PAP σε κύτταρα MCF-7 σε φάση ηρεμίας και λογαριθμικής αύξησης. Οι συνθήκες εκτέλεσης του πειράματος περιγράφονται στα Υλικά και Μέθοδοι. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 48h σε 10% FCS και στη συνέχεια προστέθηκε νέο θρεπτικό υλικό με 0,1% FCS , 48 h μετά η μια φιάλη χρησιμοποιήθηκε για απομόνωση πρωτεΐνης (θέση 1) και άλλες δυο φιάλες ανακαλλιεργήθηκαν σε 10% FCS για 24 h (θέση 2) και 48 h (θέση 3).

ΕΙΚΟΝΑ 3

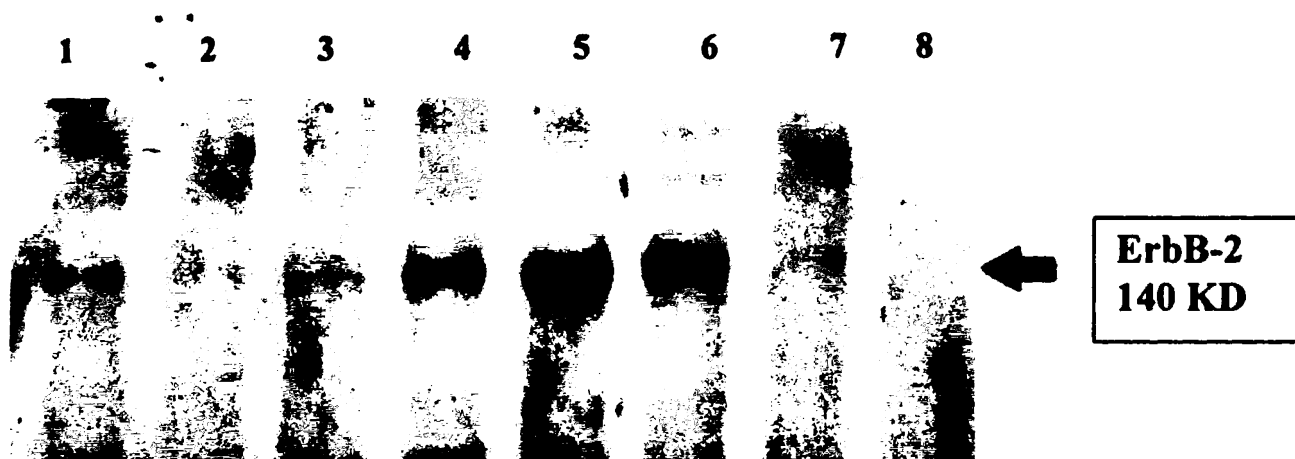


Εικόνα 3. Ανάλυση με Western blot της έκφρασης της PAP σε όγκους μαστού και στην κυτταρική σειρά MCF-7. Οι συνθήκες εκτέλεσης του πειράματος περιγράφονται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Στο σχήμα A παρουσιάζεται η συσχέτιση μεταξύ των τιμών ενεργότητας και έκφρασης της PAP.

Σχήμα A



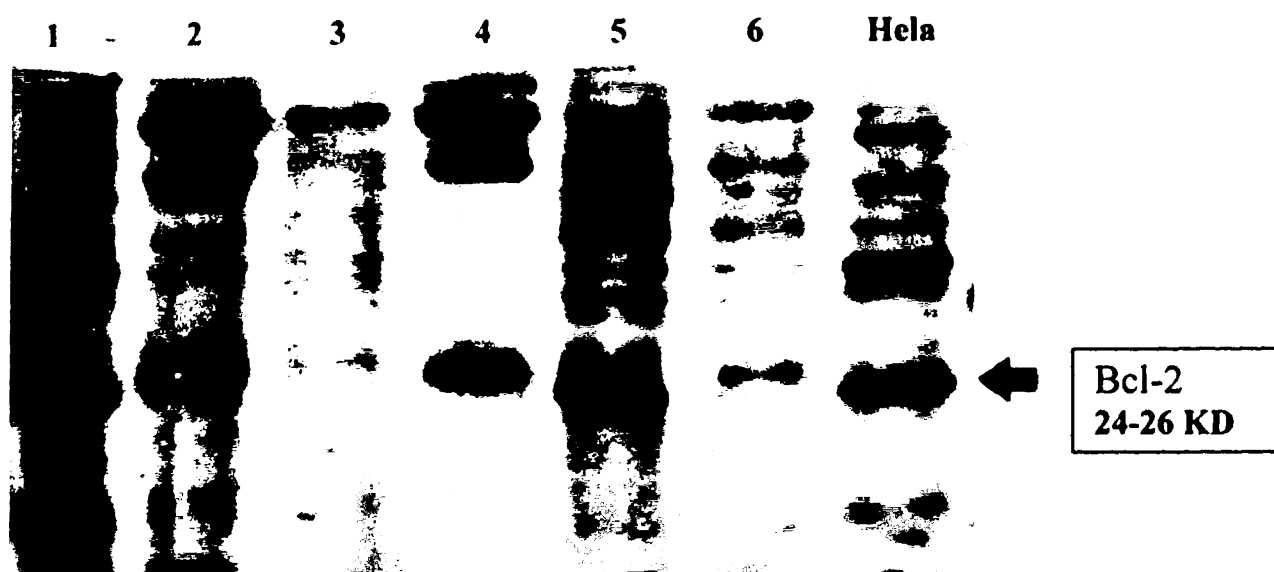
EIKONA 4



Εικόνα 4. Ανάλυση με Western blot της έκφρασης του c-erbB-2 σε κυτταρικά εκχυλίσματα όγκων μαστού. Οι συνθήκες του πειράματος περιγράφονται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Οι θέσεις 1-8 αντιστοιχούν σε διαφορετικά δείγματα όγκων μαστού.



ΕΙΚΟΝΑ 5



Εικόνα 5. Ανάλυση με Western blot της έκφρασης του bcl-2 σε κυτταρικά εκχυλίσματα όγκων μαστού. Οι συνθήκες του πειράματος περιγράφονται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Οι θέσεις 1-6 αντιστοιχούν σε διαφορετικά δείγματα από όγκους μαστού .

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ : ΠΙΝΑΚΕΣ



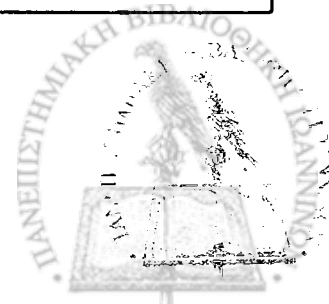
ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα 211 όγκων.

Παράμετρος	Αριθμός	Ποσοστό Συχνότητα%
Ηλικία		
<45	19	12,6
45-60	61	40,4
>60	71	47
Ιστολογικός Τύπος		
Πορογενής	139	79,4
Λοβιακό	28	16,0
Μικτό	8	4,6
Μέγεθος (cm)		
≤2	68	42,2
>2	93	57,8
Λεμφαδένες		
Αρνητικοί	69	46,9
Θετικοί	78	53,1
Grade		
I	16	9,8
II	91	55,5
III	57	34,8
Υποδοχείς Οιστρογόνων		
Αρνητικοί	66	31,8
Θετικοί	145	68,7
Υποδοχείς Προγεστερόνης		
Αρνητικοί	64	30,3
Θετικοί	147	69,7



ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Έκφραση του PCNA σε σχέση με άλλες παραμέτρους

Παράμετρος	Αριθμός	Μέση τιμή Οπτικής πυκνότητας OD units	P
Ηλικία			
<45	19	1268,4	
45-60	32	1329,9	0,867
>60	45	1398,3	
Ιστολογικός Τύπος			
Πορογενές	89	1378,3	
Λοβιακό	11	640,3	0,022
Μικτό	8	1410,0	
Μέγεθος (cm)			
<=2	42	1185,4	0,465
>2	57	1312,2	
Λεμφαδένες			
Αρνητικοί	35	1403,4	0,684
Θετικοί	47	1321,8	
Grade			
I	8	873,8	
II	53	1268,6	0,265
III	41	1393,3	
Υποδοχείς Οιστρογόνων			
Αρνητικοί	39	1404,3	0,265
Θετικοί	84	1210,0	
Υποδοχείς Προγεστερόνης			
Αρνητικοί	36	1357,9	0,475
Θετικοί	87	1236,0	



ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Συσχέτιση (Pearson Correlation) της έκφραση του PCNA με άλλες παραμέτρους.

Παράμετρος	Συσχέτιση
Ηλικία	$r=-0,077$
	$P=0,416$
	$N=89$
Μέγεθος	$r=-0,019$
	$P=0,854$
	$N=99$
Αριθμός διηθημένων λεμφαδένων	$r=-0,116$
	$P=0,436$
	$N=47$
Υποδοχείς οιστρογόνων	$r=0,171$
	$P=0,059$
	$N=123$
Υποδοχείς προγεστερόνης	$r=0,135$
	$P=0,137$
	$N=123$
P53	$r=0,243$
	$P=0,136$
	$N=39$
Τελομεράση	$r=0,165$
	$P=0,230$
	$N=55$
PAP	$r=0,414$
	$P=0,000$
	$N=123$



ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Έκφραση της mtP53 σε σχέση με άλλες παραμέτρους

Παράμετρος	Αριθμός	Μέση τιμή Οπτικής πυκνότητας OD units	P
Ηλικία			
<45	6	0,1283	
45-60	26	0,9669	0,247
>60	18	1,8972	
Ιστολογικός Τύπος			
Πορογενές	52	1,0338	
Λοβιακό	5	0,1160	0,203
Μικτό	4	0,1675	
Μέγεθος (cm)			
<=2	23	0,5404	0,198
>2	28	1,0550	
Λεμφαδένες			
Αρνητικοί	26	1,1581	0,080
Θετικοί	27	0,8659	
Grade			
I	5	1,800	
II	28	0,8400	0,415
III	18	1,0428	
Υποδοχείς Οιστρογόνων			
Αρνητικοί	24	1,4313	0,018
Θετικοί	49	0,6276	
Υποδοχείς Προγεστερόνης			
Αρνητικοί	21	1,1371	
Θετικοί	52	0,7927	0,387



Πίνακας 5. Συσχέτιση (Pearson Correlation) της έκφρασης της mtP53 με άλλες παραμέτρους.

Παράμετρος	Συσχέτιση
Ηλικία	r=0,218
	P=0,128
	N=50
Μέγεθος	r=-0,012
	P=0,935
	N=51
Αριθμός διηθημένων λεμφαδένων	r=-0,042
	P=0,822
	N=27
Υποδοχείς οιστρογόνων	r=-0,159
	P=0,178
	N=73
Υποδοχείς προγεστερόνης	r= -0,087
	P=0,462
	N=73
PCNA	r=0,243
	P=0,136
	N=39
PAP	r=-0,15
	P=0,903
	N=73

ΠΙΝΑΚΑΣ 6. Έκφραση Τελομεράσης σε σχέση με άλλες παραμέτρους.

Παράμετρος	Αριθμός	Μέση τιμή Οπτικής πυκνότητας OD units	P
Ηλικία			
<45	8	0,8155	
45-60	13	0,3952	0,030
>60	25	0,2686	
Ιστολογικός Τύπος			
Πορογενές	44	0,4222	
Λοβιακό	6	0,3165	0,612
Μικτό	2		
Μέγεθος (cm)			
<=2	23	0,4380	0,715
>2	28	0,3823	
Λεμφαδένες			
Αρνητικοί	9	0,3056	0,2488
Θετικοί	24	0,3613	
Grade			
I	6	0,1743	
II	23	0,4513	0,487
III	22	0,4248	
Υποδοχείς Οιστρογόνων			
Αρνητικοί	20	0,1743	0,203
Θετικοί	35	0,4356	
Υποδοχείς Προγεστερόνης			
Αρνητικοί	19	0,4146	
Θετικοί	36	0,3994	0,316



ΠΙΝΑΚΑΣ 7. Συσχέτιση (Pearson correlation) της ενεργότητας της Τελομεράσης με άλλες παραμέτρους.

<u>Παράμετρος</u>	<u>Συσχέτιση</u>
Ηλικία	$r=-0,421$
	$P=0,004$
	$N=46$
Μέγεθος	$r=0,036$
	$P=0,806$
	$N=50$
Αριθμός διηθημένων λεμφαδένων	$r=0,290$
	$P=0,170$
	$N=24$
Υποδοχείς Οιστρογόνων	$r=-0,12$
	$P=0,932$
	$N=55$
Υποδοχείς Προγεστερόνης	$r=0,007$
	$P=0,961$
	$N=55$
PAP	$r=0,306$
	$P=0,023$
	$N=55$
PCNA	$r=0,165$
	$P=0,230$
	$N=55$



ΠΙΝΑΚΑΣ 8. Ενεργότητα της PAP σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά.

Παράμετρος	Αριθμός	PAP ΜΕΣΗ ΕΙΔΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΤΙΑ Units/mg	P
Ηλικία			
<45	19	19,6	
45-60	61	12,6	0,056
>60	71	14,5	
Ιστολογικός Τύπος			
Πορογενές	139	15,5	
Λοβιακό	28	10,4	0,158
Μικτό	8	13,9	
Μέγεθος (cm)			
<=2	68	15,4	0,552
>2	93	14,2	
Λεμφαδένες			
Αρνητικοί	69	11,2	0,041
Θετικοί	78	14,4	
Grade			
I	16	9,0	
II	91	14,6	0,128
III	57	16,2	
Υποδοχείς Οιστρογόνων			
Αρνητικοί	66	13,9	0,856
Θετικοί	145	14,2	
Υποδοχείς Προγεστερόνης			
Αρνητικοί	64	12,7	0,264
Θετικοί	147	14,7	



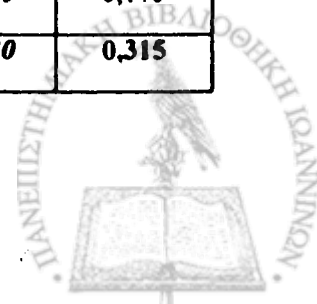
ΠΙΝΑΚΑΣ 9. Συσχετιση (Pearson correlation) της PAP με άλλες παραμέτρους.

Παράμετρος	Συσχέτιση
Ηλικία	$r=-0,001$
	$P=0,991$
	$N=151$
Μέγεθος	$r=-0,003$
	$P=0,972$
	$N=161$
Αριθμός διηθημένων λεμφαδένων	$r=0,127$
	$P=0,266$
	$N=78$
Υποδοχείς οιστρογόνων	$r=0,241$
	$P<0,000$
	$N=211$
Υποδοχείς προγεστερόνης	$r= 0,138$
	$P=0,045$
	$N=211$
PCNA	$r=0,414$
	$P<0,000$
	$N=123$
P53	$r=-0,15$
	$P=0,903$
	$N=73$
Τελομεράση	$r=0,306$
	$P=0,023$
	$N=55$



ΠΙΝΑΚΑΣ 10. Συσχέτιση της PAP κατά Pearson με άλλες παραμετρους σε ασθενείς με διηθημένους και μη λεμφαδένες και αρνητικούς και θετικούς υποδοχείς οιστρογόνων

ΠΑΡΑΜΗΤΡΟΣ	ΛΕΜΦΑΔΕΝΕΣ		ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ	
	-	+	-	+
Ηλικία				
γ	0,233	-0,137	0,181	-0,107
P	0,087	0,267	0,219	0,281
Μέγεθος				
γ	-0,107	0,228	-0,098	0,030
P	0,411	0,057	0,505	0,750
Υποδοχείς οιστρογόνων				
γ	0,3	0,144		
P	0,012	0,208		
Υποδοχείς προγεστερόνης				
γ	0,038	0,087	0,117	0,159
P	0,758	0,451	0,351	0,056
PCNA				
γ	0,501	0,191	0,353	0,456
P	0,002	0,198	0,028	0,000
P53				
γ	0,147	-0,037	0,051	-0,037
P	0,475	0,855	0,813	0,799
Τελομεραση				
γ	0,528	0,316	0,485	0,175
P	0,144	0,132	0,030	0,315



ΠΙΝΑΚΑΣ 11: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα 78 όγκων

Παράμετρος	Αριθμός ασθενών	Ποσοστό (%)
Ηλικία		
<45	12	15,4
≥45	66	84,6
Παθολογικός Τύπος		
Πορογενές Λοβιακό	70	89,7
	8	10,3
Μέγεθος (cm)		
<2	26	33,3
≥2	52	66,7
Λεμφαδένες		
Αρνητικοί	30	40,5
Θετικοί	44	59,5
Grade		
I	6	7,7
II	49	70,0
III	15	21,3
Υποδοχείς Οιστρογόνων		
Αρνητικοί	15	19,5
Θετικοί	62	80,5
Υποδοχείς Προγεστερόνης		
Αρνητικοί	18	23,4
Θετικοί	59	76,6
Πλοσίδια		
Ευκλοϊδείς	8	25,8
Διακλοϊδείς	5	16,1
Τετρακλοϊδείς	3	9,7
Αντικλοϊδείς	15	48,4
Ακτινοθεραπεία		
Ναι	46	59,0
Όχι	32	41,0
Tamoxifen		
Ναι	53	67,9
Όχι	25	32,1
CAF/CMF		
Ναι	38	48,7
Όχι	40	51,3
Υποτροπή		
Όχι	41	65,1
Ναι	22	34,9
Θάνατος		
Όχι	55	87,3
Ναι	8	12,7
c-erbB-2		
Αρνητικοί	48	64,0
Θετικοί	26	36,0
P53		
Αρνητικοί	31	39,7
Θετικοί	47	60,3
bc1-2		
Αρνητικοί	45	59,2
Θετικοί	31	40,8
PCNA		
Χαμηλό	18	23,4
Υψηλό	59	76,6
PAP		
Χαμηλή	24	44,4
Υψηλή	30	55,6



ΠΙΝΑΚΑΣ 12. Κατανομή αρνητικών /θετικών για c-erbB-2 σε σχέση με άλλες παραμέτρους.

Παράμετρος	Αρνητικοί (N, %)	Θετικοί (N, %)	P
Ηλικία			
≥ 45	6 (54,5)	5 (45,5)	0,437
< 45	42 (66,7)	21 (33,3)	
Ιστολογικός Τύπος			
Πορογενές	45 (67,2)	22 (32,8)	0,200
Λοβιακό	3 (42,9)	4 (57,1)	
Μέγεθος			
< 2	20 (80,0)	5 (20,0)	0,051
≥ 2	28 (57,1)	21 (42,9)	
Λεμφαδένες			
Αρνητικοί	20 (71,4)	8 (28,6)	0,256
Θετικοί	25 (58,1)	18 (41,9)	
Grade			
I	3 (50,0)	3 (50,0)	0,436
II	31 (66,0)	16 (34,0)	
III	11 (78,6)	3 (21,4)	
Υποδοχείς Οιστρογόνων			
Αρνητικοί	9 (64,3)	5 (35,7)	0,993
Θετικοί	38 (64,4)	21 (35,6)	
Υποδοχείς Προγεστερόνης			
Αρνητικοί	10 (58,8)	7 (41,2)	0,585
Θετικοί	37 (66,1)	19 (33,9)	
Υποτροπή			
Όχι	24 (64,9)	13 (35,1)	0,795
Ναι	15 (68,2)	7 (31,8)	
Θάνατος			
Όχι	33 (66,0)	17 (34,0)	0,847
Ναι	5 (62,5)	3 (37,5)	
P53			
Αρνητικοί	18 (60,0)	12 (40,0)	0,469
Θετικοί	30 (68,2)	14 (31,8)	
Bcl-2			
Αρνητικοί	30 (60,0)	20 (40,0)	0,300
Θετικοί	16 (72,7)	6 (27,3)	
PCNA			
Χαμηλό	12 (70,6)	5 (29,4)	0,631
Υψηλό	36 (64,3)	20 (35,7)	
PAP			
Χαμηλή	14 (77,8)	4 (22,2)	0,158
Υψηλή	21 (58,3)	15 (41,7)	



ΠΙΝΑΚΑΣ 13. Συσχετιση (Spearman rank correlation) της έκφρασης του c-erbB-2 με άλλες παραμέτρους.

Παράμετρος	Συσχέτιση
Ηλικία	r=-0,020
	P=0,867
	N=74
Μέγεθος	r=0,187
	P=0,111
	N=74
Λεμφαδένες	r=0,217
	P=0,069
	N=71
Grade :	r=-0,150
	P=0,227
	N=67
Υποδοχείς Οιστρογόνων	r=-0,011
	P=0,928
	N=72
Υποδοχείς Προγεστερόνης	r=-0,025
	P=0,833
	N=72
PCNA	r=0,113
	P=0,341
	N=73
P53	r=-0,138
	P=0,242
	N=74
Bcl-2	r=-0,158
	P=0,178
	N=74
PAP	r=0,278
	P=0,040
	N=55
DNA ploidy	r=0,041
	P=0,841
	N=27

ΠΙΝΑΚΑΣ 14. Κατανομή αρνητικών/θετικών για mtP53 όγκων ανά παράμετρο

Παράμετρος	Αρνητικοί (N, %)	Θετικοί (N, %)	P
Ηλικία			
≤45	5 (41,7)	7 (58,3)	0,882
>45	26 (39,4)	40 (60,6)	
Ιστολογικός Τύπος			
Πορογενής Λοβιακό	28 (40,0) 3 (37,5)	42 (60,0) 5 (62,5)	0,891
Μέγεθος (cm)			
<2	7 (26,9)	19 (73,1)	0,102
≥2	24 (46,2)	28 (53,8)	
Λεμφαδένες			
Αρνητικοί Θετικοί	15 (50,0) 15 (34,1)	15 (50,0) 29 (65,9)	0,171
Grade			
I II III	3 (50,0) 24 (49,0) 1 (6,7)	3 (50,0) 25 (51,0) 14 (93,3)	0,012
Υποδοχείς Οιστρογόνων			
Αρνητικοί Θετικοί	5 (33,3) 25 (40,3)	10 (66,7) 37 (59,7)	0,618
Υποδοχείς Προγεστερόνης			
Αρνητικοί Θετικοί	8 (44,4) 22 (37,3)	10 (55,6) 37 (62,7)	0,586
Υποτροπή			
Όχι Ναι	20 (54,1) 6 (26,1)	17 (45,9) 17 (73,9)	0,034
Θάνατος			
Όχι Ναι	23 (46,0) 2 (25,0)	27 (54,0) 6 (75,0)	0,256
c-erbB-2			
Αρνητικοί Θετικοί	18 (37,5) 12 (46,2)	30 (62,5) 4 (53,8)	0,469
Bcl-2			
Αρνητικοί Θετικοί	23 (43,4) 7 (30,4)	30 (56,6) 16 (69,6)	0,288
PCNA			
Χαμηλό Υψηλό	8 (44,4) 22 (37,3)	10 (55,6) 37 (62,7)	0,586
PAP			
Χαμηλή Υψηλή	5 (26,3) 14 (38,9)	14 (73,7) 22 (61,1)	0,351



ΠΙΝΑΚΑΣ 15. Συσχέτιση (Spearman rank correlation) της έκφρασης του P53 με άλλες παραμέτρους.

Παράμετρος	Συσχέτιση
Ηλικία	$r=-0,181$
	$P=0,112$
	$N=78$
Μέγεθος	$r=0,083$
	$P=0,472$
	$N=78$
Λεμφαδένες	$r=0,120$
	$P=0,310$
	$N=74$
Grade	$r=0,321$
	$P=0,007$
	$N=70$
Υποδοχείς Οιστρογόνων	$r=-0,280$
	$P=0,074$
	$N=75$
Υποδοχείς Προγεστερόνης	$r=-0,056$
	$P=0,632$
	$N=75$
PCNA	$r=0,335$
	$P=0,003$
	$N=77$
c-erbB-2	$r=-0,138$
	$P=0,242$
	$N=74$
Bcl-2	$r=0,249$
	$P=0,028$
	$N=78$
PAP	$r=0,085$
	$P=0,535$
	$N=56$
DNA ploidy	$r=0,387$
	$P=0,035$
	$N=30$



ΠΙΝΑΚΑΣ 16. Κατανομή αρνητικών/θετικών για *bcl-2* όγκων ανά παράμετρο

Παράμετρος	Αρνητικοί (N, %)	Θετικοί (N, %)	P
Ηλικία			
≤45	6 (50,0)	6 (50,0)	0,105
>45	47 (73,4)	17 (26,6)	
Ιστολογικός Τύπος			
Πορφυένξ	48 (70,6)	20 (29,4)	0,638
Λοβιακό	5 (62,5)	3 (37,5)	
Μέγεθος (cm)			
<2	19 (73,1)	7 (26,9)	0,648
≥2	34 (68,0)	16 (32,0)	
Λεμφαδένες			
Αρνητικοί	23 (76,7)	7 (23,3)	0,290
Θετικοί	28 (65,1)	15 (34,9)	
Grade			
I	5 (100,0)	0 (0)	0,235
II	34 (70,8)	14 (29,2)	
III	9 (60,0)	8 (40,0)	
Υποδοχείς Οιστρογόνων			
Αρνητικοί	11 (78,6)	3 (21,4)	0,406
Θετικοί	41 (67,2)	20 (32,8)	
Υποδοχείς Προγαστερόνης			
Αρνητικοί	14 (82,4)	3 (17,6)	0,090
Θετικοί	38 (65,5)	20 (34,5)	
Υποτροπή			
Όχι	25 (71,4)	10(28,6)	0,243
Ναι	13 (56,5)	10(43,5)	
Θάνατος			
Όχι	30 (62,5)	18 (37,5)	0,035
Ναι	8 (100,0)	0 (0,0)	
c-erbB-2			
Αρνητικοί	30 (65,2)	16 (34,8)	0,300
Θετικοί	20 (76,4)	6 (23,1)	
P53			
Αρνητικοί	23 (76,7)	7 (23,3)	0,288
Θετικοί	30 (65,2)	16(31,8)	
PCNA			
Χαμηλό	12 (70,6)	5 (29,4)	0,994
Υψηλό	41 (70,7)	17 (29,3)	
PAP			
Χαμηλή	9 (52,9)	8 (47,1)	0,066
Υψηλή	28 (77,8)	8 (22,2)	



ΠΙΝΑΚΑΣ 17. Συσχέτιση (Spearman rank correlation) της έκφρασης του bcl-2 με άλλες παραμέτρους.

Παράμετρος	Συσχέτιση
Ηλικία	$r=-0,315$
	$P=0,005$
	$N=78$
Μέγεθος	$r=0,070$
	$P=0,545$
	$N=78$
Λεμφαδένες	$r=0,089$
	$P=0,452$
	$N=74$
Grade	$r=0,189$
	$P=0,117$
	$N=70$
Υποδοχείς Οιστρογόνων	$r=0,044$
	$P=0,706$
	$N=75$
Υποδοχείς Προγεστερόνης	$r=0,070$
	$P=0,551$
	$N=75$
PCNA	$r=0,100$
	$P=0,385$
	$N=77$
c-erbB-2	$r=-0,158$
	$P=0,178$
	$N=74$
P53	$r=0,249$
	$P=0,026$
	$N=78$
PAP	$r=-0,220$
	$P=0,104$
	$N=56$
DNA ploidy	$r=0,030$
	$P=0,873$
	$N=30$



ΠΙΝΑΚΑΣ 18. Κατανομή υψηλών/χαμηλών για PCNAόγκων ανά παράμετρο.

Παράμετρος	Χαμηλή (N, %)	Υψηλή (N, %)	P
Ηλικία			
< 45	3 (25,0)	9 (75,0)	0,885
≥ 45	15 (23,1)	50 (76,9)	
Ιστολογικός Τύπος			
Πορφυράς Λοβιακό	16 (23,2) 2 (25,0)	53 (76,8) 6 (75,0)	0,909
Μέγεθος (cm)			
< 2	5 (20,0)	21 (80,0)	0,744
≥ 2	13 (25,5)	38 (74,5)	
Λεμφαδένες			
Αρνητικοί Θετικοί	8 (27,6) 8 (18,2)	21 (72,4) 36 (81,8)	0,342
Grade			
I	2 (33,3)	4 (66,7)	0,418
II	9 (18,8)	39 (81,3)	
III	5 (33,3)	10 (66,7)	
Υποδοχείς Οιστρογόνων			
Αρνητικοί Θετικοί	4 (26,7) 14 (23,0)	11 (73,3) 47 (77,0)	0,762
Υποδοχείς Προγεστερόνης			
Αρνητικοί Θετικοί	6 (33,3) 12 (20,7)	12 (66,7) 46 (79,3)	0,270
Υποτροπή			
Όχι Ναι	7 (19,4) 6 (26,1)	29 (80,0) 17 (73,9)	0,548
Θάνατος			
Όχι Ναι	10 (20,4) 2 (25,0)	39 (79,6) 6 (75,0)	0,768
c-erbB-2			
Αρνητικοί Θετικοί	12(25,0) 5 (20,0)	36 (75,0) 29 (80,0)	0,613
P53			
Αρνητικοί Θετικοί	8(26,7) 10 (55,6)	22 (73,3) 37 (78,7)	0,586
Bcl-2			
Αρνητικοί Θετικοί	12(22,6) 5 (22,7)	41 (77,4) 17 (77,3)	0,994
PAP			
Χαμηλή Υψηλή	6 (35,0) 3 (7,7)	11 (64,7) 36 (92,3)	0,010



ΠΙΝΑΚΑΣ 19. Συσχέτιση (Spearman rank correlation) της έκφρασης του PCNA με άλλες παραμέτρους.

Παράμετρος	Συσχέτιση
Ηλικία	$r=-0,154$
	$P=0,181$
	$N=77$
Μέγεθος	$r=-0,001$
	$P=0,990$
	$N=77$
Λεμφαδένες	$r=0,231$
	$P=0,049$
	$N=74$
Grade	$r=0,047$
	$P=0,700$
	$N=69$
Υποδοχείς Οιστρογόνων	$r=-0,002$
	$P=0,988$
	$N=74$
Υποδοχείς Προγεστερόνης	$r=0,072$
	$P=0,542$
	$N=74$
c-erbB-2	$r=0,113$
	$P=0,341$
	$N=73$
P53	$r=0,335$
	$P=0,003$
	$N=77$
Bcl-2	$r=0,100$
	$P=0,385$
	$N=77$
PAP	$r=0,466$
	$P=0,000$
	$N=56$
DNA ploidy	$r=0,474$
	$P=0,008$
	$N=30$



ΠΙΝΑΚΑΣ 20. Κατανομή χαμηλών/υψηλών για PAP όγκων ανά παράμετρο

Παράμετρος	Χαμηλή (N, %)	Υψηλή (N, %)	P
Ηλικία			
<45	2 (22,0)	7 (77,8)	0,562
≥45	15 (3,9)	32 (68,1)	
Ιστολογικός Τύπος			
Πορογενής	14 (28,6)	35 (71,4)	0,442
Δοβιακό	3 (42,9)	4 (57,1)	
Μέγεθος (cm)			
<2	8 (44,0)	11 (56,0)	0,251
≥2	9 (24,3)	28 (75,7)	
Λεμφαδένες			
Αρνητικοί	10 (45,5)	12 (54,5)	0,035
Θετικοί	6 (18,8)	26 (81,3)	
Grade			
I	2 (50,0)	2 (50,0)	0,438
II	8 (32,5)	26 (76,5)	
III	4 (36,4)	7 (63,6)	
Υποδοχείς Οιστρογόνων			
Αρνητικοί	4 (40,0)	6 (60,0)	0,492
Θετικοί	13 (28,9)	32 (71,1)	
Υποδοχείς Προγεστερόνης			
Αρνητικοί	3 (21,4)	11 (78,6)	0,374
Θετικοί	14 (34,1)	27 (65,9)	
Υποτροπή			
Όχι	8 (28,6)	20 (71,4)	0,113
Ναι	1 (7,7)	12 (92,3)	
Θάνατος			
Όχι	9 (25,0)	27 (75,0)	0,260
Ναι	0 (0,0)	5 (100,0)	
c-erbB-2			
Αρνητικοί	14 (40,0)	21 (60,0)	0,158
Θετικοί	4 (21,1)	15 (78,9)	
P53			
Αρνητικοί	5 (26,3)	14 (73,7)	0,351
Θετικοί	14 (37,9)	22 (61,1)	
Bcl-2			
Αρνητικοί	9 (24,3)	28 (75,7)	0,066
Θετικοί	8 (50,0)	8 (50,0)	
PCNA			
Χαμηλή	6 (66,7)	3 (33,3)	0,070
Υψηλή	11 (23,4)	36 (76,6)	



ΠΙΝΑΚΑΣ 21. Συσχέτιση (Spearman rank correlation) της έκφρασης της PAP με άλλες παραμέτρους.

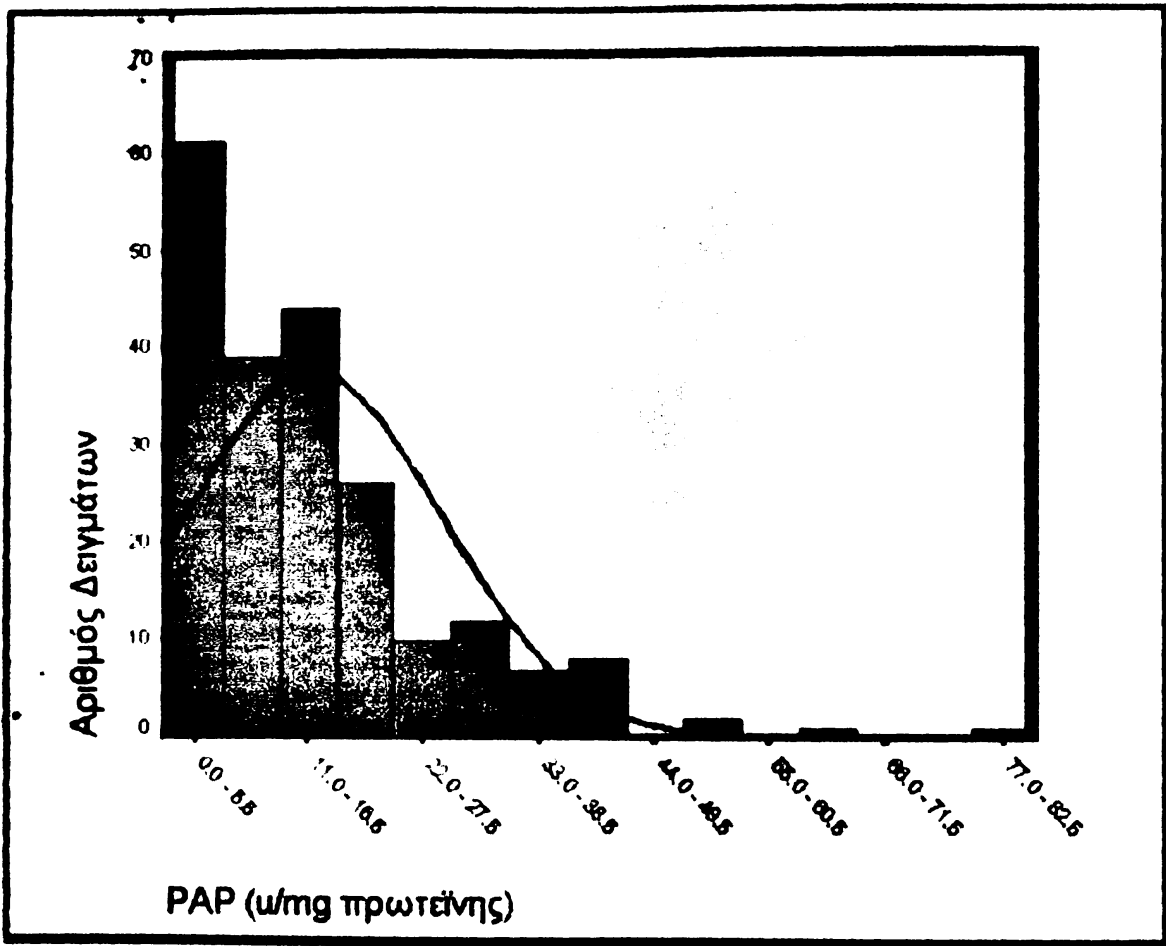
Παράμετρος	Συσχέτιση
Ηλικία	$r=-0,115$
	$P=0,398$
	$N=56$
Μέγεθος	$r=0,091$
	$P=0,503$
	$N=56$
Λεμφαδένες	$r=0,301$
	$P=0,027$
	$N=54$
Grade	$r=-0,038$
	$P=0,796$
	$N=49$
Υποδοχείς Οιστρογόνων	$r=0,068$
	$P=0,642$
	$N=54$
Υποδοχείς Προγεστερόνης	$r=0,013$
	$P=0,924$
	$N=54$
PCNA	$r=0,466$
	$P=0,000$
	$N=56$
c-erbB-2	$r=0,278$
	$P=0,040$
	$N=56$
P53	$r=0,085$
	$P=0,535$
	$N=56$
Bcl-2	$r=-0,220$
	$P=0,104$
	$N=56$
DNA ploidy	$r=0,241$
	$P=0,321$
	$N=19$



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ : ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

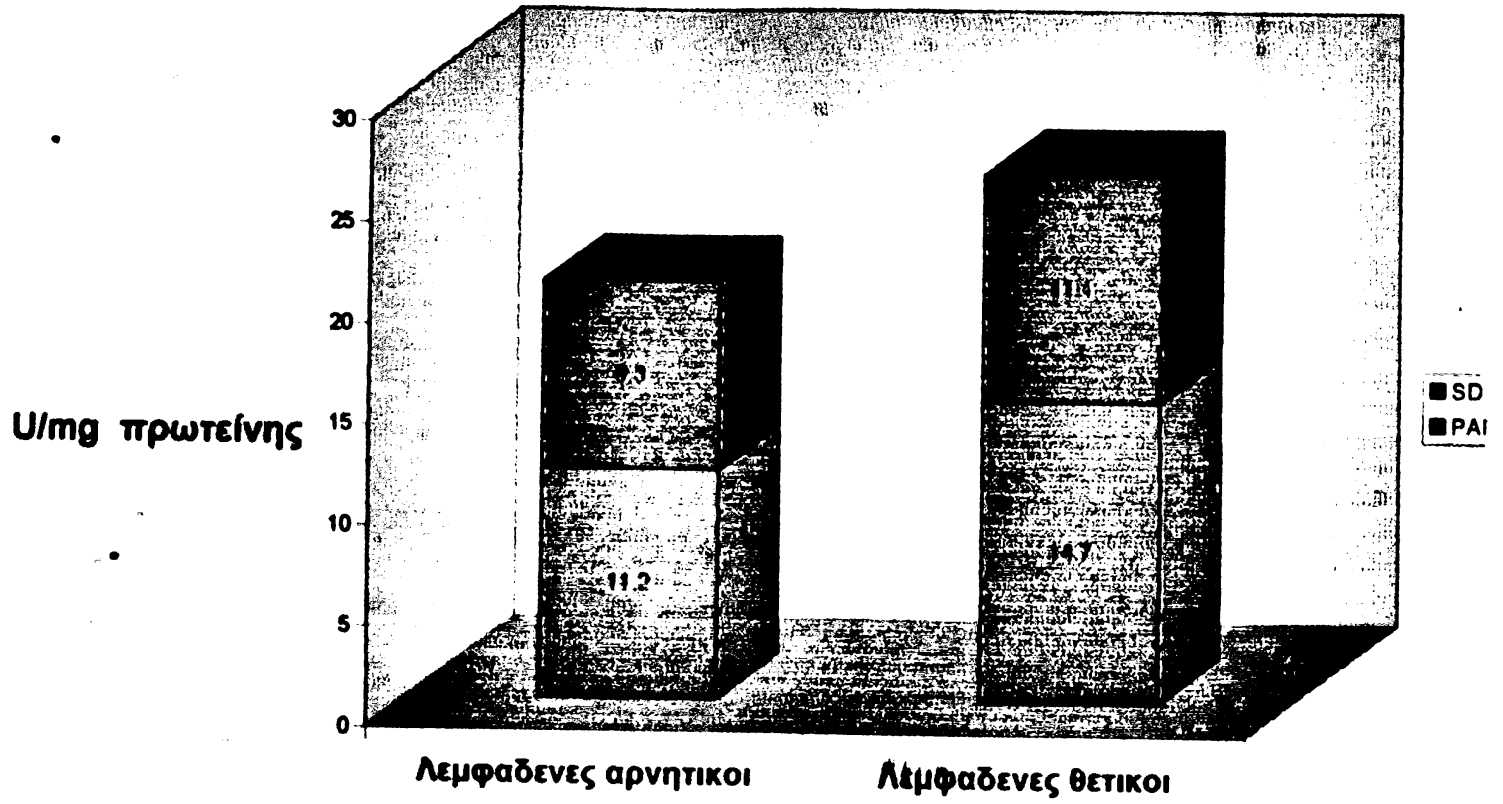


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1

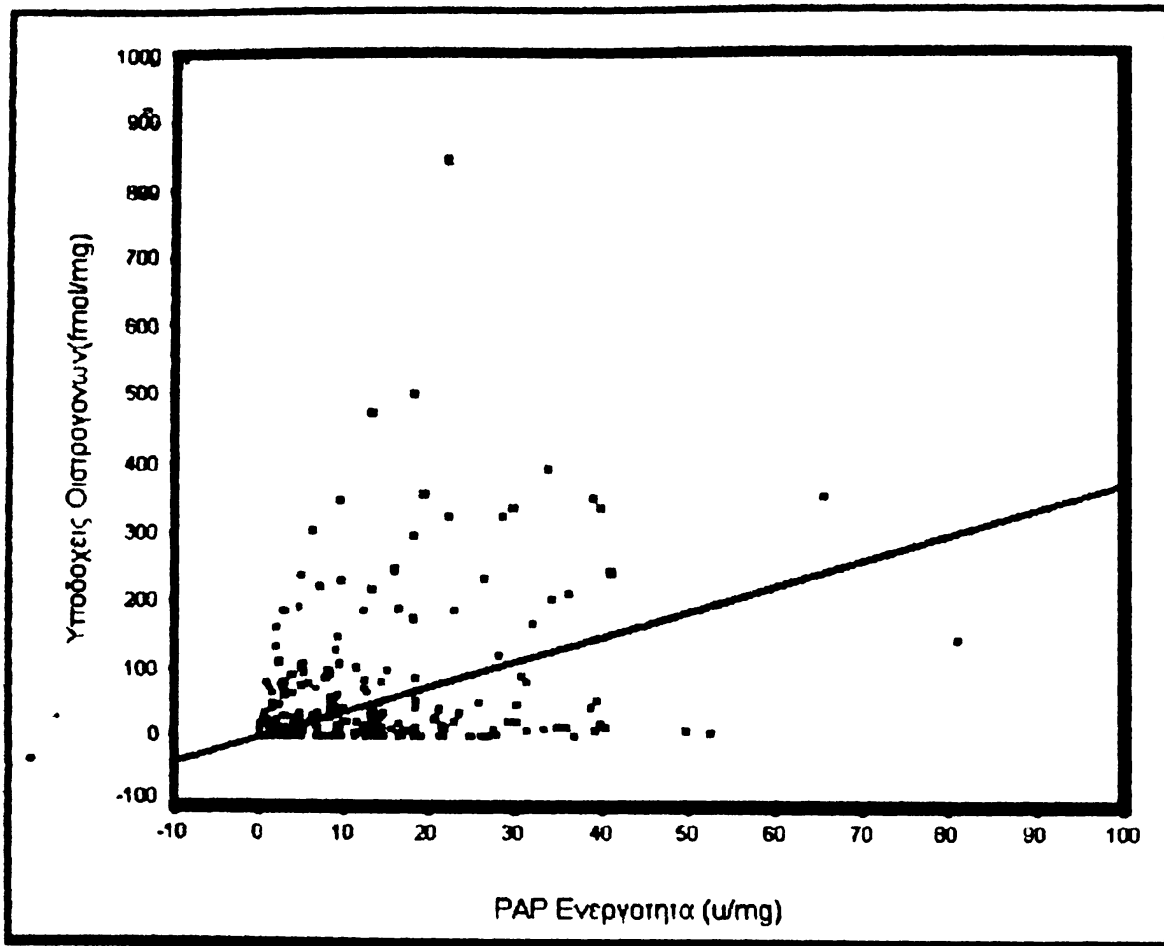


Διάγραμμα 1. Κατανομή των τιμών ειδικής ενεργότητας της PAP στο δείγμα των 211 όγκων του μαστού.

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2



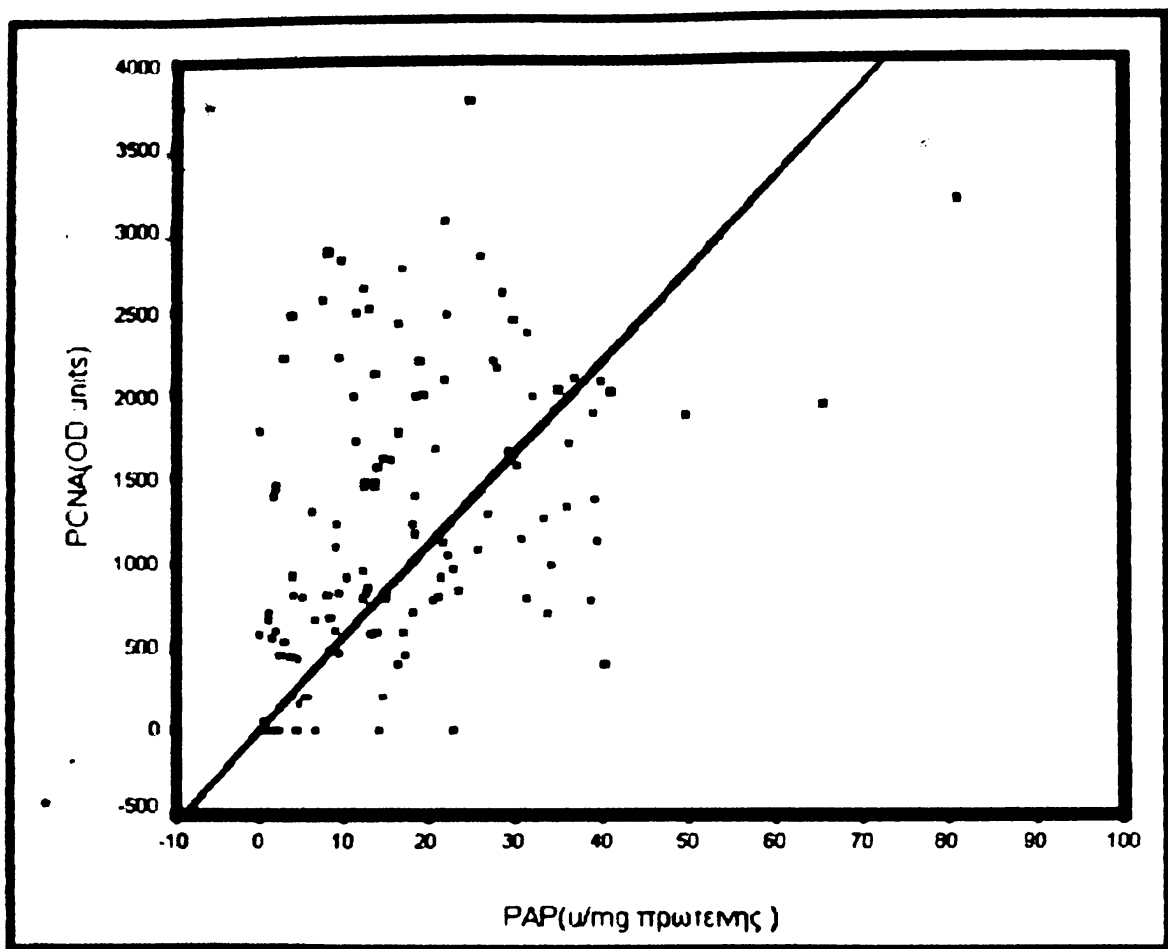
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3



Διάγραμμα 3. Συσχέτιση (Pearson correlation) μεταξύ των τιμών ειδικής ενεργότητας της PAP και της συγκέντρωσης των Οιστρογονικών υποδοχέων ($r=0,241$, $p<0,000$).

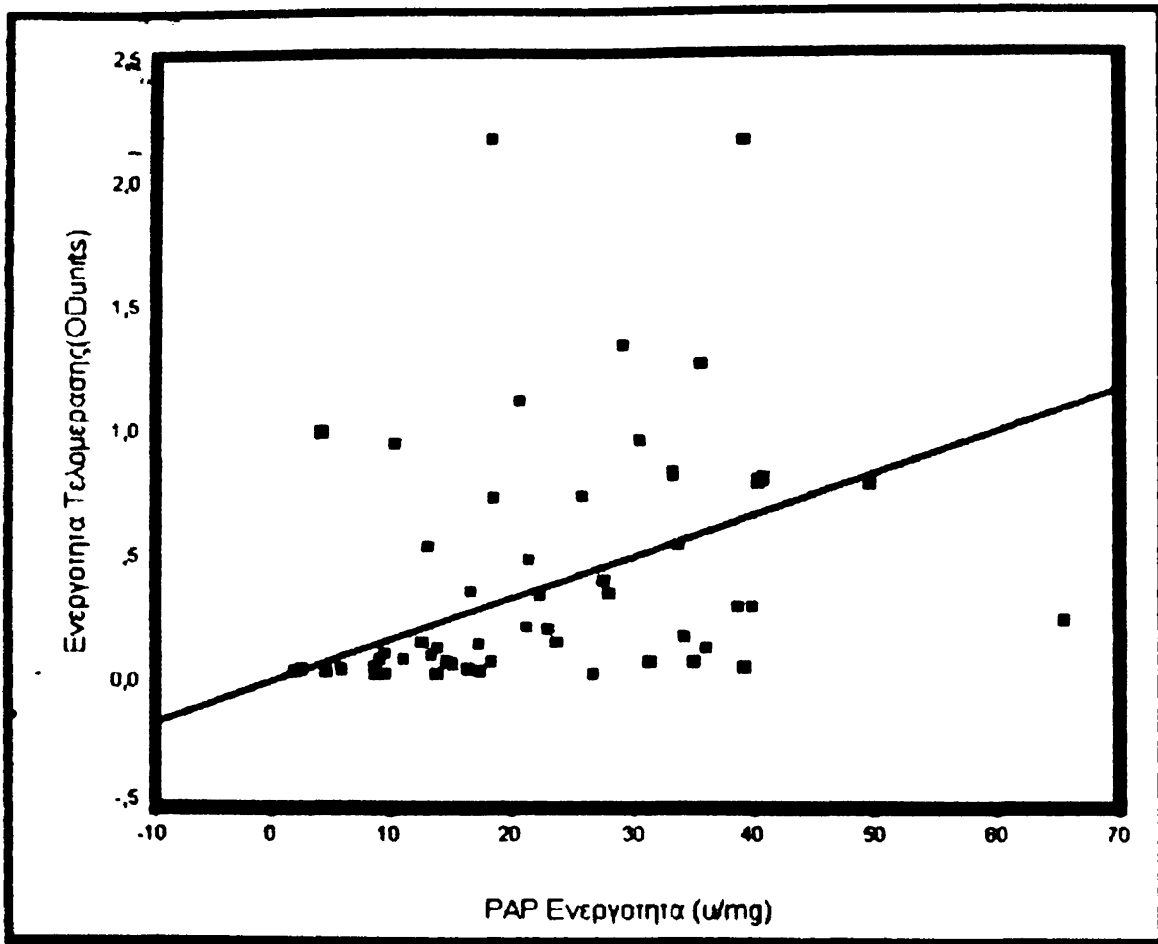


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4



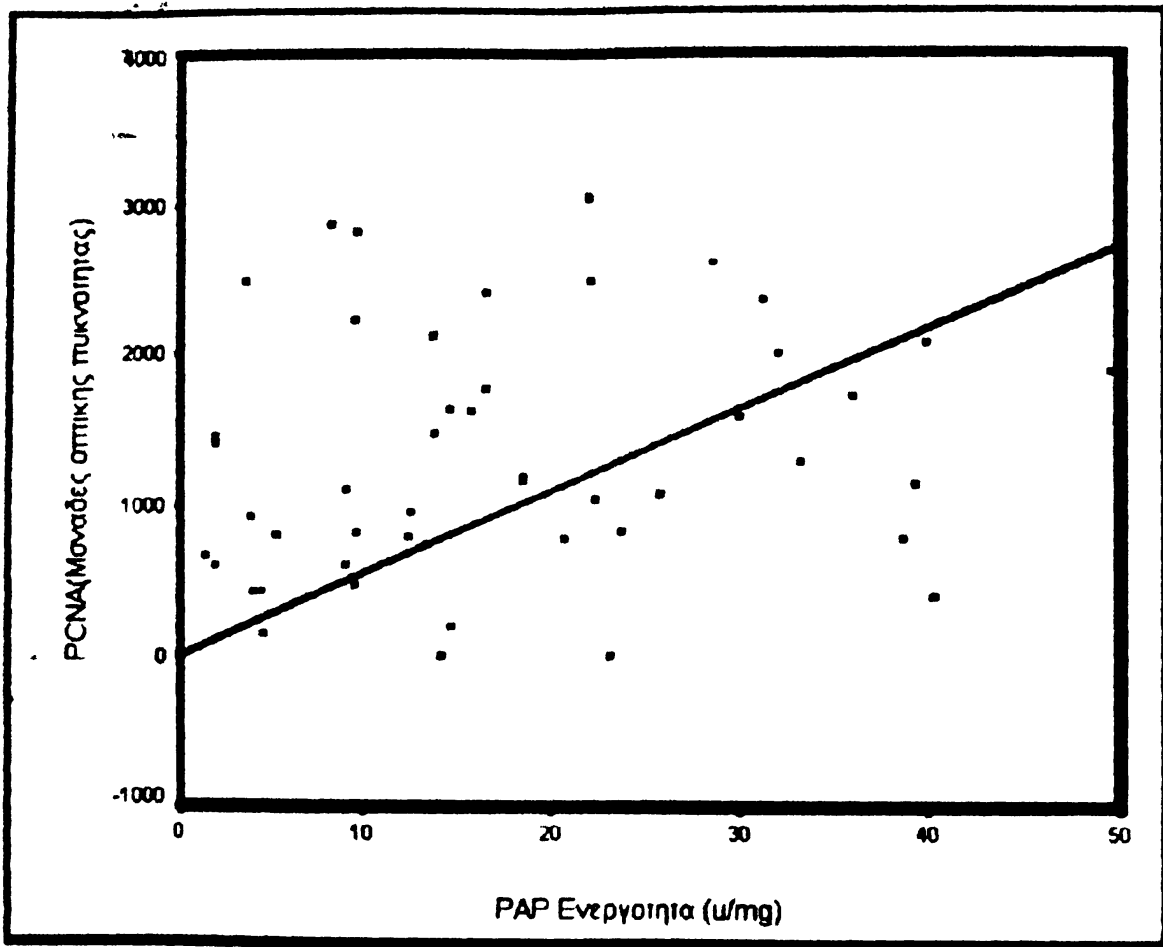
Διάγραμμα 4. Συσχέτιση (Pearson correlation) μεταξύ των τιμών ειδικής ενεργότητας της PAP και των τιμών έκφρασης του PCNA ($r=0,414$, $p<0,000$).

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 5



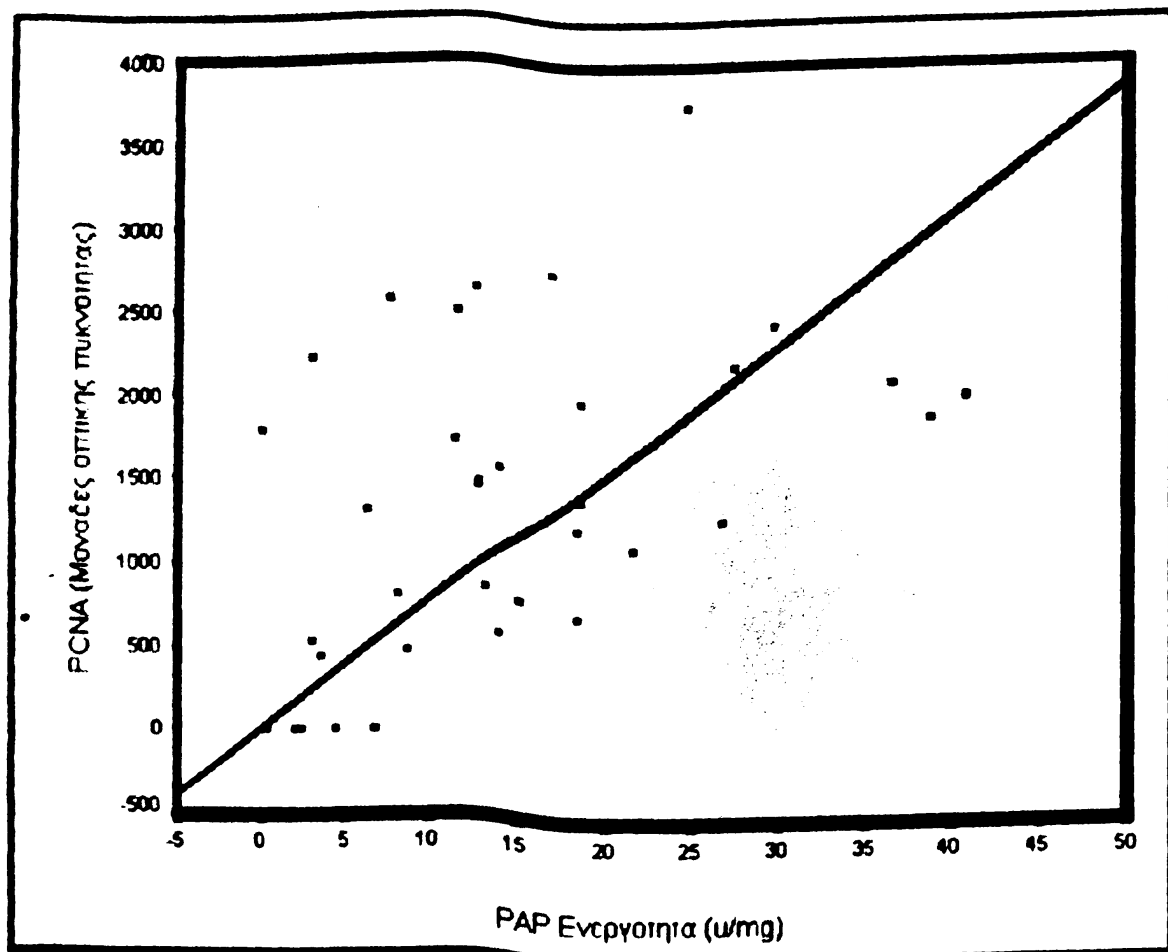
Διάγραμμα 5. Συσχέτιση (Pearson correlation) μεταξύ των τιμών ειδικής ενεργότητας της PAP και των τιμών ενεργότητας της Τελομεράσης ($r=0,306$, $p=0,023$).

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 6



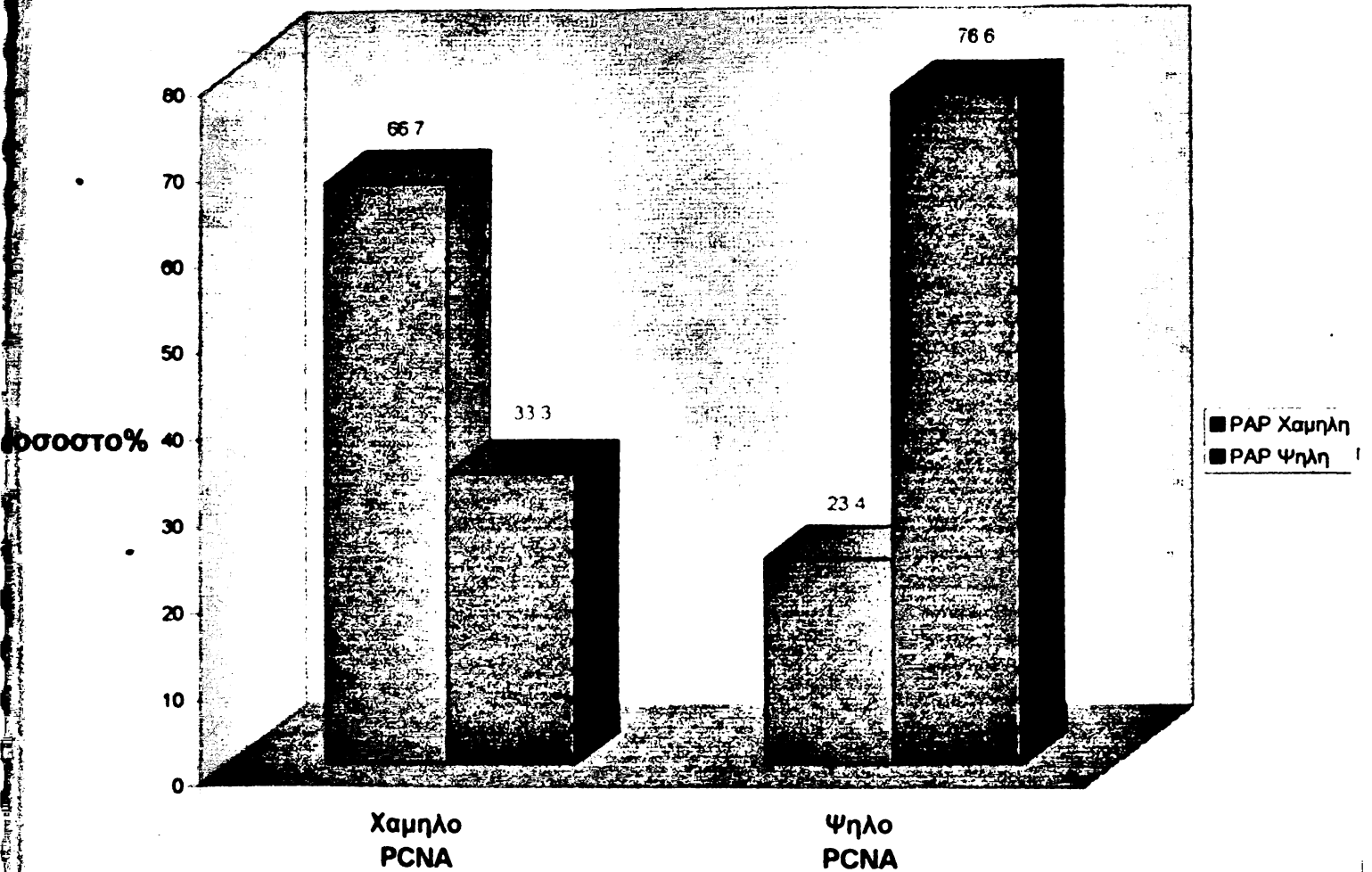
Διάγραμμα 6. Συσχέτιση (Pearson correlation) μεταξύ των τιμών ειδικής ενεργότητας της PAP και των τιμών έκφρασης του PCNA σε όγκους με διηθημένους τους επιχώριους λεμφαδένες ($r=0,191$, $p=0,198$).

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 7



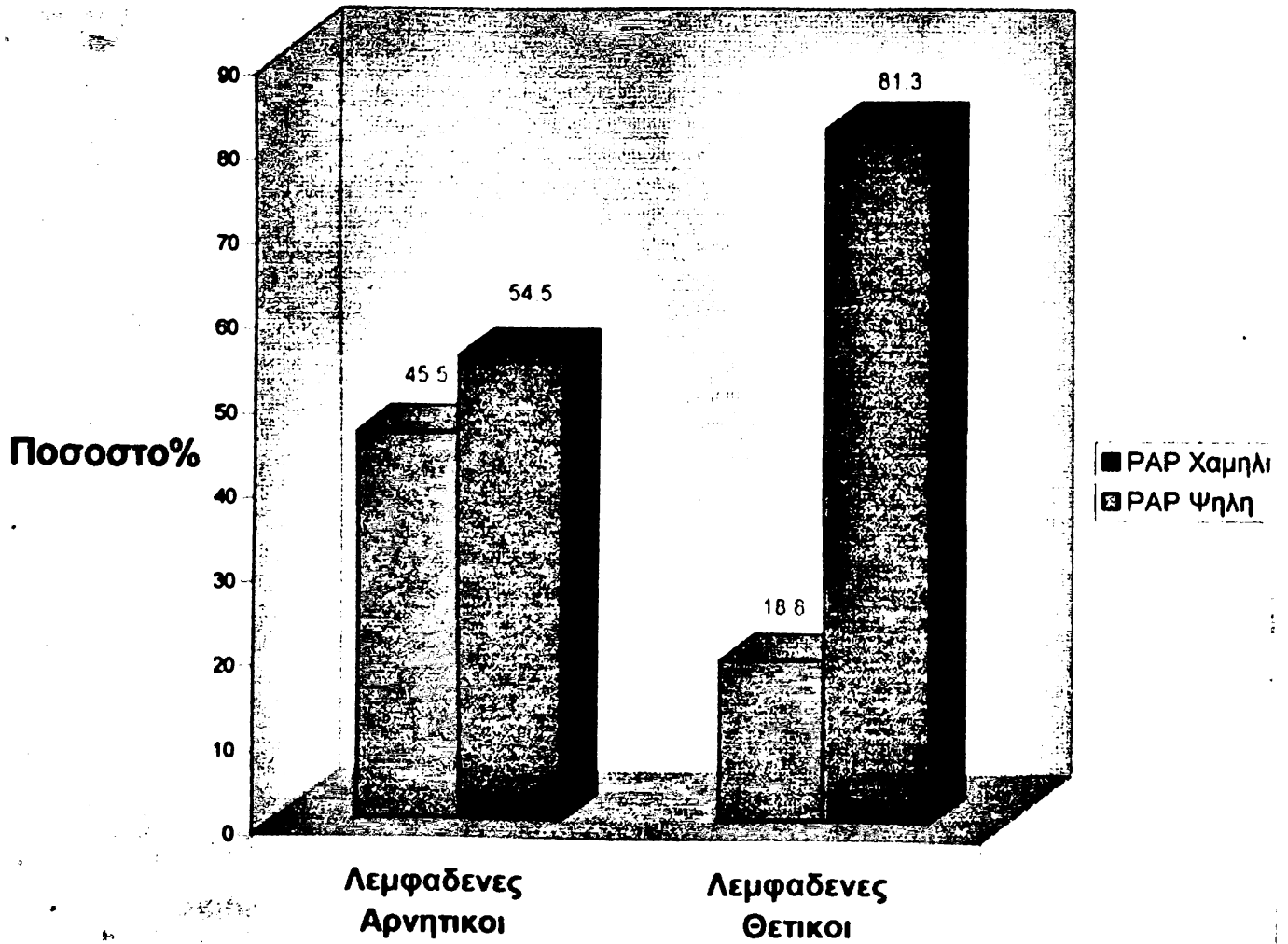
Διάγραμμα 7. Συσχέτιση (Pearson correlation) μεταξύ των τιμών ειδικής ενεργότητας της PAP και των έκφρασης του PCNA σε όγκους αρνητικούς για διήθηση στους επιχώριους λεμφαδένες ($r=0,501$, $p=0,002$).

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 8



Διάγραμμα 8. Κατανομή των όγκων με ψηλή /χαμηλή έκφραση PAP σε σχέση με την τα επίπεδα έκφρασης του PCNA.

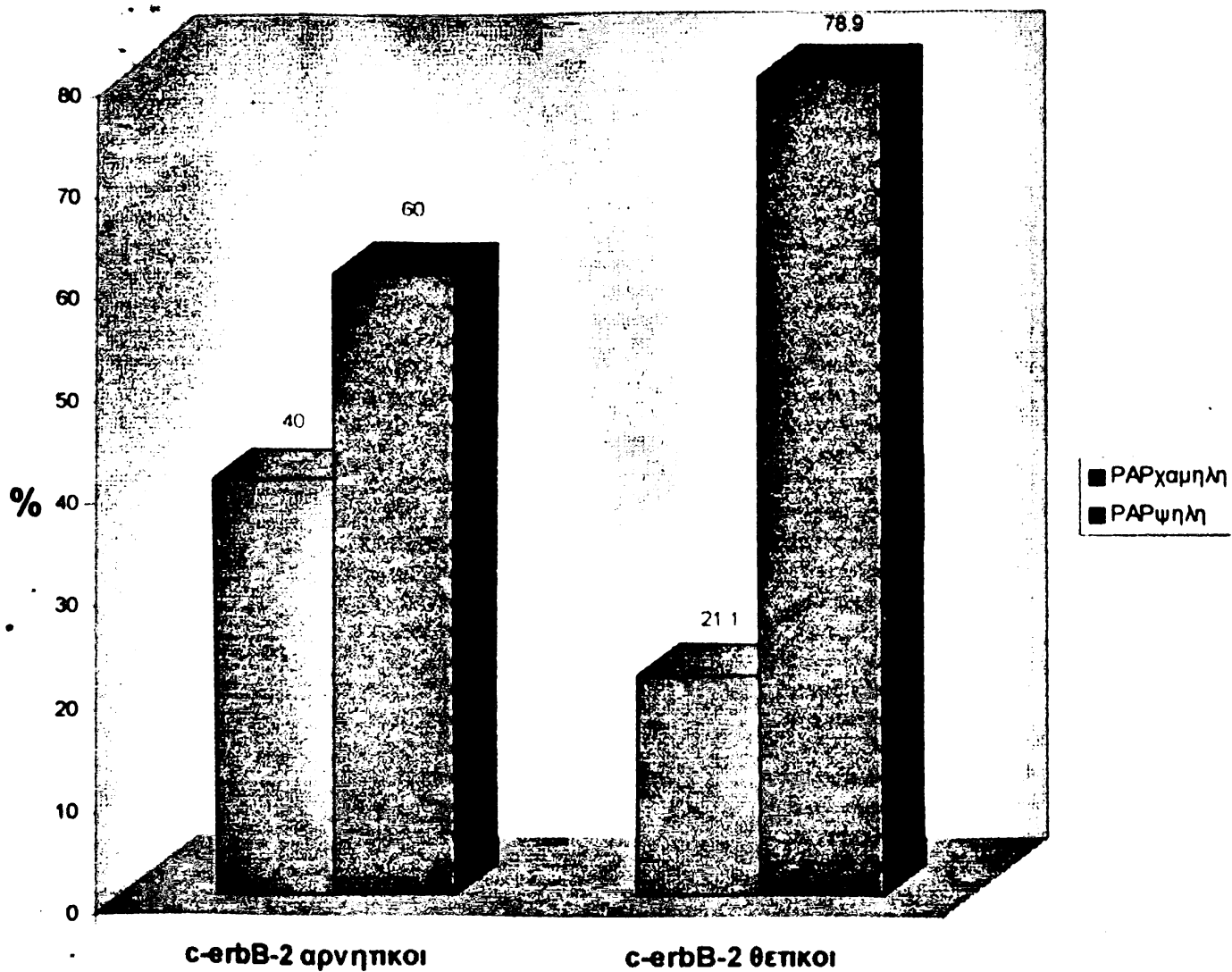
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 9



Διάγραμμα 9. Κατανομή των όγκων με χαμηλή / ψηλή έκφραση της PAP σε σχέση με την κατάσταση διήθησης των Λεμφαδένων.

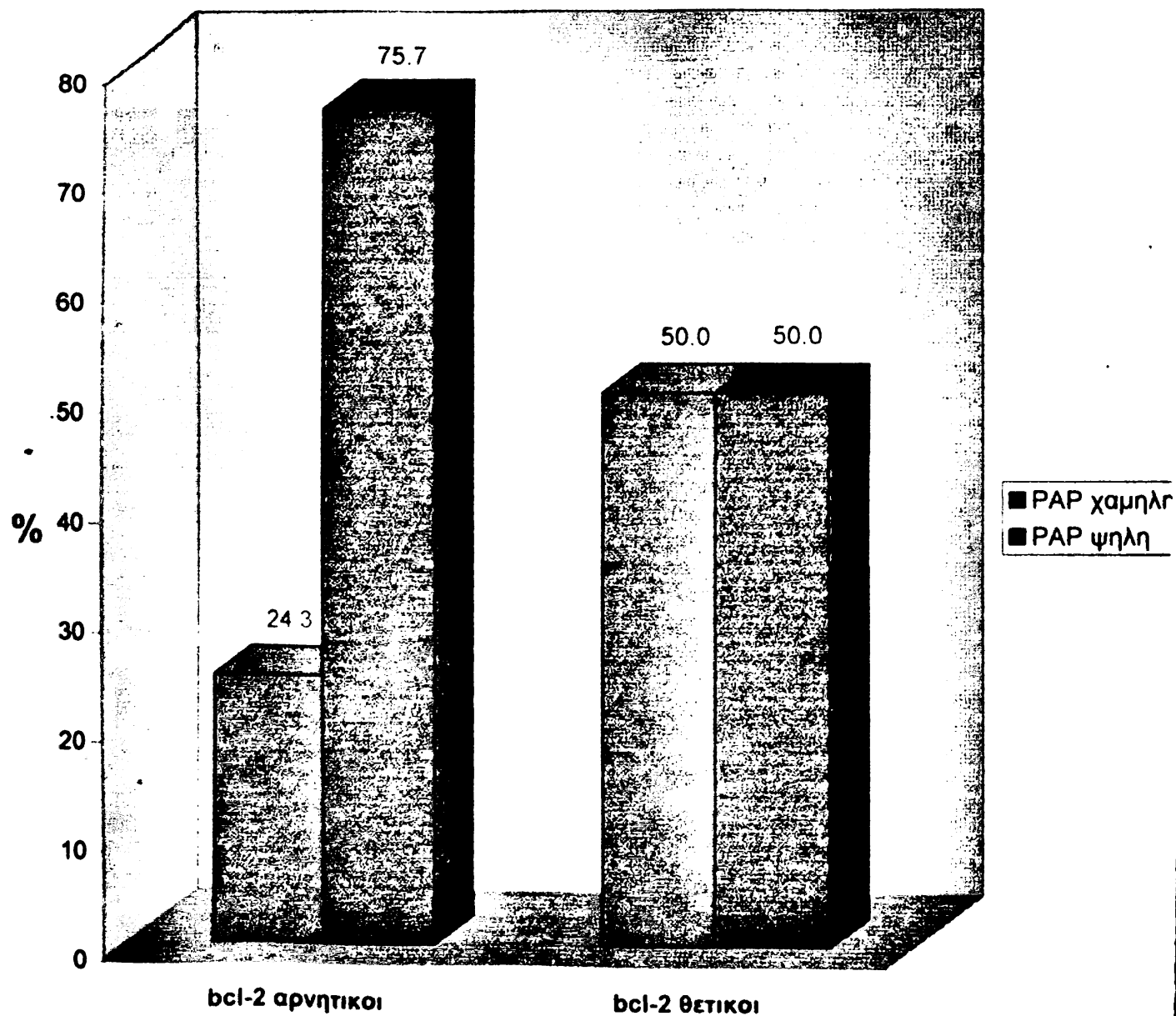


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 10



Διάγραμμα 10. Κατανομή των όγκων με χαμηλή /υψηλή έκφραση της PAP σχέση με την έκφραση του c-erbB-2.

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 11



Διάγραμμα 11. Κατανομή των όγκων με χαμηλή /ψηλή έκφραση της PAP σε σχέση με την έκφραση του bcl-2.

