

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200050

1





197.....14

A

332

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

Διευθυντής: Η Καθηγήτρια Νίκη Ι. Αγγάντη

ΠΕΡΙΦΕΡΕΙΑΚΟ ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΟ-ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ "Ο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ"
ΤΜΗΜΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ
ΑΝΑΚΑΤΑΤΑΞΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΚΑΛΟΗΘΕΙΣ ΟΓΚΟΥΣ
ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ. ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΤΗΣ
ΟΓΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ελένη Ρίζου-Μιχάλη

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2002





A
5

ВНЕШНЕЭКОНОМИЧЕСКИЕ СВЯЗИ
МИНИСТЕРСТВО
ВНЕШНЕЭКОНОМИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ВЕЩНОСТЬ
ВНЕШНЕЭКОНОМИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

17/2002

ВНЕШНЕЭКОНОМИЧЕСКИЕ СВЯЗИ
МИНИСТЕРСТВО
ВНЕШНЕЭКОНОМИЧЕСКИХ СВЯЗЕЙ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ



ВНЕШНЕЭКОНОМИЧЕСКИЕ СВЯЗИ

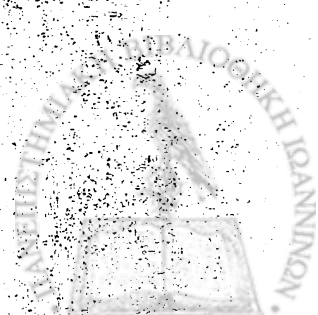
ВНЕШНЕЭКОНОМИЧЕСКИЕ СВЯЗИ

ВНЕШНЕЭКОНОМИЧЕСКИЕ СВЯЗИ



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

N.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2.



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

Μαρία Σύρρου : Επίκουρος Καθηγητής
Γενικής Βιολογίας – Ιατρικής Γενετικής
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μέλος



- Σύνθεση της Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

- Αγνάντη Νίκη :** Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής,
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, επιβλέπουσα
- Γεωργάτος Σπυρίδων :** Καθηγητής Γενικής Βιολογίας- Ιατρικής Γενετικής,
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος
- Καναβάρος Παναγιώτης :** Καθηγητής Ανατομίας-Ιστολογίας- Εμβρυολογίας
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος
- Μαλάμου-Μήτση Βασιλική:** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής,
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος
- Μπάρδη Γεωργία :** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Πειραματικής Κλινικής Γενετικής,
Πανεπιστημίου Lund, Σουηδία, μέλος
- Πανδής Νικόλαος :** Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής,
Πανεπιστημίου Lund Σουηδίας, μέλος
- Μαρία Σύρρου :** Επίκουρη Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας – Ιατρικής Γενετικής,
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος



Στον άντρα μου, Βαγγέλη Μιχάλη

Στη μάνα μου, Δήμητρα Ρίζου



Η Γενετική Ογκολογία επιστήμη με αλματώδη πρόοδο τη τελευταία εικοσαετία, έχει άμεση κλινική εφαρμογή αλλά ταυτόχρονα προσφέρεται και ως ερευνητικό πεδίο αφού πολλά από τα ερωτήματα για την εξέλιξη της νεοπλασματικής διεργασίας δεν έχουν απαντηθεί.

Η εκπόνηση αυτής της διδακτορικής διατριβής φιλοδοξεί να προσεγγίσει ορισμένα από τα γενετικά ερωτήματα που αφορούν τη βιολογική συμπεριφορά των καλοήθων όγκων του μαστού και να τα συσχετίσει με ανάλογα ευρήματα των καρκινωμάτων του μαστού.

Κατά τη διάρκεια της διατριβής είχα πολύτιμη βοήθεια και συμπαράσταση από τους παρακάτω Καθηγητές, συναδέλφους, συνεργάτες, φίλους και συγγενείς τους οποίους αισθάνομαι την ανάγκη να αναφέρω ως ελάχιστη αναγνώριση της προσφοράς τους.

Η Καθηγήτρια Δρ Νίκη Ι. Αγνάντη, Πρόεδρος του Ιατρικού Τμήματος, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και επικεφαλής της τριμελούς επιτροπής, από τους πρωτοπόρους της μελέτης του καρκίνου του μαστού στη χώρα μας, με την πλατύτητα της αντίληψης που τη διακρίνει, την κατανόηση και την ευγένεια του χαρακτήρα της, υπήρξε για μένα ουσιαστικός και ενθαρρυντικός παράγοντας για την εκπόνηση της διατριβής. Ο επιτελικός της ρόλος που συνδύασε τη στρατηγική χάραξη της εργασίας και τον έλεγχο των τακτικών επιλογών με την απαραίτητη για τον Ακαδημαϊκό πολίτη ελευθερία κινήσεων, δημιούργησε το προωθητικό υπόστρωμα αυτής της εργασίας. Οι διεθνούς επιπέδου δημοσιεύσεις της, τόσο στην παθολογοανατομική θεώρηση του καρκίνου του μαστού όσο και στη βιολογική θεώρηση αυτού του όγκου, υπήρξαν μαζί με τις προφορικές της υποδείξεις, πολύτιμες για την ολοκλήρωση της διατριβής.

Ο Αν. Καθηγητής Δρ. Νίκος Πανδής, Διευθυντής του Τμήματος Γενετικής του Ογκολογικού Νοσοκομείου «ο Άγιος Σάββας» και βασικός υπεύθυνος της διατριβής, με τις βαθύτατες γνώσεις του στη γενετική του καρκίνου του μαστού και τον ενθουσιασμό για κάθε νέα ανακάλυψη που αφορά τη Γενετική επιστήμη ήταν πρωταρχικός παράγοντας για την εκπόνηση αυτής της διατριβής. Εκτός από την πρακτική καθοδήγηση, θα ήταν



παράληψη να μην αναφέρω ότι με περιέβαλλε με εμπιστοσύνη από την αρχή της γνωριμίας μας ώστε να μου προτείνει να δουλέψω μαζί του, και από τότε με καθοδηγεί επιστημονικά. Η ευρυμάθεια, η μεταδοτικότητα και η ευθυκρισία που τον χαρακτηρίζει ήταν για μένα πηγή γνώσης. Οι ενδιαφέρουσες επιστημονικές και φιλοσοφικές μας συζητήσεις βελτίωσαν τον τρόπο σκέψης μου και μου μετέδωσαν μέρος του ενθουσιασμού του για την επιστήμη της Γενετικής.

Η επίκουρος Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας και Ιατρικής Γενετικής Δρ Μαρία Σύρρου, γνωστή στην επιστημονική κοινότητα από την ενασχόλησή της στη Γενετική, με προθυμία και ευγένεια αποδέχτηκε να είναι το τρίτο μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, έκανε γόνιμες υποδείξεις σχετικά με τη διατριβή και με περιέβαλλε με την εμπιστοσύνη της.

Η επικεφαλής της Κυτταρογενετικής Μονάδας του τμήματος Γενετικής του ΠΑΟΝΑ «ο Άγιος Σάββας» Αν. Καθηγήτρια Δρ. Γεωργία Μπάρδη με το συνεχές ενδιαφέρον της για μένα αλλά και για όλους τους μεταπτυχιακούς φοιτητές του εργαστηρίου, την προθυμία της, την επιστημονική της κατάρτιση, την ανιδιοτέλεια, την οργανωτικότητα και ευγένεια που την διακρίνει, ήταν μόνιμη πηγή ενθάρρυνσης. Η μεταλαμπάδευση της πείρας και των γνώσεών της τόσο στο θεωρητικό όσο και στο τεχνικό μέρος της δουλειάς, συνδυασμένα με την επιμονή και την αισιοδοξία της ήταν καθοριστικός παράγοντας για την ολοκλήρωση της εργασίας.

Η επικεφαλής της Μοριακής Μονάδας του τμήματος Γενετικής Δρ. Θεώνη Τράγκα με την πείρα του αντικειμένου της Μοριακής Βιολογίας που διαθέτει, απαντούσε σε κάθε ερώτησή μου σχετική με μοριακές τεχνικές και με βοήθησε αρκετές φορές στη μετάφραση της αγγλικής ορολογίας.

Ο Διευθυντής του Παθολογοανατομικού τμήματος του νοσοκομείου «ο Άγιος Σάββας», Δρ. Νικηφόρος Αποστολίκας καθώς και οι συνεργάτες του ιατροί κ.κ Μαρία Αρναούτη και Γεώργιος Γεωργίου με προθυμία απάντησαν σε όλες τις απορίες μου, παρείχαν το μεγαλύτερο μέρος των δειγμάτων καθώς και τις «ουκ άνευ» ιστολογικές διαγνώσεις.

Ο αναπληρωτής Διευθυντής Παθολογοανατομικού τμήματος του νοσοκομείου «Έλενα Βενιζέλου» Δρ. Κώστας Σφήκας, με ευγένεια, προθυμία και το ήθος που τον



διακρίνει, μου παρείχε μέρος των δειγμάτων καθώς και σημαντική βοήθεια στα ιστολογικά δεδομένα της διατριβής.

Ο Διευθυντής της Χειρουργικής Κλινικής Μαστού του 2^{ου} Θεραπευτηρίου ΙΚΑ κο Πολυχρόνης Αθανάσιος και ο ευγενής και πρόθυμος Ιατρός του ίδιου τμήματος κο Δημήτριος Χαρλαύτης προσέφεραν επίσης δείγματα.

Η συνάδελφος και φίλη κα Αλεξάνδρα Παπακώστα με την έμφυτη ευγένειά της, τη καλή της διάθεση και κουβέντα, ήταν συνεχώς δίπλα μου πάντα πρόθυμη να βοηθήσει. Ο συνάδελφος Δρ. Ευθύμιος Δημητριάδης αθόρυβα και αποτελεσματικά, όπως συνηθίζει βοήθησε στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Η υποψήφια Δρ. Χαρούλα Τσαρουχά μεταπτυχιακή φοιτήτρια του τμήματος Γενετικής, πάντα κεφάτη και αισιόδοξη, βοήθησε στην καλλιέργεια ορισμένων δειγμάτων. Ο κος Αλέξανδρος Σαμοΐλης μηχανικός Η/Υ με προθυμία και καλή διάθεση ήταν πάντα παρών για να διορθώσει ότι έχει σχέση με τη χρήση των υπολογιστών. Η υποψήφια Δρ Λουίζα Μαχαίρα, μεταπτυχιακή φοιτήτρια του τμήματος προσέφερε σημαντική πρακτική βοήθεια στην εκτύπωση των εικόνων της διατριβής. Επίσης όλοι οι υπόλοιποι συνάδελφοί μου στο εργαστήριο όπως οι κ.κ Δήμητρα Πάντου, Άννα Παπαδοπούλου επίσης υποψήφιοι διδάκτορες και η γραμματέας του τμήματος κα Βάσω Κουτσούγερα, μου συμπαραστάθηκαν, με ενθάρρυναν και ενδιαφέρθηκαν για τη διατριβή μου.

Η επικεφαλής του Τμήματος Ορμονικών Υποδοχέων και υποψήφια Διδάκτωρ κα Ιουλία Γιώτη, ακούραστη και ανιδιοτελής μου προσέφερε συχνά τεχνική βοήθεια στο πειραματικό μέρος της διατριβής. Ήταν πάντα δίπλα μου, φίλη και συνάδελφος, για να συνδράμει, όπως άλλωστε συνηθίζει σε ότι ήταν δυνατό.

Η φίλη κα Μαρίνα Μαργαρώνη από το τμήμα Ιολογίας, φιλότιμη και εργατική, με το ιδιαίτερο ενδιαφέρον που επιδεικνύει για τις κυτταροκαλλιέργειες μου πρόσφερε κάθε δυνατή τεχνική βοήθεια ιδιαίτερα στα πρώτα χρόνια της εκπαίδευσής μου.

Οι διοικητικοί συνάδελφοι κα Ζωή Κάτσιου και κος Νίκος Πάντος διευκόλυναν την έγκαιρη προμήθεια εργαστηριακών υλικών και βιβλιογραφικών δεδομένων αντίστοιχα.

Οι Διοικήσεις του ΠΑΟΝΑ «ο Άγιος Σάββας» και του Ελληνικού Αντικαρκινικού Ινστιτούτου παρείχαν τη δυνατότητα εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής στο τμήμα Γενετικής του Νοσοκομείου.



Τέλος οι «δικοί» μου άνθρωποι, η ξαδέρφη μου Βιολόγος Δρ. Λίλλη Δημητρίου και κυρίως η μάννα μου, τα παιδιά μου και ο άντρας μου στάθηκαν όλο το διάστημα δίπλα μου, με ενθάρρυναν, με στήριξαν και μου συγχώρεσαν την απουσία από κοντά τους. Ιδιαίτερα ο άντρας μου Βαγγέλης Μιχάλης μου προσέφερε και μεγάλη πρακτική βοήθεια αφού επιμελήθηκε την μορφή της διατριβής με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού.

Σε όλους τους παραπάνω αναφερόμενους Καθηγητές, συναδέλφους φίλους και συγγενείς θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου για τη συνδρομή τους.



ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Σελίδα

Γενικό Μέρος

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Η ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

3

1.1 Ο καρκίνος ως γενετική ασθένεια

3

1.2 Γονίδια και καρκίνος

4

1.3 Χρωμοσώματα και καρκίνος

7

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΑΣΤΟΣ

19

2.1 Επιδημιολογία

19

2.2 Ιστοπαθολογία

21

2.3 Κυτταρογενετική του καρκίνου του μαστού

25

2.4 Μοριακή Κυτταρογενετική του καρκίνου του μαστού

28

2.5 Μοριακή Γενετική του καρκίνου του μαστού

30

2.6 Γενετικά Χαρακτηριστικά

των καλοήθων παθήσεων του μαστού

33



Ειδικό μέρος

Σελίδα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	39
--	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	41
--------------------------	----

4.1 Υλικό	42
-----------	----

4.2 Κυτταρογενετική Μεθοδολογία	42
---------------------------------	----

4.3 Μεθοδολογία υβριδοποίησης (FISH)	48
--------------------------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	53
---------------------	----

5.1 Αποτελέσματα Κυτταρογενετικής ανάλυσης	53
--	----

5.2 Αποτελέσματα Μοριακής Κυτταρογενετικής ανάλυσης	58
---	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΖΗΤΗΣΗ	67
-----------------	----

6.1 Κυτταρογενετικά Ευρήματα	67
------------------------------	----

6.2 Μοριακά Κυτταρογενετικά Ευρήματα	79
--------------------------------------	----

6.3 Συνδυασμός μοριακών και χρωμοσωμικών ευρημάτων	83
--	----

6.4 Πολλαπλά Ινοαδενώματα	85
---------------------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	89
---------------------	----



ΠΕΡΙΛΗΨΗ	91
SUMMARY	92
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	93

Το παρόν έργο αποτελεί μια προσπάθεια να παρουσιαστεί η κατάσταση της έρευνας στην Ελλάδα σχετικά με την αντιμετώπιση των προβλημάτων που προκύπτουν από την ανάπτυξη της οικονομίας. Η έρευνα αυτή έχει ως στόχο να βοηθήσει στην κατανόηση των αιτιών των προβλημάτων και να προτείνει λύσεις που θα οδηγήσουν στην βελτίωση της οικονομικής κατάστασης.

Η έρευνα αυτή βασίζεται σε μια ανάλυση των δεδομένων που έχουν συλλεχθεί τα τελευταία χρόνια. Τα αποτελέσματα της έρευνας δείχνουν ότι τα προβλήματα που προκύπτουν από την ανάπτυξη της οικονομίας είναι πολύπλοκα και απαιτούν μια ολοκληρωμένη αντιμετώπιση. Η έρευνα αυτή προτείνει μια σειρά από μέτρα που θα βοηθήσουν στην αντιμετώπιση των προβλημάτων και στην βελτίωση της οικονομικής κατάστασης.

Η έρευνα αυτή είναι μια προσπάθεια να παρουσιαστεί η κατάσταση της έρευνας στην Ελλάδα σχετικά με την αντιμετώπιση των προβλημάτων που προκύπτουν από την ανάπτυξη της οικονομίας. Η έρευνα αυτή έχει ως στόχο να βοηθήσει στην κατανόηση των αιτιών των προβλημάτων και να προτείνει λύσεις που θα οδηγήσουν στην βελτίωση της οικονομικής κατάστασης.



Ο καρκίνος του μαστού είναι ο συχνότερος γυναικολογικός όγκος στις Δυτικές Ευρωπαϊκές χώρες και στις ΗΠΑ. Παρά τις πολυετείς ερευνητικές προσπάθειες αρκετά είναι τα ερωτήματα που παραμένουν αναπάντητα ιδιαίτερα όσον αφορά την ογκογένεση αυτού του όγκου. Τα τελευταία χρόνια η δημοσίευση πληθώρας επιστημονικών άρθρων που συνδέουν γενετικές ανωμαλίες, γονιδιακές και χρωμοσωμικές, με τον καρκίνο του μαστού υπογραμμίζει τη διατυπωμένη άποψη ότι ο καρκίνος είναι γενετική ασθένεια υπό την έννοια ότι επίκτητες ή κληρονομήσιμες μεταλλάξεις ανευρίσκονται στα καρκινικά κύτταρα και μεταβιβάζονται από κύτταρο σε κύτταρο με την κυτταρική διαίρεση.

Οι καλοήθεις αλλοιώσεις του μαστού δεν έχει αποδειχτεί μέχρι στιγμής ότι εξαλλάσσονται μετατρέπόμενες σε κακοήθεις αν και επιδημιολογικές μελέτες συνηγορούν υπέρ της συσχέτισης καλοήθων διεργασιών και αυξημένου κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου. Το γεγονός ότι σε ορισμένους άλλους καρκίνους, π.χ. καρκίνος παχέος εντέρου, τα αδενώματα θεωρούνται πρόδρομες μορφές της κακοήθειας μας ενθάρρυνε στη μελέτη των καλοήθων όγκων του μαστού. Μεθοδολογικό εργαλείο στη μελέτη αυτών των όγκων είναι η γενετική προσέγγιση ιδιαίτερα τη στιγμή που ήδη λίγες αλλά σημαντικές ενδείξεις προηγούμενων εργασιών υπογραμμίζουν ομοιότητες στο γενετικό επίπεδο καλοήθων και κακοήθων όγκων του μαστού, ώστε η περαιτέρω μελέτη να εκτιμάται ελπιδοφόρα και απαραίτητη.



Η ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

1.1 Ο καρκίνος ως γενετική ασθένεια

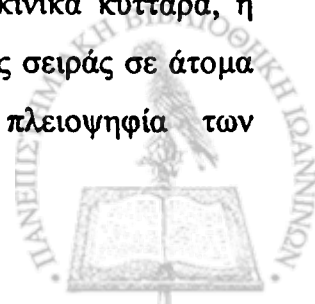
Ο καρκίνος είναι πιθανότατα μία πολύ παλιά ασθένεια, τόσο παλιά όσο και οι πολυκύτταροι οργανισμοί¹. Ίχνη συμβατά με αυτό που σήμερα ονομάζουμε καρκίνο έχουν βρεθεί σε σκελετούς δεινοσαύρων που έζησαν στο πλανήτη μας σχεδόν πριν 60 εκατομμύρια χρόνια. Περιγραφές καρκίνου παρουσιάζονται σε σχέδια και γραπτά μνημεία πολλών αρχαίων λαών. Καρκίνοι του σκελετικού συστήματος έχουν βρεθεί σε απομεινάρια από αιγυπτιακές μούμιες. Γραπτά του Ιπποκράτη περιέχουν περιγραφές και υποδείξεις αντιμετώπισης του καρκίνου. Οι επισημάνσεις αυτές είναι φανερό ότι στοιχειοθετούν την άποψη πως οι αρχαίοι ιατροί γνώριζαν τι σημαίνει καρκίνος καθώς και τις θανατηφόρες συνέπειές του².

Από τα αρχαία χρόνια μέχρι σήμερα με τον όρο καρκίνο περιγράφουμε πάνω από 200 διαφορετικές παθήσεις που μοιράζονται ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά όπως: ανώμαλη και αυτόνομη ανάπτυξη κυττάρων εντός ενός ιστού ξενιστή, δυνατότητα απομάκρυνσης μέρους αυτών των κυττάρων από τον ξενιστή και εγκατάστασής τους σε άλλους ιστούς κοντινούς ή πιο απομακρυσμένους, όπου αναπτύσσονται περαιτέρω³.

Η πρώτη σύνδεση καρκίνου και γενετικών ανωμαλιών έγινε από τον Γερμανό Παθολογοανατόμο David von Hansemann το 1890⁴. Το 1914 ο T. Boveri⁵ συνέθεσε αυτές και άλλες παρατηρήσεις μορφοποιώντας τη «θεωρία της σωματικής μετάλλαξης του καρκίνου» μέσω επίκτητων γενετικών βλαβών.

Ο καρκίνος σήμερα θεωρείται ότι είναι μία γενετική ασθένεια η οποία ξεκινά από τη συσσώρευση πολλών μη θανατηφόρων γενετικών ανωμαλιών. Η συσσώρευση αυτή προωθεί την κλωνική επιλογή και επέκταση των κυττάρων τα οποία έχουν διαφύγει από τον ομαλό αναπτυξιακό έλεγχο^{6,7,8}.

Οι γενετικές βλάβες ή μεταλλάξεις που εκκινούν την κακοήγη διεργασία μπορεί να είναι σωματικές, δηλαδή παρούσες μόνο στα καρκινικά κύτταρα, ή μπορεί να κληρονομούνται μέσω των κυττάρων της γεννητικής σειράς σε άτομα με κληρονομούμενα καρκινικά σύνδρομα. Πάντως η πλειοψηφία των



μεταλλάξεων είναι σωματικές και μόνον το 1% περίπου αφορά τα κληρονομούμενα καρκινικά σύνδρομα.

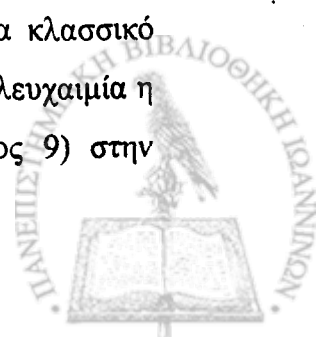
1.2 Γονίδια και καρκίνος

Από τα γονίδια που έχουν εντοπιστεί σε καρκινικά κύτταρα και φέρουν μεταλλάξεις, αυτά τα οποία έχει αποσαφηνιστεί ότι πράγματι συνδέονται με αυτόν τον όγκο, μπορούν να διαχωριστούν σε δύο αδρές κατηγορίες⁹: α) γονίδια που ενέχονται στην καρκινογένεση (*MYC*, *RBI*, *BRCA1*, *TP53* κ.α και β) γονίδια που ενέχονται στην προαγωγή και τη συμπεριφορά του όγκου (*CDH3*, *CDH5*, *MMP1*, *MDR1* κ.ά).

Προς το παρόν –οι γνώσεις στον τομέα της μοριακής γενετικής αυξάνονται ραγδαία– πολύ περισσότερα είναι γνωστά για τα γονίδια και γενετικά δρώμενα στην ογκογένεση από ότι για τα γονίδια που συνδέονται με τη βιολογική συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων. Τα γονίδια της πρώτης κατηγορίας, αν και πιθανόν τα μέχρι σήμερα δεδομένα να οδηγούν σε υπεραπλουστεύσεις, μπορούν να ταξινομηθούν στις εξής κατηγορίες: ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά, γονίδια επιδιορθωτικά του DNA. Όμως θα μπορούσε να γίνει και μια άλλη πιο ειδική κατάταξη βάσει των επιμέρους λειτουργιών (ρυθμιστικά γονίδια της απόπτωσης, γονίδια ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου κ.ά).

- **Ογκογονίδια (oncogenes)**

Τα ογκογονίδια είναι γονίδια που προάγουν την ομαλό πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των κυττάρων και τα οποία έχουν μεταβληθεί από ένα μεταλλακτικό γεγονός που δημιουργήσε αλλαγές στη δομή του γονιδίου ή στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Τα ογκογονίδια προάγουν την ογκογένεση δρώντας με τον επικρατή – γενετικά – τρόπο κληρονομικότητας στο κυτταρικό επίπεδο, δηλαδή αρκεί μία μετάλλαξη στο ένα από τα δύο αλληλόμορφα. Μεταλλακτικά γεγονότα που οδηγούν στην ενεργοποίηση των ογκογονιδίων περιλαμβάνουν σημειακές μεταλλάξεις, χρωμοσωμικές ανακατατάξεις και γονιδιακή επέκταση. Ίσες εισχωρήσεις και ενσωματώσεις μπορούν επίσης να οδηγήσουν στην ενεργοποίηση των ογκογονιδίων¹⁰. Παραδείγματα αυτών των μηχανισμών ενεργοποίησης των ογκογονιδίων υπάρχουν πολλά. Ένα κλασσικό σήμερα παράδειγμα είναι η μετάθεση t (9;22) στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία η οποία μετακινεί ένα τμήμα του γονιδίου *ABL* (του χρωμοσώματος 9) στην



περιοχή συνάθροισης σημείων θραύσης (Breakpoint Cluster Region: *BCR*) στο χρωμόσωμα 22 με αποτέλεσμα τη χιμαιρική πρωτεΐνη *BCR/ABL* με δράση κινάσης της τυροσίνης^{11,12}. Παραδείγματα γονιδιακής επέκτασης είναι αυτά των γονιδίων *c-ERBB-2* και *MYC* στον καρκίνο του μαστού^{13,14}.

- **Ογκοκατασταλτικά Γονίδια (Tumor suppressor genes)**

Τα ογκοκατασταλτικά είναι γονίδια τα οποία φυσιολογικά καταστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό¹⁵. Η συμμετοχή τους στην καρκινογένεση γίνεται με απώλεια ή μεταλλάξεις των δύο αλληλομόρφων γενοτύπων που έχει ως αποτέλεσμα απώλεια, καταστολή ή ανωμαλίες στην πρωτεΐνη που κωδικοποιούν. Είναι επομένως κατανοητό ότι στο κυτταρικό επίπεδο τα γονίδια αυτά συμπεριφέρονται με τον υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα κατασταλτικού γονιδίου είναι αυτό του ρετινοβλαστώματος (*RBI*). Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι το ρετινοβλάστωμα είναι κατά 40% κληρονομούμενος καρκίνος ενώ κατά 60% σποραδικός. Ο κληρονομούμενος τύπος παρουσιάζεται σε νεαρότερα άτομα και συνήθως εμφανίζεται και στα δύο μάτια. Όταν το ένα από τα δύο γονίδια του *RBI* (χρωμοσωμική θέση 13q14) είναι μεταλλαγμένο σε ένα άτομο εκ γενετής, από τα κύτταρα της γενετικής σειράς μέσω του γονιμοποιημένου ωαρίου, τότε χρειάζεται επιπροσθέτως μία δεύτερη μετάλλαξη σε ένα κύτταρο του αμφιβληστροειδούς, σωματική αυτή τη φορά, ώστε να «αδρανοποιηθεί» και το δεύτερο από τα αλληλόμορφα γονίδια με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ρετινοβλαστώματος. Στο σποραδικό τύπο χρειάζονται δύο μεταλλάξεις στο ίδιο κύτταρο του αμφιβληστροειδούς για να ξεκινήσει η ογκογένεση. Το μοντέλο αυτό της ογκογένεσης, γνωστό ως “two hit hypothesis”¹⁶ που πρωτοχρησιμοποιήθηκε για να εξηγήσει τη συμπεριφορά του ρετινοβλαστώματος έχει γενικότερη εφαρμογή σε διάφορα καρκινικά σύνδρομα και τους αντίστοιχους σποραδικούς καρκίνους όπου εμπλέκονται μεταλλάξεις ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

- **Επιδιορθωτικά γονίδια DNA**

Τέτοιου είδους γονίδια στη φυσιολογική μορφή τους έχουν σαν ρόλο τη διατήρηση της ομαλότητας ολοκλήρου του γονιδιώματος. Αποτέλεσμα των μεταλλάξεών τους είναι η συσσώρευση «λαθών» κατά τη διάρκεια διπλασιασμού του DNA κυρίως στις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (microsatellites) που βρίσκονται μεταξύ των γονιδίων. Η γενετική αστάθεια αυτών των αλληλουχιών



αυξάνει με τη σειρά της την πιθανότητα να συμβεί μετάλλαξη σε άλλα γονίδια που συνδέονται με τον καρκίνο, προκαλώντας με αυτό το τρόπο δευτερογενώς καρκινογένεση.

Γνωστό παράδειγμα είναι τα επιδιορθωτικά γονίδια *MLH1*, *PMS1*, *PMS2* των οποίων μεταλλάξεις οδηγούν στο μη πολυποδιακό κληρονομούμενο καρκίνο του παχέος εντέρου.

- **Ρυθμιστικά γονίδια απόπτωσης (apoptosis regulating genes)**

Η απόπτωση δηλαδή ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ρυθμίζεται από ειδική κατηγορία γονιδίων¹⁷. Μεταλλάξεις σε τέτοιου είδους γονίδια τα καθιστούν αντιαποπτωτικά δηλαδή προωθείται η μακρά επιβίωση των κυττάρων επιτρέποντας έτσι μεταλλάξεις σε πρωτοογκογονίδια και/ή ογκοκατασταλτικά γονίδια που με τη σειρά τους προάγουν την ογκογένεση. Παράδειγμα τέτοιου γονιδίου είναι το *BCL2* στη χρωμοσωμική θέση 18q21 που εμφανίζεται με παθολογική δράση σε μεγάλο ποσοστό των λεμφωμάτων¹⁸.

Το γονίδιο *TP53* που κατά τη φυσιολογική του δράση ευνοεί την απόπτωση σε κύτταρα με βλάβες του DNA, έχει βρεθεί λειτουργικά απενεργοποιημένο σε αρκετούς τύπους καρκίνου. Τέτοιου είδους γονίδια ονομάζονται προαποπτωτικά.

- **Γονίδια ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου**

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν γονίδια που φυσιολογικά τα προϊόντα τους είναι ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου κυρίως κυκλίνες (cyclins), οι εξαρτώμενες από αυτές κινάσες (CDKs), αναχαιτιστές των κινασών (CKIs), καθώς και το υπόστρωμα στο οποίο δρουν. Τα σύμπλοκα (χημικά) που σχηματίζονται από τις κυκλίνες και τις CDK δρουν ρυθμιστικά με φωσφορλίωση σημαντικών πρωτεϊνών που ενέχονται σε διεργασίες του κυτταρικού κύκλου. Μεταλλάξεις στις κυκλίνες και στις κινάσες τις ωθούν ώστε να δρουν ως ενεργοποιημένα ογκογονίδια¹⁹.

Από την άλλη πλευρά, οι αναχαιτιστές των κινασών λειτουργούν ως αρνητικοί ρυθμιστές σχηματίζοντας σταθερά σύμπλοκα που απενεργοποιούν την καταλυτική μονάδα κυκλίνης-κινάσης. Λόγω της “υπολειπόμενης” φύσης τους στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και του γεγονότος ότι μερικοί από αυτούς παρουσιάζονται μεταλλαγμένοι σε ανθρώπινους όγκους, έχει υποδειχτεί ότι πρέπει επίσης να λειτουργούν ως ογκοκατασταλτικά γονίδια²⁰.



Υπερέκφραση του γονιδίου της κυκλίνης D1 (*CCND1*) που είναι μέλος της οικογένειας κυκλινών G1, έχει βρεθεί περίπου στο 35% των πορογενών καρκινωμάτων του μαστού²¹. Το γονίδιο αυτό εντοπίζεται στη χρωμοσωμική θέση 11q13.

1.3. Χρωμοσώματα και καρκίνος

Πληθώρα πολυποίκλων χρωμοσωμικών ανακατατάξεων έχει εντοπιστεί σε 39.000 περίπου νεοπλάσματα²² τα οποία έχουν μελετηθεί με σύγχρονες κυτταρογενετικές τεχνικές. Η μεγάλη πλειοψηφία αυτών των νεοπλασμάτων αφορά αιματολογικές κακοήθειες νόσους παρά το γεγονός ότι η νεοπλασματικής αιτιολογίας νοσηρότητα και θνησιμότητα του ανθρώπου οφείλεται κυρίως στους συμπαγείς όγκους. Αιτία της δυσανάλογης, σε σχέση με τη σημασία τους, κυτταρογενετικής πληροφορίας των νεοπλασιών, είναι κυρίως τεχνικές δυσκολίες και μεθοδολογικά σφάλματα στην προσέγγισή τους.

Η τεράστια ποικιλία των διαφορετικών χρωμοσωμικών ανακατατάξεων που ενέχονται στον καρκίνο, οδήγησε τους επιστήμονες στην αναζήτηση και διαμόρφωση μίας κοινής γλώσσας και έτσι σήμερα χρησιμοποιείται το Διεθνές Σύστημα Ανθρώπινης Κυτταρογενετικής Ονοματολογίας του 1995²³ (International System for Human Cytogenetic Nomenclature) που αποτελεί τον παγκόσμια αποδεκτό τρόπο περιγραφής των χρωμοσωμικών ανωμαλιών και τη βάση επικοινωνίας των επιστημόνων που αναφέρονται στην Κυτταρογενετική. Οι αποφάσεις και οδηγίες του ISCN δημιούργησαν μία γλώσσα περιγραφής των κυτταρογενετικών φαινομένων και των στοιχείων τα οποία υπεισέρχονται, με τη χρησιμοποίηση ειδικών συμβόλων κατά ανάλογο τρόπο με τις γλώσσες άλλων επιστημών π.χ Οργανική Χημεία (Ονοματολογία Γενεύης).

Βασικά στοιχεία της Ονοματολογίας δίνονται παρακάτω.

- **Ονοματολογία**

Καρυότυπος ονομάζεται η συστηματοποιημένη τοποθέτηση του συνόλου των χρωμοσωμάτων σύμφωνα με το μέγεθος τους, τη θέση του κεντρομεριδίου και το πρότυπο ζωνών ενός κυττάρου που αντιπροσωπεύει ένα άτομο ή μία νεοπλασία.

Τα χρωμοσώματα κατατάσσονται σε αυτοσωμικά χρωμοσώματα που αριθμούνται από το 1 έως και το 22 και σε φυλετικά που αναφέρονται ως X και Y.



Το κεντρομερίδιο χωρίζει κάθε χρωμόσωμα σε δύο σκέλη το βραχύ p σκέλος και το μακρύ q σκέλος.

Κάθε σκέλος χωρίζεται κατά μήκος σε συγκεκριμένες περιοχές ή τμήματα (regions) και κάθε περιοχή περιλαμβάνει ορισμένες εγκάρσιες ζώνες (bands). Οι ζώνες μπορούν να χωριστούν περαιτέρω σε υποζώνες (subbands) όταν τα χρωμοσώματα είναι μακρά σε μήκος και με τη σήμανση έχει επιτευχθεί υψηλής ευκρίνειας ανάλυση (high resolution). Οι περιοχές και οι ζώνες αριθμούνται διαδοχικά κατά μήκος του κάθε σκέλους ξεκινώντας από το κεντρομερίδιο και καταλήγοντας στα άκρα του χρωμοσώματος. Επομένως για τον προσδιορισμό μιας συγκεκριμένης ζώνης απαιτούνται τέσσερα στοιχεία: ο αριθμός του χρωμοσώματος, το σύμβολο του σκέλους (ανάλογα p ή q), ο αριθμός της περιοχής και ο αριθμός της ζώνης. Αυτά τα στοιχεία γράφονται διαδοχικά πάντα με την ίδια αυστηρή σειρά χωρίς μεσοδιαστήματα. Όταν είναι δυνατός και ο καθορισμός των υποζωνών, αφού γραφούν τα παραπάνω στοιχεία, ακολουθεί τελεία και ο αριθμός της συγκεκριμένης υποζώνης. π.χ **1p36.3** σημαίνει: η υποζώνη 3, της ζώνης 6, της περιοχής 3, του μικρού σκέλους του χρωμοσώματος 1.

Οι ανωμαλίες που μπορεί να παρουσιάζει ένας καρυότυπος χωρίζονται σε :

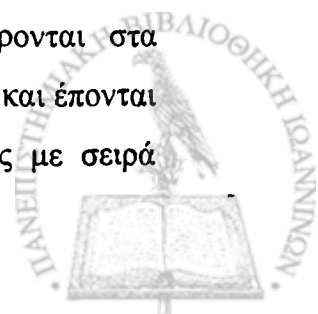
Αριθμητικές, δηλαδή ύπαρξη επιπλέον χρωμοσωμάτων ή απώλειά τους.

Δομικές, δηλαδή θραύση ενός ή περισσότερων χρωμοσωμάτων σε κάποια σημεία και ανακατάταξη κάποιου χρωμοσωμικού τμήματος. Η θέση του σημείου θραύσης καθορίζεται από τη ζώνη και την υποζώνη (αν αυτό είναι εφικτό) όπου έγινε το σπάσιμο. Με αυτόν τον τρόπο δομικά αλλαγμένα χρωμοσώματα μπορούν να προσδιοριστούν από τα σημεία θραύσης τους. Ο τρόπος συμβολισμού των κυριότερων δομικών χρωμοσωμικών αλλαγών ενός καρυότυπου φαίνεται στον πίνακα 1.3 I στη σελίδα 11.

Σωστή σύνταξη καρυότυπου: Για να γραφεί σωστά ένας καρυότυπος ακολουθούνται οι παρακάτω απλοί κανόνες:

A) Πρώτα γράφεται ο συνολικός αριθμός των χρωμοσωμάτων ακολουθεί κόμμα (,) και τα φυλετικά χρωμοσώματα. Άρα 46,XX και 46,XY είναι ο φυσιολογικός καρυότυπος για γυναίκα και άντρα αντίστοιχα.

B) Σε ανώμαλους καρυότυπους οι ανωμαλίες που αναφέρονται στα φυλετικά χρωμοσώματα γράφονται πρώτες (προηγούνται αυτές του X και έπονται του Y). Ακολουθούν οι ανωμαλίες των αυτοσωμικών ξεκινώντας με σειρά



μεγέθους (από το 1 έως το 22), ανεξάρτητα από το είδος της ανωμαλίας. Οι ανωμαλίες για κάθε χρωμόσωμα χωρίζονται με κόμμα (,).

Γ) Οι αριθμητικές ανωμαλίες προηγούνται στη γραφή από τις δομικές και συμβολίζονται με (+) και (-) και τον αριθμό του χρωμοσώματος για να υποδηλώσουν την ύπαρξη περισσότερων ή λιγότερων των δύο χρωμοσωμάτων αντίστοιχα.

Δ) Για την παρουσίαση δομικών ανακατατάξεων γράφεται πρώτα το είδος της ανακατάταξης χρησιμοποιώντας την αγγλική συντομογραφία (βλέπε Πίνακα 1.31) και ακολουθεί σε παρένθεση το ή τα χρωμοσώματα που ενέχονται σε αυτή. Αν ενέχονται περισσότερα του ενός χρωμοσώματα τότε αυτά χωρίζονται μέσα στη παρένθεση με ελληνικό ερωτηματικό. Πρώτα γράφονται τα φυλετικά χρωμοσώματα και ακολουθούν αυτά με το μικρότερο αριθμό (δηλαδή τα μεγαλύτερα σε μέγεθος). Εξαίρεση υπάρχει μόνο στην περίπτωση που περιγράφουμε παρεμβολή (ins) χρωμοσωμικού υλικού όπου πάντα αναγράφεται πρώτο το χρωμόσωμα που γίνεται δέκτης του χρωμοσωμικού υλικού ανεξάρτητα από το μέγεθός του.

Ε) Τα σημεία θραύσης αναγράφονται στη συνέχεια σε ξεχωριστή παρένθεση σε αντιστοιχία με τη σειρά των χρωμοσωμάτων. Δεν χρησιμοποιείται ερωτηματικό όταν η ανακατάταξη αφορά ένα χρωμόσωμα.

Για παράδειγμα: t(9;22)(q34;q11) δηλώνει μία μετάθεση ανάμεσα στα χρωμοσώματα 9 και 22 με σημεία θραύσης τα 9q34 και 22q11 αντίστοιχα ενώ η έλλειψη del(6)(q21q23) αφορά ένα χρωμοσωμικό κομμάτι εντός του χρωμοσώματος 6 στο μακρύ του σκέλος.

ΣΤ) Μία χρωμοσωμική ανωμαλία για να περιγραφεί στον καρυότυπο πρέπει να είναι κλωνική δηλαδή να χαρακτηρίζει έναν κυτταρικό πληθυσμό ή κλώνο που προέρχεται από ένα μοναδικό κύτταρο πρόγονο. Για να θεωρηθεί μία ανωμαλία κλωνική πρέπει να έχει βρεθεί σε τουλάχιστον δύο κύτταρα εκτός από την περίπτωση απώλειας ενός ολοκλήρου χρωμοσώματος. Σε αυτή την περίπτωση απαιτούνται τουλάχιστον τρία κύτταρα με την ανωμαλία για να θεωρηθεί κλωνική. Η βιολογική σημασία των κλωνικών ανωμαλιών και των κλώνων από τους οποίους προέρχονται, αναπτύσσεται παρακάτω στη σελίδα 14.

Ζ) Στον καρυότυπο οι σχετιζόμενες κλωνικές ανωμαλίες περιγράφονται διαδοχικά ξεκινώντας από την πιο απλή και καταλήγοντας στην πιο σύνθετη.



Άρα ο βασικός κλώνος (stemline) ενός ανώμαλου κυτταρικού πληθυσμού που είναι και ο πιο συχνός χρωμοσωμικός τύπος αναφέρεται πάντα πρώτος.

Η) Μη σχετιζόμενες κλωνικές χρωμοσωμικές ανακατάξεις αναγράφονται με σειρά μεγέθους ξεκινώντας από τη μεγαλύτερη σε αριθμό ανωμάτων κυττάρων και καταλήγοντας στη μικρότερη. Χωρίζονται δε η μία από την άλλη με πλάγια γραμμή (/).

Θ) Αμέσως μετά την αναγραφή κάθε κλωνικής χρωμοσωμικής ανωμαλίας, ακολουθεί μέσα σε αγκύλες ([]) ο αριθμός των κυττάρων στα οποία αυτή βρέθηκε.

Ο αντιπροσωπευτικός αριθμός (modal number) είναι ο πιο κοινός χρωμοσωμικός αριθμός σε ένα κυτταρικό πληθυσμό ενός όγκου και αντίστοιχα στον καρυότυπό του. Ένας καρυότυπος περιγράφεται ανάλογα με τον αριθμό των χρωμοσωμάτων που διαθέτει εκφρασμένος σε πολλαπλάσια του απλοειδούς αριθμού ($n=23$). Συγκεκριμένα χρησιμοποιείται η παρακάτω ορολογία: Διπλοειδής ($2n$), τριπλοειδής ($3n$), τετραπλοειδής ($4n$) χρωμοσωμικός αριθμός, περί τη διπλοειδία ($2n \pm$), περί την τριπλοειδία ($3n \pm$) κλπ, ανάλογα με το πλησιέστερο επίπεδο πλοειδίας όταν δεν είναι ακριβές πολλαπλάσιο του n . Επίσης υπάρχουν οι όροι υποδιπλοειδής ($2n-$), υπερδιπλοειδής ($2n+$) κοκ. Ακόμη χρησιμοποιούνται και οι όροι ψευδοδιπλοειδής, ψευδοτριπλοειδής κλπ που περιγράφουν καρυότυπο με ισοδύναμο αριθμό χρωμοσωμάτων με αυτόν του αντίστοιχου επιπέδου πλοειδίας - αλλά ανώμαλου λόγω αριθμητικών και/ή δομικών ανωμαλιών. Όλοι οι χρωμοσωμικοί αριθμοί που αποκλίνουν από τους ευπλοειδικούς αριθμούς ($2n$) είναι ανευπλοειδείς.

Με την πρόοδο της επιστήμης, τη σύνθεση των δύο επιπέδων της γενετικής ανάλυσης – κυτταρογενετικού και μοριακού – και την ανάπτυξη της Μοριακής Κυτταρογενετικής, δημιουργήθηκε επίσης η ανάγκη περιγραφής βασικών στοιχείων που υπεισέρχονται στις τεχνικές της φθορισμικής in-situ υβριδοποίησης δηλαδή της βασικής τεχνικής της Μοριακής Κυτταρογενετικής.



Πίνακας 1.31 Περιγραφή και συμβολισμός των συνηθέστερων δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών

Χρωμοσωμική Ανωμαλία	Περιγραφή	Αγγλική Ορολογία/ (Συντομογραφία)
Προσθήκη	Προσθήκη χρωμοσωμικού υλικού αγνώστης προέλευσης	Addition/ (add)
Έλλειψη	Έλλειψη χρωμοσωμικού υλικού είτε εντός είτε στο άκρο του χρωμοσώματος	Deletion/ (del)
Δευτερογενές Χρωμόσωμα	Δομικά ανακαταταγμένο χρωμόσωμα που προκύπτει από αλλαγές εντός ενός χρωμοσώματος ή από μη ισοζυγισμένες ανακατατάξεις όπου ενέχονται δύο ή περισσότερα χρωμοσώματα.	Derivative Chromosome/(der)
Δικεντρικό Χρωμόσωμα	Ανώμαλο χρωμόσωμα που έχει δύο κεντρομερίδια	Dicentric Chromosome/(dic)
Διπλοί χρωμοσωμικοί Κόκκοι	Μικροί χρωμοσωμικοί σχηματισμοί, χωρίς κεντρομερίδιο που υπάρχουν σε πολλαπλά αντίγραφα	Double minutes/ (dmin)
Διπλασιασμός	Διπλασιασμός χρωμοσωμικού τμήματος	Duplication/(dup)
Ομογενώς χρωσμένη Περιοχή	Ομογενώς χρωσμένα χρωμοσωμικά τμήματα το μέγεθος των οποίων ξεπερνά τη φυσιολογική χρωμοσωμική ζώνη	Homogeneously staining Region/(hsr)
Ισοχρωμόσωμα	Χρωμόσωμα που αποτελείται από δύο ομόλογα πανομοιότυπα μεταξύ τους σκέλη συμμετρικά το ένα του άλλου	Isochromosome/ (i)
Αναστροφή (περικεντρική ή παρακεντρική)	Περιστροφή ενός χρωμοσωμικού τμήματος κατά 180°	Inversion/(inv)
Εισχώρηση ή Παρεμβολή	Ένα χρωμοσωμικό τμήμα έχει παρεμβληθεί σε μία διαφορετική θέση στο ίδιο ή σε άλλο χρωμόσωμα	Insertion/ (ins)
Χρωμόσωμα Δείκτης	Δομικά ανώμαλο χρωμόσωμα που δεν μπορεί να αναγνωριστεί η προέλευση κανενός τμήματός του.	Marker chromosome/ (mar)
Δακτυλιοειδής ή Χρωμόσωμα Δακτύλιος	Κυκλικό χρωμόσωμα που έχει προέλθει από σπάσιμο και επανασυγκόλληση δύο χρωμοσωμικών σκελών	Ring chromosome/ (r)
Μετάθεση	Μεταφορά χρωμοσωμικού υλικού από ένα χρωμόσωμα σε άλλο	Translocation/(t)



Στο διεθνές συνέδριο (ISCN,1995) που διαμορφώθηκε η κυτταρογενετική Ονοματολογία καθορίστηκαν και οι αρχές που πρέπει να διέπουν την Ονοματολογία του υβριδισμού.

Τα κυριότερα σύμβολα που χρησιμοποιούνται περιγράφονται στο παρακάτω πίνακα. 1.3II

Πίνακας 1.3II : Κυριότερα Σύμβολα Ορολογίας Υβριδισμού και σημασία τους

Σύμβολο	Επεξήγηση
-	Απουσία σήματος σε συγκεκριμένο χρωμόσωμα
+	Παρουσία σήματος σε συγκεκριμένο χρωμόσωμα
++	Παρουσία διπλού σήματος σε συγκεκριμένο χρωμόσωμα
×	Σήμα πολ/σμού. Γράφεται μπροστά από τον αριθμό των σημάτων που παρατηρούνται
.	Τελεία. Διαχωρίζει τα κυτταρογενετικά ευρήματα από τα αποτελέσματα του υβριδισμού
;	Χωρίζει τα probes σε διαφορετικά ανώμαλα χρωμοσώματα
<i>Amp</i>	Το σήμα του υβριδισμού παρουσιάζεται μεγαλύτερο δηλαδή με περισσότερη ένταση φωτός από το φυσιολογικό (amplified)
<i>Con</i>	Τα παρατηρούμενα σύμβολα παρουσιάζονται ενωμένα (το ένα κολλημένο δίπλα στο άλλο)
<i>(f)ish</i>	(φθορισμικός) in situ Υβριδισμός
<i>Nuc ish</i>	Υβριδισμός που έχει γίνει σε μεσοφασικό πυρήνα
<i>wcp</i>	Σήμανση με probe ολοκλήρου του χρωμοσώματος (whole chromosome paint)

Συνοπτικά οι κυριότεροι κανόνες που ακολουθούνται είναι:

A) Πάντα το σύμβολο ish προηγείται κατά την περιγραφή του υβριδισμού. Αν έχει προηγηθεί κυτταρογενετική ανάλυση τότε ο καρυότυπος προηγείται στη γραφή και χωρίζεται από τον υβριδισμό με τελεία (.) και το σύμβολο ish. Αν δεν έχει γίνει καρυότυπος η περιγραφή ξεκινά με ish.

B) Όταν πρόκειται για υβριδισμό σε μεταφάσεις μετά το σύμβολο ish ακολουθεί η ζώνη, η περιοχή και το σκέλος του χρωμοσώματος όπου βρίσκεται η συγκεκριμένη γενετική θέση (locus) που εξετάστηκε με την τεχνική υβριδισμού. Π.χ 46,XX.ish del(22)(q11.2q11.2)(D22S75-) σημαίνει ότι ένας καρυότυπος που είχε βρεθεί ομαλός με την κλασσική κυτταρογενετική ανάλυση, παρουσιάζει μία έλλειψη με την τεχνική υβριδισμού στο χρωμόσωμα 22 στην υποζώνη q11.2. Η έλλειψη αυτή ανιχνεύτηκε με ένα ανιχνευτή για τη γενετική θέση (locus) D22S75. ish. del(15)(q11.2q11.2)(SNRPN-,D15S10-) Σε αυτή τη περίπτωση έχουμε ένα

περιστατικό που έχει μελετηθεί μόνο με υβριδισμό και βρέθηκε ότι έχει μία έλλειψη στην υποζώνη q11.2 διότι οι δύο γενετικές θέσεις (loci) SNRPN και D15S10 που εξετάστηκαν δεν δίνουν σήμα άρα λείπουν.

Γ) Όταν ο υβριδισμός έχει γίνει σε μεσοφασικό πυρήνα τότε πάντα γράφεται μπροστά το σύμβολο *nuc ish* και ακολουθεί η χρωμοσωμική ζώνη και το locus το οποίο εξετάστηκε μέσα σε παρένθεση. Στην παρένθεση εκτός από την ονομασία του locus μπαίνει και το σήμα (x) και ο αριθμός των φωτεινών σημάτων που παρατηρήθηκαν. Π.χ **nuc ish 21q22(D21S65×3)**: Στη ζώνη 21q22 παρατηρήθηκαν τρία σήματα για το locus D21S65

Δ) Αν χρησιμοποιούνται δύο ιχνηθέτες (probes) για δύο διαφορετικές γενετικές θέσεις στην ίδια χρωμοσωμική ζώνη τότε αναγράφονται όπως προαναφέρθηκε σε παρένθεση και χωρίζονται μεταξύ τους με κόμμα. Αν έχουμε δύο διαφορετικές χρωμοσωμικές ζώνες τα αποτελέσματα για τη κάθε γενετική θέση γράφονται αμέσως μετά τη χρωμοσωμική θέση στην οποία βρίσκονται και χωρίζονται με κόμμα. Π.χ **nuc ish 21q22(D21S65×2,D21S64×3)**: Στη ζώνη q22 του χρωμοσώματος 21 βρέθηκαν δύο και τρία αντίγραφα για τα loci D21S65 και D21S64 αντίστοιχα. **Nuc ish Xp22.3(KAL×2),21q22(D21S65×3)**: Βρέθηκαν δύο αντίγραφα για το locus *KAL* και τρία για το D21S65 στις χρωμοσωμικές θέσεις Xp22.3 και 21q22 αντίστοιχα.

Ε) Αν εξετάζονται δύο γενετικές θέσεις (loci) σε δύο διαφορετικά χρωμοσώματα και έχουν ενωθεί γιατί υπάρχει χρωμοσωμική ανακατάταξη τότε τα αποτελέσματα εκφράζονται ως συνήθως αλλά ακολουθεί και μία παρένθεση όπου οι γενετικές θέσεις γράφονται και με το σύμβολο *con*. Π.χ **nuc ish. 9q34(ABL×2),22q11(BCR×2)**: Υπάρχουν και οι δύο γενετικές θέσεις και στα δύο ζεύγη των εξεταζόμενων χρωμοσωμικών θέσεων και τα αποτελέσματα του σήματος υβριδισμού δείχνουν ένα φυσιολογικό κύτταρο (βλέπουμε συνολικά 4 διαφορετικά σήματα). **Nuc ish. 9q34(ABL×2),22q11(BCR×2)(ABLconBCR×1)**: Δύο σήματα ένα για τη γενετική θέση BCR και ένα για την ABL έχουν ενωθεί και δίνουν ένα ανώμαλο σήμα που αντιστοιχεί στο υβριδικό προϊόν που έχει σχηματιστεί. Επομένως το κύτταρό μας δεν είναι φυσιολογικό και βλέπουμε συνολικά 3 σήματα (δύο φυσιολογικά και ένα ανώμαλο).

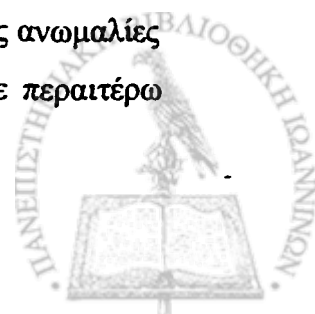


- **Βασικές κατηγορίες χρωμοσωμικών ανωμαλιών και βιολογική τους σημασία.**

Καθημερινά νέα στοιχεία προστίθενται στις μέχρι τώρα γνώσεις για την ογκογένεση και σημαντικά κυτταρογενετικά ευρήματα είναι διαθέσιμα για αρκετά είδη νεοπλασιών. Στον πίνακα 1.4 στη σελίδα 18 παρουσιάζονται μερικές από τις χρωμοσωμικές ανακατατάξεις που χαρακτηρίζουν συγκεκριμένα είδη νεοπλασιών.

Το κυριότερο συμπέρασμα που συνάγεται από τη μελέτη τέτοιου είδους δεδομένων είναι ότι οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες δομικές ή αριθμητικές που εμπλέκονται σε συγκεκριμένο είδος όγκου ή αιματολογικής κακοήθειας δεν είναι τυχαίες²⁴. Δηλαδή περιορίζονται σε συγκεκριμένα σημεία θραύσης και συγκεκριμένες περιοχές των χρωμοσωμάτων πολύ λιγότερες από όσες έχει συνολικά το ανθρώπινο γονιδίωμα. Παρά αυτή την «προτίμηση» των νεοπλασματικών κυττάρων, τα κυτταρογενετικά δεδομένα δίνουν την εντύπωση μιας τεράστιας ετερογένειας. Πρακτικά, σε όλες τις νεοπλασίες όλα τα είδη των κυτταρογενετικών ανωμαλιών έχουν αναφερθεί και μόνο η συχνότητα και η κλινική τους επίδραση αλλάζει.

Η καλύτερη προσέγγιση της βιολογικής πραγματικότητας ενός όγκου μπορεί να επιτευχθεί αν οι κλωνικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες διαιρεθούν σε δύο κατηγορίες, τις πρωτογενείς και τις δευτερογενείς. Ως πρωτογενείς θεωρούνται⁷ εκείνες που συχνά βρίσκονται ως μοναδικές ανωμαλίες και συνδέονται με ένα συγκεκριμένο τύπο όγκου. Ο όρος πρωτογενείς δεν αφορά μόνο το γεγονός ότι οι ανωμαλίες αυτές θεωρούνται το πρώτο βήμα των γενετικών αλλαγών στη διαδικασία της καρκινικής εξαλλαγής αλλά επί πλέον θεωρείται ότι αντανακλούν ένα αιτιακό ρόλο στην ογκογένεση, δηλαδή είναι βασικές στην εγκαθίδρυση του καρκίνου. Δευτερογενείς, θεωρούνται οι ανωμαλίες που σπάνια ή ποτέ δεν βρίσκονται ως μοναδικές ανωμαλίες. Εμφανίζονται ως ένα επόμενο βήμα σε κύτταρα που ήδη φέρουν πρωτογενείς και πολλές φορές είναι πολυάριθμες ώστε κυριαρχούν σε έναν καρυότυπο. Αν και εμφανίζουν μία μικρότερη συσχέτιση από ότι οι πρωτογενείς με συγκεκριμένο είδος όγκου, εν τούτοις δεν παρουσιάζουν τυχαία χαρακτηριστικά και η κατανομή τους συνδέεται με τις πρωτογενείς ανωμαλίες και τους τύπους των όγκων. Θεωρείται ότι οι δευτερογενείς ανωμαλίες δεν «ευθύνονται» για την εκκίνηση του όγκου αλλά συνδέονται με περαιτέρω



βήματα της εξέλιξής του, δηλαδή με τη διαφοροποίηση των κυττάρων, την επιθετικότητα κλπ. Συνεπώς και αυτές οι ανωμαλίες έχουν ιδιαίτερη σημασία.

Επιπρόσθετα από τις πρωτογενείς και δευτερογενείς ανωμαλίες οι οποίες παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και εξέλιξη του καρκίνου και οι οποίες εξ' ορισμού θεωρούνται ως τέτοιες εφ' όσον είναι κλωνικές, στα νεοπλασματικά κύτταρα ανιχνεύεται ένας αριθμός μη κλωνικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Οι ανωμαλίες αυτές είναι πολυάριθμες και ιδιαίτερα στους συμπαγείς όγκους θεωρείται ότι είναι τυχαία γενετικά συμβάντα τα οποία δεν προσδίδουν κάποια προσαρμοστική ικανότητα στο κύτταρο ώστε να επικρατήσουν και να εμφανιστούν ως κλωνικές. Αυτές οι ανωμαλίες χαρακτηρίζονται ως κυτταρογενετικός θόρυβος.

Οι ανωμαλίες που παρατηρούνται σε έναν κυτταρικό πληθυσμό μίας νεοπλασίας εξαρτώνται από το ποιοι κλώνοι (υποπληθυσμοί που προέρχονται από το ίδιο κύτταρο πρόγονο) έχουν επικρατήσει τη στιγμή της λήψης των χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων. Η επικράτηση αυτή συμβαίνει κατά ένα Δαρβινικό τρόπο: δηλαδή από μία σειρά γενετικών ανωμαλιών αυτές που τελικά ανιχνεύονται είναι αυτές που υπό το κράτος επιλεκτικών πιέσεων προσδίδουν στα κύτταρα που τις διαθέτουν ικανότητες προσαρμογής και επιβίωσης.

Η παρουσία των κλωνικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών και οι μηχανισμοί που τις διέπουν σε σχέση με το καρκινικό φαινότυπο, υπήρξε αντικείμενο ιδιαίτερης θεωρητικής συζήτησης και πειραματικής αναζήτησης. Η προαναφερθείσα παρατήρηση ότι οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες που παρουσιάζονται σε συγκεκριμένη νεοπλασία εντοπίζονται επιλεκτικά σε συγκεκριμένες ζώνες σήμανσης οδήγησε στην υπόθεση ότι στις ζώνες αυτές βρίσκονται αλληλουχίες DNA σημαντικές για την νεοπλασματική εξαλλαγή. Η επιβεβαίωση της υπόθεσης ήρθε με σύγκριση των πρωτογενών χρωμοσωμικών ανακατατάξεων και γονιδίων (ογκογονιδίων, ογκοκατασταλτικών κ.ά.) που συνδέονται με τον καρκίνο^{25,26}. Διαπιστώθηκε έτσι ότι τα σημεία θραύσης των χρωμοσωμικών ανακατατάξεων αντανakλούν τη θέση γονιδίων τα οποία δρουν άμεσα ή έμμεσα στην ογκογένεση. Σχετικά πρόσφατα ένα ειδικό τεύχος του διεθνούς έγκριτου περιοδικού Nature Genetics δημοσίευσε έναν εκτεταμένο κατάλογο των κλωνικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών (από την παγκόσμια βάση δεδομένων «χρωμοσωμικών ανωμαλιών του καρκίνου» που βρίσκεται στο τμήμα Κλινικής Γενετικής του Πανεπιστημίου Lund στη Σουηδία) σε σχέση με τους

όγκους που απαντώνται²⁷. Αποτέλεσμα της εντυπωσιακής αυτής δημοσίευσης είναι η εκκίνηση ενός μεγάλου προγράμματος του Cancer Genome Anatomy Project (CGAP) που ξεκίνησε το National Cancer Institute των ΗΠΑ με διεθνή συνεργασία με σκοπό την ανίχνευση γονιδίων που συνδέονται με τον καρκίνο και υποδηλώνονται από τα σημεία θραύσης των χρωμοσωμικών ανακατατάξεων.

Οι βασικοί τρόποι με τους οποίους μία χρωμοσωμική ανωμαλία μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση γονιδίων που ενέχονται στην ογκογενετική διαδικασία περιγράφονται παρακάτω.

1. Ανασυνδυασμός χρωμοσωμικού υλικού (χωρίς πλεόνασμα ή απώλεια):

Περιλαμβάνει ανακατατάξεις εντός του ίδιου χρωμοσώματος, όπως αναστροφές, ή/και μεταξύ δύο ή περισσότερων χρωμοσωμάτων όπως μεταθέσεις και εισχωρήσεις (translocations, insertions). Οι ανασυνδυασμοί αυτοί δεν δημιουργούν ποσοτικές αλλά μόνο ποιοτικές αλλαγές σε επίπεδο αλληλουχιών DNA. Με αυτό τον τρόπο, το ανασυνδυασμένο DNA δημιουργεί, είτε νέα γενετικά προϊόντα κυρίως υβριδικά γονίδια με ογκογενετική δράση²⁸ (*BCR/ABL* στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία, *MYC/IGH* στο λέμφωμα Burkitt κ.ά), είτε ανασυνδυάζοντας τη θέση των γονιδίων, επιδρά στη ρύθμιση της έκφρασής τους (π.χ *BCL2* στο μη Hodgkin λέμφωμα)²⁹.

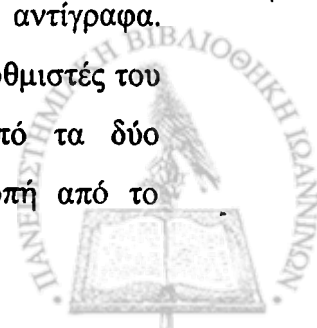
2. Έλλειμμα χρωμοσωμικού υλικού:

Μπορεί να δημιουργηθεί με απώλεια μέρους κάποιου χρωμοσώματος (deletions) ή και ολοκλήρου τού χρωμοσώματος (μονοσωμίες-monosomies) καθώς και με μη ισοζυγισμένες μεταθέσεις (unbalanced translocations).

Το συνηθισμένο παθογενετικό αποτέλεσμα τέτοιου είδους αλλαγών είναι αντίστοιχη απώλεια ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή γονιδίων επιδιορθωτών του DNA που υπάρχουν στη χρωμοσωμική περιοχή που χάνεται. Κλασσικό παράδειγμα η απώλεια του ογκοκατασταλτικού γονιδίου *RBI* από έλλειψη στη χρωμοσωμική θέση 13q14 στους ασθενείς με ρετινοβλάστωμα³⁰.

3. Πλεόνασμα χρωμοσωμικού υλικού:

Δημιουργείται με διπλασιασμό ή και πολλαπλασιασμό συγκεκριμένου χρωμοσωμικού τμήματος ή και ολοκλήρου χρωμοσώματος. Κατά αναλογία, τα γονίδια που ευρίσκονται σε αυτή την περιοχή εμφανίζουν πολλαπλά αντίγραφα. Με αυτό τον τρόπο ογκογονίδια (*ERBB2*, *MYC*) καθώς και γονίδια ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου (*CCND1*) εμφανίζονται σε περισσότερα από τα δύο αλληλόμορφα αντίτυπα (μεγαλύτερη δόση) με αποτέλεσμα εκτροπή από το



φυσιολογικό τους ρόλο και έναρξη ογκογονετικής δραστηριότητας. Το φαινόμενο της παρουσίας πολλαπλών αντιγράφων συγκεκριμένων γενετικών θέσεων ονομάζεται γονιδιακή επέκταση (gene amplification). Η αντίστοιχη αλλαγή στο χρωμοσωμικό επίπεδο γίνεται ορατή σαν ομογενώς χρωσμένη περιοχή (hsr) ή σαν διπλοί χρωμοσωμικοί κόκκοι (double minutes).

Η ανίχνευση των περιγραφόμενων παραπάνω χρωμοσωμικών ανωμαλιών με την ιδιαίτερη βαρύτητα της βιολογικής τους σημασίας μπορεί να επιτευχθεί με μεγάλο φάσμα τεχνικών της κλασσικής κυτταρογενετικής και της Μοριακής Κυτταρογενετικής. Καμία από αυτές τις τεχνικές δεν αποτελεί από μόνη της πανάκεια αλλά παρουσιάζει σε σχέση με τις άλλες πλεονεκτήματα, μειονεκτήματα και όρια που συζητούνται στο επόμενο κεφάλαιο (σελίδες 28,29). Επομένως η επιλογή της κατάλληλης μεθοδολογίας και τεχνικής ή ο συνδυασμός τους συναρτάται κάθε φορά από το συγκεκριμένο επιστημονικό ερώτημα που καλείται να απαντηθεί³¹.



Πίνακας 1.4 Συνήθειες γενετικές αλλαγές που χαρακτηρίζουν διάφορες νεοπλασίες

Είδος Νεοπλασίας	Χρωμοσωμική Ανακατάταξη/Θέση	Εμπλεκόμενα Γονίδια	Αναφορές
Χρόνια Μυελογενής Λευχαιμία (CML)	t(9;22)(q34;q11)	<i>ABL, BCR</i>	(Rowley ¹¹ , 1973; Prakash & Yunis ¹² , 1984; Daley & Ben-Neriah ¹³ , 1991; Kurzrock & Talpaz ¹⁴ , 1991)
Οξεία Μυελογενής Λευχαιμία (AML)	t(8;21)(q22;q22) M2 t(15;17)(q22;q11-21) M3 inv(16)(p13p22) M4	<i>ETO, AML1</i> <i>PML, RARA</i> <i>MYH11, CBFβ</i>	(Rowley ¹⁵ , 1973; Nucifora et al ¹⁶ , 1993) (Rowley et al ¹⁷ , 1977; Grignani et al ¹⁸ , 1994) (le Beau et al ¹⁹ , 1983; Claxton et al ²⁰ , 1996)
Λέμφωμα Burkitt	t(8;14)(q24;q32)	<i>MYC, IGH</i>	(Zech et al, 1976; Zhang et al, 1982; Potter, 1992; Croce, 1993)
Λέμφωμα non-Hodgkin non-Burkitt	t(14;18)(q32;q21)	<i>IGH, BCL2</i>	(Fukuhara et al ²⁴ , 1979; Yunis et al ²⁵ , 1984; Hochenbery et al ²⁶ , 1990)
Σάρκωμα Ewing	t(11;22)(q24;q12)	<i>FLI1, EWS</i>	(Aurias et al ²⁶ , 1983; Turc-Carel et al ²⁷ , 1983; May et al ²⁸ , 1993)
Κυψελιδικό Ραβδομυοσάρκωμα	t(2;13)(q35;q14)	<i>PAX3, FKHR</i>	(Seidal et al ²⁹ , 1982; Barr et al ³⁰ , 1993)
Μυξοειδές Λιποσάρκωμα	t(12;16)(q13;p11)	<i>CHOP, FUS</i>	(Turc-Carel et al ³¹ , 1986; Aman et al ³² , 1992; Rabbits et al ³³ , 1993)
Συνοβιοσάρκωμα	t(X;18)(p11;q11)	<i>SYT, SSX</i>	(Limon et al ³⁴ , 1986; Clark et al ³⁵ , 1994)
Κληρονομούμενη αδеноματώδης πολυποδίαση	del(5)(q21)	<i>APC</i>	(Grodin et al ³⁶ , 1991; Nishisho et al ³⁷ , 1991)
Καρκίνωμα παχέος Εντέρου	del(17)(p13) del(18)(q21)	<i>K-RAS</i> <i>DCC</i>	(Fearon ³⁸ , 1994) (Hedrick et al ³⁹ , 1994)



2.1 Επιδημιολογία

Οι καλοήθεις και κακοήθεις παθήσεις του μαστού είναι μία μεγάλη και ετερογενής ομάδα παθήσεων που αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο μέρος της παθολογίας του μαστού⁶⁰.

Οι φλεγμονώδεις παθήσεις του μαζικού αδένος προκαλούνται κυρίως από την επίδραση μικροοργανισμών στο μαστό.

Η κυστική νόσος εμφανίζεται με συχνότητα περίπου 50% κλινικά και 90% ιστολογικά στο μαστό⁶¹. Είναι νόσος της παραγωγικής ηλικίας της γυναίκας και σπάνια αναπτύσσεται πριν την ήβη ή μετά την εμμηνόπαυση αν και η κλινική εικόνα μπορεί να υπάρχει και σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας⁶².

Η σχέση της κυστικής νόσου και ειδικότερα της άτυπης και τυπικής υπερπλασίας με τον καρκίνο του μαστού θα εξεταστεί στο επόμενο υποκεφάλαιο.

Από τα καλοήθη νεοπλάσματα του μαστού (ινοαδενώματα, θηλώματα, καλοήθη φυλλοειδή και αδενώματα) το συχνότερο είναι το ινοαδένωμα και απαντάται κυρίως σε γυναίκες ηλικίας 15-30 ετών.

Εκτιμάται ότι η παρουσία ινοαδενώματος αποτελεί παράγοντα κινδύνου για περαιτέρω ανάπτυξη καρκίνου του μαστού (2-3 φορές αυξημένη πιθανότητα)⁶³ παρόλο που προγενέστερες μελέτες μιλούν για πολύ μικρότερη πιθανότητα⁶⁴.

Τα θηλώματα (μονήρη ή πολλαπλά) απαντώνται με συχνότητα που δεν ξεπερνά το 10% των συνολικών καλοήθων νεοπλασμάτων. Γυναίκες που φέρουν θηλώματα έχουν ελαφρά αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης διηθητικού καρκινώματος του μαστού ιδιαίτερα αν το θήλωμα συνοδεύεται από άτυπη υπερπλασία. Αντίθετα, τα πολλαπλά θηλώματα είναι σπανιότερα αλλά συνδέονται με μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης κακοήθειας σε σχέση με τα μονήρη⁶⁵.

Οι φυλλοειδείς όγκοι είναι σχετικά σπάνιοι και παρουσιάζονται κυρίως σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας. Οι καλοήθεις φυλλοειδείς εμφανίζονται συνήθως σε νεαρότερες γυναίκες ενώ οι κακοήθεις σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας⁶⁶ (Petrek 1996).



Ο καρκίνος του μαστού είναι μία από τις συνηθέστερες αιτίες θανάτου της γυναίκας. Ιδιαίτερα στις αναπτυγμένες χώρες το ποσοστό των νέων κυρίως γυναικών που πάσχουν από καρκίνο του μαστού αυξάνεται ανησυχητικά τις τελευταίες δεκαετίες. Η πιθανότητα να νοσήσει μία γυναίκα από καρκίνο του μαστού εξαρτάται από διάφορους παράγοντες κινδύνου οι σημαντικότεροι από τους οποίους είναι⁶⁷:

-Ηλικία: Ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου αυξάνεται σημαντικά στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση.

-Ηλικία πρώτης έμμηνης ρύσης: Αυξημένος κίνδυνος στις γυναίκες που είχαν πρόωρη έμμηνο ρύση.

-Ηλικία εμμηνόπαυσης: Ο κίνδυνος μεγαλώνει με την καθυστέρηση της εμμηνόπαυσης.

-Υπαρξη παιδιών και ηλικία πρώτης εγκυμοσύνης: Οι εγκυμοσύνες και ιδιαίτερα σε μικρές ηλικίες (πριν τα 30 χρόνια) μειώνουν την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού.

-Ιστορικό κυστικής νόσου στο μαστό ή κάποιας κακοήθειας στις ωοθήκες ή/και το ενδομήτριο αυξάνουν σημαντικά την πιθανότητα εμφάνισης της νόσου και στο μαστό. Ιδιαίτερα για τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε γυναίκες με προηγούμενη εμφάνιση κυστικής νόσου θα μιλήσουμε αναλυτικότερα στο επόμενο κεφάλαιο.

-Ιστορικό οικογενειακού καρκίνου του μαστού σε προεμμηνοπαυσιακές συγγενείς πρώτου βαθμού: Η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού μεγαλώνει σε γυναίκες με βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό. Στοιχεία για τον κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού δίνονται παρακάτω.

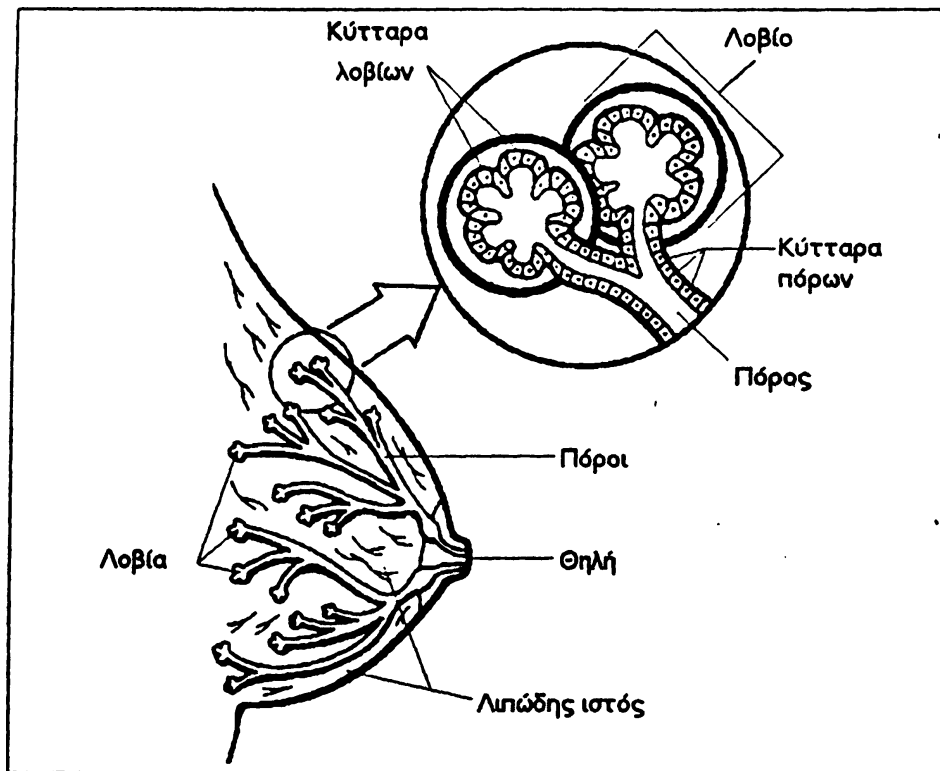
Δεν πρέπει επίσης να αγνοούνται ψυχολογικοί παράγοντες (όπως θάνατος, διαζύγιο, αλλαγές στο τρόπο ζωής, συναισθηματικά και οικογενειακά προβλήματα) που μπορούν να δράσουν επιβαρυντικά⁶⁸.

Στη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού παρατηρείται σημαντική γεωγραφική ετερογένεια. Οι Η.Π.Α παρουσιάζουν τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης (9%), ακολουθεί ο Καναδάς (7%), η Ευρώπη με ποσοστά που κυμαίνονται από 6.8% έως 4% σε Ιταλία και Ρωσία αντίστοιχα, ενώ τις τελευταίες θέσεις καταλαμβάνουν οι ασιατικές χώρες όπως Ιαπωνία (2.7%), Ινδία (2.4%) και Κίνα (2.1%)⁶⁹.



2.2 Ιστοπαθολογία

Ο μαστός (εικόνα 2.1) είναι σύνθετος σωληνοκυψελοειδής αδένας που σχηματίζεται από την αρχέγονη μαστική ακρολοφία. Στη γυναίκα αναπαραγωγικής ηλικίας αποτελείται από 15-20 λοβούς (αδένες παραγωγής γάλακτος) που διατάσσονται ακτινοειδώς γύρω από τη θηλή. Στους λοβούς αντιστοιχούν οι εκφορητικοί (γαλακτοφόροι) πόροι που καταλήγουν στη θηλή. Μεταξύ των λοβών και των πόρων που αποτελούνται από επιθηλιακά κύτταρα υπάρχει συνδετικός ιστός, αιμοφόρα αγγεία και λεμφαγγεία.



Εικόνα 2.1 : Σχηματική αναπαράσταση μαστού.

- **Κακοήθη νεοπλάσματα του μαστού**

Τα κακοήθη νεοπλάσματα του μαστού κατατάσσονται ανάλογα με την ιστολογική τους προέλευση σε επιθηλιακά ή καρκινώματα, σε διφασικά ή ινοεπιθηλιακά και σε μεσεγγυματικά ή σαρκώματα.

Τα καρκινώματα είναι τα πιο συχνά κακοήθη νεοπλάσματα σε σχέση με τις άλλες δύο κατηγορίες. Ανάλογα με το βαθμό της ιστολογικής κακοήθειας χωρίζονται σε μη διηθητικά ή in-situ που δεν έχουν αποκτήσει τη δυνατότητα μετάστασης και σε διηθητικά όπου τα νεοπλασματικά κύτταρα έχουν ήδη διασπάσει τη βασική μεμβράνη και διαθέτουν πλέον τη δυνητική ικανότητα να μεθίστανται. Τα άτομα με in situ καρκίνωμα έχουν αυξημένο κίνδυνο (8-10 φορές περισσότερο από το μέσο όρο) ανάπτυξης και διηθητικού καρκινώματος^{70,71}. Επίσης είναι συνηθισμένο φαινόμενο η ανάπτυξη διηθητικού καρκινώματος του μαστού στην ίδια ακριβώς θέση όπου παλαιότερα είχε διαγνωστεί, με ιστολογική εξέταση, καρκίνωμα in situ⁷².

Σε σχέση με το σημείο που εκδηλώνεται η κακοήθεια στο μαζικό αδένα τα καρκινώματα χωρίζονται σε πορογενή, λοβιακά και μικτά. Τα καρκινώματα που ιστολογικά ανήκουν σε αυτές τις τρεις κατηγορίες αποτελούν περίπου το 90% των κακοήθων όγκων του μαστού⁷³.

Τα πορογενή καρκινώματα που απαντώνται συχνότερα από τα λοβιακά και τα μικτά χωρίζονται σε μη ειδικού τύπου και σε ειδικού τύπου (σωληνώδες, βλεννώδες, μυελοειδές, θηλώδες και αδenoειδές κυστικό). Τα ειδικού τύπου πορογενή καρκινώματα συνδέονται με καλύτερη πρόγνωση^{74,75} σε σχέση με τα μη ειδικού τύπου αλλά αποτελούν μόνο το 6% των κακοήθων όγκων του μαστού⁷⁶. Ιδιαίτερα συνηθισμένο φαινόμενο σε καρκίνωμα του μαστού είναι να συνυπάρχουν διαφορετικά αρχιτεκτονικά πρότυπα ανάπτυξης εντός του ίδιου όγκου.

Όπως προαναφέρθηκε εκτός από τα καρκινώματα αναπτύσσονται σπανιότερα στο μαστό και άλλα κακοήθη νεοπλάσματα μεσεγγυματογενούς προέλευσης (σαρκώματα) καθώς και διφασικοί όγκοι (μεσεγγυματογενούς και επιθηλιακής προέλευσης) με κυριότερο αντιπρόσωπο τους κακοήθεις φυλλοειδείς.

Σήμερα οι γενικά παραδεκτοί και πιο διαδεδομένοι δείκτες που χρησιμοποιούνται στην πρόγνωση και θεραπεία της κακοήθειας είναι:



A. Κλασσικά παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά όπως:

- α) παθολογοανατομική σταδιοποίηση (μέγεθος όγκου, λεμφαδενικές μεταστάσεις)
- β) ιστολογικός τύπος
- γ) ιστολογικός βαθμός κακοήθειας.

B. Ορμονικοί υποδοχείς (οιστρογονικοί και προγεστερονικοί).

Γ. Έκφραση ογκοπρωτεϊνών (p53, erbB2).

Δ. Δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Ki 67)^{77,78}.

- **Καλοήθεις παθήσεις του μαστού**

Μπορούν αδρά να χωριστούν στη κυστική νόσο, στα καλοήθη νεοπλάσματα και στις φλεγμονώδεις παθήσεις⁶⁰.

Ο όρος κυστική νόσος (ΚΝ) περιλαμβάνει μία ετερογενή ομάδα παθήσεων που προέρχονται κυρίως από αλλοιώσεις του επιθηλιακού στοιχείου του μαστικού αδένου και τη δημιουργία κύστεων από ινώδη συνδετικό ιστό⁷⁹.

Η κυστική νόσος εκφράζεται κυρίως με τρεις μορφές μαστοπάθειας: κυστική μαστοπάθεια (υπεροχή των κυστικών αλλοιώσεων με ή χωρίς επιθηλιακή υπερπλασία), σκληρυντική μαστοπάθεια (μικροσκοπικές κυστικές αλλοιώσεις και πυκνός ινώδης συνδετικός ιστός) και ινοκυστική μαστοπάθεια (μικτή μορφή των δύο προηγούμενων που εμφανίζεται σε μεγαλύτερη συχνότητα)⁸⁰.

Η κυστική νόσος εκτός από τις κύστες, χαρακτηρίζεται από:

Αδένωση (επιθηλιακή υπερπλασία λοβιακής προέλευσης) που κυριότερες κατηγορίες της είναι απλή, σκληρυντική, ψευδοδιηθητική και ογκόμορφη.

Αποκρινική μετάπλαση όπου το φυσιολογικό κυβικό επιθήλιο μεταπλάσσεται.

Υπερπλασία πόρων και λοβίων (χωρίς κάποιο άλλο χαρακτηριστικό) όπου παρατηρείται αντίστοιχη αύξηση του αριθμού των επιθηλιακών κυττάρων που τα αποτελούν (εικόνα 2.2, σελίδα 37).

Σχέση κυστικής νόσου και καρκίνου του μαστού :

Η υπερπλασία των επιθηλιακών κυττάρων που εμφανίζεται στη ΚΝ δύναται να εξελιχθεί στο μαστό και από τυπική να καταλήξει άτυπη. Στο τέλος αυτής της πορείας είναι δυνατόν να ξεκινήσει η εξαλλαγή του επιθηλίου που καταλήγει σε προδιηθητικό καρκίνωμα, πορογενές ή λοβιακό⁸¹. Επίσης συχνό φαινόμενο σε ιστολογικές εξετάσεις παρασκευασμάτων για καρκίνο είναι η συνύπαρξη περιοχών με όλες οι εναλλαγές από την καλοήθη υπερπλασία μέχρι το καρκίνωμα. Τα παραπάνω ευρήματα δημιούργησαν την ανάγκη ενός

διαφορετικού τρόπου ταξινόμησης της κυστικής νόσου ανάλογα με το σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Η ταξινόμηση αυτή προτάθηκε από την Επιτροπή Καρκίνου του Αμερικανικού Κολλεγίου Παθολογοανατόμων⁸² και μετά από πιο πρόσφατες βελτιώσεις⁸³ παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα. 2.2.

Πίνακας 2.2. Κυστική νόσος και ενδεχόμενος κίνδυνος ανάπτυξης διηθητικού καρκινώματος.

ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	ΣΧΕΤΙΚΟΣ ΚΙΝΔΥΝΟΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥ
Καλοήθεις παθήσεις χωρίς υπερπλασία: Κύστες (μακρο-μικροσκοπικές) Διάταση πόρου (ποροεκτασία) Μικρού βαθμού σκληρυντική αδένωση Μικρού βαθμού επιθηλιακή υπερπλασία Ίνωση Μαστίτιδα Αποκρινική μετάπλαση	Μη αυξημένος κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου
Καλοήθεις παθήσεις με υπερπλασία Μέτρια υπερπλασία Θηλωμάτωση Επιθλιώση Σκληρυντική αδένωση	Ελαφρά αυξημένος κίνδυνος, κατά 1-2 φορές, Σε σχέση με το γενικό πληθυσμό
Καλοήθεις παθήσεις με άτυπη υπερπλασία Άτυπη υπερπλασία των πόρων Άτυπη υπερπλασία των λοβών	Αρκετά αυξημένος κίνδυνος, κατά 4-5 φορές, Σε σχέση με το γενικό πληθυσμό

Αξίζει να σημειωθεί ότι έρευνες στον ελληνικό πληθυσμό κατέληξαν σε παρόμοια συμπεράσματα⁸⁴ με αυτά των αμερικανών επιστημόνων.

Το ινοαδένωμα (εικόνα 2.2, σελίδα 37) είναι η πιο συχνή μορφή καλοήθους ινοεπιθηλιακού (διφασικού) όγκου. Είναι όγκος μονήρης, κινητός, λευκωπός και περιβάλλεται από κάψα. Συνήθως δεν υπερβαίνει τα 3 εκ. ενώ συχνά παρατηρούνται πολλαπλά ινοαδενώματα στην ίδια ασθενή που εντοπίζονται στον ίδιο μαστό ή αμφοτερόπλευρα σε ποσοστό 10-20% και 3% αντίστοιχα⁸⁵. Σε άτομα νεαρής ηλικίας εμφανίζονται συχνά ινοαδενώματα με υπερπλασία του επιθηλιακού και στρωματικού στοιχείου (νεανικά ινοαδενώματα).



Εκτός από τα ινοαδενώματα και οι καλοήθεις φυλλοειδείς είναι ινοεπιθηλιακοί όγκοι που χαρακτηρίζονται από στρωματική κυτταροβρίθεια και φυλλοειδή διαμόρφωση με ή χωρίς υπερπλασία του επιθηλιακού στοιχείου. Η ταξινόμησή τους σε καλοήθεις, οριακής κακοήθειας και κακοήθεις είναι εξαιρετικά δύσκολη με ιστολογικά κριτήρια⁸⁶.

Τα αδενώματα (σωληνώδες, αποκρινές, πορογενές, της γαλουχίας, πλειόμορφο) είναι σπάνιοι καλοήθεις επιθηλιακοί όγκοι του μαστικού με μέγεθος 1-4 εκ. Εμφανίζονται συνήθως σε νεαρής ηλικίας άτομα.

Τα θηλώματα (μονήρη και πολλαπλά) είναι καλοήθη νεοπλάσματα του μαστού. Τα πολλαπλά θηλώματα παρουσιάζονται αμφοτερόπλευρα σε 25% των περιπτώσεων.

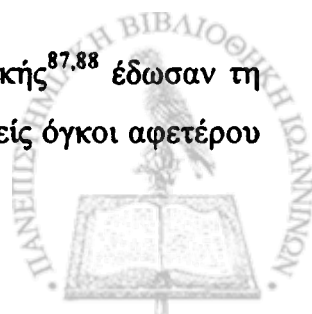
Τα μυοεπιθηλιακά νεοπλάσματα (αδενοεπιθηλίωμα, μυοεπιθηλίωμα) είναι καλοήθεις όγκοι του μαστού που αποτελούνται από μυοεπιθηλιακά κύτταρα.

Οι φλεγμονώδεις παθήσεις του μαστού ή αλλιώς μαστίτιδες είναι φλεγμονές που προκαλούνται κυρίως από επίδραση μικροοργανισμών στο μαστικό αδένα και συνυπάρχουν αρκετά συχνά με την κυστική νόσο. Διακρίνονται σε ειδικές (φυματίωση, σύφιλη, εχίνοκοκκίαση, φιλαρίαση κλπ) και σε μη ειδικές (χρόνια μαστίτιδα της γαλουχίας ή μη, ιδιοπαθής κοκκιωματώδης μαστίτιδα, ποροεκτασία, υποθηλαίο σύστημα, συρίγγιο, έκζεμα θηλής κλπ)⁶⁰.

2.3 Κυτταρογενετική του καρκίνου του μαστού

Από το 1980 οπότε τέθηκαν σε ευρεία εφαρμογή οι διάφορες τεχνικές σήμανσης των χρωμοσωμάτων (banding) έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία τουλάχιστον 500 περιπτώσεις καρκινωμάτων του μαστού με εμφανείς κυτταρογενετικές ανωμαλίες. Ο αριθμός αυτός είναι όχι μόνο μικρός – όπως άλλωστε και γενικότερα το σύνολο των μελετηθέντων συμπαγών όγκων – σε σχέση με τις αιματολογικές κακοήθειες και τα λεμφώματα που έχουν αναλυθεί κυτταρογενετικά²² αλλά και σε αρκετές περιπτώσεις δεν δίνει σημαντικές πληροφορίες για τον καρυότυπο του όγκου αφού σε πολλά από τα περιστατικά αυτά όταν έγινε η κυτταρογενετική ανάλυση, δεν ήταν δυνατή η αναγνώριση των χρωμοσωμάτων.

Την τελευταία δεκαετία περαιτέρω βελτιώσεις της τεχνικής^{87,88} έδωσαν τη δυνατότητα αφενός να καλλιεργηθούν περισσότεροι πρωτογενείς όγκοι αφετέρου



διευκόλυναν τη λήψη λιγότερο σύνθετων καρυοτύπων. Πάντως τα αποτελέσματα αποκλίνουν ανάλογα με τη μεθοδολογία που θα χρησιμοποιηθεί³¹. Για παράδειγμα η άμεση απομόνωση χρωμοσωμάτων, χωρίς να έχει προηγηθεί κυτταροκαλλιέργεια, παρόλο που πολλές φορές αποτυγχάνει να δώσει ουσιαστική πληροφόρηση λόγω της πολυπλοκότητας των ανωμαλιών επιτρέπει λήψη μεγάλου ποσοστού ανώμαλων καρυοτύπων^{89,90}. Από την άλλη πλευρά, οι καλλιέργειες μικρής διάρκειας επιτρέπουν τη λήψη καλύτερης ποιότητας χρωμοσωμάτων με απλές χρωμοσωμικές ανακατατάξεις σε ποσοστό ως και 80% των εξεταζόμενων δειγμάτων. Πολλές από αυτές τις ανακατατάξεις εμφανίζονται συχνά και ως μοναδικές ανωμαλίες σε συγκεκριμένο όγκο^{87,91}.

Από τα μέχρι σήμερα αναλυθέντα περιστατικά είναι εμφανές ότι οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες που εμφανίζονται στον καρκίνο του μαστού δεν είναι τυχαίες. Οι κυριότερες από αυτές αναφέρονται παρακάτω:

1) Δομικές:

α) $\text{del}(3)(\text{p}12\sim\text{p}14\sim\text{p}21)$. Οι ελλείψεις εντός του μικρού σκέλους του χρωμοσώματος 3 είναι μία από τις συνηθέστερες ανωμαλίες (συχνότητα ~13%). Αναφέρεται συνήθως ως μοναδική χρωμοσωμική ανωμαλία στο μεγαλύτερο ποσοστό των αναλυθέντων περιστατικών⁹¹⁻⁹⁵.

β) $\text{der}(1;16)(\text{q}10;\text{p}10)$ και $\text{i}(1)(\text{q}10)$. Οι ανακατατάξεις αυτές έχουν ανιχνευτεί σε ποσοστά 12% και 10% αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα και των δύο παραπάνω ανωμαλιών είναι προσθήκη ενός ακόμη μακρού σκέλους του χρωμοσώματος 1 (1q)⁹⁶.

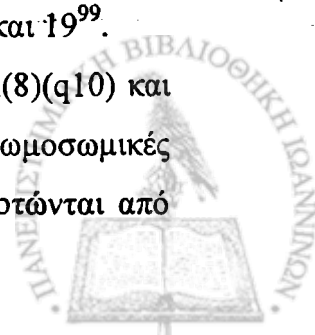
γ) $\text{del}(1)(\text{q}11\sim\text{q}12)$, $\text{del}(1)(\text{q}42)$, $\text{del}(6)(\text{q}21\sim\text{q}23)$, $\text{del}(7)(\text{q}31\sim\text{q}32)$. Αυτές οι ελλείψεις αυτές εμφανίζονται με συχνότητα 2-5%.

2) Αριθμητικές:

α) Οι πιο συχνά (7-17%) εμφανιζόμενες τρισωμίες είναι: +7, +8, +12, +18 και +20 με πιο συχνές ως μοναδικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες το +18 και +7 (52% και 47% αντίστοιχα). Ειδικότερα για την τρισωμία 8 ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι χαρακτηρίζει μία υποκατηγορία του πορογενούς καρκινώματος^{97,98}.

β) Οι πιο συνηθισμένες μονοσωμίες είναι των χρωμοσωμάτων X, 18 και 19⁹⁹.

Οι πιο συχνές δευτερογενείς ανωμαλίες είναι οι $\text{del}(3)(\text{p}13)$, $\text{i}(8)(\text{q}10)$ και $\text{del}(11)(\text{q}23)$ ¹⁰⁰. Αν και δεν έχει ακόμη πλήρως αποδειχτεί ότι οι χρωμοσωμικές ανακατατάξεις που συναντώνται στις δευτερογενείς ανωμαλίες εξαρτώνται από



αυτές που έχουν βρεθεί στις πρωτογενείς του ίδιου όγκου, φαίνεται ότι κάτι τέτοιο ισχύει σύμφωνα με τα πρώτα βιβλιογραφικά στοιχεία¹⁰¹.

Από τις μέχρι σήμερα παρατηρηθείσες ανωμαλίες στο μαστό φαίνεται ότι η πολυκλωνικότητα δηλαδή η ύπαρξη διαφορετικών, μη σχετιζόμενων κυτταρογενετικά κλώνων, είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα για το συγκεκριμένο είδος όγκου⁹¹. Η πολυκλωνικότητα φαίνεται να αυξάνει ανάλογα με το βαθμό ιστολογικής κακοήθειας του όγκου (grade)¹⁰². Μελέτες αναφέρουν ύπαρξη πολυκλωνικότητας μέχρι και στο 70% των αναλυθέντων περιστατικών¹⁰³. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να ερμηνευτεί είτε ως αποτέλεσμα μιας γενετικής αλλαγής μη ορατής στο χρωμοσωμικό επίπεδο που δίνει δευτερογενώς διαφορετικές κυτταρογενετικές ανωμαλίες, ή πιθανότερα, οι μη σχετιζόμενοι κυτταρογενετικά κλώνοι είναι και πραγματικά άσχετοι μεταξύ τους και έχουν προέλθει από διαφορετικά προγονικά κύτταρα. Οι χρωμοσωμικές ανακατατάξεις που παρατηρούνται στους διάφορους κλώνους των πολυκλωνικών καρκινωμάτων δεν διαφέρουν από αυτές που έχουν βρεθεί και σαν μοναδικές ανωμαλίες σε άλλα καρκινώματα του μαστού¹⁰⁴.

Η βιολογική σημασία της κυτταρογενετικής πολυκλωνικότητας δεν έχει πλήρως διελευκανθεί, όμως μελέτες σε αμφοτερόπλευρα και πολυεστιακά καρκινώματα^{93,105,106} καθώς και συσχετισμοί κυτταρογενετικών και κλινικών δεδομένων¹⁰² θέτουν το ερώτημα μήπως οι μη σχετιζόμενοι κυτταρογενετικά κλώνοι ενός συγκεκριμένου όγκου δρουν συνεργιστικά και προσδίδουν στα κύτταρά του διαφορετικά χαρακτηριστικά όπως π.χ δυνατότητα να εξαπλώνεται τοπικά, να μεθίσταται σε άλλους ιστούς, μη ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία κ.ά.

Παρόλο ότι οι προαναφερθείσες χρωμοσωμικές ανακατατάξεις αναμφισβήτητα δεν είναι τυχαίες, δεν έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα χαρακτηριστικές ανωμαλίες που να συνδέονται αποκλειστικά με το καρκίνο του μαστού ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαγνωστικά. Όμως η κλινική χρησιμότητα των κυτταρογενετικών δεδομένων έγκειται, όπως έχει ήδη αρχίσει να διαφαίνεται, στην προγνωστική τους εφαρμογή. Διαφορετικά πρότυπα (τύποι) ανωμαλιών χαρακτηρίζουν τα μεταστατικά και τα μη μεταστατικά καρκινώματα του μαστού. Συγκεκριμένα η απώλεια της περιοχής 6q10~21 και του 16q είναι σημαντικά συχνότερη στα μεταστατικά καρκινώματα ενώ η απώλεια του χρωμοσώματος 18 είναι συχνότερη στα μη μεταστατικά⁹⁵. Επιπρόσθετα

καρκινώματα που θεωρούνται κακής πρόγνωσης με βάση τα συνήθη κριτήρια (νεαρή ηλικία ασθενούς, χαμηλή διαφοροποίηση νεοπλασματικών κυττάρων, μεταστατική μορφή της ασθένειας, απώλεια ορμονικών υποδοχέων) παρουσιάζουν συχνότερα ομογενώς χρωσμένες περιοχές (HSR) στον καρυότυπό τους¹⁰⁷. Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι οι ασθενείς με πολύπλοκο καρυότυπο παρουσίασαν χαμηλότερα ποσοστά επιβίωσης στους 36 μήνες συγκρινόμενοι με αυτούς που είχαν απλές αλλαγές ή/και ομαλό καρυότυπο. Τέλος σημειώνεται ότι η ανίχνευση του χρωμοσώματος der(1;16) στα καρκινώματα του μαστού με τη μέθοδο του in-situ φθορισμικού υβριδισμού FISH συσχετίζεται με καλά ποσοστά επιβίωσης¹⁰⁰.

2.4 Μοριακή Κυτταρογενετική του καρκίνου του μαστού

Η σύζευξη της Κυτταρογενετικής με την Μοριακή Γενετική οδήγησε στην καλούμενη «Μοριακή Κυτταρογενετική», η οποία ως νέα συνθετική μεθοδολογία, είτε επιβεβαίωσε πληροφορίες των προηγούμενων επιπέδων ανάλυσης (μοριακού και κυτταρογενετικού), είτε, το σημαντικότερο, προσέθεσε νέα αξιοσημείωτα δεδομένα.

Τα δεδομένα της Μοριακής Κυτταρογενετικής μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις αδρές κατηγορίες ανάλογα με τη μεθοδολογική προσέγγιση που ακολουθείται.

Η συνήθης φθορίζουσα υβριδοποίηση, Fluorescence In-Situ Hybridization ή FISH «επιλεγμένων στόχων» με τη χρήση ενός ή περισσότερων (πάντως λίγων) ανιχνευτών (probes) απαντά σε προεπιλεγμένα ερωτήματα με ναι ή όχι, για την ύπαρξη συγκεκριμένων κάθε φορά αριθμητικών ή δομικών ανωμαλιών. Με αυτή τη μεθοδολογική προσέγγιση μπορούμε να προσδιορίσουμε ακριβέστερα το γενετικό υλικό των κυττάρων που βρίσκονται στην μεσόφαση ενώ η κλασσική Κυτταρογενετική προϋποθέτει την ύπαρξη μεταφάσεων.

Η συγκριτική γενομική υβριδοποίηση (Comparative Genomic Hybridization: CGH) μας δίνει τη συνολική εικόνα των μη ισοζυγισμένων γενετικών ανακατατάξεων (πλεόνασμα ή έλλειμμα γενετικού υλικού) που υπάρχουν σε όλα τα χρωμοσώματα στην in-vivo κατάσταση.

Η πολυχρωματική φθορίζουσα υβριδοποίηση (Multi-color FISH:M-FISH) χρησιμοποιώντας διαφορετικά χρώματα ή ψευδοχρώματα (όσα και τα



χρωμοσώματα) επιτρέπει τον προσδιορισμό πολύπλοκων ανακατατάξεων ακόμη και ισοζυγισμένων όμως μειονεκτεί σε σχέση με το CGH γιατί προϋποθέτει καλλιέργεια και μιτωτική δραστηριότητα των κυττάρων (in-vitro προσέγγιση) η οποία δεν είναι πάντοτε εφικτή.

Αξιόλογες πληροφορίες από το απλό FISH έχουν δοθεί κυρίως για το εύρος του πληθυσμού των κυττάρων που φέρουν συγκεκριμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Ένα ακόμη σημαντικό εύρημα αυτής της τεχνικής είναι ο εντοπισμός της γονιδιακής επέκτασης (gene amplification) στα γονίδια που διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση και την προώθηση του καρκίνου όπως το *ERBB2*, *MYC*, *CCND1*.

Ένα από τα σημαντικότερα ζητήματα τα οποία οι μοριακές κυτταρογενετικές τεχνικές διελεύκαναν καλύτερα είναι οι HSRs που με τις κλασσικές σημάνσεις της κυτταρογενετικής (G-, R-, Q-banding) εμφανίζονται ομογενώς χρωσμένες (χωρίς ταινίες). Πριν τη χρησιμοποίηση του FISH είχε ήδη υπάρξει η υπόθεση ότι αντιπροσωπεύουν την κυτταρογενετική εμφάνιση της γονιδιακής επέκτασης αλλά δεν υπήρχε σαφής απόδειξη. Όμως ο Saint-Ruf¹⁰⁸ απέδειξε ότι οι HSR περιέχουν γονίδια με γονιδιακή επέκταση (amplified genes) και αργότερα αποκαλύφθηκαν τα πρώτα στοιχεία του μηχανισμού δημιουργίας των. Συγκεκριμένα, οι HSRs προέρχονται από περίπλοκους συνδυασμούς διπλασιασμών και μεταθέσεων ορισμένων γονιδίων. Η πιο συνηθισμένη περιοχή HSR ανήκει στο 8p¹⁰⁹ και ακολουθούν οι περιοχές εντός των χρωμοσωμάτων 11, 17 και 19^{110,111}. Οι αλληλουχίες με HSR του 8p δεν παραμένουν συνήθως εντός του χρωμοσώματος 8 αλλά μετακινούνται σε άλλες χρωμοσωμικές θέσεις ενώ αντίθετα αλληλουχίες HSR που δημιουργούνται στα χρωμοσώματα 11 και 17 συνήθως παραμένουν εντός αυτών των χρωμοσωμάτων.

Η CGH προσέγγιση αφενός μεν συνέβαλλε στην περαιτέρω πιστοποίηση γενετικών ανακατατάξεων που είχαν ανιχνευθεί με τη Κυτταρογενετική, αφετέρου δε προσέθεσε νέα δεδομένα. Ένα από τα σημαντικότερα ευρήματα αυτής της προσέγγισης ήταν ο εντοπισμός στο καρκίνο του μαστού νέων γονιδιακών περιοχών που παρουσιάζουν γονιδιακή επέκταση (amplification) αλλά δεν είχαν εντοπισθεί με τις κυτταρογενετικές προσεγγίσεις. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι στη περιοχή 20q13¹¹² συμβαίνει γονιδιακή επέκταση σε πολλά καρκινώματα του μαστού καθώς και ότι οι συχνότερες “amplified” περιοχές στον καρκίνο του μαστού τοποθετούνται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 8. Σε

αυτή τη περιοχή του 8q μεταξύ άλλων γονιδίων τα οποία δεν γνωρίζουμε ακόμη, βρίσκεται και το γονίδιο *MYC* που έχει ήδη βρεθεί να εμπλέκεται στον καρκίνο του μαστού.

Άλλες σημαντικές πληροφορίες που δίνει η προσέγγιση με CGH είναι η μοριακή πλέον απόδειξη της πολυκλωνικότητας μη σχετιζόμενων κλώνων στον καρκίνο του μαστού¹⁰⁰ καθώς επίσης και ότι όλοι οι κυτταρογενετικά ομαλοί καρκίνοι του μαστού παρουσιάζουν γενετικές ανωμαλίες και επομένως στο κυτταρογενετικό επίπεδο είναι ψευδώς ομαλοί¹¹³.

Το M-FISH τέλος, πέρα από τη γενική συνεισφορά του στην αποκάλυψη της υφής διαφόρων μη προσδιορισμένων χρωμοσωμικών δεικτών (markers) συνετέλεσε – έχει εφαρμοστεί περιορισμένα μέχρι σήμερα κυρίως λόγω κόστους – στη μελέτη της μετάστασης¹¹⁴.

2.5 Μοριακή Γενετική του καρκίνου του μαστού.

• Σποραδικός καρκίνος

Όπως προαναφέρθηκε οι μοριακές κυτταρογενετικές μέθοδοι και οι κλασσικές κυτταρογενετικές αναγνωρίζουν μη τυχαίες χρωμοσωμικές περιοχές με πλεόνασμα ή έλλειμμα γενετικού υλικού ή σημεία θραύσης των χρωμοσωμάτων (breakpoints). Οι γενετικές αυτές θέσεις είναι υποψήφιες για περαιτέρω διερεύνηση με μοριακές μεθόδους γιατί υποδεικνύουν την ύπαρξη γονιδίων που εμπλέκονται στη διαδικασία ογκογένεσης του καρκίνου του μαστού.

Παρακάτω αναφέρονται τα γονίδια που μεταλλάξεις τους είναι συχνό φαινόμενο σε καρκινώματα του μαστού. Οι πιο συνηθισμένοι μηχανισμοί με τους οποίους τα γονίδια αυτά απορυθμίζονται είναι η γονιδιακή επέκταση (gene amplification) και η έλλειψη (deletion) γενετικού υλικού.

MYC

Το προϊόν αυτού του πρωτοογκογονιδίου είναι μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει κυτταρικές λειτουργίες όπως πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση ακόμη και απόπτωση¹¹⁵. Βρίσκεται στη χρωμοσωμική θέση 8q24 και παρουσιάζεται μεταλλαγμένο, με τη μορφή κυρίως της γονιδιακής επέκτασης, στο 20-30% περίπου των καρκινωμάτων του μαστού περίπου¹¹⁶. Η συχνότητα υπερέκφρασης του γονιδίου στα καρκινώματα του μαστού είναι υψηλότερη ή δεν συμβαδίζει πάντα με τη συχνότητα της γονιδιακής του επέκτασης¹¹⁷. Επομένως



εκτός από τη γονιδιακή επέκταση φαίνεται ότι υπάρχουν και άλλοι μηχανισμοί ενεργοποίησης του γονιδίου όπως π.χ πολυσωμία του χρωμοσώματος 8 ή ακόμη και ανακατάταξη των αλληλουχιών του^{118,119}. Η συχνότητα της γονιδιακής επέκτασης του *MYC* είναι μεγαλύτερη στο διηθητικό πορογενές καρκίνωμα από ότι στο αντίστοιχο *in situ*¹²⁰. Πολλές μελέτες συσχετίζουν τη παρουσία του γονιδιακά ενισχυμένου *MYC* με κακή πρόγνωση και μικρή επιβίωση^{117,121,122}.

ERBB2

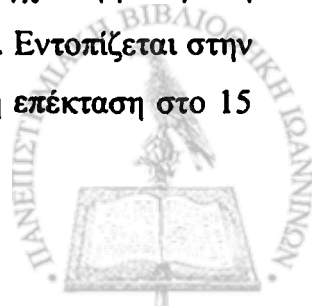
Το *ERBB2* (*HER-2/neu*) αποτελεί ίσως το καλύτερα μελετηθέν πρωτογονίδιο στους όγκους του μαστού. Η μελέτη του βοήθησε στη κατανόηση των μηχανισμών μοριακής γενετικής στους συμπαγείς όγκους γενικά και στο μαστό ειδικότερα¹²³. Εντοπίζεται στη χρωμοσωμική θέση 17q21 και το πρωτεϊνικό προϊόν του είναι διαμεμβρανικός υποδοχέας ομόλογος των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων EGF. Στα φυσιολογικά κύτταρα αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα της κυτταρικής αύξησης. Παρουσιάζεται με αλλαγές μέσω γονιδιακής επέκτασης (amplified) σε ποσοστό περίπου 20-30% των καρκινωμάτων του μαστού^{124,125}. Η υπερέκφραση συμβαδίζει με τη γονιδιακή επέκταση στις περισσότερες περιπτώσεις^{126,127}.

Από τη προηγούμενη δεκαετία έγινε ήδη γνωστή η σημασία του *ERBB2* ως προγνωστικού παράγοντα^{128,129}. Οι περισσότερες μελέτες αναφέρουν κακή πρόγνωση για όγκους με υψηλά επίπεδα υπερέκφρασης και γονιδιακής επέκτασης του *ERBB2*^{130,131}.

Τα τελευταία χρόνια μετά από κλινικές δοκιμές με μονοκλωνικά αντισώματα (Mabs) που μπλοκάρουν αποτελεσματικά τους υποδοχείς του *ERBB2*¹³² βρέθηκε το καταλληλότερο από αυτά (Mab4D5) που εμποδίζει το πολλαπλασιασμό κυττάρων του όγκου¹³³. Το Mab4D5 γνωστό με το εμπορικό όνομα Herceptin έχει ήδη εγκριθεί για την χρησιμοποίησή του σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο του μαστού, εφόσον βέβαια παρουσιάζουν υπερέκφραση και γονιδιακή επέκταση του *ERBB2*, αφού αποδείχτηκε αποτελεσματικό στην αναχαίτηση εξάπλωσης της νόσου¹³⁴.

CCND1

Το γονίδιο *CCND1* κωδικοποιεί την κυκλίνη D1 που ελέγχει τη μετάβαση των κυττάρων από τη G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου. Εντοπίζεται στην χρωμοσωμική περιοχή 11q13 και παρουσιάζεται με γονιδιακή επέκταση στο 15



έως 20% των καρκινωμάτων του μαστού αν και η υπερέκφρασή του είναι περισσότερο συχνή, περίπου 35-50%^{117,135,136}.

Η συσχέτιση γονιδιακής ενίσχυσης ή/και υπερέκφρασης *CCND1* με την πρόγνωση δεν έχει δώσει μέχρι στιγμής ξεκάθαρα αποτελέσματα¹³⁸ γεγονός που ίσως οφείλεται ότι στην συγκεκριμένη περιοχή εμπλέκονται και άλλα γονίδια σημαντικά στην καρκινογένεση¹²⁴.

Η γονιδιακή επέκταση και η υπερέκφραση της κυκλίνης D1 αυξάνεται σε όγκους υψηλότερου βαθμού κακοήθειας (IDC)^{120,138} σε σχέση με όγκους χαμηλότερου, γεγονός που ίσως υποδεικνύει ότι οι γενετικές αλλαγές στο γονίδιο αντιπροσωπεύουν ένα σχετικά πρώιμο στάδιο στη διαδικασία ανάπτυξης του όγκου¹³⁹.

Οι απόψεις σχετικά με τη χρονική σειρά μετάλλαξης των προαναφερόμενων ογκογονιδίων είναι αντικρουόμενες. Άλλες μελέτες υποστηρίζουν ότι το *CCND1* μεταλλάσσεται νωρίτερα από το *MYC* και το *ERBB2*¹⁴⁰ ενώ άλλες έρευνες βρίσκουν συχνά ταυτόχρονη γονιδιακή επέκταση και στα τρία γονίδια^{141,142}.

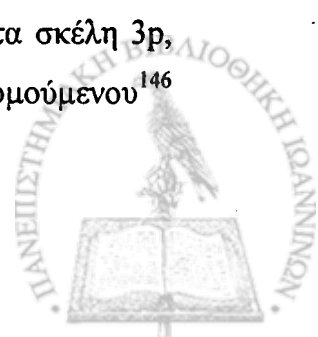
TP53

Το γονίδιο *TP53* χαρτογραφείται στη χρωμοσωμική θέση 17p13 και η πρωτεΐνη (p53) που κωδικοποιεί παίζει ρυθμιστικό ρόλο στη διαφοροποίηση και απόπτωση των κυττάρων¹⁴³. Αναφέρεται βιβλιογραφικά ότι είναι το συχνότερα μεταλλαγμένο γονίδιο γενικά στο σποραδικό καρκίνο (συχνότητα 15-50%)^{117,124} ενώ μεταλλάξεις στα κύτταρα της γαμετικής σειράς ανιχνεύονται στο σύνδρομο Li-Fraumeni¹⁴⁴.

Άλλα γονίδια με ογκοκατασταλτική δράση που έχουν βρεθεί μεταλλαγμένα αλλά σπανιότερα από τα παραπάνω στον καρκίνο του μαστού, είναι το *CDKN2* (p16) που δρα αναχαιτιστικά στον κυτταρικό κύκλο και εδράζεται στη χρωμοσωμική θέση 9p21-22¹³⁶, αυτό του ρετινοβλαστώματος (*RBI*) στη χρωμοσωμική θέση 13q14¹³⁶ και το *VHL* στη περιοχή 3p25¹⁴⁵.

LOH

Η γενετική αστάθεια – κυρίως απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH) - είναι συχνό φαινόμενο στα καρκινώματα. Αλλαγές στα 6q, 7p, 16q, 17p και 17q έχουν βρεθεί σε 25-50% σε in-situ λοβιακά καρκινώματα ενώ αλλαγές στα σκέλη 3p, 8p, 16q, 17p, 17q είναι συνηθέστερες σε περιπτώσεις κληρονομούμενου¹⁴⁶ καρκίνου για τον οποίο θα μιλήσουμε παρακάτω.



• Κληρονομούμενος καρκίνος του μαστού

Ο κληρονομούμενος καρκίνος του μαστού αποτελεί ποσοστό περίπου 5%-10% των συνολικών περιπτώσεων καρκίνου και κληρονομείται με επικρατή αυτοσωμικό τρόπο¹⁴⁷. Χαρακτηρίζεται από ύπαρξη αμφοτερόπλευρων όγκων, έναρξη της ασθένειας σε νεαρότερη ηλικία και ύπαρξη όγκων και σε άλλα μέρη εκτός μαστού. Προς το παρόν δύο είναι τα γονίδια που έχουν βρεθεί να εμπλέκονται: το *BRCA1* και το *BRCA2* που εδράζονται στις χρωμοσωμικές θέσεις 17q21¹⁴⁸ και 13q12-13¹⁴⁹ αντίστοιχα. Φαίνεται ότι τα γονίδια αυτά δρουν ως επιδιορθωτικά σε βλάβες του γενετικού υλικού. Οι φορείς των γονιδίων αυτών έχουν μεγάλες πιθανότητες (~80%) να νοσήσουν από καρκίνο του μαστού. Η εμπλοκή και άλλων άγνωστων προς το παρόν γονιδίων εμπλεκόμενων στον κληρονομούμενο καρκίνο του μαστού θεωρείται πιθανή^{150,151}.

Όπως προαναφέρθηκε, οι γενετικές αλλαγές που έχουν ανιχνευθεί στη πολύπλοκη διαδικασία της νεοπλασματικής εξαλλαγής ή/και μεταστατικής πορείας των κυττάρων του μαστού προϋποθέτουν την ύπαρξη και άλλων εμπλεκόμενων γονιδίων. Ο συνδυασμός των γενετικών προσεγγίσεων (κυτταρογενετικές, μοριακές κυτταρογενετικές και μοριακές τεχνικές) θα υποδείξει μελλοντικά αυτά τα νέα γονίδια που συνδέονται με τους όγκους του μαστού. Τελικός σκοπός παραμένει η πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση της νόσου (πρόγνωση, διάγνωση και θεραπεία).

2.6 Γενετικά χαρακτηριστικά καλοήθων παθήσεων του μαστού

• Κυτταρογενετικά ευρήματα

Μέχρι σήμερα και πριν τη δημοσίευση της παρούσης εργασίας έχουν αναφερθεί περίπου 90 περιπτώσεις κυτταρογενετικά ανώμαλων καλοήθων παθήσεων του μαστού. Ο αριθμός αυτός είναι μικρός σε σχέση με τα καρκινώματα που έχουν αναλυθεί κυτταρογενετικά και σε σχέση με τη συχνότητα εμφάνισης των καλοήθων παθήσεων.

Τα περιστατικά αυτά περιλαμβάνουν καλοήθη νεοπλάσματα (ινοαδενώματα, θηλώματα, αμαρτώματα, αδενολιπόματα) καθώς και καλοήθεις διεργασίες (υπερπλαστικές με ή χωρίς ατυπία).



Τα περισσότερα από τα περιστατικά παρουσίασαν σχετικά απλούς καρυότυπους με ισοζυγισμένες, τις περισσότερες φορές ανακατατάξεις και χρωμοσωμικό αριθμό στην πλειοψηφία τους κοντά στη διπλοειδία. Οι συχνότερες όμως επαναλαμβανόμενες χρωμοσωμικές ανωμαλίες που ανιχνεύτηκαν περιλαμβάνουν ανακατατάξεις μη ισοζυγισμένες όπως $\text{del}(1q)$, $+1q$, $\text{del}(3p)$ καθώς και τρισωμίες με πιο συχνές των χρωμοσωμάτων 7, 18, 20^{152} ή ακόμη και τετρασωμία (π.χ του 18) σε μία περίπτωση κυστικής νόσου¹⁵³. Οι ανωμαλίες αυτές ας σημειωθεί ότι βρίσκονται επίσης ως πρωτογενείς ανακατατάξεις στα καρκινώματα του μαστού. Μονοσωμία του 9 αναφέρθηκε σε δείγμα κυστικής νόσου με υπερπλαστική αλλοίωση¹⁵⁴. Δείγματα από όλες τις κατηγορίες των όγκων παρουσίασαν κυτταρογενετική πολυκλωνικότητα.

Στα ινοαδενώματα, εκτός από τις παραπάνω ανωμαλίες αναφέρεται και σχετικά συχνή ανακατάταξη του $12q^{155,156}$ που θεωρείται ως χαρακτηριστικό των μεσεγχυματογενών κυττάρων.

Οι καλοήθεις φυλλοειδείς εμφανίζουν απλούς καρυότυπους με πιθανή συμμετοχή στις χρωμοσωμικές ανακατατάξεις και του μεσεγχυματογενούς και του επιθηλιακού στοιχείου αντίθετα από τους κακοήθεις που εμφανίζουν πολύπλοκες ανακατατάξεις. Με αυτό τον τρόπο η κυτταρογενετική ανάλυση γίνεται δείκτης διάκρισης καλοήθων και κακοήθων φυλλοειδών όγκων¹⁵⁷. Η παρατήρηση ότι η καρυοτυπική πολυπλοκότητα συμβαδίζει με το βαθμό κακοήθειας επιβεβαιώθηκε με μελέτες CGH¹⁵⁸.

Τα μέχρι σήμερα κυτταρογενετικά δεδομένα δεν έχουν καταφέρει να ανιχνεύσουν χρωμοσωμικούς δείκτες ειδικούς για τις καλοήθεις παθήσεις του μαστού. Αντίθετα βρέθηκαν όπως προαναφέρθηκε χρωμοσωμικές ανωμαλίες που είχαν ήδη ανιχνευτεί στα καρκινώματα.

• Μοριακά κυτταρογενετικά ευρήματα και μοριακά γενετικά ευρήματα.

Τα μέχρι σήμερα μοριακά δεδομένα εστιάζονται κυρίως στα γονίδια ή/και στις χρωμοσωμικές περιοχές που έχουν βρεθεί μεταλλαγμένα σε μεγάλη συχνότητα εκτός από τους καλοήθεις και στους κακοήθεις όγκους του μαστού. Πολλές από τις μελέτες από τις οποίες προέκυψαν αυτά τα δεδομένα έχουν γίνει με μοριακές γενετικές και ανοσοϊστοχημικές τεχνικές που χρησιμοποιούν υλικό αρχείου με όλες τις ιστολογικές βαθμίδες νεοπλασματικής εξέλιξης από την υπερπλασία μέχρι το διηθητικό καρκίνωμα.



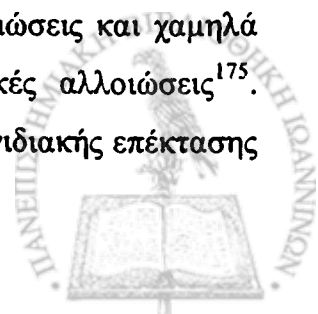
Ενώ, όπως προαναφέρθηκε, μελέτες με CGH στους φυλλοειδείς όγκους δίνουν ευρήματα ανάλογα με τα κυτταρογενετικά, παλαιότερες μελέτες σε ινοαδενώματα αδυνατούν να ανιχνεύσουν γενετικές αλλαγές¹⁵⁹, γεγονός που δεν εκπλήσσει αφού οι χρωμοσωμικές ανακατατάξεις που παρατηρούνται στα ινοαδενώματα είναι συνήθως ισοζυγισμένες και η τεχνική αυτή αδυνατεί να τις ανιχνεύσει. Εν τούτοις μία εντελώς πρόσφατη έρευνα με CGH σε ινοαδενώματα, αναφέρει πλεόνασμα γενετικού υλικού στις χρωμοσωμικές θέσεις 1q, 16q, 5p14, 5q34-qter και 13q32-qter¹⁶⁰.

Σε περιπτώσεις υπερπλασίας προσκείμενης σε πορογενές προδιθητικό και διθητικό καρκίνωμα αναφέρθηκε σαν κοινή χρωμοσωμική περιοχή γονιδιακής επέκτασης η 20q13¹⁶¹. Άλλες έρευνες σε ινοαδενώματα, καρκινώματα *in situ* και διθητικά, βρίσκουν σαν κοινή χρωμοσωμική περιοχή έλλειψης την 6q27-qter¹⁶². Έρευνες με CGH σε αποκρινική μετάπλαση, αποκρινές καρκίνωμα *in situ* και το αντίστοιχο διθητικό αναφέρουν κοινές γενετικές αλλαγές που αυξάνονται ανάλογα με το βαθμό κακοήθειας¹⁶³.

Οι έρευνες με FISH που υπάρχουν στις καλοήθεις παθήσεις του μαστού είναι σχετικά περιορισμένες. Οι περισσότερες αφορούν αριθμητικές αλλαγές και τα αποτελέσματά τους δείχνουν περισσότερες τρισωμίες παρά μονοσωμίες¹⁶⁴. Κάποιες άλλες έρευνες με την ίδια τεχνική δεν κατάφεραν να ανιχνεύσουν πολυσωμίες¹⁶⁵ ενώ αναφέρθηκαν και περιστατικά με μονοσωμίες¹⁶⁶. Αύξηση της ανευπλοειδίας παρατηρείται γενικά όσο προχωράμε από υπερπλασίες προς κακοήγη νεοπλάσματα^{167,168}.

Οι περισσότερες μελέτες του ογκογονιδίου *MYC* και των καλοήθων παθήσεων του μαστού εστιάζονται στην υπερέκφραση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης που έχει βρεθεί αυξημένη σε υπερπλαστική Κυστική Νόσο^{169,170} καθώς και σε ινοαδενώματα και κυστική νόσο¹⁷¹. Ελάχιστες μελέτες έχουν γίνει αποκλειστικά για τη γονιδιακή επέκταση του *MYC* και αναφέρουν καθόλου^{119,172}, μικρά¹²¹ έως σημαντικά ποσοστά επέκτασης¹⁷³.

Παρόμοια με το *MYC*, το γονίδιο *ERBB2* και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί έχουν μελετηθεί κυρίως ανοσοϊστοχημικά στις καλοήθεις παθήσεις του μαστού πολλές φορές σε συνδυασμό με υπερέκφραση άλλων πρωτεϊνών¹⁷⁴. Τα αποτελέσματα αναφέρουν υπερέκφραση σε ινοκυστικές αλλοιώσεις και χαμηλά επίπεδα πρωτεΐνης για ινοαδενώματα και μη υπερπλαστικές αλλοιώσεις¹⁷⁵. Πρόσφατη έρευνα αναφέρει την ύπαρξη μικρού ποσοστού γονιδιακής επέκτασης



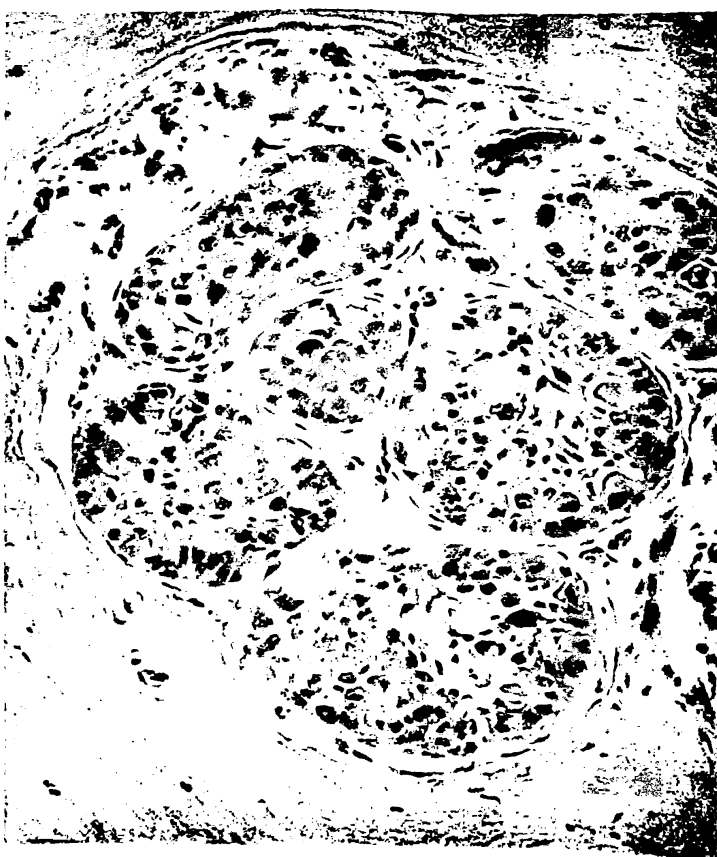
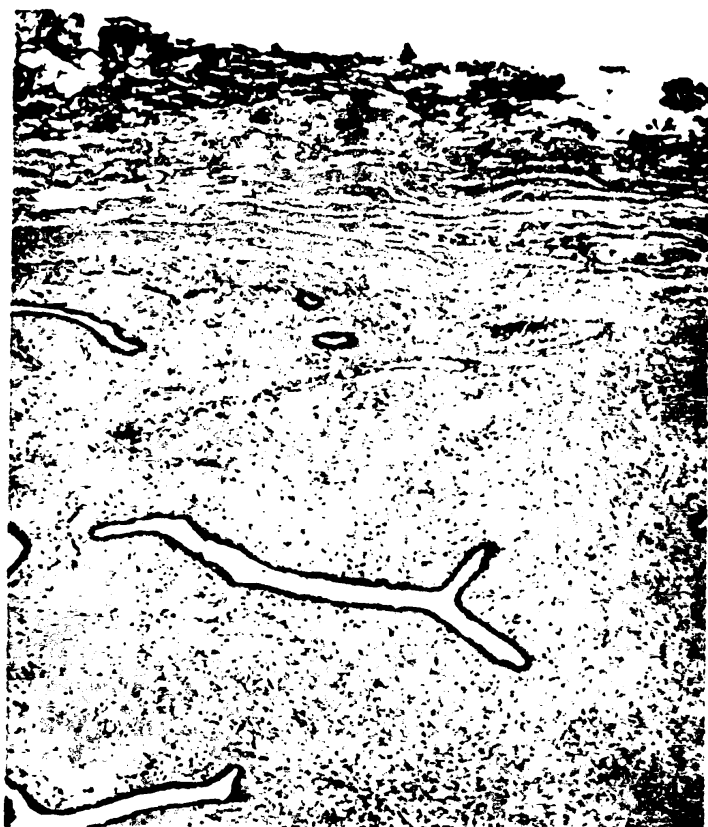
σε ασθενείς με κυστική νόσο που δεν ανέπτυξαν καρκίνωμα και μεγαλύτερου σε γυναίκες που αργότερα ανέπτυξαν¹⁷⁶. Έρευνα που συνδυάζει ανοσοϊστοχημεία και FISH για τη μελέτη υπερέκφρασης και γονιδιακής ενίσχυσης σε δείγμα αποκρινικών αδενώσεων έδειξε μόνο υπερέκφραση¹⁷⁷.

Πρόσφατες μελέτες επιβεβαιώνουν τη γονιδιακή επέκταση του CCND1¹⁷⁸ και αναφέρουν ότι αυξάνεται όσο προχωράμε από τον ομαλό ιστό στη κυστική νόσο με υπερπλασία και στο καρκίνωμα¹⁷⁹.

Στις καλοήθειες παθήσεις του μαστού έχουν επίσης αναφερθεί γενετικές αλλαγές σε διάφορες χρωμοσωμικές θέσεις. Μοριακές μελέτες έχουν υποδείξει απώλεια της ετεροζυγωτίας (LOH) σε άτυπες υπερπλαστικές αλλοιώσεις¹⁸⁰ καθώς και γενετική αστάθεια (Microsatellite Instability) σε ινοαδενώματα¹⁸¹.

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα συνάδουν με αυτά των κυτταρογενετικών μελετών στο γεγονός ότι δεν εντοπίζουν γονίδια ειδικά για τον κάθε τύπο νεοπλασματος.





Εικόνα 2.2: Ιστολογικές τομές από καλοήθεις αλλοιώσεις του μαστού.

Πάνω αριστερά: Ινοαδένωμα.

Πάνω δεξιά: Ινοκυστικές αλλαγές χωρίς ατυπία που περιέχουν κύστεις, ινώδη συνδετικό ιστό και περιοχή μικροασβεστώσεων (τόξο).

Κάτω αριστερά: Επιθηλιακή υπερπλασία χωρίς ατυπία.

Κάτω δεξιά: Επιθηλιακή υπερπλασία με ατυπία.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Αν και επιδημιολογικά και ιστολογικά δεδομένα συνδέουν τους καλοήθεις όγκους του μαστού με τους κακοήθεις, τα μέχρι σήμερα γενετικά ευρήματα δεν έχουν αποσαφηνίσει κατηγορηματικά τη μεταξύ τους σχέση. Δεδομένου ότι η μελέτη της ογκογένεσης είναι βασικό συστατικό στοιχείο της διερεύνησης της βιολογίας των όγκων, η περαιτέρω μελέτη των καλοήθων όγκων και αλλοιώσεων του μαστού είναι σημαντική, ώστε νέα δεδομένα να ωθήσουν προς την αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση του καρκίνου αυτού του αδένα.

Οι μέχρι σήμερα διαθέσιμες κυτταρογενετικές πληροφορίες για τους καλοήθεις όγκους του μαστού είναι σχετικά λίγες σε σχέση με τους άλλους καλοήθεις όγκους (π.χ λειομύωμα της μήτρας) και ακόμη λιγότερες σε σχέση με τις γενετικές πληροφορίες που αφορούν τα καρκινώματα. Οι γενετικές έρευνες που αφορούν τους καλοήθεις όγκους του μαστού, αν και περιορισμένες, εν τούτοις έχουν ήδη εντοπίσει ορισμένα χαρακτηριστικά κοινά με αυτά των καρκινωμάτων τόσο κυτταρογενετικά (ειδικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, πολυκλωνικότητα), όσο και μοριακά (υπερέκφραση ορισμένων γονιδίων). Παρόλα αυτά η διεργασία από την καλοήθεια στην κακοήθεια δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένη γενετικά όσον αφορά τις κοινές γενετικές ανακατατάξεις και ακόμη περισσότερο τους μηχανισμούς που τις διέπουν.

Είναι επομένως φανερό, ότι η σχετική έλλειψη γενετικών μελετών που υπάρχει σε συνδυασμό με τη σημασία που έχει η ογκογένεση δημιουργεί την ανάγκη περαιτέρω μελετών για την αποσαφήνιση της καρκινογενετικής διεργασίας.

Αυτός είναι και ο βασικός σκοπός της παρούσας διατριβής, δηλαδή η μελέτη των γενετικών αλλαγών των καλοήθων όγκων του μαστού σε σχέση με τους κακοήθεις και η επίδρασή τους στο φαινότυπο των νεοπλασματικών κυττάρων.

Αναλυτικότερα οι στόχοι που εξυπηρετούν αυτό το σκοπό είναι:

1. Ο περαιτέρω κυτταρογενετικός χαρακτηρισμός των καλοήθων αλλοιώσεων και όγκων του μαστού, η συσχέτισή τους με τον ιστολογικό τύπο αλλά και με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά των καρκινωμάτων.

2. Η προσπάθεια εντοπισμού κοινών ή μη χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε πολλαπλούς καλοήθεις όγκους του ίδιου ασθενή.



3. Η ανίχνευση ύπαρξης μοριακών αλλαγών στους καλοήθεις όγκους και συγκεκριμένα η διερεύνηση ύπαρξης γονιδιακής επέκτασης για τα ογκογονίδια *ERBB2*, *CCND1*, *MYC* και η συσχέτισή τους με τον καρκίνο του μαστού.

4. Η διερεύνηση ύπαρξης κοινών ή μη αλλαγών στο γενετικό επίπεδο στους πολλαπλούς όγκους.

5. Η συσχέτιση χρωμοσωμικών και μοριακών ανακατατάξεων στον ίδιο όγκο και η προσπάθεια ανίχνευσης πρώιμων γεγονότων στη καρκινογένεση.

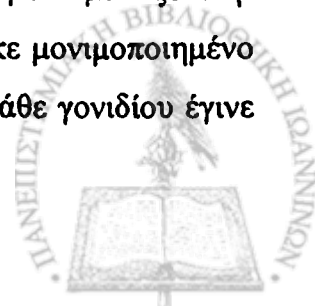


ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Υλικό

Το υλικό της παρούσης ερευνητικής εργασίας προήλθε από ασθενείς που εγχειρίστηκαν για την αφαίρεση καλοήθους όγκου του μαστού και περιλαμβάνει κυστικές αλλοιώσεις, ινοαδενώματα και κάποιους καλοήθεις φυλλοειδείς όγκους. Οι ασθενείς νοσηλεύτηκαν στην Κλινική Μαστού του Νοσοκομείου «ο Άγιος Σάββας», στην αντίστοιχη Κλινική του Νοσοκομείου «Έλενα Βενιζέλου» και του 2^{ου} Θεραπευτηρίου ΙΚΑ. Τα δείγματα που προήλθαν από το Θεραπευτήριο του ΙΚΑ παρελήφθησαν απευθείας από το Χειρουργείο ενώ αυτά που προήλθαν από τα άλλα δύο Νοσοκομεία ήταν από υλικό βιοψίας και προέρχονταν από τα Παθολογοανατομικά Εργαστήρια. Όλα τα δείγματα τοποθετήθηκαν από το χειρουργό ή τον παθολογοανατόμο σε στείρο διάλυμα φυσιολογικού ορού με αντιβιοτικό και η διαδικασία της καλλιέργειας ξεκίνησε αμέσως μετά την παραλαβή τους. Συνολικά συλλέχθηκαν 81 δείγματα από 69 γυναίκες (μερικές από αυτές παρουσίασαν πολλαπλούς όγκους αμφοτερόπλευρα ή στον ίδιο μαστό). Συγκεντρώθηκαν επίσης τα απαραίτητα κλινικοπαθολογικά δεδομένα.

Για 40 από τα παραπάνω δείγματα - μετά από την κυτταρογενετική ανάλυση - ακολούθησε επιπρόσθετη μελέτη για την ύπαρξη γονιδιακής επέκτασης στα ογκογονίδια *ERBB2*, *c-MYC*, *CCND1* μέσω φθορίζουσας υβριδοποίησης (FISH). Η επιλογή των 40 δειγμάτων για την υβριδοποίηση έγινε με κριτήρια την ύπαρξη ομαλού ή ανώμαλου καρυότυπου και τη διαθεσιμότητα και καταλληλότητα του υλικού από το αρχείο του Παθολογοανατομικού Εργαστηρίου. Για το σκοπό αυτό στα περισσότερα από τα περιστατικά χρησιμοποιήθηκαν τομές από το μονιμοποιημένο υλικό βιοψίας κάθε δείγματος που διέθετε το Παθολογοανατομικό Εργαστήριο. Η λήψη των τομών έγινε από το πιο κατάλληλο block παραφίνης του κάθε περιστατικού. Τα blocks επλέχτηκαν από παθολογοανατόμο μετά από μικροσκοπική παρατήρηση τομών από κάθε block χρωσμένων με αιματοξυλίνη-ηωσίνη. Για τον υβριδισμό οκτώ περιστατικών χρησιμοποιήθηκε μονιμοποιημένο υλικό από τη κυτταροκαλλιέργεια του δείγματος. Ο υβριδισμός κάθε γονιδίου έγινε



σε ξεχωριστή αντικειμενοφόρο πλάκα. Εκτός από τις τομές των δειγμάτων, εξετάστηκαν με τη μέθοδο FISH και 3 τομές ομαλού ιστού του μαστού για να χρησιμοποιηθούν σαν αρνητικοί μάρτυρες (controls) για καθένα από τα τρία ογκογονίδια καθώς και τομή από καρκίνωμα που είχε βρεθεί ανοσοϊστοχημικά με υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης (+++) του *ERBB2* για να χρησιμοποιηθεί ως θετικός μάρτυρας. Συνολικά έγινε υβριδοποίηση σε 122 πλακίδια μικροσκοπίου.

Ο αριθμός περιστατικών που συλλέχθηκαν για μελέτη ανά τεχνική, ανά ιστολογικό τύπο και το εύρος ηλικίας των ασθενών συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα 4.1 I

Πίνακας 4.1I: Ιστολογικά-Κλινικά Στοιχεία Δειγμάτων

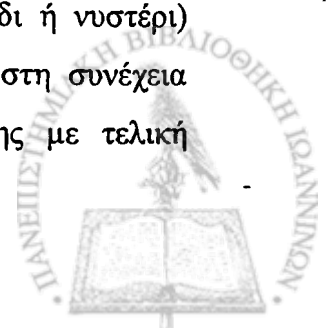
Ιστολογικός Τύπος	Εύρος Ηλικίας	Κυτταρογενετική ανάλυση	Ανάλυση FISH		
			ERBB2	MYC	CCND1
Ίνοαδενώματα/ Αδένωμα	18-65	64	34	34	34
Κυστικές αλλοιώσεις/ Θήλωμα	24-52	13	5	5	3
Καλοήγη φυλλοειδή	32-54	4	1	1	1

4.2 Κυτταρογενετική Μεθοδολογία

• Α. Αποδιάταξη του όγκου, διαχωρισμός κυττάρων και κυτταροκαλλιέργεια

Οι καλλιέργειες των δειγμάτων είχαν σαν βασικό στόχο την ανάπτυξη των νεοπλασματικών κυττάρων εις βάρος των ομαλών και για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η τεχνική καλλιέργειας νεοπλασματικών κυττάρων του μαστού⁸⁷. Επειδή τα περισσότερα από τα δείγματά μας ήταν διφασικοί όγκοι, γινόταν επίσης προσπάθεια διαχωρισμού του επιθηλιακού από το μεσεγχυματικό στοιχείο κατά Dietrich et al., 1994¹⁸² που αποτελεί την παραλλαγή της ανωτέρω τεχνικής. Η σύσταση του καλλιεργητικού μέσου που χρησιμοποιήθηκε αναφέρεται αναλυτικά στον πίνακα 4.2.I στη σελίδα 46. Αναλυτικά, ή όλη διαδικασία είχε διάρκεια 2-8 ημέρες και περιελάμβανε τα ακόλουθα:

Τα δείγματα τεμαχίζονταν μηχανικά (με αποστειρωμένο ψαλίδι ή νυστέρι) εντός στείρου τρυβλίου σε όσο το δυνατό μικρότερα τεμάχια και στη συνέχεια προστίθονταν διαλύματα κολλαγενάσης I, II και υαλουρονιδάσης με τελική



συγκέντρωση στο διάλυμα του τρυβλίου 400U/ml, 200U/ml και 200U/ml αντίστοιχα για το κάθε ένζυμο καθώς και καλλιεργητικό μέσο (wash medium) ώστε το τρυβλίο να περιέχει συνολικά 5ml.

Στη πρώτη φάση της αποδιάταξης γινόταν προσπάθεια διαχωρισμού επιθηλιακών και μεσεγχυματικών κυττάρων με βάση το γεγονός ότι τα μεσεγχυματικά κύτταρα είναι μονήρη και αποδιατάσσονται γρηγορότερα από τη συνδετική ουσία που τα περιβάλλει σε σχέση με τα επιθηλιακά. Η φάση της αποδιάταξης διαρκούσε από 2-6 ώρες ανάλογα με τον τύπο και το μέγεθος του καλοήθους όγκου. Στο διάστημα αυτό το τρυβλίο παρέμενε σε επωαστικό κλίβανο 37° και κατά διαστήματα παρατηρείτο στο ανεστραμμένο μικροσκόπιο. Όταν η αποδιάταξη των μεσεγχυματικών κυττάρων κρινόταν ικανοποιητική, δηλαδή τα περισσότερα μεσεγχυματικά κύτταρα ήταν μονήρη, το περιεχόμενο του τρυβλίου μεταφερόταν σε σωλήνα φυγοκέντρου όπου έμενε σε ηρεμία για 10-15 λεπτά με σκοπό να γίνει μία υποτυπώδης κλασματοποίηση του υλικού. Το σκεπτικό ήταν ότι τα επιθηλιακά κύτταρα που επί το πλείστον βρίσκονταν σε μεγαλύτερα συσσωματώματα θα συγκεντρώνονταν στο πυθμένα του σωλήνα, ενώ τα μονήρη κύτταρα, κυρίως ινοβλάστες, θα παρέμεναν στο υπερκείμενο ως ελαφρύτερα. Έτσι ο σωλήνας φυγοκέντρου χωριζόταν σε τρία τμήματα που από πάνω προς τα κάτω τα ονομάζαμε F1: το πιο πλούσιο σε μονήρη κύτταρα όγκου περίπου 2.5 ml, F2: το μεσαίο τμήμα του σωλήνα όγκου περίπου 2 ml και F3: το ίζημα με τα επιθηλιακά συσσωματώματα, όγκου περίπου 0.5 ml. Το F3 κλάσμα επέστρεφε στο τρυβλίο και τα F2 και F1 τοποθετούνταν σε νέο σωλήνα φυγοκέντρου όπου παρέμεναν για άλλα 10 λεπτά. Όσο από το υλικό αυτό κατακαθόταν ως ίζημα σε αυτό το δεύτερο σωλήνα (με τα F2 και F1), επέστρεφε στο τρυβλίο ενώ το υπερκείμενο φυγοκεντρείτο 2 φορές για 10 λεπτά στις 1000 στροφές απορριπτόταν κάθε φορά το υπερκείμενο και προστίθετο κάθε φορά νέο wash medium ώστε να ξεπλυθεί όσο το δυνατόν καλύτερα το υλικό από τα ένζυμα. Στο τέλος της δεύτερης φυγοκέντρωσης και αφού απορρίπτετο το υπερκείμενο προστίθετο στο σωλήνα Sarcoma Medium περίπου 3 ml, ο σωλήνας ηρεμούσε και από τη νέα αυτή κλασματοποίηση το υπερκείμενο ~2ml τοποθετείτο σε φιάλη καλλιέργειας 25cm² (Primaria, Falcon) που ονομαζόταν F1 ενώ το κάτω κλάσμα του σωλήνα σε φιάλη F2. Το τρυβλίο με τα ιζήματα επέστρεφε στον επωαστικό κλίβανο αφού προστίθετο wash medium μέχρι τελικό όγκο 5 ml. Μετά από 12-15 ώρες και τακτική παρατήρηση του τρυβλίου με το δείγμα που είχε απομείνει στο ανεστραμμένο μικροσκόπιο, τα περισσότερα

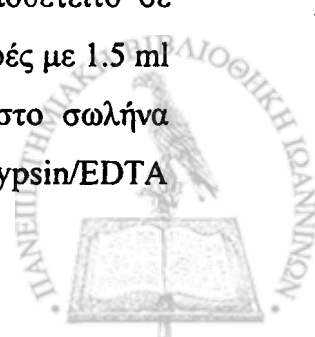
συσσωματώματα του όγκου στο τρυβλίο έφταναν στο κατάλληλο μέγεθος για τη μεταφορά τους σε φιάλη καλλιέργειας. Τότε το περιεχόμενο του τρυβλίου μεταφερόταν σε σωλήνα φυγοκέντρου και μετά από δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις, όπως προηγουμένως, γινόταν απόρριψη του υπερκείμενου και προστίθετο στο ίζημα καλλιεργητικό μέσο CDM-5. Ο σωλήνας έμενε για κλασματοποίηση και τα F1, F2 κλάσματα εμπλούτιζαν τις αντίστοιχες φιάλες που υπήρχαν ήδη στον κλίβανο ενώ το τελικό αυτό ίζημα δημιουργούσε μία νέα φιάλη F3 που ήταν και η πιο πλούσια σε επιθηλιακά κύτταρα. Όλες οι φιάλες καλλιέργειας φυλάγονταν σε επωαστικό κλίβανο 37°C κορεσμένου με 5% CO₂ και η πρόοδος ανάπτυξης των νεοπλασματικών κυττάρων παρατηρούνταν κάθε μέρα με το ανεστραμμένο μικροσκόπιο. Το καλλιεργητικό μέσο (Sarcoma Medium για τις F1, F2 και CDM-5 για τη F3) αλλάζόταν περίπου κάθε δεύτερη μέρα. Όταν θεωρείτο ότι τα κύτταρα είχαν ικανοποιητικό αριθμό μεταφάσεων γινόταν η συγκομιδή τους και η απομόνωση των χρωμοσωμάτων (Harvest).

Οι καλλιέργειες αυτές ονομάζονται μικρής διάρκειας (short-term cultures). Όλες οι διαδικασίες που περιελάμβαναν τεμαχισμό του όγκου, κυτταροκαλλιέργεια, αλλαγές θρεπτικών υλικών κ.α γίνονταν σε άσηπτες συνθήκες για προστασία της καλλιέργειας από επιμολύνσεις.

Οι συγκεντρώσεις των χρησιμοποιηθέντων διαλυμάτων των ενζύμων καθώς και η σύσταση των καλλιεργητικών μέσων (Wash, Sarcoma, CDM-5) αναγράφονται αναλυτικά στον πίνακα 4.2 I στη σελίδα 46.

• **B. Απομόνωση χρωμοσωμάτων**

Όταν τα κύτταρα παρουσίαζαν το άριστο σημείο ανάπτυξης και μιτωτικής δραστηριότητας ξεκινούσε η διαδικασία απομόνωσης των χρωμοσωμάτων με τη προσθήκη κολσεμίδιου (colcemid, Gibco) με συγκέντρωση 20ng/ml καλλιεργητικού μέσου στη φιάλη για 4-6 ώρες. Το κολσεμίδιο επιδρά επί της μιτωτικής ατράκτου εμποδίζοντας τη μετακίνηση των χρωμοσωμάτων προς τους πόλους επομένως όσα κύτταρα βρίσκονται στο τέλος πρόφασης και μετάφασης παραμένουν σε αυτές τις φάσεις. Δημιουργείται έτσι συνάθροιση μιτώσεων καθώς τα κύτταρα που διανύουν τον κυτταρικό κύκλο σταματούν στις φάσεις που προαναφέραμε. Μετά την επώαση στο κολσεμίδιο, το καλλιεργητικό μέσο που υπήρχε στη φιάλη τοποθετείτο σε σωληνάριο φυγοκέντρου και ο πυθμένας της φιάλης ξεπλενόταν δύο φορές με 1.5 ml διαλύματος φυσιολογικού ορού. Ο φυσιολογικός ορός τοποθετείτο στο σωλήνα φυγοκέντρου και στη φιάλη προστίθετο 1.5 ml διαλύματος θρυψίνης (Trypsin/EDTA

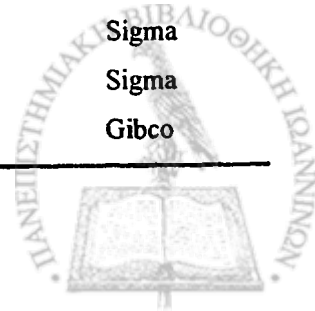


1X, Gibco) που παρέμενε για 2-6 λεπτά. Όταν τα κύτταρα φαίνονταν με το ανεστραμμένο μικροσκόπιο αποκολλημένα από τον πυθμένα της φιάλης, συλλέγονταν και το διάλυμα θρυψίνης-κυττάρων τοποθετείτο σε σωλήνα φυγοκέντρου. Ο πυθμένας της φιάλης ξεπλένεται 2 φορές με φυσιολογικό ορό που τοποθετείτο και αυτό στο σωλήνα ο οποίος φυγοκεντρείται σε 850 στροφές για 6 λεπτά. Κατόπιν το υπερκείμενο απορριπτόταν και στο ίζημα γινόταν υποτονική μεταχείριση των κυττάρων με προσθήκη περίπου 5 ml KCl 0.05M, ήπια ανάδευση και παραμονή για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια γινόταν προσεκτική ήπια μονιμοποίηση με διάλυμα μεθανόλης:οξικού οξέως 3:1. Αναλυτικά: το σωληνάριο με το υποτονικό φυγοκεντρείται 3 φορές στις 850 στροφές για 6 λεπτά, με χρόνους παραμονής στο μονιμοποιητικό προοδευτικά αυξανόμενους (1 λεπτό, 10 λεπτά, 30 λεπτά). Σε κάθε φυγοκέντρηση αφαιρείτο σταδιακά το υποτονικό και προστίθετο με ήπια ανάδευση όλο και περισσότερο μονιμοποιητικό διάλυμα ώστε μετά το τέλος και της τρίτης φυγοκέντρωσης τα κύτταρα να βρίσκονται μέσα σε καθαρό μονιμοποιητικό διάλυμα και να είναι έτοιμα προς επίστρωση. Τα κύτταρα με μικρή ποσότητα μονιμοποιητικού (περίπου 0.4 ml) επιστρώονταν σε καθαρές αντικειμενοφόρους που φυλάγονταν σε απεσταγμένο νερό στο ψυγείο. Οι αντικειμενοφόροι με τα κύτταρα τοποθετούνταν σε ξηρό κλίβανο 60° C για 12-16 ώρες αφού προηγουμένως είχαν στεγνώσει στον αέρα. Όταν οι αντικειμενοφόροι έβγαιναν από το ξηρό κλίβανο, τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο 60° C εντός διαλύματος 2XSSC (μίγμα των διαλυμάτων 0.6 M NaCl και 0.06M Na₃Citrate σε ίσες αναλογίες) για 3.5 ώρες ώστε να καθαριστούν από υπολείμματα κυταροπλάσματος, σκουπίδια κ.λ.π, κατόπιν τοποθετούνταν στο ψυγείο για 30 λεπτά και τελικά ξεπλένονταν με νερό βρύσης. Όταν τα πλακίδια ήταν απολύτως στεγνά (συνήθως μετά από 24 ώρες) ξεκινούσε η διαδικασία της χρωμοσωμικής σήμανσης τύπου G.



Πίνακας 4.21: Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια στις κυτταροκαλλιέργειες του μαστού

ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ	ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΤΕΛΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (στο medium)	ΕΤΑΙΡΙΑ
Διάλυμα κολλαγενάσης I	Collagenase I	400U/	Sigma
	RPMI medium (διαλύτης)	ml medium στο τρυβλίο	Gibco
Διάλυμα κολλαγενάσης II	Collagenase II	200U/	Sigma
	RPMI medium	ml medium στο τρυβλίο	Gibco
Διάλυμα υαλουρονιδάσης	Hyaluronidase	200U/	Sigma
	RPMI medium(διαλύτης)	ml medium στο τρυβλίο	Gibco
Wash Καλλιεργητικό Μέσο	RPMI medium	100 ml	Gibco
	Penicillin	50U/ml medium	Gibco
	Streptomycin	50 µg/ml medium	Gibco
Sarcoma Καλλιεργητικό Μέσο	RPMI medium	100 ml	Gibco
	Penicillin	50U/ml medium	Gibco
	Streptomycin	50 µg/ml medium	Gibco
	Foetal Bovine Serum	17% medium	Gibco
CDM-5 Καλλιεργητικό Μέσο	DMEM-F12	100ml	Gibco
	Penicillin	50U/ml medium	Gibco
	Streptomycin	50 µg/ml medium	Gibco
	Foetal Bovine Serum	17% στο medium	Gibco
	Insulin	3µg/ml medium	Sigma
	Sodium selenite	2.6ng/ml medium	Gibco
	Transferrin	25µg/ml medium	Sigma
	Epidermal Growth Factor	20ng/ml medium	Gibco
	β-estradiol	10 ⁻¹⁰ M στο medium	Sigma
	Hydrocortisone	0.5µg/ml medium	Sigma
	Cyclic-AMP	10 ⁻⁸ M στο medium	Sigma
	Fetuin	20µg/ml medium	Sigma
	Fibronectin	100ng/ml medium	Gibco
	Triiodo-thyronine	10 ⁻⁹ M στο medium	Sigma
	Phosphoethanolamine	10 ⁻⁴ M στο medium	Sigma
	Ascorbic acid	10µg/ml medium	Sigma
	Cholera toxin	0.5µg/ml medium	Sigma
	L-Glutamine	0.24mg/ml medium	Gibco



- **Γ. Χρωμοσωμική Σήμανση (G-banding)**

Για τη σήμανση τύπου G (banding) χρησιμοποιείτο η τεχνική κατά Mandahl¹⁸⁴ με χρωστική Wright (Sigma).

Αναλυτικά χρησιμοποιούνταν τα ακόλουθα αντιδραστήρια: Α) ρυθμιστικό διάλυμα Sorensen ($p.H=6.8$) που προκύπτει από μίξη δύο διαλυμάτων Α, Β ($A=0.06M Na_2HPO_4$, $B=0.06M KH_2PO_4$) σε αναλογία Α:Β, 51:49. Β) διάλυμα χρωστικής Wright που προκύπτει με διάλυση 0.25g χρωστικής σε 100 ml μεθανόλης.

Η διαδικασία της χρώσης γινόταν ως εξής: Οι αντικειμενοφόροι τοποθετούνταν οριζόντια και καλύπτονταν με ρυθμιστικό διάλυμα για 30-45 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια το ρυθμιστικό διάλυμα απορρίπτονταν και το πλακάκι καλύπτονταν με μίγμα διαλύματος χρωστικής και ρυθμιστικού διαλύματος Sorensen (σε αναλογία 1:3 αντίστοιχα) για 2-2,5 λεπτά. Μετά τη χρώση οι αντικειμενοφόρες πλάκες ξεπλένονταν με νερό βρύσης, στέγνωναν στον αέρα, καλύπτονταν με καλυπτρίδα όταν ήταν τελείως στεγνές και ήσαν έτοιμες για μικροσκοπική παρατήρηση.

- **Δ. Μικροσκοπική παρατήρηση – Καρυοτυπική ανάλυση**

Η παρατήρηση των παρασκευασμάτων γινόταν με οπτικό μικροσκόπιο Zeiss. Οι μιτώσεις ανιχνεύονταν αρχικά με μεγέθυνση 10X10 και η παρατήρησή τους γινόταν με καταδυτικό φακό 10X100. Για κάθε περιστατικό αναλύονταν στο μικροσκόπιο όλες οι διαθέσιμες μεταφάσεις και επιλέγονταν οι καταλληλότερες από αυτές για τη δημιουργία καρυογραμμάτων. Το μικροσκόπιο ήταν εφοδιασμένο με κατάλληλο λογισμικό σύστημα (Ikarus, Metasystems) με δυνατότητα αποθήκευσης και επεξεργασίας των παρατηρούμενων μεταφάσεων καθώς και άμεσης εκτύπωσης των καρυογραμμάτων. Επιλέγοντας τα καταλληλότερα από αυτά (συνήθως 2-5 καρυογράμματα) δημιουργείτο ο καρυότυπος κάθε περιστατικού. Τα κριτήρια κλωνικότητας και η περιγραφή των καρυοτύπων έγιναν σύμφωνα με την Διεθνή Ονοματολογία²³ (ISCN 1995).



4.3 Μεθοδολογία Υβριδοποίησης

Η διαδικασία υβριδοποίησης έγινε σύμφωνα με το προτεινόμενο πρωτόκολλο της εταιρία Vysis που ήταν ο κύριος προμηθευτής των αντιδραστηρίων. Αναλυτικά τα διάφορα στάδια περιγράφονται παρακάτω.

- **A. Προετοιμασία Δείγματος**

Για τα 8 δείγματα (συνολικά 24 πλακίδια) στα οποία η υβριδοποίηση έγινε στο μονιμοποιημένο καλλιεργητικό υλικό δεν χρειάστηκε το στάδιο της αποπαραφίνωσης και της πρωτεόλυσης. Τα πλακίδια επιστρώθηκαν με το υλικό και αφέθηκαν να στεγνώσουν στον αέρα για 24 ώρες. Μετά από παρατήρηση με μικροσκόπιο σκοτεινού πεδίου σημειωνόταν με υαλογράφο η προς υβριδισμό περιοχή σε κάθε πλακίδιο.

Για τα περισσότερα από τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν τομές μεγέθους 4 μm από το μονιμοποιημένο σε φορμόλη και εγκλεισμένο σε παραφίνη υλικό (block) της βιοψίας. Οι τομές τοποθετήθηκαν σε θετικά φορτισμένες αντικειμενοφόρες πλάκες ακολουθώντας τη συνήθη διαδικασία για την προετοιμασία ιστολογικού παρασκευάσματος (έκταση των τομών σε υδατόλουτρο με απεσταγμένο νερό θερμοκρασίας 40° C, τοποθέτησή τους στη θετική πλευρά της αντικειμενοφόρου και στέγνωμα στον αέρα). Κατόπιν τα πλακίδια με τις τομές έμεναν σε ξηρό κλίβανο θερμοκρασίας 56° C για 4-12 ώρες.

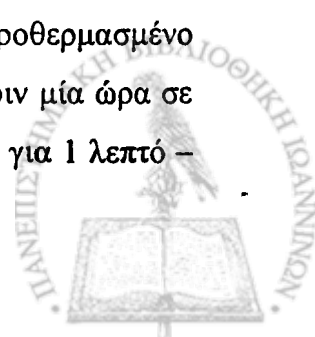
- **B. Αποπαραφίνωση**

Αμέσως μετά ξεκινούσε η διαδικασία της αποπαραφίνωσης που γινόταν σε θερμοκρασία δωματίου και περιελάμβανε: Εμβαπτισμό των πλακιδίων σε ξυλόλη (2 φορές από 10 λεπτά κάθε φορά) και αφυδάτωση με αιθανόλη 100% (δύο φορές από 5 λεπτά). Κατόπιν τα πλακίδια στέγνωναν στον αέρα.

- **Γ. Προεπεξεργασία τομών - Πρωτεόλυση**

Η συνολική διαδικασία έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας (Vysis) που προμήθευσε και τα αντίστοιχα αντιδραστήρια προεπεξεργασίας (pretreatment kit-Vysis, France).

Γίνονταν διαδοχικά τα ακόλουθα: εμβαπτισμός των τομών σε διάλυμα 0.2N HCl για 20 λεπτά – ξέπλυμα σε απεσταγμένο νερό για 3 λεπτά – εμβαπτισμός στο Wash Buffer για 3 λεπτά – εμβαπτισμός για 30 λεπτά στο προθερμασμένο Pretreatment Solution (η προθέρμανση είχε ξεκινήσει τουλάχιστον πριν μία ώρα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 80° C) – ξέπλυμα σε απεσταγμένο νερό για 1 λεπτό –



εμβαπτισμός σε δύο διαφορετικά δοχεία με το ίδιο Wash Buffer για 2 φορές από 5 λεπτά – εμβαπτισμός σε προθερμασμένο Protease Solution (η προθέρμανση είχε ξεκινήσει τουλάχιστον πριν μία ώρα σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37° C) – εκ νέου εμβαπτισμός στα δύο παραπάνω χρησιμοποιηθέντα δοχεία με Wash Buffer για 2 φορές από 5 λεπτά – αφυδάτωση σε διαλύματα ανιούσας αιθανόλης (70%, 85%, 100%), 2 λεπτά σε κάθε στάδιο.

Σε όλα τα παραπάνω στάδια, τα διαλύματα τοποθετούνταν σε δοχεία τύπου Coplin όπου εμβαπτιζόνταν και τα πλακίδια. Το Wash Buffer και το Pretreatment Solution ήταν έτοιμα προς χρήση διαλύματα ενώ το Protease Solution προετοιμαζόταν την ημέρα που θα χρησιμοποιείτο προθερμαίνοντας σε υδατόλουτρο 37° C μία φιάλη των 50 ml Protease Buffer p.H=2 όπου προστίθετο ένα φιαλίδιο (vial) ενζύμου (protease) των 25mg.

Στο τέλος της παραπάνω διαδικασίας, τα πλακίδια στέγνωναν στον αέρα και ήταν έτοιμα για την υβριδοποίηση με κατάλληλο μοριακό ανιχνευτή (ιχνηθέτη).

• Δ. Υβριδοποίηση

Όλοι οι ιχνηθέτες (probes) που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία υβριδοποίησης είχαν προμηθευτεί από την εταιρία Vysis (France).

Για τα γονίδια *ERBB2*, *CCND1*, *MYC* επιλέχθηκαν τα προϊόντα LSI *HER2/neu*, LSI Cyclin D1 και LSI 8q24 αντίστοιχα. Οι ιχνηθέτες ήταν άμεσα σημασμένοι κόκκινα (spectrum orange) στην περιοχή των ογκογονιδίων με κατάλληλο φθορισμικό μόριο, γεγονός που απλοποιεί τη διαδικασία υβριδισμού. Επιπρόσθετα έγινε υβριδοποίηση και του κεντρομεριδίου των χρωμοσωμάτων 17 και 11 όπου ανήκουν τα γονίδια *ERBB2* και *CCND1* αντίστοιχα με ιχνηθέτες σημασμένους πράσινα (spectrum green) οι οποίοι διατίθενται μαζί με τα ογκογονίδια από την παρασκευάστρια εταιρία.

Το τελικό διάλυμα του probe για το *ERBB2* προσφέρεται έτοιμο προς χρήση από την εταιρία ενώ για τα άλλα δύο γονίδια προκύπτει με ανάμειξη 7λ LSI Buffer Solution (Vysis, France) +1λ LSI probe (Vysis, France) +2λ απεσταγμένο νερό. Τα βήματα του υβριδισμού περιγράφονται παρακάτω:

Αφού το τελικό διάλυμα του κάθε probe είχε παραμείνει για 1 περίπου ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, μετά από καλή ανάμειξη για λίγα δευτερόλεπτα με συσκευή vortex και φυγοκέντρηση ήταν έτοιμο προς χρήση. Προστίθεντο 10μl από το διάλυμα του probe (ή και μεγαλύτερη ποσότητα ανάλογα με το μέγεθος της προς εξέταση περιοχής του πλακιδίου) και ακολουθούσε επικάλυψη με γυάλινη

καλυπτρίδα $18 \times 18 \text{ mm}^2$ και στεγανοποίηση με κόλλα. Οι καλυμμένες αντικειμενοφόροι τοποθετούνταν σε θερμαινόμενη πλάκα 85° C για 2-3 λεπτά για ταυτόχρονη αποδιάταξη του DNA του probe και του παρασκευάσματος και κατόπιν παρέμεναν σε κλίβανο 37° C για 12-16 ώρες προστατευμένες από το φως ώστε να ολοκληρωθεί η διαδικασία της υβριδοποίησης.

• **Ε. Έκπλυση μετά την υβριδοποίηση-Αντίχρωση**

Για την έκπλυση της περίσσειας του probe χρησιμοποιείται το Post-Hybridization Wash Buffer που αποτελείτο από 100ml 20xSSC (p.H 5.3) + 897ml απεσταγμένο νερό + 3ml NP-40 (p.H 7-7.5). Το 20xSSC πυκνό διάλυμα γινόταν με 66g 20xSSC + προσθήκη ~ 200ml απεσταγμένου νερού (ρύθμιση p.H 5.3 με προσθήκη HCl) + συμπλήρωση με νερό ως τα 250 ml + φιλτράρισμα με φίλτρο $0.45 \mu\text{m}$. Το 20xSSC καθώς και το απορρυπαντικό NP-40 παρείχοντο από τη Vysis, France.

Τα στάδια της έκπλυσης περιγράφονται παρακάτω:

Το Post-Hybridization Wash Buffer τοποθετείτο σε δύο δοχεία τύπου Coplin και το ένα προθερμαινόταν σε υδατόλουτρο 72° C ενώ το άλλο παρέμενε σε θερμοκρασία δωματίου όπου εμβαπτιζόνταν οι αντικειμενοφόροι για περίπου 1-2 λεπτά αφού είχαν αφαιρεθεί προηγουμένως οι καλυπτρίδες. Τα πλακίδια εμβαπτιζόνταν στη συνέχεια στο δεύτερο δοχείο Coplin εντός του υδατόλουτρου για 2-4 λεπτά. Αφού τα πλακίδια ήταν απολύτως στεγνά, γινόταν αντιχρώση με τη προσθήκη 10 μl DAPI (antifade solution, Vysis) στην περιοχή ενδιαφέροντος. Κατόπιν καλύπτονταν με καλυπτρίδα $22 \times 22 \text{ mm}^2$ και ήταν έτοιμα για μικροσκοπική παρατήρηση.

• **ΣΤ. Μικροσκοπική Παρατήρηση για τη μέτρηση και αξιολόγηση του σήματος υβριδισμού.**

Για τη μικροσκοπική παρατήρηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο φθορισμού (Axiohplan, Zeiss) εφοδιασμένο με λάμπα φθορισμού 100 watt πηγής υδραργύρου και κατάλληλα φίλτρα για την απεικόνιση των πράσινων και κόκκινων σημάτων υβριδισμού. Η απεικόνιση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με κατάλληλο λογισμικό σύστημα (Isis) της εταιρίας Metasystems.

Η καταγραφή και αξιολόγηση των σημάτων υβριδοποίησης έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτόκολλου της εταιρίας Vysis και ακολουθώντας διεθνώς παραδεκτά κριτήρια¹⁸⁵ που αναλυτικώς περιγράφονται παρακάτω:



Ο υβριδοποίηση θεωρείτο επιτυχής αν α) ήταν ομοιόμορφη σε όλη την τομή. Δηλαδή τα σήματα κόκκινο και πράσινο για το γονίδιο και το κεντρομερίδιό του αντίστοιχα, ήταν ίδιας φωτεινότητας, μεγέθους και σχήματος (σφαιρικό ή οβάλ). β) δεν υπήρχε απώλεια γενετικού υλικού δηλαδή οι κυτταρικοί πυρήνες διακρίνονταν εύκολα και ήταν βαμμένοι ομοιόμορφα μπλέ με τη χρώση DAPI γ) το φόντο (background) του παρασκευάσματος ήταν σκούρο μπλέ ή μαύρο και με όσο το δυνατό λιγότερο «θόρυβο» (όχι σωματίδια υβριδισμού, θαμπάδα κ.α).

Συνολικά γινόταν μέτρηση των σημάτων υβριδοποίησης σε 100 πυρήνες και αν αυτό δεν ήταν εφικτό, τουλάχιστον σε 50. Οι πυρήνες δεν έπρεπε να έχουν αλληλοκαλυπτόμενες περιοχές ή τουλάχιστον τα σήματά τους να μην βρίσκονται σε αυτές τις περιοχές. Η μέτρηση των σημάτων γινόταν με τη χρησιμοποίηση καταδυτικού φακού 10X100 και συνήθως σαρωνόταν όλη η τομή.

Σε ένα περιστατικό θεωρείτο ότι υπήρχε γονιδιακή επέκταση αν ο λόγος των συνολικών σημάτων του *ERBB2*, *CCND1* σε σχέση με τα συνολικά κεντρομεριδιακά σήματα του πυρήνα ήταν μεγαλύτερος από 2. Για το *MYC* όπου δεν υπήρχε κεντρομεριδιακή σήμανση, περιστατικό που παρουσίαζε γονιδιακή επέκταση θεωρείτο όποιο είχε πάνω από 4 σήματα σε τουλάχιστον 10% των μετρηθέντων πυρήνων.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Αποτελέσματα Κυτταρογενετικής ανάλυσης

Από τα 81 δείγματα που παρελήφθησαν για κυτταρογενετική ανάλυση καλλιιεργήθηκαν επιτυχώς, δηλαδή έδωσαν αναλύσιμες μεταφάσεις, τα 68. Από τα υπόλοιπα 13 δείγματα, τα 7 (1 ινοκυστική μαστοπάθεια και 6 ινοαδενώματα) δεν κατάφεραν να προσκολληθούν ή να πολλαπλασιαστούν στις φιάλες καλλιέργειας οπότε δεν έδωσαν και μεταφάσεις και τα 6 (1 ινοκυστική μαστοπάθεια και 5 ινοαδενώματα) επιμολύνθηκαν πιθανότερα λόγω μη προσεκτικής λήψης είτε λόγω κακών χειρισμών κατά τη διάρκεια της κυτταροκαλλιέργειας. Από τα 68 περιστατικά που μελετήθηκαν κυτταρογενετικά τα 28 (περίπου το 41%) ευρέθησαν κυτταρογενετικά ανώμαλα. Μεγαλύτερο ποσοστό ανώμαλων περιστατικών παρατηρήθηκε κατά σειρά στους καλοήθεις φυλλοειδείς, κατόπιν στα ινοαδενώματα και τέλος στις κυστικές αλλοιώσεις. Αξιοσημείωτο είναι ότι κυτταρογενετικές ανωμαλίες βρέθηκαν σε όλα τα αναλυθέντα δείγματα, όμως δεν ήταν πάντα κλωνικές.

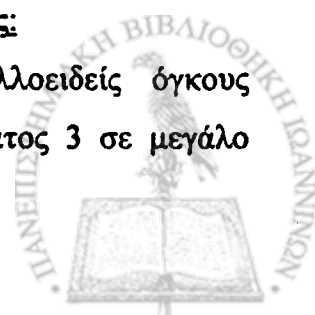
Τα περιστατικά με κυτταρογενετικές ανωμαλίες καθώς και αυτά χωρίς εμφανείς κυτταρογενετικές ανωμαλίες (ομαλά) παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. 5.1 I

Πίνακας 5.1 Αριθμός ανώμαλων και ομαλών δειγμάτων ανά ιστολογική κατηγορία

ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ	ΑΝΩΜΑΛΑ (%)	ΟΜΑΛΑ (%)	ΣΥΝΟΛΟ- (ΜΗ-ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑ)
Ινοαδενώματα/Αδένωμα	21 (40%)	31 (60%)	52 (11)
Κυστική Αλλοίωση/Θήλωμα	4 (33.3%)	8 (66.7%)	12 (2)
Καλοήθεις Φυλλοειδείς	3 (75%)	1 (25%)	4 (0)
ΣΥΝΟΛΟ	28 (41%)	40 (59%)	68 (13)

- Κυτταρογενετικά ευρήματα στους καλοήθεις φυλλοειδείς:

Σε δύο από τους τρεις μελετηθέντες καλοήθεις φυλλοειδείς όγκους παρατηρήθηκαν ελλείψεις του μικρού σκέλους του χρωμοσώματος 3 σε μεγάλο



αριθμό μεταφάσεων (περιπτώσεις 22/96 και 26/96). Το τρίτο δείγμα (205/98) παρουσίασε έλλειψη ενός ολοκλήρου χρωμοσώματος (16) σε τρεις από τις αναλυθείσες μεταφάσεις. Οι καρυότυποι των τριών φυλλοειδών παρουσιάζονται στον αναλυτικό πίνακα 5.1 IV, σελίδες 61-64.

- **Κυτταρογενετικά ευρήματα στις κυστικές αλλοιώσεις :**

Αναλύθηκαν συνολικά 12 περιπτώσεις κυστικών αλλοιώσεων που περιελάμβαναν 7 απλές περιπτώσεις χωρίς υπερπλασία (ινοκυστικές μαστοπάθειες, κυστική ινοαδένωση, ινώδης μαστοπάθεια, κύστη), 4 περιπτώσεις με ήπια υπερπλασία και 1 περίπτωση πολλαπλής θηλωμάτωσης με ατυπία..

Από τις 7 περιπτώσεις απλής κυστικής νόσου, οι 6 είχαν ομαλό καρυότυπο ενώ η μία (71/97) είχε ανώμαλο καρυότυπο παρόμοιο με αυτό του περιστατικού (72/96) που περιγράφεται παρακάτω.

Από τις 4 κυστικές αλλοιώσεις με υπερπλασία, η μία που είχε βρεθεί «σε έδαφος αμαρτώματος» είχε ομαλό καρυότυπο, ενώ οι άλλες τρεις ανώμαλο. Ο καρυότυπος του ενός περιστατικού ήταν υποδιπλοειδικός με αριθμό χρωμοσωμάτων από 37-45 και μονοσωμίες των 1, 3, 18 (περίπτωση 70/96). Το δεύτερο περιστατικό παρουσίασε δομική ανωμαλία και συγκεκριμένα υπήρχε ισοζυγισμένη μετάθεση μεταξύ των χρωμοσωμικών σκελών 4q και 14q σε πέντε μεταφάσεις (135/97) ενώ το τρίτο (72/96) είχε κοινά κυτταρογενετικά στοιχεία με την προαναφερόμενη ανώμαλη απλή κυστική νόσο. Συγκεκριμένα, στους καρυότυπους και των δύο περιστατικών (72/96 και 71/97) υπήρχαν δύο μη σχετιζόμενοι ανώμαλοι κλώνοι, ένας ίδιος και στα δύο δείγματα με κοινή αριθμητική ανωμαλία το +7 και από ένας κλώνος με δομική ανωμαλία που περιελάμβανε μετάθεση μεταξύ των χρωμοσωμικών σκελών 1p και 3q σε διαφορετικά όμως σημεία θραύσης για το κάθε περιστατικό.

Τέλος, η αναλυθείσα περίπτωση θηλωμάτωσης με ατυπία έδειξε ομαλό καρυότυπο.

- **Κυτταρογενετικά ευρήματα στα ινοαδενώματα και αδενώματα**

Τα 51 ινοαδενώματα που μελετήθηκαν κυτταρογενετικά περιελάμβαναν 4 ινοαδενώματα με υπερπλασία του επιθηλιακού στοιχείου, 4 ινοαδενώματα που συνυπήρχαν με κυστική νόσο (ειδικότερα το ένα από τα τέσσερα συνυπήρχε με άτυπη υπερπλασία), 1 ινοαδένωμα με «εστίες εικόνας φυλλοειδούς καλοήθους» και 42 ινοαδενώματα χωρίς κάποιο άλλο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό. Τέλος, υπήρχε και 1 αδένωμα γαλουχίας.



Τα ανώμαλα και τα ομαλά ινοαδενώματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα 5.1/ ενώ ο καρνύτυπος κάθε περιστατικού περιγράφεται στον συνολικό πίνακα 5.1 IV, σελίδες 61-64.

Πίνακας 5.1 II: Αριθμός ανώμαλων και ομαλών δειγμάτων ανά κατηγορία ινοαδενώματος

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΑΝΩΜΑΛΟ (%)	ΟΜΑΛΟ (%)
Ινοαδενώματα με υπερπλασία επιθηλιακού στοιχείου	2 (50%)	2 (50%)
Ινοαδενώματα με συνυπάρχουσα κυστική νόσο	1(25%)	3 (75%)
Ινοαδένωμα με εστίες φυλλοειδούς καλοήθους	1(100%)	0 (0%)
Αδένωμα γαλουχίας	1 (100%)	0 (0%)
Ινοαδενώματα χωρίς άλλο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό	16 (38%)	26 (62%)

Από τα δύο κυτταρογενετικά ανώμαλα ινοαδενώματα που εμφάνιζαν υπερπλασία του επιθηλιακού στοιχείου το ένα παρουσίαζε καρνύτυπο με επιπλέον χρωμοσωμικό υλικό στη ζώνη 1p22 καθώς και μονοσωμία του χρωμοσώματος 7 (περίπτωση 161/98), ενώ το άλλο περιστατικό (244/98) είχε προσθήκη χρωμοσωμικού υλικού αγνώστου προελεύσεως στο σκέλος 17p.

Τα ινοαδενώματα που συνυπήρχαν με κυστικές αλλοιώσεις ήταν ομαλά εκτός από ένα που συνυπήρχε με άτυπη υπερπλασία στις παρυφές καρκινώματος in-situ (CIS) και παρουσίαζε έλλειψη που περιλάμβανε τη περιοχή 1q31q42 σε δύο μεταφάσεις (περίπτωση 127/97).

Το αδένωμα γαλουχίας (95/97) (ο καρνύτύπος του παρουσιάζεται στην εικόνα 5.1, σελίδα 65) καθώς και το ινοαδένωμα με εστίες καλοήθους φυλλοειδούς (258/98) παρουσίασαν και τα δύο καρνύτυπους με επιπλέον χρωμοσώματα από τα οποία κάποια ήταν κοινά και στα δύο περιστατικά (τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 5, 11, 20). Εκτός από αυτές τις τρισωμίες το αδένωμα γαλουχίας παρουσίασε ακόμη τρισωμίες των 8, 10, 18. Το περιστατικό αυτό παρουσίασε κλωνική εξέλιξη (δύο κλώνοι σχετιζόμενοι μεταξύ τους).

Από τα ινοαδενώματα χωρίς άλλο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό, ο καρνύτυπος 7 περιστατικών παρουσίασε μόνο αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Σε τρία περιστατικά παρατηρήθηκαν τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 5, 7, 11, 18, 20. Συγκεκριμένα το ένα περιστατικό είχε δύο σχετιζόμενους μεταξύ τους κλώνους που παρουσίασαν τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 5 και 20 (περίπτωση 141/98). Το δεύτερο περιστατικό παρουσίασε τρισωμία του 11 σε δύο μεταφάσεις (περίπτωση

298/98), ενώ το τρίτο είχε 52 χρωμοσώματα με τρισωμίες των χρωμοσωμάτων 5, 7, 11, 18, 19, 20 (περίπτωση 73/99). Τα υπόλοιπα 4 περιστατικά παρουσίασαν υποδιπλοειδικό καρυότυπο και μονοσωμίες των χρωμοσωμάτων 3, 16 (περίπτωση 69/97), μονοσωμία 8 (περιπτώσεις 73 και 74/99) και μονοσωμία 17 (περιστατικό 115/99).

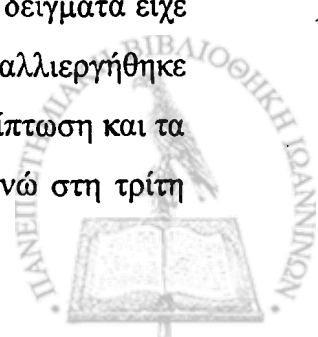
Τρία περιστατικά παρουσίασαν μεταθέσεις. Δύο ινοαδενώματα έδειξαν ισοζυγισμένες μεταθέσεις μεταξύ των χρωμοσωμικών σκελών 4p και 12q (περίπτωση 94/97), 1q και 4p (περίπτωση 141/97) ενώ ένα περιστατικό παρουσίασε μη ισοζυγισμένη μετάθεση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 7p και 13q (περίπτωση 279/98).

Ένα ακόμη περιστατικό με δομική ανακατάταξη ήταν το 267/98 που είχε αναστροφή στο χρωμοσωμικό σκέλος 3q.

Τέσσερα περιστατικά παρουσίασαν ελλείψεις χρωμοσωμικών τμημάτων και συγκεκριμένα εντός του χρωμοσωμικού σκέλους 3p που συνοδευόταν και από αναστροφή στο ίδιο σκέλος (82/96), έλλειψη από το 12q22 μέχρι το τέλος του σκέλους (περίπτωση 156/97), ελλείψεις και στα δύο χρωμοσώματα 10 στο μεγάλο σκέλος (252/98) καθώς και έλλειψη του μικρού σκέλους του χρωμοσώματος 17 (περίπτωση 281/98).

Τέλος ένα περιστατικό παρουσίασε τελομερική σύνδεση μεταξύ των χρωμοσωμάτων 15 και 22 (περίπτωση 249/98).

Από τα 52 συνολικά ινοαδενώματα και αδένωμα που συλλέχθηκαν για κυτταρογενετική ανάλυση 19 βρίσκονταν σε 19 διαφορετικές γυναίκες και 22 ήταν πολλαπλά και αναπτύχθηκαν σε 9 διαφορετικούς ασθενείς (Πίνακας 5.1 III, σελίδα 57). Ένα επιπλέον ινοαδένωμα (134/98) αναπτύχθηκε αμφοτερόπλευρα με υπερπλαστική κυστική νόσο, κυτταρογενετικά ανώμαλη (135/97), αλλά απέτυχε η κυτταροκαλλιέργειά του. Από τις 9 παραπάνω περιπτώσεις οι 8 αφορούσαν ανάπτυξη στον ίδιο μαστό και μία περίπτωση αμφοτερόπλευρη ανάπτυξη. Η αμφοτερόπλευρη ανάπτυξη των δύο ινοαδενωμάτων (περιπτώσεις 229/98 και 230/98) έδειξε ομαλό καρυότυπο και για τα δύο περιστατικά. Σε 3 από τις 8 περιπτώσεις ανάπτυξης ινοαδενωμάτων στον ίδιο μαστό, αφαιρέθηκαν από το κάθε ασθενή τρία ινοαδενώματα. Στη πρώτη περίπτωση το ένα από τα τρία δείγματα είχε ως μόνη ανωμαλία τελομερική σύνδεση (249/98), το άλλο δεν καλλιιεργήθηκε (250/98) και το τρίτο είχε ομαλό καρυότυπο (251/98). Στη δεύτερη περίπτωση και τα τρία δείγματα παρελήφθησαν μολυσμένα (254/98, 255/98, 256/98) ενώ στη τρίτη



περίπτωση ανάπτυξης τριπλού όγκου, τα δύο από τα δείγματα είχαν ομαλό καρυότυπο (114/99, 116/99) και το ένα (115/99) παρουσίασε μονοσωμία του χρωμοσώματος 17. Στις άλλες 5 περιπτώσεις πολλαπλής ανάπτυξης αφαιρέθηκαν 2 όγκοι από κάθε ασθενή. Σε δύο περιπτώσεις ο ένας από τους δύο όγκους του κάθε ασθενή δεν καλλιεργήθηκε (250/98, 284/98) και ο άλλος είχε ομαλό καρυότυπο (251/98, 284/98). Σε δύο περιπτώσεις και οι δύο όγκοι του ίδιου ασθενούς ήταν κυτταρογενετικά ομαλοί (21/99, 22/99 και 229/98, 230/98). Μόνο σε δύο περιπτώσεις και τα δύο ινοαδενώματα κάθε ασθενούς παρουσίασαν ανώμαλο καρυότυπο. Στη μία περίπτωση κάθε ινοαδένωμα είχε καρυότυπο διαφορετικό από το γειτονικό του (94/99 και 95/99) ενώ στην άλλη τα δύο ινοαδενώματα (74/99 και 75/99) εμφάνισαν τους καρυότυπους τους κοινή ανωμαλία την έλλειψη του χρωμοσώματος 8.

Πίνακας 5.1 III: Κυτταρογενετικά ευρήματα στους πολλαπλούς όγκους.

A/A	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΑΝΩΜΑΛΑ (Α) ΟΜΑΛΑ (Ο)	ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ
1	94/97 95/97	A A	Μη σχετιζόμενοι καρυότυποι
2	134/97* 135/97*	- A	Αποτυχία κυτταροκαλλιέργειας για το περιστατικό 134/97
3	229/98* 230/98*	O O	
4	249/98 250/98 251/98	A - O	
5	254/98 255/98 256/98	- - -	Και τα τρία περιστατικά επιμολύνθηκαν κατά τη διάρκεια της κυτταροκαλλιέργειας
6	279/98 280/98	A O	
7	284/98 285/98	- O	
8	21/99 22/99	O O	
9	74/99 75/99	A A	Σχετιζόμενοι καρυότυποι
10	114/99 115/99 116/99	O A O	

Σημείωση: με αστερίσκο (*) σημειώνονται τα αμφοτερόπλευρα περιστατικά.



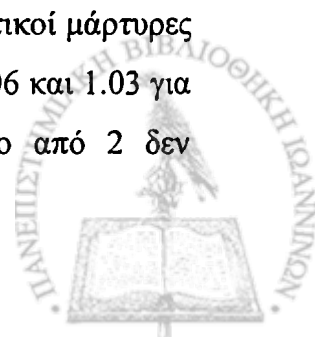
Οι καρυότυποι όλων των αναλυθέντων περιστατικών εμφανίζονται στον αναλυτικό Πίνακα 5.1 IV που ακολουθεί (σελ. 61-64). Συνοπτικά επισημαίνεται ότι τα πιο συχνά εμπλεκόμενα σε δομικές ανωμαλίες χρωμοσώματα ήταν το 3 και το 1 και τα δύο σκέλη τους, ακολουθούσε το 10q, το 4p και το 12q. Πιο συχνές μονοσωμίες παρατηρήθηκαν για τα χρωμοσώματα 8 και 16 ενώ συχνά υπήρχαν τρισωμίες στα χρωμοσώματα 5, 7, 11, 18, 20. Ιδιαίτερα η παρουσία τρισωμίας των χρωμοσωμάτων 5, 11, 20 ήταν η πιο συχνή παρατηρούμενη ανωμαλία και βρέθηκε σε 5 διαφορετικά περιστατικά.

5.2 Αποτελέσματα Μοριακής Κυτταρογενετικής ανάλυσης.

Συνολικά έγινε φθορίζουσα in-situ υβριδοποίηση σε 40 περιστατικά (24 με κυτταρογενετικές ανωμαλίες και 16 χωρίς εμφανείς κυτταρογενετικές ανωμαλίες). Σε ένα περιστατικό (156/97) απέτυχε ολосχερώς η διαδικασία της υβριδοποίησης και για τα τρία γονίδια λόγω ακαταλληλότητας του υλικού του block παραφίνης

Αναλυτικά, για τα *ERBB2* και *MYC* εφαρμόστηκε η τεχνική FISH και στα 40 προαναφερόμενα περιστατικά ενώ για το *CCND1* σε 38 από αυτά. Η υβριδοποίηση περατώθηκε επιτυχώς σε 38/40 (95%) για το *ERBB2*, σε 32/40 (80%) για το *MYC* και σε 35/38 (92%) για το *CCND1*. Σε δύο περιστατικά - μία κυστική αλλοίωση (81/97) και ένα ινοαδένωμα (279/98) απέτυχε η τεχνική FISH για το *ERBB2*, επειδή δεν έγινε εφικτή η μέτρηση σημάτων υβριδισμού σε περισσότερους από 50 πυρήνες. Στο ίδιο ινοαδένωμα (279/98) απέτυχε και η ανίχνευση επαρκών σημάτων για το *CCND1* αφού μετρήθηκαν μόνο 46 πυρήνες. Μικρός ήταν επίσης ο αριθμός των πυρήνων (45) που μετρήθηκαν για το περιστατικό 280/98 σε σχέση με την υβριδοποίηση του *CCND1*. Στον υβριδισμό του *MYC* υπήρξε το μεγαλύτερο ποσοστό αποτυχίας όσον αφορά την υβριδοποίηση, αφού εκτός από το περιστατικό 156/97 απέτυχαν να δώσουν σήματα ακόμη 5 δείγματα (141/98, 222/98, 268/98, 281/98, 285/98) προερχόμενα από μονιμοποιημένο υλικό κυτταροκαλλιέργειας. Σε τρία ακόμη περιστατικά δεν έγινε εφικτή η μέτρηση σήματος για το *MYC* σε περισσότερα από 50 κύτταρα (150/98, 205/98, 71/99).

Στα περιστατικά ομαλού ιστού που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες (controls), ο λόγος των σημάτων ογκογονιδίου/κεντρομερίδιο ήταν 1.06 και 1.03 για το *ERBB2* και το *CCND1*, ενώ οι πυρήνες με λόγο μεγαλύτερο από 2 δεν



ξεπερνούσαν το 3% και 4% αντίστοιχα. Για το *MYC* που δεν υπήρχε κεντρομεριδιακή σήμανση το ποσοστό των κυττάρων με περισσότερα από 4 σήματα ανά πυρήνα ήταν 4%. Ο υβριδισμός για το θετικό μάρτυρα του γονιδίου *ERBB2* έδειξε λόγο 2.8 σε ποσοστό 65% των κυττάρων.

Ανιχνεύτηκαν τρεις περιπτώσεις γονιδιακής επέκτασης, δύο φορές για το *CCND1* και μία φορά για το *MYC*, συνολικά σε δύο ινοαδενώματα. Σε ένα περιστατικό (75/99) ανιχνεύτηκε γονιδιακή επέκταση για το *CCND1* και σε ένα ακόμη ινοαδένωμα (127/98) παρατηρήθηκε ταυτόχρονη γονιδιακή επέκταση και για τα δύο προαναφερόμενα ογκογονίδια (εικόνα 5.2, σελίδα 66). Κανένα περιστατικό κυστικής νόσου ή καλοήθους φυλλοειδούς δεν παρουσίασε γονιδιακή επέκταση.

Επιπροσθέτως, σε κάποια δείγματα παρουσιάστηκε αυξημένος λόγος σήματος ογκογονιδίου/κεντρομερίδιο (1.3-1.6) για το *ERBB2* και το *CCND1*, σε σημαντικό ποσοστό (12-28%) των πυρήνων τους σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες. Τα περιστατικά αυτά ήταν όλα ινοαδενώματα, 2 για το *ERBB2* (141/97-εικόνα 5.2, 229/98) και 7 για το *CCND1* (67/97, 94/97, 267/98, 17/99, 21/99, 73/99, 74/99). Από τα 9 αυτά περιστατικά τα 5 ήταν κυτταρογενετικά ανώμαλα.

Τα αποτελέσματα της μοριακής κυτταρογενετικής ανάλυσης φαίνονται στο συνοπτικό πίνακα 5.1 IV, σελ.61-64.

Από τα περιστατικά πολλαπλών όγκων από ίδιες ασθενείς, στον ίδιο μαστό ή αμφοτερόπλευρα έγινε μελέτη FISH σε 12 από αυτά (6 ζεύγη). Σε δύο (279/98, 280/98) υπήρξε μερική αποτυχία της τεχνικής αφού δεν υπήρξαν αξιόπιστα αποτελέσματα για όλα τα γονίδια. Ορισμένα περιστατικά παρουσίασαν πυρήνες με αυξημένο σήμα για το *CCND1* και για τα δύο δείγματα του ίδιου ασθενούς (21-22/99), άλλα ζεύγη δεν έδειξαν αυξημένο σήμα για κανένα ογκογονίδιο (249-251/98) και τα περισσότερα εμφάνισαν αυξημένο σήμα για ένα από τα δύο δείγματα του ίδιου ασθενούς είτε για το *CCND1* (94-95/97, 21-22/99) είτε για το *ERBB2* (229-230/98).

Στον πίνακα 5.2 I της επόμενης σελίδας φαίνονται τα αποτελέσματα της υβριδοποίησης στους πολλαπλούς όγκους σε σύγκριση με κυτταρογενετικά στοιχεία που συνάγονται από τον καρυότυπό τους.



Πίνακας 5.2I: Σύγκριση αποτελεσμάτων Φθορίζουσας Υβριδοποίησης και Κυτταρογενετικής Ανάλυσης στους πολλαπλούς όγκους.

ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΕΡΙΣΤΑΤΙΚΟΥ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ FISH <i>ERBB2/CCND1/MYC</i>	ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ
I. 94/97	Φ/+/Φ	t(4;12)
95/97 (ίδιος μαστός)	Φ/Φ/Φ	τρισωμίες 5, 8,10,11,18,20
II. 229/98	+/Φ/Φ	Ομαλός
230/98 (αμφοτερόπλευρα)	Φ/Φ/Φ	Ομαλός
III. 249/98	Φ/Φ/Φ	tas (15;22)
251/98 (ίδιος μαστός)	Φ/Φ/Φ	Ομαλός
IV. 279-280/98 (ίδιος μαστός)	-/-/Φ	der (7)t(7;13)
	Φ/-/Φ	Ομαλός
V. 21/99	Φ/+/Φ	Ομαλός
22/99 (ίδιος μαστός)	Φ/Φ/Φ	Ομαλός
VI. 74/99	Φ/+/Φ	Μονοσωμία #8
75/99 (ίδιος μαστός)	Φ/+/Φ	Μονοσωμία #8

Φ = φυσιολογικό σήμα, (+) = αυξημένο σήμα, (-) = αποτυχία υβριδισμού. Τα σύμβολα στη μεσαία στήλη αναφέρονται κατά σειρά στα γονίδια *ERBB2*, *CCND1*, *MYC*.



Πίνακας 5.1.IV: Αποτελέσματα μοριακής και κυτταρογενετικής ανάλυσης

Α/Α	N0	ΜΔ	Η	ΙΕ	ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ	FISH		
						ERBB2	CCND1	MYC
1	022/96	21		ΚΦ	46,XX,del(3)(p12p14)[25]/46,XX[64]			
2	026/96	46		ΚΦ	46,XX,del(3)(p21p23)[32]/46,XX[179]			
3	038/96		40	INA	46,XX [78]			
4	067/96			ΚΑ	46,XX[55]			
5	068/96			ΚΑ	46,XX[62]			
6	069/96			ΚΑ	46,XX[44]			
7	070/96		44	ΚΑ(Y)	37-45,XX,-1,-3,-18[cp5]/46,XX[55]			
8	071/96			ΚΑ	46,XX[47]			
9	072/96		52	ΚΑ(Y)	47,XX,+7[10]/46,XX,t(1;3)(p31;q24)[5]/46,XX[52]			
10	080/96			INA	46,XX[68]			
11	081/96			INA	46,XX[71]			
12	082/96		54	INA	46,XX,del(3)(p12p21)inv(3)(p25p21)[24]/46,XX[4]			
13	009/97	29	61	ΚΑ	46,XX,[12]			
14	067/97	85	56	INA	46,XX [60]	2% ¹ - 1.04 ² (94) ³	25% - 1.45 (95)	1% (71)
15	069/97	26	24	INA	42-45,XX,-3,-16 [cp 5]/46,XX[50]	10% - 1.35 (123)	7.5% - 1.20 (71)	0% (77)
16	071/97	40	52	ΚΑ	46,XX,t(1;3)(p13;q21) [9]/47,XX,+7[8]/46,XX [145]	2% - 1.03 (95)	6% - 1.15 (53)	4% (54)
17	076/97	14		ΚΑ(Y)	-			
18	078/97			INA	-			
19	080/97	20	33	INA	46,XX, [48]			
20	081/97	40	32	ΚΑ	46,XX [72]	4% - 1.05 (47)		1% (55)
21	090/97	50		ΚΑ	-			
22	094/97 ^a	40	22	INA	46,XX,t(4;12)(p16;q15)[23]/46,XX [112]	8% - 1.20 (180)	15% - 1.30 (107)	1% (109)

Πίνακας 5.1.IV: Αποτελέσματα μοριακής και κυτταρογενετικής ανάλυσης

23	095/97 ^a	30	22	INA ^y	52,XX,+5,+8,+10,+11,+18,+20[33]/ 52,XX,ident(10;20)(q23;p12)[19]/46,XX[12]	7%- 1.12 (100)	7.5% - 1.15 (95)	1.5% (78)
24	127/97		38	INA/YA/CIS	46,XX,del(1)(q31q42)[2]/46,XX,[138]	0%- 1.08 (86)	51% - 2.35 (68)	31% (97)
25	134/97 ^b	40		INA	-			
26	135/97 ^b	9		KA(Y)	46,XX t(4;14)(q27;q22)[5]/46,XX[39]	4%- 1.12 (94)	5% - 1.15 (75)	5.5% (77)
27	137/97	6	34	KA/AM	46,XX [85]	6%- 1.15 (104)	0%- 1.02 (64)	0% (50)
28	141/97	10	32	INA	46,XX,t(1;4)(q23;p15.1)[26]/46,XX[165]	19% - 1.50 (125)	0% - 1.06 (121)	05 (265)
29	156/97	13	38	INA	46,XX,del(12)(q22) [2]/46,XX[60]	-	-	-
30	119/98	30	22	INA(Y)	46,XX[70]			
31	121/98	20	24	INA(Y)	46,XX[71]			
32	141/98	30	65	INA	47,XX,+20[26]/48,XX,ident+5[10]/46,XX[25]	1%- 1.02 (134)	2% - 1.00 (86)	-
33	148/98	30	46	INA	46,XX[22]			
34	150/98	30	27	INA	46,XX[19]	0%- 1.10 (77)	0% - 1.00 (85)	0% (29)
35	161/98	30	18	INA(Y)	46,XX,+add(1)(p22),-7[4]/46,XX[25]			
36	165/98	25	28	INA	46,XX[48]	7%- 1.20 (124)	2.5% - 0.99 (120)	3% (132)
37	205/98	85	54	KΦ	45,XX,-16[3]/46,XX[130]	0%- 1.02 (128)	5% - 1.05 (56)	0% (29)
38	222/98	25	21	INA	46,XX[61]	0%- 0.95 (65)	0% - 1.05 (104)	-
39	228/98	18	58	INA	46,XX[82]	7.5%- 1.20 (80)	7% - 1.20 (73)	0% (73)
40	229/98 ^b	40	29	INA	46,XX[97]	19% - 1.55 (115)	0% - 0.95 (81)	1% (98)
41	230/98 ^b	23	29	INA	46,XX[70]	7%- 1.15 (99)	2% - 1.10 (92)	1.5% (63)
42	244/98	22	22	INA(Y)	46,XX,der(?)t(1;17)(?;p11)[3]/46,XX[72]	3%- 1.05 (94)	9% - 1.19 (71)	0% (54)
43	249/98 ^a	15		INA	46,XX,tas(15;22)(p11.2;p11.2)[15]/46,XX[32]	2.5%- 1.12 (118)	1.5% - 1.02 (131)	0% (159)
44	250/98 ^a	12		INA	-			
45	251/98 ^a	8		INA	46,XX[8]	1%- 0.97 (112)	0% - 1.08 (99)	0% (177)
46	252/98	40	34	INA	46,XX,del(10)(q22q24),der(10)del(p11)add(1)(q11)[3]/ 46,XX[18]			

47	254/98			INA	-				
48	255/98			INA	-				
49	256/98			INA	-				
50	258/98	42	49	INA ⁶	49,XX,+5,+11,+20 22 /46,XX 46	0% - 1.04 (128)	3.5% - 0.80 (79)	3% (66)	
51	260/98			INA	-				
52	267/98	30	25	INA	46,XX,inv(3)(q13.2q21) 3 /46,XX 162	3% - 1.11 (181)	27% - 1.60 (74)	7% (110)	
53	268/98			INA	46,XX[40]	0% - 1.03 (71)	4% - 1.05 (71)	-	
54	279/98 ^a	30	38	INA	46,XX,der(7)(t(7;13)(p10;q10) 3 /46,XX 132	0% - 1.10 (20)	6.5% - 1.20 (46)	2% (57)	
55	280/98 ^a	80	38	INA	46,XX 102	8% - 1.15 (75)	2% - 1.05 (45)	0% (60)	
56	281/98	15	18	INA	46,XX,del(17)(p13) 4 /46,XX 78	0% - 1.10 (138)	2% - 1.05 (96)	-	
57	284/98 ^a	42	41	INA(KA)	-				
58	285/98 ^a	38	41	INA(KA)	46,XX[73]	2% - 0.99 (93)	2.5% - 1.08 (73)	-	
59	297/98			INA	-				
60	298/98	32	40	INA	47,XX,+11 2 /46,XX 15	2% - 1.10 (109)	4% - 1.15 (77)	0% (93)	
61	017/99	25	40	INA(KA)	46,XX[69]	5% - 1.15 (94)	14% - 1.48 (56)	9% (101)	
62	021/99 ^a	35	24	INA	46,XX[6]	6% - 1.20 (103)	12% - 1.35 (94)	7% (52)	
63	022/99 ^a	36	24	INA	46,XX[39]	7% - 1.20 (103)	9.5% - 1.25 (84)	3% (99)	
64	023/99	43	50	Θ(YA,T)	46,XX[18]	0% - 0.90 (99)		0% (96)	
65	024/99	38	23	INA	46,XX[22]				
66	052/99	50	19	INA	46,XX[5]				
67	071/99		27	INA	46,XX[48]	1.5% - 1.10 (71)	5% - 1.15 (51)	8% (24)	
68	073/99	17	24	INA	52,XX,+5,+7,+11,+18,+19,+20 13 /46,XX 30	1% - 1.14 (94)	11.5% - 1.38 (52)	0% (50)	
69	074/99 ^a	42	36	INA	41-45,XX,-8 cp4 /46,XX 38	3% - 1.15 (103)	18.5% - 1.50 (60)	4.5% (110)	
70	075/99 ^a	39	36	INA	43-44,XX,-8 cp4 /46,XX 52	0% - 0.99 (73)	28% - 2.15 (64)	0% (79)	
71	079/99	90	41	INA	46,XX [48]	3% - 1.05 (66)	5% - 1.05 (61)	0% (56)	
72	080/99		44	INA(KA(Y)	46,XX[32]	4% - 1.05 (142)	0% - 1.05 (83)	1% (131)	
73	114/99 ^a	44	19	INA	46,XX[28]				

Πίνακας 5.1.IV: Αποτελέσματα μοριακής και κυτταρογενετικής ανάλυσης

74	115/99 ^a	41	19	INA	35-44,XX,-17[cp4]/46,XX[86]		
75	116/99 ^a	36	19	INA	46,XX[44]		
76	142/99		24	INA	46,XX[98]		
77	225/99	55	19	INA	-		
78	53/01		32	KΦ	46,XX[18]		
79	55/01		47	INA	46,XX [6]		
80	64/01		48	INA	-		
81	65/01		29	INA	46,XX [12]		

Συντομογραφίες:

A/A= αύξων αριθμός, N0=αριθμός εργαστηρίου, MΔ=μέγιστη διάμετρος δείγματος σε χιλιοστόμετρα, H=ηλικία ασθενούς
IE=αποτελεσμα ιστολογικής εξέτασης.

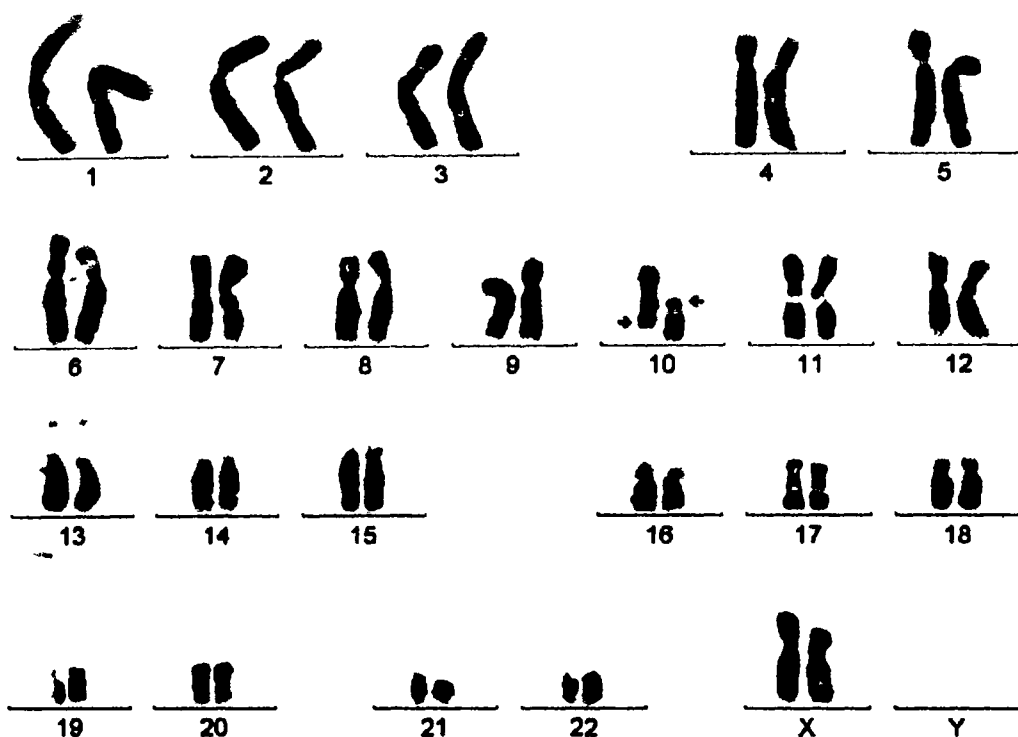
KΦ= καλοήθης φυλλοειδής, KA= Κυστική Νόσος-Αλλοίωση, INA= Ινοαδένωμα με υπερπλασία επιθηλιακού στοιχείου, Y=υπερπλασία, A=άτυπη μορφή, T=τυπική μορφή, ()=τα γραφόμενα εντός, εμπεριέχονται στον ιστολογικό τύπο που εμφανίζεται πριν την παρένθεση, (/)= τα γραφόμενα μετά συνυπάρχουν αλλά ο κύριος ιστολογικός τύπος είναι αυτός που έχει γραφεί πρώτος, CIS=καρκίνωμα in-situ, Θ=πολλαπλή θηλομάτωση, AM=Αμάρτωμα.

^a=το δείγμα προέρχεται από τον ίδιο μαστό της ίδιας ασθενούς, ^p=το δείγμα προέρχεται από διαφορετικό μαστό της ίδιας ασθενούς, γ= INA γαλουχίας ^δ=με εστίες φυλλοειδούς.

Στις στήλες των ογκογονιδίων ο πρώτος αριθμός¹ αφορά ποσοστό πυρήνων με γονιδιακή επέκταση, ο δεύτερος αριθμός² (για τα ERBB2 και CCND1) αφορά το λόγο των σημμάτων προς κεντρομερίδιο και ο αριθμός³ σε παρένθεση το συνολικό αριθμό μετρηθέντων πυρήνων.

(-)= τεχνική αποτυχία στο συγκεκριμένο δείγμα

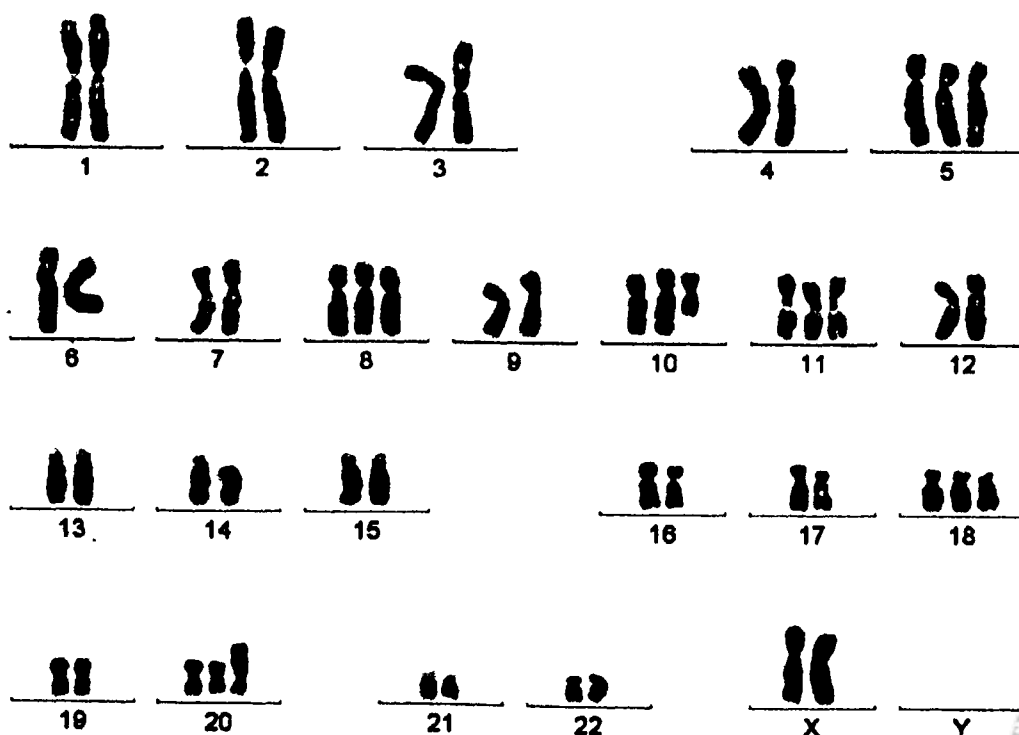


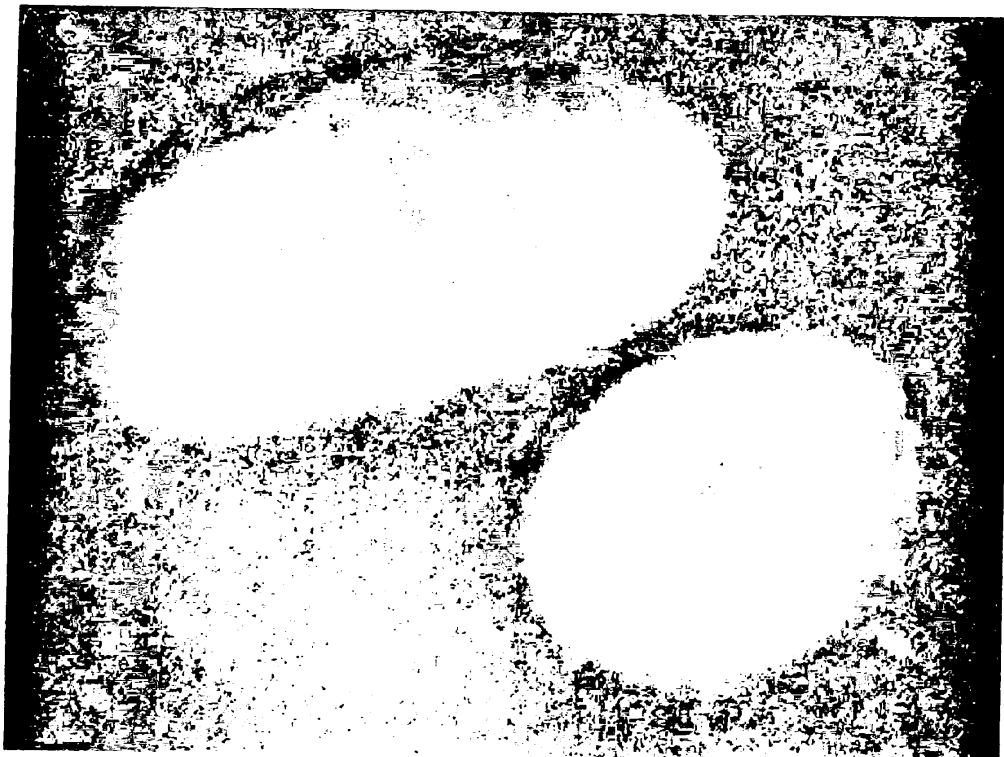


Εικόνα 5.1: Ανώμαλοι καρνότυποι της παρούσης μελέτης.

Πάνω: Ελλείψεις και για τα δύο ομόλογα χρωμοσώματα 10 (περιστατικό 252/98).

Κάτω: Υπερδιπλοειδικός καρνότυπος με τρισωμίες και ισοζυγισμένη μετάθεση (10;20) (περιστατικό 95/97).





ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η διδακτορική αυτή διατριβή είχε στόχο την προσέγγιση και κατά το δυνατόν ερμηνεία της βιολογικής συμπεριφοράς των καλοήθων νεοπλασμάτων του μαστού μέσω της μελέτης των γενετικών ευρημάτων. Η συσχέτιση με ανάλογα ευρήματα στα καρκινώματα του μαστού είναι απαραίτητη έτσι ώστε να αποφευχθεί η αποσπασματικότητα, η μονομέρεια και η αναγωγή (αφαίρεση), αντιθέτως δέ να εξετασθεί συνολικά η ογκογένεση στο μαστό. Στο πλαίσιο αυτής της συγκριτικής θεώρησης των αποτελεσμάτων κινείται η συζήτηση που ακολουθεί.

6.1 Κυτταρογενετικά ευρήματα

- Ποσοστό περιστατικών με κυτταρογενετικές ανωμαλίες – συσχέτιση με ανάλογα ευρήματα στα καρκινώματα

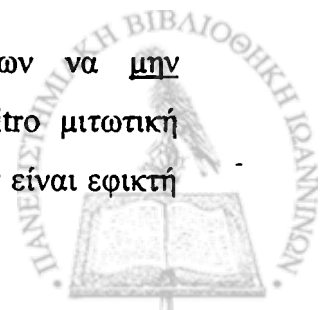
Από τα περιστατικά που συγκεντρώθηκαν για κυτταρογενετική ανάλυση χωρίς να συμπεριλαμβάνονται αυτά που μολύνθηκε ή απέτυχε η κυτταροκαλλιέργεια, τα ποσοστά των περιπτώσεων που παρουσίαζαν κυτταρογενετικές ανωμαλίες ήταν 75% για τους καλοήθεις φυλλοειδείς, 33.5% για τις κυστικές αλλοιώσεις και 40% για τα ινοαδενώματα. Το τελικό ποσοστό περιστατικών με κυτταρογενετικές ανωμαλίες ανεξάρτητα ιστολογικού τύπου ήταν περίπου 41%. Τα αποτελέσματα αυτά κινούνται στα πλαίσια των διεθνών αναφορών^{157,185,186} με ελαφρά αυξημένο το ποσοστό των ανώμαλων ινοαδενωμάτων της παρούσης μελέτης.

Σημαντικός παράγοντας που συνετέλεσε στην επιτυχία ήταν ο τρόπος καλλιέργειας κατά Pandis et al, 1992⁸⁷ που προάγει την καλλιέργεια των επιθηλιακών κυττάρων και με την κλασματοποίηση επιτυγχάνει αδρά το διαχωρισμό επιθηλιακού και μεσεγχυματογενούς στοιχείου. Επίσης η χρησιμοποίηση, για τους διφασικούς όγκους, της τροποποιημένης τεχνικής κατά Dietrich et al, 1994¹⁸² αυξάνει την περιεκτικότητα σε μεσεγχυματικά κύτταρα των αντιστοιχών κλασμάτων. Ένας ακόμη λόγος που ενίσχυσε τη λήψη ανώμαλων καρυοτύπων μπορεί να θεωρηθεί η παραλαβή των

περισσότερων δειγμάτων από το Παθολογοανατομικό Εργαστήριο. Στα 12 δείγματα που παρελήφθησαν από το Χειρουργείο υπήρχαν κυτταρογενετικές ανωμαλίες στα 3 δηλαδή στο 25% ενώ στα 56 καλλιεργηθέντα που προήλθαν από το Παθολογοανατομικό Εργαστήριο στα 25 (45%). Συνολικά το 35% των δειγμάτων με κυτταρογενετικές ανωμαλίες προήλθε από το Χειρουργείο και το 65% από το Παθολογοανατομικό Εργαστήριο. Είναι εμφανές ότι δείγματα που έχουν προηγουμένως εξεταστεί και επιλεγεί από Παθολογοανατόμο είχαν μεγαλύτερη πιθανότητα να αποτελούν τμήμα του όγκου αυξάνοντας το ποσοστό ανώμαλων κυττάρων ενώ τα αντίστοιχα δείγματα του Χειρουργείου αντιθέτως. Ίσως αυτό το ποσοστό να ήταν ακόμη μεγαλύτερο αν κάποια δείγματα δεν επιμολύνονταν είτε κατά την παραλαβή τους είτε κατά τη διάρκεια των χειρισμών κυτταροκαλλιέργειας. Το πιθανότερο είναι η μόλυνση να προήλθε από το Παθολογοανατομικό Εργαστήριο κατά την εξέταση και κοπή των δειγμάτων αφού όλα τα μολυσμένα δείγματα είχαν παραληφθεί από εκεί. Αυτό είναι και το κυριότερο μειονέκτημα της συλλογής δειγμάτων από το υλικό ιστολογικής εξέτασης αφού δεν επικρατούν εκεί οι άσηπτες συνθήκες του Χειρουργείου. Επομένως σημαντικός παράγοντας για τη λήψη κυττάρων με ανωμαλίες αποτελεί η προσεκτική σχεδίαση της ακολουθούμενης τεχνικής και ο υπολογισμός των επί μέρους παραμέτρων ώστε να έχουμε κάθε φορά το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα³¹. Σε σχέση με τους κακοήθεις όγκους του μαστού όπου έχει χρησιμοποιηθεί ή ίδια τεχνική μεθοδολογία τα ποσοστά των καλοήθων περιστατικών με καρυοτυπικές ανωμαλίες παραμένουν σημαντικά χαμηλότερα. Πράγματι, στα καρκινώματα το ποσοστό των περιστατικών με εμφανείς κυτταρογενετικές ανωμαλίες ξεπερνούσε το 80%^{87,91,100}. Το διαφορετικό αυτό ποσοστό επιτυχίας θα πρέπει, αν εξαιρεθούν μικροδιαφορές στους χειρισμούς της τεχνικής από συγκεκριμένο άτομο, να αποδοθεί σε τρεις διαφορετικούς και συμπληρωματικούς μεταξύ τους λόγους.

1) οι καλοήθεις όγκοι φαίνεται ότι σε σχέση με τα καρκινώματα έχουν μικρότερου βαθμού μιτωτική δραστηριότητα επομένως από ένα περιστατικό λαμβάνονται συνολικά λιγότερες μεταφάσεις άρα και λιγότερες ανώμαλες μεταφάσεις.

2) είναι δυνατόν τα κύτταρα των καλοήθων όγκων να μην ανταποκρίνονται ικανοποιητικά στην καλλιέργεια έτσι η in-vitro μιτωτική δραστηριότητα να είναι περιορισμένη έως μηδενική ώστε να μην είναι εφικτή



η συγκομιδή μιτώσεων του όγκου. Κάτι ανάλογο έχει παρατηρηθεί σε καρκινώματα τα οποία ενώ εμφάνιζαν φυσιολογικό καρυότυπο, η προσέγγισή τους με την τεχνική του συγκριτικού γενομικού (CGH) έδειξε ότι γενετικές ανωμαλίες υπήρχαν αλλά ήταν μη ανιχνεύσιμες κυτταρογενετικά λόγω χαμηλής μιτωτικής δραστηριότητας in-vivo και in-vitro ¹¹³.

3) τέλος μία τρίτη πιθανότητα είναι να υπάρχουν υπομικροσκοπικές γενετικές αλλαγές στις μεταφάσεις που αναλύθηκαν και οι οποίες δεν είναι κυτταρογενετικά ανιχνεύσιμες αφού στο χρωμοσωμικό επίπεδο το μικρότερο ανιχνεύσιμο έλλειμα ή ανακατατάξη είναι περίπου 4-5 Mb.

Εκτός από τα μικρότερα ποσοστά κυτταρογενετικά ανώμαλων καλοήθων περιστατικών σε σχέση με τα καρκινώματα, παρατηρήθηκαν λιγότερες και απλούστερες χρωμοσωμικές ανωμαλίες ανά περιστατικό και ο αριθμός των χρωμοσωμάτων τους παρουσιάζει, συνήθως, μόνο μικρές αποκλίσεις από τη διπλοειδία. Αντίθετα στα καρκινώματα σημαντικό ποσοστό των περιστατικών παρουσιάζει πολύπλοκους καρυότυπους και ο αριθμός των χρωμοσωμάτων μπορεί να κυμαίνεται από 29-211 χρωμοσώματα¹⁰⁰. Η παρατηρούμενη διακύμανση του χρωμοσωμικού αριθμού και των απλών έως πολύπλοκων καρυοτύπων στα καρκινώματα του μαστού δεν είναι τυχαία αλλά συνδέεται με κλινικοπαθολογικούς παραμέτρους αυξανόμενης κακοήθειας¹⁰². Παρόμοια κυτταρογενετικά ευρήματα στους φυλλοειδείς όγκους του μαστού αναφέρουν ότι η πολυπλοκότητα είναι ένδειξη κακοήθειας¹⁵⁷. Εξ'άλλου μελέτες σε υπερπλασίες και προκαρκινικές αλλοιώσεις του μαστού με FISH συσχετίζουν τη βαθμιαία ιστολογική αλλαγή προς τη κακοήθεια με αυξήσεις ή μειώσεις στον αριθμό των χρωμοσωμικών αντιγράφων^{168,187}.

Φαίνεται επομένως ότι στους καλοήθεις όγκους τα φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά αντανakλούν ένα γονότυπο καλοήθους προτύπου (pattern) που περιέχει λιγότερες και ηπιότερες χρωμοσωμικές ανακατατάξεις σε σχέση με τα καρκινώματα.

- Κοινές χρωμοσωμικές ανωμαλίες της παρούσης εργασίας με ανάλογα ευρήματα στους καλοήθεις όγκους άλλων μελετών αλλά και στα καρκινώματα:

Κάποια από τα χρωμοσωμικά χαρακτηριστικά των καλοήθων παθήσεων που βρέθηκαν στη παρούσα μελέτη έχουν αναφερθεί στα καρκινώματα του



μαστού αλλά και σε ανάλογες εργασίες καλοήθων όγκων. Τα πιο συνήθη από αυτά τα χαρακτηριστικά αναφέρονται παρακάτω:

1. Ελλείψεις εντός του χρωμοσωμικού σκέλους 3p.

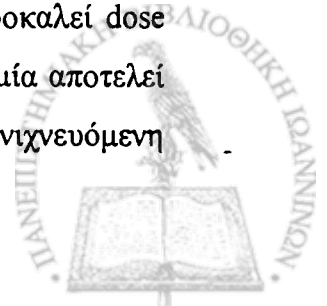
Οι ελλείψεις σε αυτές τις περιοχές αποτελούν συχνό χρωμοσωμικό εύρημα στα καρκινώματα. Ιδιαίτερα οι ελλείψεις γύρω από τη χρωμοσωμική ζώνη 3p14 αποτελούν τη πιο συχνή (10%) δομική ανωμαλία στα καρκινώματα του μαστού⁹². Η προαναφερόμενη έλλειψη έχει ανιχνευτεί επίσης σε μελέτες Απώλειας της Ετεροζυγωτίας (LOH) στα καρκινώματα^{188,189}. Η επαναλαμβανόμενη έλλειψη συγκεκριμένου χρωμοσωμικού τμήματος αποτελεί περιοχή προς εξέταση για τη χαρτογράφηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Στη συγκεκριμένη περίπτωση υποψήφιο ογκοκατασταλτικό γονίδιο που υπάρχει στη χρωμοσωμική περιοχή 3p είναι το *FHIT* που έχει βρεθεί, με μοριακές τεχνικές, να εκλείπει στα καρκινώματα του μαστού και άλλων κακοήθων νεοπλασιών¹⁹⁰ αλλά και σε καλοήθεις υπερπλαστικές αλλοιώσεις που παρουσιάζουν κυτταρογενετικές ανακατατάξεις της ίδιας περιοχής (3p)¹⁹¹.

2. Μονοσωμίες του χρωμοσώματος 17 και ελλείψεις εντός του χρωμοσωμικού σκέλους 17p.

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκαν τέτοιου είδους ελλείψεις και αναφέρονται αναλυτικά παρακάτω (βλέπε ευρήματα στα ινοαδενώματα). Μονοσωμία του χρωμοσώματος 17 έχει αναφερθεί σε ινοαδένωμα από Ozisik και συνεργάτες¹⁵⁶. Η έλλειψη στη χρωμοσωμική περιοχή 17p11~13 είναι συχνό κυτταρογενετικό εύρημα (14%) στα καρκινώματα του μαστού¹⁰⁰. Στη περιοχή 17p13 ως γνωστό τοποθετείται το γονίδιο *TP53* που θεωρείται ένα από τα “κρίσιμα” γονίδια για το καρκίνο του μαστού¹⁹² αλλά και άλλων όγκων. Μεταλλαγές του γονιδίου *P53* έχουν ήδη αναφερθεί και σε καλοήθεις όγκους του μαστού¹⁹³.

3. Επιπλέον χρωμοσωμικά αντίγραφα του 1q.

Η τρισωμία του χρωμοσωμικού σκέλους 1q αν και δεν παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία, έχει εν τούτοις εντοπισθεί σε καλοήθεις αλλοιώσεις όπως ινοαδένωμα, ινοκυστική μαστοπάθεια και καλοήθεις φυλλοειδείς από άλλους ερευνητές^{157,182,185}. Παρόλο που δεν είναι γνωστός μέχρι σήμερα ο ακριβής ρόλος της στην καρκινογένεση του μαστού, πιθανόν προκαλεί dose effect (αποτέλεσμα δόσης). Είναι αξιοσημείωτο ότι αυτή η τρισωμία αποτελεί μία από τις συχνότερες χρωμοσωμικές ανωμαλίες του μαστού ανιχνευόμενη



σταθερά με όλες τις τεχνικές προσεγγίσεις¹⁵⁹ (Κυτταρογενετική, LOH καθώς και CGH). Ο λόγος της απουσίας της ανωμαλίας αυτής μεταξύ των αποτελεσμάτων της μελέτης πιθανόν οφείλεται στους ίδιους λόγους που ερμηνεύουν τα σχετικά μικρά, σε σχέση με τα καρκινώματα, ποσοστά ανώμαλων καρυοτύπων, σε συνδυασμό με τον αριθμό των δειγμάτων παρά σε υποτιθέμενη γενετική γεωγραφική ετερογένεια.

4. Αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες: +7, +8, +18, +20.

Οι τρισωμίες +7, +8, +18, +20 που ανιχνεύτηκαν σε αυτή την εργασία έχουν ήδη εντοπιστεί σε καλοήθεις όγκους από άλλους ερευνητές^{157,186,194}. Οι ανωμαλίες αυτές έχουν επίσης εντοπιστεί και σε καρκινώματα του μαστού και έχουν χαρακτηριστεί ως πρωτογενείς αριθμητικές ανωμαλίες. Ειδικότερα το +7, +18 αποτελούν τις πιο συχνές αριθμητικές ανωμαλίες που εμφανίζονται ως μοναδικές ανωμαλίες σε καρυότυπους καρκινωμάτων του μαστού¹⁰⁰. Η τρισωμία 7 αποτελεί συχνό κυτταρογενετικό εύρημα στους περισσότερους τύπους κακοήθων συμπαγών όγκων¹⁹⁵.

Οι παραπάνω αναφερθείσες χρωμοσωμικές ανωμαλίες υποστηρίζεται ότι μάλλον σχετίζονται με την υπερπλαστική διεργασία παρά με την καρκινική εξαλλαγή¹⁹⁶ και αυτό γιατί αφενός μεν έχουν εντοπισθεί ως μοναδικές αλλαγές στα καρκινώματα αφετέρου ανιχνεύονται και στους καλοήθεις όγκους γενονός που υποδεικνύει ότι αυτές οι κυτταρογενετικές αλλαγές είναι πρώιμες.

5. Πολυκλωνικότητα

Παράλληλοι κυτταρογενετικά μη σχετιζόμενοι μεταξύ τους κλώνοι εμφανίζονται σε σημαντικό ποσοστό καρκινωμάτων του μαστού¹⁰⁴ και ήταν εύρημα κυστικών αλλοιώσεων αυτής της εργασίας όπως και ανάλογων εργασιών τους καλοήθεις διφασικούς όγκους^{186,191,197}. Η συχνότητα παρουσίας κυτταρογενετικά πολυκλωνικών καλοήθων όγκων ήταν περίπου 3%, δηλαδή σημαντικά μικρότερη από αυτή των καρκινωμάτων. Δυο πιθανές εξηγήσεις μπορούν να ερμηνεύσουν αυτό το γεγονός: I) η μία αφορά τις δυνατότητες που προσφέρει η κυτταρογενετική μεθοδολογία και II) η άλλη τη χρονική στιγμή που παρουσιάζονται οι παρατηρούμενες αλλαγές (διαφορετικοί κλώνοι).

I) όπως προαναφέρθηκε, η κυτταρογενετική ανάλυση επιτρέπει την ανίχνευση ανωμαλιών μόνο σε διαιρούμενα κύτταρα κατά τη φάση της μετάφασης. Επομένως η μικρότερη μιτωτική δραστηριότητα που πιθανόν παρουσιάζουν οι καλοήθεις όγκοι, σε σχέση με τα καρκινώματα, δεν επιτρέπει

την ανίχνευση όλων των κυτταρογενετικά ανώμαλων κλώνων, αφού κάποια κύτταρα δεν διαιρούνται αρκετά συχνά ώστε να έχουμε τη δυνατότητα να τα χαρακτηρίσουμε κυτταρογενετικά.

II) οι γενετικές αλλαγές στα διάφορα κύτταρα του καλοήθους όγκου μπορεί να μην γίνονται ταυτόχρονα, αλλά ορισμένες από αυτές να προηγούνται στην πορεία της νεοπλασματικής εξαλλαγής σε κάποια κύτταρα και με τη σειρά τους να προκαλούν ή να δημιουργούν το κατάλληλο περιβάλλον για άλλες επόμενες σε γειτονικά κύτταρα. Όσον αφορά τους διφασικούς όγκους η κυτταρογενετική πολυκλωνικότητα μπορεί να ερμηνευθεί και από ένα πρόσθετο λόγο: ως αποτέλεσμα των γενετικών ανακατατάξεων και των δύο φάσεων, τόσο της μεσεγχυματογενούς όσο και της επιθηλιακής.

6. Μη κλωνικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες.

Εκτός από τις κλωνικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες σε όλα τα περιστατικά της παρούσης μελέτης βρέθηκαν και μη κλωνικές χρωμοσωμικές ανακατατάξεις. Η παρουσία αυτών των ανωμαλιών έχει δύο πιθανές εξηγήσεις. Είτε πρόκειται πράγματι για κυτταρογενετικούς κλώνους μη ανιχνεύσιμους λόγω αδυναμίας καλλιέργειας και απομόνωσης των κυττάρων που φέρουν τις χρωμοσωμικές αλλαγές, είτε πρόκειται για κυτταρογενετικό θόρυβο σύμφωνα με τον ορισμό που ισχύει στα καρκινώματα του μαστού.

Από τις παραπάνω αναφερόμενες βιβλιογραφικές αναφορές και τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας είναι εμφανές ότι οι καλοήθεις όγκοι του μαστού παρουσιάζουν μη τυχαίες, επαναλαμβανόμενες χρωμοσωμικές ανακατατάξεις που ορισμένες από αυτές έχουν ήδη εντοπιστεί στα καρκινώματα υποδεικνύοντας έτσι κοινά γενετικά χαρακτηριστικά στις δύο αυτές διαφορετικές νεοπλασματικές οντότητες.

• Κυτταρογενετικές ανωμαλίες στους καλοήθεις φυλλοειδείς

Οι καλοήθεις φυλλοειδείς παρουσίασαν αναλογικά το μεγαλύτερο ποσοστό λήψης ανώμαλων καρυοτύπων σε σχέση με τις άλλες δύο κατηγορίες καλοήθων αλλοιώσεων που εξετάζονται στη παρούσα εργασία. Μία πιθανή εξήγηση για αυτή τη διαφορά μπορεί να είναι η καλύτερη προσαρμοστική ικανότητα των κυττάρων των φυλλοειδών όγκων στις καλλιεργητικές συνθήκες. Ο μικρός όμως αριθμός των δειγμάτων δεν επιτρέπει ασφαλή συμπεράσματα και δεν αποκλείει το γεγονός η μεγαλύτερη, αναλογικά, λήψη ανώμαλων καρυοτύπων να είναι και τυχαίο γεγονός.



Στη παρούσα εργασία ευρέθηκαν ελλείψεις χρωμοσωμικού υλικού στους καλοήθεις φυλλοειδείς και συγκεκριμένα ελλείψεις εντός του 3p και μονοσωμία του χρωμοσώματος 16. Οι ελλείψεις στο μικρό σκέλος του χρωμοσώματος 3 έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά σε μελέτες με CGH σε φυλλοειδείς όγκους από Lu et al¹⁵⁹ και κυτταρογενετικά από Dietrich et al¹⁵⁷. Επίσης ελλείμματα στο 3p έχουν βρεθεί σε ένα αμάρτωμα του μαστού¹⁹⁸ καθώς και σε ινοαδένωμα της παρούσης μελέτης. Η σημασία των ελλείψεων 3p συζητήθηκε παραπάνω. Σε εργασία της Dietrich¹⁵⁷ αναφέρεται και μονοσωμία του χρωμοσώματος 16 σε έναν κοντά στην τριπλοειδία πολύπλοκο καρυότυπο κακοήθους φυλλοειδούς όγκου. Μονοσωμία του χρωμοσώματος 16 δεν έχει ξανααναφερθεί σε καλοήγη φυλλοειδή ενώ έχει βρεθεί κυτταρογενετικά σε υπερπλασία και άτυπη υπερπλασία του μαστού από Burbano και συνεργάτες¹⁵⁴. Μελέτες με FISH αναφέρουν επίσης μονοσωμίες του χρωμοσώματος 16 σε καλοήθεις υπερπλασίες από Micale 1994¹⁸⁷. Το έλλειμμα στο χρωμοσωμικό βραχίονα 16q είναι ένα από τα αποτελέσματα της πρωτογενούς ανωμαλίας der(1;16)(q10;p10) που ανευρίσκεται συχνά στα καρκινώματα του μαστού. Μικρότερα ελλείμματα στο μικρό βραχίονα χρωμοσώματος 16 έχουν ανιχνευτεί τόσο με κυτταρογενετική ανάλυση όσο και με μοριακές μελέτες απώλειας της ετεροζυγωτίας. Τέτοιου είδους μελέτες (LOH) έχουν περιγράψει ελλείμματα στο 16q σε καρκινώματα του μαστού^{180,199}. Φαίνεται επομένως ότι το έλλειμμα μέρους ή ολοκλήρου του χρωμοσώματος 16 μπορεί να υποδείξει θέσεις υποψήφιων ογκοκατασταλτικών γονιδίων.

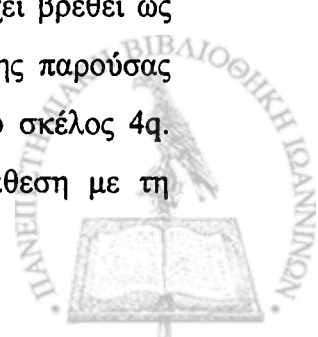
• **Κυτταρογενετικά ευρήματα στις καλοήθεις κυστικές αλλοιώσεις**

Από τα περιστατικά της παρούσης μελέτης μόνο 1 στα 8 δείγματα (12.5%) κυστικής νόσου χωρίς υπερπλασία παρουσιάστηκε κυτταρογενετικά ανώμαλο ενώ η συχνότητα των ανώμαλων υπερπλαστικών κυστικών αλλοιώσεων ήταν 75% (3 από τα 4 αναλυθέντα περιστατικά). Τέλος η περίπτωση θηλώματος και κυστικής νόσου με άτυπη υπερπλασία βρέθηκε κυτταρογενετικά ομαλή. Όμως ένα μοναδικό περιστατικό δεν μπορεί να οδηγήσει σε ασφαλή συμπεράσματα. Το γεγονός ότι οι υπερπλαστικές κυστικές αλλοιώσεις επιδεικνύουν πολύ μεγαλύτερα ποσοστά ανώμαλων καρυοτύπων σε σχέση με τις μη υπερπλαστικές (75% και 12.5% αντίστοιχα),

συνδέει τη παρουσία υπερπλασίας με αύξηση των κυτταρογενετικών αλλαγών και γενικότερα με γενετική αστάθεια. Από την άλλη πλευρά, η κυτταρογενετικά ανώμαλη περίπτωση κυστικής νόσου χωρίς υπερπλασία μπορεί να σημαίνει ότι οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες προηγούνται και επόμενο βήμα είναι η παρουσία υπερπλασίας.

Κυτταρογενετικές ανωμαλίες σε Κυστική Νόσο με υπερπλαστικές αλλοιώσεις έχουν αναφερθεί από την Petersson και συνεργάτες^{185,200}. Τα περιστατικά αυτών των μελετών (αν και λίγα για εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων) συμφωνούν με τη παρούσα διατριβή ότι η συχνότητα ανωμάτων περιστατικών είναι μικρότερη στις μη υπερπλαστικές κυστικές αλλοιώσεις. Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται επίσης σε συμφωνία με επιδημιολογικές μελέτες όπου στις απλές κυστικές αλλοιώσεις (χωρίς υπερπλασία) δεν φαίνεται να υπάρχει αυξημένος κίνδυνος μετέπειτα ανάπτυξης καρκίνου του μαστού⁸². Φαίνεται επομένως ότι υπάρχει παράλληλη πορεία ιστολογικής εικόνας, συχνότητας παρατηρούμενων κυτταρογενετικών ανωμαλιών και κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου του μαστού.

Σε δύο περιπτώσεις κυστικής νόσου εκ των οποίων ή μία με υπερπλασία, παρατηρήθηκαν δύο άσχετοι μεταξύ τους κλώνοι με παρόμοιες όμως ανωμαλίες για τις δύο περιπτώσεις. Η πολυκλωνικότητα, συζητήθηκε παραπάνω, έχει αναφερθεί και σε άλλες περιπτώσεις κυστικών αλλοιώσεων καθώς και ινοαδενωμάτων^{185,197,201} και είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα πολλών καρκινωμάτων του μαστού⁹¹. Η κοινή αριθμητική ανωμαλία των δύο παραπάνω περιστατικών ήταν τρισωμία του χρωμοσώματος 7 (η σημασία εύρεσης τρισωμίας 7 έχει ήδη αναφερθεί) ενώ οι δομικές ανακατατάξεις και των δύο περιστατικών περιλάμβαναν ισοζυγισμένες μεταθέσεις ανάμεσα στα χρωμοσωμικά σκέλη 1p και 3q σε διαφορετικά όμως σημεία θραύσης. Αυτά τα χρωμοσωμικά σκέλη έχουν βρεθεί ανακαταταγμένα σε αρκετές περιπτώσεις καλοήθων όγκων του μαστού. Ιδιαίτερα η χρωμοσωμική ζώνη 3p13 που συμμετείχε σε μία από τις προαναφερόμενες ισοζυγισμένες μεταθέσεις έχει βρεθεί σε ανακατάταξη με τη ζώνη 8p21¹⁹⁷ σε επιθηλιακή υπερπλασία μαστού από περιστατικό προφυλακτικής μαστεκτομής. Η ζώνη 3q21 έχει βρεθεί ως σημείο θραύσης σε χρωμοσωμική αναστροφή ινοαδενώματος της παρούσας μελέτης. Ανακατατάξεις παρουσιάστηκαν και στο χρωμοσωμικό σκέλος 4q. Συγκεκριμένα η ζώνη 4q27 συμμετείχε σε ισοζυγισμένη μετάθεση με τη



14q22. Η ίδια ζώνη έχει αναφερθεί ως σημείο θραύσης σε ισοζυγισμένη μετάθεση με τη 12q15 σε ινοαδένωμα¹⁵³.

Σε μία υπερπλαστική κυστική αλλοίωση βρέθηκαν μόνο ελλείψεις χρωμοσωμάτων και συγκεκριμένα μονοσωμία του χρωμοσώματος 1 που έχει αναφερθεί μόνο μία φορά σαν μοναδική ανωμαλία επιθηλιακής υπερπλασίας από Teixeira et al, 1996¹⁹⁷, μονοσωμία του χρωμοσώματος 3 που δεν έχει ξανααναφερθεί παρά μόνο σε ινοαδένωμα της παρούσης μελέτης καθώς και του χρωμοσώματος 18 που αποτελεί μία από τις συχνά παρατηρούμενες ελλείψεις στα καρκινώματα του μαστού²².

• **Κυτταρογενετικά ευρήματα στα ινοαδενώματα.**

Τα ινοαδενώματα παρουσίασαν μεγάλη ποικιλία κυτταρογενετικών ανωμαλιών γεγονός που μάλλον οφείλεται στο ότι ήταν και η πολυπληθέστερη ομάδα των εξεταζόμενων περιστατικών. Το μοναδικό ινοαδένωμα που συνυπήρχε με εστίες καλοήθους φυλλοειδούς ήταν κυτταρογενετικά ανώμαλο. Η συχνότητα κυτταρογενετικά ανώμαλων ινοαδενωμάτων (Πίνακας 5.1 II, σελίδα 55) ήταν μεγαλύτερη για αυτά που παρουσίαζαν υπερπλασία του επιθηλιακού στοιχείου (50%). Επομένως η συνύπαρξη χρωμοσωμικών ανωμαλιών και υπερπλασίας του επιθηλιακού στοιχείου εμφανίζεται και στα ινοαδενώματα εκτός από τις κυστικές αλλοιώσεις που εξετάστηκαν παραπάνω.

Ένα άλλο κοινό εύρημα και στις δύο ιστολογικές ομάδες (κυστικές αλλοιώσεις και ινοαδενώματα) με υπερπλασία, είναι η παρουσία μόνο μη ισοζυγισμένων ανακατατάξεων σε όλα τα ανώμαλα ινοαδενώματα και σε τρεις από τις τέσσερις κυστικές αλλοιώσεις. Θα πρέπει επομένως να θεωρηθεί πιθανός ο συσχετισμός υπερπλασίας και συγκεκριμένου είδους χρωμοσωμικών ανακατατάξεων (μη ισοζυγισμένες μεταθέσεις). Επιπρόσθετα το μοναδικό ινοαδένωμα (περίπτωση 127/97) που συνυπήρχε με άτυπη υπερπλασία και *in-situ* καρκίνωμα παρουσίασε και αυτό στο καρυότυπό του μη ισοζυγισμένη κυτταρογενετική ανακατάταξη και συγκεκριμένα έλλειψη του 1q. Η έλλειψη αυτή συζητείται διεξοδικότερα παρακάτω.

Ακολουθούσαν σε συχνότητα ανώμαλων καρυοτύπων τα ινοαδενώματα χωρίς ιδιαίτερο χαρακτηριστικό. Η συχνότητα ήταν 38% ίση περίπου με το συνολικό ποσοστό των ανώμαλων ινοαδενωμάτων.

Η μικρότερη συχνότητα ανωμαλιών εμφανιζόταν στα ινοαδενώματα που συνυπήρχαν με κυστική νόσο κάτι που μπορεί να θεωρηθεί συμπτωματικό.



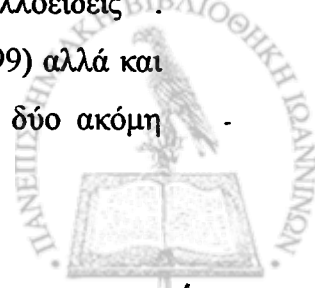
Οι κυριότερες ανωμαλίες που παρατηρήθηκαν στα ινοαδενώματα της παρούσης διατριβής μπορούν να ομαδοποιηθούν σε:

α) ισοζυγισμένες ανακατατάξεις. Οι ζώνες που συμμετέχουν σε αυτές βρίσκονταν κυρίως στα χρωμοσώματα 1, 3 και στα χρωμοσωμικά σκέλη 4p, 10q, 12q, 20q. Οι ζώνες 3p21 και 3p25 βρέθηκαν εμπλεκόμενες σε αναστροφή (82/96). Σημεία θραύσης στο 3p έχουν αναφερθεί και σε άλλα ινοαδενώματα^{186,202} ενώ οι ελλείψεις στο χρωμοσωμικό σκέλος 3p και η σημασία τους, έχουν ήδη αναφερθεί. Οι ζώνες 4p15.1 και 4p16 παρουσιάστηκαν σε ισοζυγισμένες μεταθέσεις με τα χρωμοσωμικά σκέλη 1q και το 12q στα περιστατικά 141/97 και 94/97 αντίστοιχα. Η ζώνη 12q15 που συμμετείχε στην ισοζυγισμένη μετάθεση με το 4p είναι συχνό σημείο θραύσης στους μεσεγγυματογενείς και τους διφασικούς όγκους και συσχετίζεται με το μεσεγγυματικό τους στοιχείο. Αναφορές υπάρχουν στα ινομύματα της μήτρας²⁰³, στα λιπώματα²⁰⁴, καθώς και στα ινοαδενώματα^{155,156,186,201}. Στη συγκεκριμένη ζώνη έχει ήδη χαρτογραφηθεί το γονίδιο *HMGIC*. Η ζώνη 10q23 που συμμετείχε σε ισοζυγισμένη μετάθεση με τη 20p12 (περίπτωση 95/97) δεν έχει ξαναβρεθεί ανακαταταγμένη σε καλοήγη περιστατικά του μαστού αν και ανακατατάξεις του 10q και του 20q αναφέρονται στα καρκινώματα⁹¹ όχι όμως ως συχνή χρωμοσωμική ανωμαλία.

β) μη ισοζυγισμένες ανακατατάξεις και ειδικότερα:

Ελλείμματα χρωμοσωμικού τμήματος ή χρωμοσώματος: Παρατηρήθηκαν συχνότερα στα χρωμοσώματα 3, 8, 10 και 1 είτε ως έλλειμα χρωμοσωμικού τμήματος είτε ως έλλειψη ολοκλήρου χρωμοσώματος. Στο χρωμόσωμα 3 παρατηρήθηκε και μονοσωμία αλλά και έλλειψη του 3p12p21 στα περιστατικά 69/97 και 94/97 αντίστοιχα. Ελλείμματα αυτής της χρωμοσωμικής περιοχής του 3p εκτός από τα καρκινώματα έχουν βρεθεί και σε όλους τους καλοήθεις όγκους όπως φυλλοειδείς (παρούσα μελέτη), κυστικές αλλοιώσεις, (παρούσα μελέτη και μελέτες των Dietrich et al²⁰¹, Petersson et al²⁰⁵) και σε ένα αμάρτωμα¹⁹⁸.

Το έλλειμμα στο χρωμοσωμικό σκέλος 1q που παρατηρήθηκε στη παρούσα μελέτη (127/97) έχει κοινά σημεία με ελλείμματα στην ίδια χρωμοσωμική περιοχή σε υπερπλασίες^{201,205} και καλοήθεις φυλλοειδείς¹⁸². Μονοσωμίες του χρωμοσώματος 17 σε σύνθετο καρυότυπο (115/99) αλλά και ελλείμματα των χρωμοσωμικών τμημάτων 17p13 και 17p11 σε δύο ακόμη



καρυότυπους (281/98 και 244/98 αντίστοιχα) αναφέρθηκαν σε αυτή την εργασία ως μοναδικές ανωμαλίες. Μονοσωμία του 17 έχει αναφερθεί σε ινοαδένωμα¹⁵⁶, κακοήγη φυλλειδή¹⁵⁷ όχι όμως σαν μοναδική ανωμαλία σε καμία από τις δύο αναφορές. Συχνή μονοσωμία του χρωμοσώματος 17 έχει αναφερθεί από Micale et al, 1994¹⁸⁷ σε μελέτη με FISH για υπερπλασίες του μαστού.

Σε δύο πολλαπλά ινοαδενώματα προερχόμενα από την ίδια ασθενή ευρέθησαν σύνθετοι καρυότυποι με κοινό εύρημα μονοσωμία του 8 και για τα δύο περιστατικά (74/99 και 75/99). Παρόμοια απώλεια ολοκλήρου του χρωμοσώματος δεν έχει αναφερθεί σε καλοήθεις όγκους του μαστού ούτε είναι συχνό εύρημα στα καρκινώματα. Σε CGH μελέτη ινοαδενωμάτων αναφέρεται έλλειψη της περιοχής 8q24.1-pter από Ojori et al, 2001¹⁶⁰. Παρόλο που η μονοσωμία 8 παρατηρήθηκε σε σύνθετους καρυότυπους η εύρεσή της δύο φορές στον ίδιο ασθενή πρέπει να προβληματίζει σχετικά με τη παθογενετική σημασία της.

Ινοαδενώματα με υπερδιπλοειδικό αριθμό χρωμοσωμάτων:

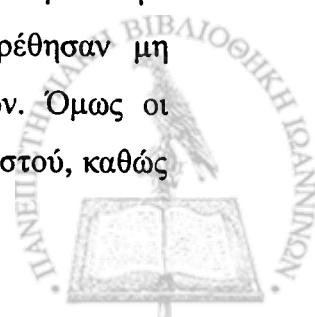
Πέντε ανώμαλα κυτταρογενετικά ινοαδενώματα (95/97, 141/98, 258/98, 298/98 και 73/99) αυτής της εργασίας παρουσίασαν μόνο αριθμητικές ανωμαλίες και συγκεκριμένα τρισωμίες. Τα πιο συχνά εμπλεκόμενα σε τρισωμίες χρωμοσώματα ήταν τα 5, 11, 20 που εμφανίστηκαν με ένα επιπλέον αντίγραφο είτε ως μοναδική ανωμαλία είτε σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα χρωμοσώματα σε 4 από τους 5 προαναφερόμενους καρυότυπους. Ακολουθούσε σε συχνότητα το χρωμόσωμα 18 που παρουσιάστηκε σε τρισωμίες 2 φορές. Από μία φορά παρατηρήθηκε επιπλέον χρωμοσωμικό αντίγραφο για τα χρωμοσώματα 7, 8, 10, 19. Τέτοιου είδους αριθμητικές αλλαγές έχουν αναφερθεί από Petersson al,¹⁸⁶; Fletcher et al,¹⁹⁴; Dietrich et al,²⁰²; Dal-Cin¹⁹⁷. Ιδιαίτερα για το χρωμόσωμα 18 έχει βρεθεί και τετρασωμία του ως μοναδική ανωμαλία σε δύο περιπτώσεις κυστικής νόσου από Staats et al, 1998¹⁵³. Η τρισωμία του χρωμοσώματος 20 θεωρείται πρώιμο γεγονός στην ανάπτυξη καρκίνου του μαστού^{91,124} και είναι μία από τις συχνότερες χρωμοσωμικές αριθμητικές ανωμαλίες, μαζί με το +18, σε αυτόν τον όγκο¹⁰⁰. Η τρισωμία του 7 που παρατηρήθηκε και σε περιπτώσεις κυστικής νόσου έχει ήδη συζητηθεί. Η πλειοψηφία των ανώμαλων καρυοτύπων αυτής της εργασίας είχε μόνο μικρές αποκλίσεις από τη διπλοειδία. Εξάιρεση αποτελούν οι

παραπάνω αναφερόμενοι καρυότυποι που είχαν έως και 52 χρωμοσώματα. Αυτά τα ινοαδενώματα μπορούν να θεωρηθούν ειδική κατηγορία από κυτταρογενετικής πλευράς. Χαρακτηριστικό τους γνώρισμα είναι οι μαζικές αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Στην παρούσα μελέτη τρία περιστατικά ινοαδενωμάτων παρουσίασαν περισσότερες από τρεις τρισωμίες και υπερδιπλοειδικό αριθμό. Η σειρά με την οποία αποκτήθηκαν τα επιπλέον χρωμοσωμικά αντίγραφα είναι δύσκολο να προσδιοριστεί αλλά σε ένα περιστατικό (141/98) που παρουσίασε κλωνική εξέλιξη φαίνεται ότι το χρωμόσωμα 20 προηγείται του 5. Επίσης σε άλλο από αυτά τα περιστατικά (95/97) παρατηρήθηκαν εκτός από τις αριθμητικές ανακατατάξεις και μία ισοζυγισμένη μετάθεση ανάμεσα σε δύο από τα χρωμοσώματα που υπήρχαν σε τρισωμία (10;20) που πιθανότατα προέκυψε ως αποτέλεσμα κλωνικής εξέλιξης. Αν προσθέσουμε σε αυτά τα περιστατικά και άλλες τρεις περιπτώσεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία²⁰⁶ ο συνολικός αριθμός των περιστατικών με υπερδιπλοειδία και τρισωμίες συγκεκριμένων χρωμοσωμάτων φτάνει τις 6 περιπτώσεις. Ένα κοινό χαρακτηριστικό αυτών των ινοαδενωμάτων είναι η συνήθως σχετικά μικρή ηλικία των ασθενών. Μόνο σε μία περίπτωση (258/98) της παρούσης μελέτης η ηλικία των ασθενών ήταν μεγαλύτερη από 35 ετών και συγκεκριμένα 49.

Όγκοι που αφαιρέθηκαν από παιδιά και παρουσίασαν αριθμητικές μόνο ανωμαλίες συνδέονται με χαμηλού ιστολογικού βαθμού κακοήθεια όπως ρινικοί πολύποδες, παιδικό ινοσάρκωμα κ.α²⁰⁶. Δεν είναι γνωστό αν αυτές οι αριθμητικές αλλαγές στα ινοαδενώματα σε συνδυασμό με τη μικρή ηλικία των ασθενών είναι ένδειξη μειωμένου ή όχι σχετικού κινδύνου περαιτέρω ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Το σίγουρο είναι ότι αυτή η ειδική κατηγορία ινοαδενωμάτων αποτελεί πιθανόν μία ξεχωριστή κυτταρογενετική οντότητα που έχει ενδιαφέρον να μελετηθεί διεξοδικότερα.

- **Συσχετισμός επιθηλιακού και μεσεγχυματικού στοιχείου με συγκεκριμένες χρωμοσωμικές ανωμαλίες**

Στην παρούσα εργασία δεν υπήρξε η δυνατότητα συσχετισμού μεσεγχυματικού και επιθηλιακού στοιχείου των διφασικών όγκων με συγκεκριμένο τύπο χρωμοσωμικών ανωμαλιών διότι δεν ευρέθησαν μη σχετιζόμενοι κλώνοι σε καρυότυπους αυτών των περιστατικών. Όμως οι ελλείψεις 1q και 3p που έχουν βρεθεί και σε καρκινώματα του μαστού, καθώς



και η δομική ανακατάταξη της ζώνης 12q15 συχνό εύρημα στους μεσεγγυματογενείς όγκους, δίνουν τη δυνατότητα της υπόθεσης ότι και το επιθηλιακό και το μεσεγγυματογενές στοιχείο του όγκου αντιπροσωπεύεται από αντίστοιχες κυτταρογενετικές αλλαγές. Η ύπαρξη νεοπλασματικών αλλαγών στο μεσεγγυματικό στοιχείο αυτών των όγκων έχει επιβεβαιωθεί με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους^{194,207}. Για την ύπαρξη ανωμαλιών του επιθηλιακού στοιχείου σοβαρές ενδείξεις υπάρχουν από εργασία της Dietrich et al, 1995²⁰¹ όπου φαίνεται ότι η τεχνική διαχωρισμού επιθηλιακού και μεσεγγυματογενούς στοιχείου σε διαφορετικές φιάλες κατά τη διάρκεια της κυτταροκαλλιέργειας επέτρεψε την ανίχνευση και διαφορετικών κυτταρογενετικών ευρημάτων ανά φιάλη. Αυτό το γεγονός ενισχύει περαιτέρω την άποψη ότι ορισμένες ανωμαλίες αφορούν το επιθήλιο των διφασικών όγκων.

6.2 Μοριακά κυτταρογενετικά ευρήματα

Η ύπαρξη επαναλαμβανόμενων μη τυχαίων χρωμοσωμικών ανωμαλιών στους καλοήθεις όγκους του μαστού που διαπιστώθηκε στη παρούσα εργασία αλλά και σε προηγούμενες, έθεσε το ερώτημα της ύπαρξης και αλλαγών στο γονιδιακό επίπεδο. Η εύρεση κοινών κυτταρογενετικών αλλαγών σε καρκινώματα και καλοήθεις αλλοιώσεις οδηγεί στην υπόθεση της ύπαρξης ανάλογων κοινών μεταβολών στο γονιδιακό επίπεδο. Στην προσπάθεια να διερευνηθεί η ύπαρξη τέτοιου είδους αλλαγών στις καλοήθεις αλλοιώσεις του μαστού, επιλέχθηκαν τρία από τα γνωστότερα και συχνότερα μεταλλαγμένα πρωτοογκογονίδια που ενέχονται στην καρκινογένεση του μαστού. Τα γονίδια αυτά ήταν τα *ERBB2*, *CCND1*, *MYC* και οι λόγοι για τους οποίους επιλέχθηκαν δίνονται συνοπτικά παρακάτω:

1. Μεταλλάξεις των ανωτέρω γονιδίων έχουν αναφερθεί σε μεγάλο ποσοστό των καρκινωμάτων του μαστού. Οι συνήθεις μεταλλαγές που έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά αφορούν γονιδιακή επέκταση της συγκεκριμένης χρωμοσωμικής θέσης και έχουν ανιχνευτεί με μοριακές και μοριακές κυτταρογενετικές τεχνικές. Συχνά επίσης αναφέρεται υπερέκφραση των αντίστοιχων γονιδιακών προϊόντων που έχει ανιχνευθεί με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας¹⁷⁴



2. Εκτός από τα διηθητικά καρκινώματα του μαστού η παρουσία τέτοιων μεταβολών έχει αναφερθεί σε πορογενή in-situ καρκινώματα. (DCIS)^{118,208,209} καθώς και σε μερικές περιπτώσεις καλοήθων περιστατικών^{173,177,179}.

3. Το γεγονός ότι και τα τρία προαναφερόμενα πρωτοογκογονίδια έχουν ρυθμιστικό ρόλο στον κυτταρικό κύκλο, τυχόν αλλαγές τους θεωρούνται πρώιμα στάδια της νεοπλασματικής διεργασίας. Στο συμπέρασμα αυτό καταλήγουν και πρόσφατες μελέτες που υποστηρίζουν ότι η γονιδιακή επέκταση καθώς και οι χρωμοσωμικές ανακατατάξεις προηγούνται της ανευπλοειδεΐας στα καρκινώματα του μαστού²⁰⁹.

4. Και τα τρία γονίδια θεωρείται ότι μπορούν να αποτελέσουν προγνωστικούς παράγοντες αν συσχετιστούν με άλλες παραμέτρους όπως ιστολογικό τύπο, θετικούς ορμονικούς υποδοχείς κ.ά.²¹⁰. Ιδιαίτερα το *ERBB2* αποτελεί πλέον εξέταση ρουτίνας που εφαρμόζεται στη κλινική πράξη και δίνει πληροφορίες για τα καρκινώματα του μαστού σχετικές με την πρόγνωση και την ανταπόκριση στη θεραπευτική αγωγή.

5. Οι εργασίες που αναφέρονται σε γονιδιακή επέκταση των παραπάνω γονιδίων στις καλοήθεις αλλοιώσεις του μαστού είναι λιγοστές (δεν ξεπερνούν τις 10) ενώ αυτές που χρησιμοποιούν ως μεθοδολογική προσέγγιση τη τεχνική FISH είναι ακόμη λιγότερες και δεν υπάρχει καμία που να συνδυάζει ταυτόχρονα στα ίδια δείγματα και τις δύο μεθοδολογικές προσεγγίσεις, την κυτταρογενετική και τη μοριακή κυτταρογενετική.

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη της γονιδιακής επέκτασης στα συγκεκριμένα ογκογονίδια ήταν η κλασσική in-situ φθορίζουσα υβριδοποίηση μεσοφασικών πυρήνων. Η φθορίζουσα υβριδοποίηση δίνει τη δυνατότητα να ανιχνεύσουμε τη γονιδιακή επέκταση σε υλικό βιοψίας σε κάθε νεοπλασματικό πυρήνα ξεχωριστά ενώ με μοριακές τεχνικές όπως Shouthern blotting και ποσοτικό PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης) παίρνουμε ένα μίγμα DNA που μπορεί να εμπεριέχει και μη νεοπλασματικά κύτταρα¹¹⁹.

• Εφαρμογή τεχνικής FISH

Η τεχνική εφαρμόστηκε επιτυχώς και για τα τρία γονίδια. Το ποσοστό επιτυχών περιστατικών ήταν μεγαλύτερο από 90% για το *ERBB2* και το *CCND1* ενώ, σημαντικά χαμηλότερο για το *MYC* (80%) λόγω του ότι η σήμανση ήταν μονοχρωματική (απουσίαζε η κεντρομεριδιακή σήμανση) με αποτέλεσμα την ανεπαρκή, πολλές φορές, εκτίμηση του σήματος για το γονίδιο. Προβλήματα στην



τεχνική μεθοδολογία παρουσιάστηκαν είτε γιατί κάποια περιστατικά δεν είχαν επαρκή αριθμό κυττάρων για μέτρηση του σήματος είτε γιατί σε κάποια άλλα η ανίχνευση γονιδιακής επέκτασης έγινε σε μονιμοποιημένο υλικό κυτταροκαλλιέργειας και όχι σε υλικό από block παραφίνης με αποτέλεσμα σήμα χαμηλότερης έντασης. Τα καλύτερα αποτελέσματα ως προς τη ποιότητα του σήματος προήλθαν από τη μελέτη του *ERBB2* πιθανόν λόγω του αντιδραστηρίου που χρησιμοποιήθηκε (Pathvysion-Vysis) το οποίο είναι εγκεκριμένο στις ΗΠΑ (FDA approved) για εφαρμογή στην κλινική πράξη στα καρκινώματα του μαστού. Η χρησιμοποίηση του kit σε ένα καρκίνωμα του μαστού που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας έδωσε, όπως ήταν αναμενόμενο, περισσότερα σήματα ανά πυρήνα και ανά περιστατικό.

Σύμφωνα με όσα γνωρίζουμε, δεν αναφέρεται βιβλιογραφικά κάποια άλλη μελέτη που να συνδυάζει τη γονιδιακή επέκταση και των τριών προαναφερόμενων γονιδίων σε καλοήθεις αλλοιώσεις του μαστού ώστε να έχουμε τη δυνατότητα σύγκρισης της τεχνικής μεθοδολογίας σε παρόμοιο υλικό.

• Γενετικά ευρήματα στα *ERBB2*, *CCND1*, *MYC*.

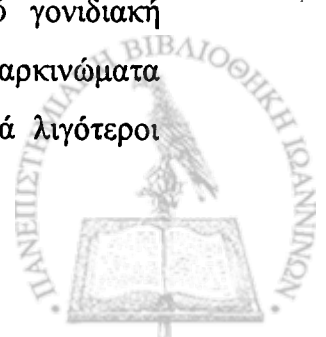
Γονιδιακή επέκταση του *ERBB2* σύμφωνα με τον αυστηρό ορισμό συνολικά σήματα ογκογονιδίου/κεντρομεριδίου >2 δεν ανιχνεύτηκε στα εξετασθέντα περιστατικά. Αναφορές από άλλους ερευνητές συμφωνούν για τη μη ύπαρξη γονιδιακής επέκτασης σε καλοήθεις όγκους αλλά οι αναφορές είτε περιλαμβάνουν πολύ μικρό αριθμό περιστατικών από κυστικές αλλοιώσεις²¹¹ είτε αναφέρονται σε εξειδικευμένη κατηγορία κυστικής νόσου όπως π.χ αποκρινική αδένωση¹⁷⁷. Παρόλη την απουσία γονιδιακής επέκτασης, δύο περιστατικά (ένα ανώμαλο και ένα ομαλό κυτταρογενετικά) έδειξαν μέσο λόγο σήματος *ERBB2*/κεντρομερίδιο 1.50 και 1.55 και λόγο γονιδίου/κεντρομερίδιο μεγαλύτερο από 2 σε ποσοστό 19% των μετρηθέντων κυττάρων. Αν και στα περιστατικά αυτά ο μέσος λόγος είναι σαφώς μικρότερος από 2 υπάρχει σημαντική απόκλιση από τον αρνητικό μάρτυρα καθώς και από όλα τα υπόλοιπα εξετασθέντα περιστατικά που ο μέσος λόγος γονιδίου/κεντρομερίδιο κυμάνθηκε από 0.90-1.35. Επομένως τα δύο αυτά ινοαδενώματα (5% του συνόλου) μπορούμε να θεωρήσουμε ότι εμφανίζουν γονιδιακή επέκταση στο 1/5 περίπου των μετρηθέντων πυρήνων τους. Δεδομένου ότι οι πυρήνες που ανήκαν στο 19% ήταν σε γειτονικές θέσεις στη τομή ή ακόμη και στο ίδιο μικροσκοπικό πεδίο μπορούμε να υποθέσουμε ότι αυτά τα ινοαδενώματα εμφάνισαν χαμηλού βαθμού γονιδιακή επέκταση σε συγκεκριμένες

περιοχές. Γονιδιακή επέκταση του *ERBB2* σε 1 από 32 ινοαδενώματα του μαστού έχει αναφερθεί από Stark et al,¹⁷⁶ που χρησιμοποίησε τη τεχνική του PCR σε block παραφίνης από υλικό αρχείου. Στην ίδια εργασία αναφέρεται και γονιδιακή επέκταση σε κυστικές αλλοιώσεις του μαστού.

Στη γονιδιακή θέση *CCND1* παρατηρήθηκε το μεγαλύτερο ποσοστό γονιδιακής επέκτασης αφού δύο ανώμαλα κυτταρογενετικά ινοαδενώματα ευρέθησαν με γονιδιακή επέκταση για το συγκεκριμένο γονίδιο (λόγοι >2) και ακόμη 7 ινοαδενώματα ευρέθησαν με οριακή γονιδιακή επέκταση (λόγοι μεταξύ 1.30-1.60) σύμφωνα με το σκεπτικό που αναλύθηκε προηγουμένως και για το γονίδιο *ERBB2*. Το ποσοστό όλων των περιστατικών που παρουσιάζουν μερική ή ολική γονιδιακή επέκταση στο γονίδιο της κυκλίνης D1 είναι το υψηλότερο από όλα τα εξεταζόμενα γονίδια και συμφωνεί με εργασία που αναφέρει ποσοστά γονιδιακής επέκτασης για το *CCND1*, 15%, 19%, 27% σε ομαλό ιστό, υπερπλαστικές αλλοιώσεις χωρίς ή με ατυπία αντίστοιχα¹⁸⁰. Από τα 9 περιστατικά που έδειξαν γονιδιακή επέκταση για το *CCND1*, τα 6 (67%) εμφάνισαν και κυτταρογενετικές ανωμαλίες. Παρόλο που φαίνεται ότι υπάρχει συσχέτιση κυτταρογενετικών και γενετικών ανωμαλιών, δυστυχώς ο μικρός αριθμός των περιστατικών δεν επιτρέπει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Γονιδιακή επέκταση για το *MYC* παρατηρήθηκε σε ένα από τα ινοαδενώματα. Το ινοαδένωμα αυτό παρουσίασε γονιδιακή επέκταση και για το *CCND1*, ήταν ανώμαλο κυτταρογενετικά και συνυπήρχε με κυστική νόσο του μαστού στις παρυφές καρκινώματος in-situ. Δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές σχετικές με γονιδιακή επέκταση στα ινοαδενώματα. Δύο μελέτες δεν κατάφεραν να ανιχνεύσουν γονιδιακή επέκταση στα ινοαδενώματα^{172,173} παρόλο που η δεύτερη από αυτές έδειξε γονιδιακή επέκταση για τη συγκεκριμένη γενετική θέση σε 5 εξετασθείσες υπερπλαστικές κυστικές αλλοιώσεις χωρίς ατυπία.

Η χρησιμοποίηση της τεχνικής υβριδοποίησης στην παρούσα εργασία έδωσε τη δυνατότητα ανίχνευσης γονιδιακών μεταβολών στους καλοήθεις όγκους του μαστού και για τα τρία ογκογονίδια. Συνολικά 11 από τις 40 (27.5%) καλοήθεις παθήσεις του μαστού εμφάνισαν σημαντικού βαθμού γονιδιακή επέκταση σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες. Σε σχέση με τα καρκινώματα το ποσοστό της γονιδιακής επέκτασης είναι μικρότερο (συνολικά λιγότεροι



πυρήνες με γονιδιακή επέκταση αλλά και λιγότερα σήματα ανά πυρήνα) γεγονός αναμενόμενο.

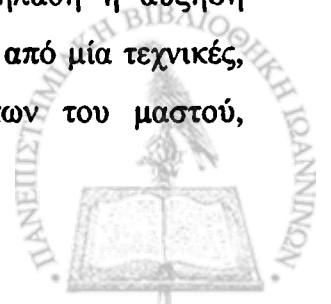
Το ποσοστό των ανώμαλων γονιδιακά περιστατικών είναι αρκετά χαμηλότερο από το αντίστοιχο ποσοστό των ανώμαλων κυτταρογενετικά καλοήθων όγκων αυτής της εργασίας (40%). Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται είτε σε μη σωστή προσαρμογή της τεχνικής στους καλοήθεις όγκους αφού η τεχνική FISH χρησιμοποιείται κυρίως στα καρκινώματα ή, το πιθανότερο, σε ύπαρξη των μελετηθέντων γονιδιακών μεταβολών μόνο σε μικρή μερίδα καλοήθων περιστατικών του μαστού.

Η συχνότητα εμφάνισης της γονιδιακής επέκτασης ήταν μεγαλύτερη για το *CCND1* σε σχέση με τα άλλα δύο ογκογονίδια. Το αποτέλεσμα αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το γονίδιο της κυκλίνης D1 ίσως παίζει πιο ουσιαστικό ρόλο από τα άλλα δύο στη νεοπλασματική διεργασία γενικά στους καλοήθεις όγκους και ειδικά στα ινοαδενώματα. Ανάλογα ευρήματα έχουν αναφερθεί σε πορογενή καρκινώματα *in-situ*¹⁴⁰.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μοριακής κυτταρογενετικής ανάλυσης φαίνεται ότι υπάρχουν και στο γονιδιακό επίπεδο στους καλοήθεις όγκους του μαστού ανάλογοι μηχανισμοί με τα καρκινώματα όπως φάνηκε προηγουμένως ότι ισχύει και στο χρωμοσωμικό επίπεδο. Οι γονιδιακές αυτές μεταβολές των καλοήθων όγκων είναι λιγότερο συχνές σε σχέση με ανάλογες μεταβολές στα καρκινώματα και το πιθανότερο είναι ότι αποτέλεσμά τους είναι, πιθανόν, όχι η κακοήθης εξαλλαγή αλλά η εκτροπή του κυττάρου από τη φυσιολογική πορεία του.

6.3 Συνδυασμός μοριακών και χρωμοσωμικών ευρημάτων

Ο αριθμός των κυτταρογενετικά ανώμαλων περιστατικών ήταν 28 και ο αριθμός των περιστατικών με μοριακές ανακατατάξεις 11. Από αυτά, 7 περιστατικά παρουσίασαν κυτταρογενετικές και μοριακές ανακατατάξεις ταυτόχρονα. Όμως 4 περιστατικά δεν αλληλοεπικαλύπτονταν, έτσι ώστε ο συνολικός αριθμός περιπτώσεων με γενετικές ανακατατάξεις ανεξαρτήτως κατηγορίας ήταν συνολικά 32 (47%). Το γεγονός αυτό, δηλαδή η αύξηση ανώμαλων περιστατικών, όταν χρησιμοποιούνται περισσότερες από μία τεχνικές, γνωστό άλλωστε από πολυάριθμες μελέτες κακοήθων όγκων του μαστού,



υπογραμμίζει για μία ακόμη φορά τα όρια των τεχνικών και τη διατυπωμένη ήδη άποψη ότι καμία τεχνική από μόνη της δεν αποδίδει πλήρως την πραγματική (in-vivo) κατάσταση. Είναι επομένως φανερό ότι πραγματικά σε βάθος μελέτη είναι απαραίτητος ο συνδυασμός περισσότερων για μία της μίας τεχνικών. Πράγματι πέραν της ανωτέρω βασικής διαπίστωσης, η συνδυαστική μελέτη των όγκων που περιλαμβάνονται στην παρούσα εργασία παρείχε ορισμένα επιπλέον αξιοσημείωτα στοιχεία που εκτίθενται κατωτέρω.

Οι συγκρίσεις μεταξύ των δύο αναλύσεων, κυτταρογενετικής και μοριακής κυτταρογενετικής όσον αφορά το σύνολο των ανωμάτων περιστατικών είναι εξαιρετικά δύσκολες, γιατί αφενός παρουσιάζουν τεχνικές δυσκολίες, αφετέρου η δεύτερη μειονεκτεί μεθοδολογικά έναντι της πρώτης από την άποψη ότι απαντά σε επιλεγμένα ερωτήματα και επομένως προσεγγίζει μερικά το θέμα.

Επομένως αν θεωρηθεί ως αντικειμενικό δεδομένο το γεγονός ότι από τα 11 δείγματα με γονιδιακή επέκταση μόνο τα 7 ευρέθησαν κυτταρογενετικά ανώμαλα, η υπόθεση που προκύπτει είναι ότι οι μοριακές αλλαγές σε αυτούς τους όγκους προηγούνται των χρωμοσωμικών ή στην ακραία περίπτωση είναι ταυτόχρονες. Η επισήμανση αυτή σημαίνει ότι οι μηχανισμοί των γενετικών ανακατατάξεων στους όγκους αυτούς είναι διαφορετικοί από τους αντίστοιχους των αιματολογικών νεοπλασιών και της πλειοψηφίας των μεσεγχυματογενών νεοπλασμάτων, όπου ένα υβριδικό γονίδιο είναι αποτέλεσμα μίας χρωμοσωμικής μετάθεσης π.χ BCR/ABL αποτέλεσμα της μετάθεσης (9;22)(q24;q11) στη χρόνια μυελογενή λευχαιμία, EWS/FLI1 αποτέλεσμα της μετάθεσης (11;22)(q24;q12) στα σαρκώματα του Ewing. Ήδη έχει διατυπωθεί η άποψη ότι τα καρκινώματα διέπονται από διαφορετικούς γενετικούς μηχανισμούς από αυτούς των αιματολογικών κακοηθειών²¹².

Ένα από τα ινοαδενώματα παρουσίασε ταυτόχρονες γονιδιακές μεταβολές για το *CCND1* και *MYC* κατά τη στιγμή της ανάλυσης. Ο όγκος αυτός ήταν κυτταρογενετικά ανώμαλος και παρουσίαζε έλλειψη του χρωμοσωμικού τμήματος 1q που είναι συχνό εύρημα στα καρκινώματα του μαστού. Επιπλέον το ινοαδένωμα αυτό συνυπήρχε με κυστική αλλοίωση με ατυπία και στις παρυφές τους εντοπίστηκε καρκίνωμα in-situ. Στο συγκεκριμένο περιστατικό παρουσιάζεται μία προοδευτική αλλαγή στην ιστολογική του εικόνα που ξεκινά από ένα μη κακοήγη όγκο (ινοαδένωμα), συνεχίζεται με μία αυξημένου κινδύνου για μετέπειτα κακοήθεια κυστική αλλοίωση και καταλήγει σε μία χαμηλού

βαθμού κακοήθεια. Η ιστολογική αυτή «εξέλιξη» συνοδεύεται από κυτταρογενετικές (del 1q) και γονιδιακές ανωμαλίες (gene amplification) συνήθεις για τα καρκινώματα του μαστού. Φαίνεται ότι στη συγκεκριμένη περίπτωση τα γενετικά και ιστολογικά δεδομένα βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία και επαληθεύουν την άποψη ότι η κακοήθεια επέρχεται με τη συσσώρευση πολλών γενετικών αλλαγών. Το αν αυτό ισχύει γενικότερα δεν μπορεί να απαντηθεί με την εξέταση ενός μόνο περιστατικού.

Γονιδιακή επέκταση παρουσιάστηκε και σε 4 ινοαδενώματα που είχαν ομαλό καρυότυπο. Τα ευρήματα αυτά μπορούν να ερμηνευτούν με δύο υποθέσεις: 1) είτε σε ορισμένες περιπτώσεις οι μοριακές αλλαγές προηγούνται, επομένως οι χρωμοσωμικές δεν υφίστανται σε αυτό το στάδιο εξέλιξης της ογκογένεσης. 2) προβλήματα στην in-vitro ανάπτυξη των κυττάρων προάγουν την ανάπτυξη ομαλών κυττάρων ενώ τα κύτταρα του όγκου δεν διαιρούνται οπότε δεν είναι εφικτή η ανίχνευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών.

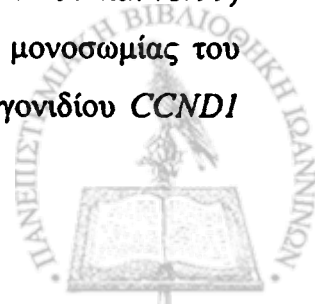
6.4 Πολλαπλά ινοαδενώματα

Μία ξεχωριστή κατηγορία περιστατικών σε αυτή την μελέτη ήταν οι πολλαπλοί καλοήθεις όγκοι στον ίδιο ασθενή (Πίνακας 5.21, σελίδα 60).

Στο υλικό που μελετήθηκε 22 από τα εξετασθέντα ινοαδενώματα προέρχονταν από 9 διαφορετικούς ασθενείς και βρίσκονταν ανά ομάδες δύο ή τριών ινοαδενωμάτων στον ίδιο μαστό είτε αμφοτερόπλευρα. Τα ινοαδενώματα αυτά δεν εμφάνισαν στη γενετική τους ανάλυση κάποιο ιδιαίτερο κυτταρογενετικό ή μοριακό χαρακτηριστικό που να τα διαφοροποιεί εμφανώς από τα μονήρη.

Είναι γνωστό ότι η παρουσία πολλαπλών ινοαδενωμάτων στον ίδιο μαστό είναι σχετικά συχνό φαινόμενο⁶⁰ και κάθε ινοαδένωμα θεωρείται παθολογοανατομικά ως ξεχωριστή ιστολογική οντότητα που αναπτύσσεται ανεξάρτητα σε διαφορετικά σημεία του ίδιου μαστού.

Τα δεδομένα αυτά σε συνδυασμό με ορισμένα κυτταρογενετικά και μοριακά ευρήματα προκαλούν ενδιαφέροντα ερωτήματα. Η μελέτη ενός ασθενούς με πολλαπλά ινοαδενώματα (αριθμοί περιστατικών: 74/99 και 75/99) αποκάλυψε το μεγάλου ενδιαφέροντος εύρημα μιας κοινής μονοσωμίας του χρωμοσώματος 8 και ταυτόχρονη γονιδιακή μεταβολή του γονιδίου CCND1



που βεβαίως δεν εδράζεται σε αυτό το χρωμόσωμα. Από τη στιγμή που οι όγκοι αυτοί είναι καλοήθεις και αποκλείεται η διασπορά των κυττάρων του όγκου, τι συμβαίνει και εντοπίζονται κύτταρα και στα δύο ινοαδενώματα με τις ίδιες γενετικές βλάβες; Αν και δεν μπορεί να αποκλειστεί η περίπτωση του τυχαίου, εν τούτοις με δεδομένη την μεταξύ των όγκων ετερογένεια των γενετικών ευρημάτων μπορεί κάποιος να υποθέσει ότι υπάρχει ένα είδος «προδιάθεσης» για την ανάπτυξη ίδιων ανωμαλιών. Παρόλο που είναι γνωστό ότι ο καρκίνος του μαστού¹⁰⁰ δεν παρουσιάζει ένα τόσο «γραμμικό» μοντέλο καρκινογένεσης όπως ο καρκίνος του παχέως εντέρου, εν τούτοις οι δευτερογενείς ανωμαλίες δεν είναι τυχαίες και φαίνεται ότι ορισμένες από αυτές είναι αλληλουχιακές¹⁰¹.

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεν αποκλείεται η αναφερθείσα προδιάθεση να είναι γενετική δηλαδή να υπάρχει κάποιο ή κάποια γονίδια που να προδιαθέτουν στην ανάπτυξη πολλαπλών όγκων με παρόμοια πρότυπα γενετικής εξέλιξης. Είναι γνωστό ότι πολλαπλά καρκινώματα του μαστού (αμφοτερόπλευροι όγκοι) είναι αποτέλεσμα κληρονομικής προδιάθεσης όπως το σύνδρομο «μαστού-ωοθήκης» με ενοχοποιηθέντα γονίδια τα *BRCA1* και *BRCA2*, αλλά και καλοήθεις όγκοι όπως ορισμένα πολλαπλά λειομυώματα της μήτρας είναι συστατικό στοιχείο του συνδρόμου πολλαπλών λειομυωμάτων του δέρματος στο οποίο έχει ήδη εντοπισθεί κληρονομική προδιάθεση.

Η αμέσως επόμενη περίπτωση μίας ασθενούς με δύο ινοαδενώματα στον ίδιο μαστό (94/97 και 95/97) εμφανίζει μία αντίθετη εικόνα από τα παραπάνω αναφερόμενα ευρήματα. Σε αυτήν την ασθενή υπήρχαν διαφορετικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες στο κάθε ινοαδένωμα και στο ένα ανιχνεύτηκε γονιδιακή επέκταση του *CCND1* ενώ στο άλλο όχι. Χωρίς κανείς να ξεχνά τα τεχνικά προβλήματα που έχουν ήδη συζητηθεί, δεν μπορεί να αποκλεισθεί και η περίπτωση της γενικότερης ετερογένειας των όγκων του μαστού που όχι μόνον έχει εντοπισθεί γενετικά μεταξύ διαφορετικών όγκων αλλά παρουσιάζεται και εντός του ίδιου όγκου κυρίως στα καρκινώματα του μαστού¹⁰⁵.

Για τους υπόλοιπους 4 ασθενείς με πολλαπλά ινοαδενώματα δεν είναι εφικτή η εξαγωγή συμπερασμάτων επειδή σε κάθε περίπτωση ο ένας τουλάχιστον καρυότυπος ήταν ομαλός.



Συμπερασματικά τα παραπάνω ευρήματα είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος και οδηγούν σε σημαντικές υποθέσεις, η αλήθεια όμως των οποίων μπορεί να επιβεβαιωθεί ή απορριφθεί με τη συγκέντρωση και άλλων ερευνητικών δεδομένων.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στη συγκέντρωση και μελέτη κυτταρογενετικών και γονιδιακών δεδομένων που αφορούν τις καλοήθεις παθήσεις του μαστού, στις μεταξύ τους συγκρίσεις καθώς και σε συγκρίσεις αυτών των δεδομένων με τα αντίστοιχα των καρκινωμάτων. Τα κυριότερα συμπεράσματα που συνάγονται από τα ευρήματα αυτά συνοψίζονται παρακάτω:

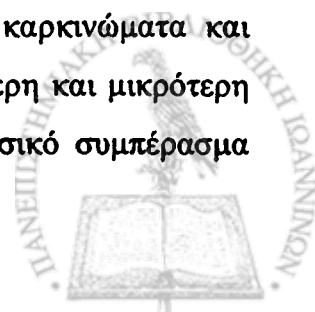
1. Οι καλοήθεις όγκοι του μαστού παρουσιάζουν αυξημένο αριθμό ομαλών καρυοτύπων σε σχέση με τα καρκινώματα που είτε αντανακλά μικρότερη μιτωτική δραστηριότητα *in-vivo* και *in-vitro* είτε ότι οι χρωμοσωμικές αλλαγές είναι ένα επόμενο βήμα, σε πολλές περιπτώσεις, το οποίο έπεται των μοριακών ανακατατάξεων.

2. Οι καλοήθεις όγκοι του μαστού παρουσιάζουν απλούστερα κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τα καρκινώματα. Παρατηρείται μικρότερος χρωμοσωμικός αριθμός, απλούστερες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, λιγότερες μη ισοζυγισμένες ανακατατάξεις και λιγότερα χρωμοσώματα δείκτες (markers). Επίσης υπάρχει πολυκλωνικότητα μη σχετιζόμενων κυτταρογενετικά κλώνων όμως σε λιγότερες περιπτώσεις από ότι στα καρκινώματα.

3. Στα ινοαδενώματα εμφανίζεται μία διακριτή κυτταρογενετική υποομάδα με μαζικές αριθμητικές κυρίως ανωμαλίες χωρίς προς το παρόν να είναι σαφής η συσχέτισή της με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους.

4. Οι καλοήθεις όγκοι του μαστού παρουσιάζουν σημαντικού βαθμού γονιδιακή επέκταση ορισμένων γονιδίων (*ERBB2*, *CCND1*, *MYC*) σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες. Τα γονίδια αυτά έχουν ήδη εντοπισθεί μεταλλαγμένα σε καρκινώματα του μαστού.

5. Η ανίχνευση κοινών μοριακών αλλαγών στα καρκινώματα και στους καλοήθεις όγκους του μαστού καθώς και η απλούστερη και μικρότερη εμφάνιση χρωμοσωμικών ανακατατάξεων οδηγούν στο βασικό συμπέρασμα



ότι η ογκογένεση των καρκινωμάτων είναι μία σταδιακή πορεία από την καλοήθεια στην κακοήθεια μέσω της αλληλουχίας διαδοχικών γεγονότων. Η ενδεδειγμένη γνώση αυτής πορείας θα οδηγήσει στην βαθύτερη κατανόηση του καρκίνου του μαστού και στην αποτελεσματικότερη αντιμετώπισή του.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι καλοήθεις παθήσεις του μαστού φαίνεται ότι συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού σύμφωνα με δεδομένα επιδημιολογικών κυρίως ερευνών. Επιπροσθέτως δεν είναι γνωστοί οι μηχανισμοί που επιτρέπουν τη μετάβαση από το ομαλό επιθήλιο στο καρκινικό κύτταρο.

Τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη της Ογκολογικής Γενετικής έχει προσφέρει αξιόλογες πληροφορίες για πολλά νεοπλάσματα μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται και τα καρκινώματα του μαστού. Οι υπάρχουσες γενετικές πληροφορίες που αφορούν τις καλοήθεις παθήσεις του μαστού είναι πενιχρές παρά την αναφερόμενη σχέση τους με τα καρκινώματα και τη σημασία που έχουν αυτά για τη νοσηρότητα του γυναικείου πληθυσμού από κακοήθεις νόσους.

Με σκοπό τη διερεύνηση των γενετικών ανακατατάξεων στους καλοήθεις όγκους και την πιθανή σύνδεση με τα καρκινώματα, 68 δείγματα καλοήθων παθήσεων μελετήθηκαν με κυτταρογενετική ανάλυση ενώ σε 40 από αυτά έγινε περαιτέρω ανίχνευση γονιδιακής επέκτασης για τα γονίδια *ERBB2*, *CCND1*, *MYC* με την τεχνική της φθορίζουσας in-situ υβριδοποίησης (FISH).

41% των κυτταρογενετικά αναλυθέντων δειγμάτων παρουσίασαν χρωμοσωμικές ανακατατάξεις. Στο 3% των περιπτώσεων παρατηρήθηκε κυτταρογενετική πολυκλωνικότητα. Σημαντικού βαθμού γονιδιακή επέκταση ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 27.5% των εξετασθέντων περιπτώσεων συνολικά και για τα τρία προαναφερθέντα ογκογονίδια, με μεγαλύτερη συχνότητα για το *CCND1*.

Η ερμηνεία και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι οι καλοήθεις παθήσεις του μαστού παρουσιάζουν κοινά, αν και απλούστερα, γενετικά χαρακτηριστικά με τα καρκινώματα του μαστού. Οι ομοιότητες των χρωμοσωμικών ανακατατάξεων και οι λιγότερες και απλούστερες αλλαγές του γονιδιώματος σε σχέση με τους κακοήθεις όγκους ενισχύουν την άποψη ότι η μετάβαση από τη καλοήθεια στην κακοήθεια είναι μία συνεχής δυναμική διεργασία για τα κύτταρα του μαστού.

Πότε και υπό ποιες συνθήκες το καλόηθες κύτταρο μετατρέπεται σε κακόηθες, παραμένει προς το παρόν αδιευκρίνιστο.



SUMMARY

Molecular and chromosomal rearrangements of Benign Breast Lesions

Benign Breast Lesions (BBL) seem to be correlated to increased risk for subsequent development of invasive breast cancer according, mainly, to epidemiological data. Additionally the genetic mechanisms that permit the transition from normal epithelium to cancer cell remain unknown.

The significant growth of Cancer Genetics in recent years has provided valuable information about many malignant neoplasms including breast carcinomas. The data concerning BBL, however, has been meager although benign tumors are closely related to malignant ones.

In order to detect genetic alterations in BBL and correlate the findings to those already obtained from breast carcinomas, 68 benign breast samples were cytogenetically analyzed while 40 of them were further investigated for the presence of gene amplification of *ERBB2*, *CCND1* and *MYC* by means of FISH analysis.

41% of the samples displayed clonal chromosome rearrangements whereas in 3% of them more than one cytogenetically abnormal clone was present. A significant level of amplification was detected in 27.5% of the examined cases, in total for all three oncogenes, *CCND1* being the most common one.

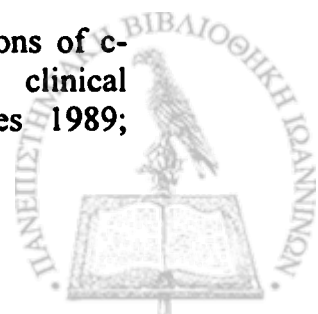
Evaluation of these results suggests that BBL and malignant breast tumors share common genetic features, although simpler in benign cases. Similarities observed in chromosome rearrangements and the less and simpler molecular changes in BBL compared to carcinomas, strength the belief that transition from benign to malignant breast cell is a continuous and potential process.

The conditions, under which a benign neoplasm of the breast is transformed to a malignant one, have yet to be determined.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

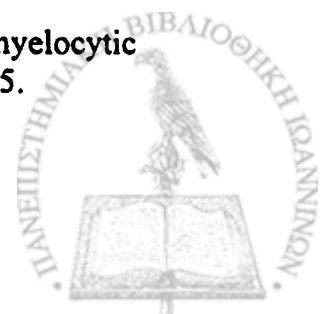
1. Breasted JH. The Edwin Smith Papyrus. University of Chicago Press 1970;pp 403-406.
2. Bryan GT. Manual of Clinical Oncology. Springer Verlag 6th ed. International Union Against Cancer. 1994;pp5-6.
3. Love RR. Manual of Clinical Oncology. Springer Verlag 6th ed. International Union Against Cancer. 1994;pp3-4.
4. von Hansemann D. Über asymmetrische Zellteilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung. Virchows Arch Pathol Anat 1890;119:299-234.
5. Boveri T. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Gustav Fisher Verlag Jena 1914.
6. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell population. Science 1976; 194:23-28.
7. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990;61:759-67.
8. Stein WD. Analysis of cancer incidence data on the basis of multistage and clonal growth models. Adv Cancer Res 1991;56:161-213.
9. Leong AS-Y, Leong FGW-M. What we need to know about cancer genes? Diagn Cytopathol 1998;18:33-40.
10. Robinson WS. Molecular events in the pathogenesis of hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma. Annu Rev Med 1994;45:297-323.
11. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature. 1973; 243:290-293.
12. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ et al. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. Science 1990;247:1079-1082.
13. Garcia I, Dietrich P-Y, Aapro M et al. Genetic Alterations of c-myc, c-erbB-2, and c-HA-ras protooncogenes and clinical associations in human breast carcinomas. Cancer Res 1989; 49:6675-5579.



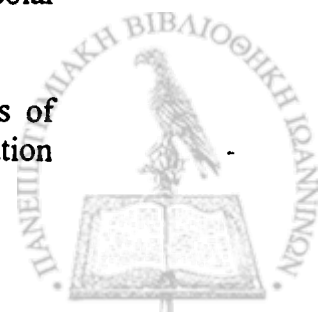
14. Borg A, Baldetorp B, Ferno M et al. ERBB2 amplification in breast cancer with a high rate of proliferation. *Oncogene* 1991;6:137-143.
15. Levine AJ, Mohamad J. Tumour suppressor genes; the p53 and retinoblastoma sensitivity gene and gene products. *Biochem Biophys Acta* 1990;132:119-136.
16. Knudson AG. Mutation and Cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971;68:820-823.
17. Agnantis NJ, Goussia AC. Apoptosis and Cancer (article in French). *Bull Acad Natl Med* 1999; 183(2):277-286.
18. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988; 335:440-442.
19. Kamb A. Cell cycle regulators and cancer. *Trends Genet.* 1995;11:136-140
20. Cordon-Cardo C. Mutation of cell cycle regulators. Biological and clinical implication for human neoplasia. *Am J Pathol* 1995; 147:545-560.
21. Zukerberg LR, Yang WI, Gadd M et al. Cyclin D1 (PRAD1) protein expression in breast cancer: approximately one-third of infiltrating mammary carcinomas show overexpression of the cyclin D1 oncogene. *Mod Pathol* 1995; 8:560-567.
22. Mitelman Data Base of Chromosome Aberrations. Mitelman F, Johansson B, Mertens F (eds) 2000 <http://cgap.nci.gov/Chromosomes/Mitelman>.
23. ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Mitelman F (ed). 1995 Basel: S Karger.
24. Mitelman F. Clustering of breakpoints to specific chromosomal regions in human neoplasia. A survey of 5.345 cases. *Hereditas* 1986; 104:113-119.
25. Heim S, Mitelman F. Nineteen of 26 cellular oncogenes precisely localized in the human genome map to one of 83 bands involved in primary cancer-specific rearrangements. *Hum Genet* 1987; 75:70-72.



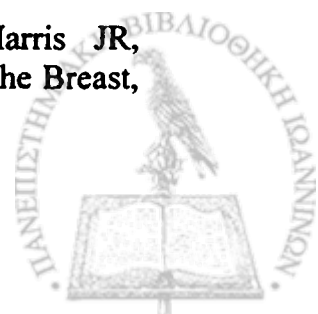
26. Mitelman F, Heim S. Consistent involvement of only 71 of the 329 chromosomal bands of the human genome in primary neoplasia associated rearrangements. *Cancer Res* 1988; 48:7115-19.
27. Mitelman F, Mertens F, Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nature Genetics* 1997; 15:4117-4174.
28. Zhang S, Zech L, Klein G. High-resolution analysis of chromosome markers in Burkitt lymphoma cell lines. *Int J Cancer* 1982; 29:153-157.
29. Hockenbery D, Nunez G, Millman C et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks cell death. *Nature* 1990; 348:334-6.
30. Yunis JJ, Ramsay N. Retinoblastoma and subband deletion of chromosome 13. *Am J Dis Child* 1978; 132:161-163.
31. Pandis N, Bardi G, Heim S. Interrelationship between Methodological Choices and Conceptual Models in Solid Tumor Cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 76:77-84.
32. Prakash O, Yunis JJ. High resolution chromosomes of the t(9;22) positive leukemias. *Cancer Genet Cytogenet* 1984; 11:361-7.
33. Daley GQ, Ben-Neriah Y. Implicating the bcr/abl gene in the pathogenesis of Philadelphia chromosome-positive human leukaemia. *Adv Cancer Res* 1991; 57:151-184.
34. Kurzrock R, Talpaz M. The molecular pathology of chronic myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1991; 79 Suppl 1:34-7.
35. Rowley JD. Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Ann Genet.* 1973; 16:109-112.
36. Nucifora G, Birn DJ, Erickson P et al. Detection of DNA rearrangements in the AML1 and ETO loci and of an AML1/ETO fusion mRNA in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia. *Blood* 1993; 81:883-8.
37. Rowley JD, Golomb HM, Dougherty C. 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukemia. *Lancet* 1977; i:549-550.
38. Grignani F, Fagioli M, Alcalay M et al. Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment. *Blood* 1994; 83:10-25.



39. Le Beau MM, Larson RA, Bitter MA et al. Association of an inversion of chromosome 16 with abnormal marrow eosinophils in acute myelomonocytic leukemia. A unique cytogenetic-clinicopathological association. *N Engl J Med* 1983; 309:360-6.
40. Claxton D, Xie QS, Patel S et al. The gene product of CBFB-MYH11. *Leukemia* 1996;10:1479-85.
41. Zech L, Haglund U, Nilsson K et al. Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 1976; 17:47-56.
42. Potter M. Pathogenetic mechanisms in B-cell non-Hodgkin's lymphomas in humans. *Cancer Res* 1992; 52:5222-8.
43. Croce CM. Molecular Biology of lymphomas. *Sem Oncol* 1993; 20:3-46.
44. Fukuhara S, Rowley JD, Vatiakojis D et al. Chromosome abnormalities in poorly differentiated lymphocytic lymphoma. *Cancer Res* 1979; 39:3119-3128.
45. Yunis JJ, Oken MM, Theologides A et al. Recurrent chromosomal defects are found in most patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1984; 13:17-28.
46. Aurias A, Rimbeaut C, Buffe D et al. Translocation du chromosome 22 dans le sarcome d'Ewing. *C R Seances Acad Sci III* 1983;296 :1105-7.
47. Turc-Carel C, Philip I, Berger MP et al. Translocation chromosomique (11;22) dans les lignees cellulaires de sarcomas d'Ewing. *C R Seances Acad Sci III* 1983; 296: 1101-3.
48. May WA, Gishizky ML, Lessnick SL et al. Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:5752-6.
49. Seidal T, Mark J, Hagmar B et al. Alveolar rhabdomyosarkoma: a cytogenetic and correlated cytological and histochemical study. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]* 1982; 90:345-354.
50. Barr FG, Galili N, Holick J et al. Rearrangements of the PAX3 paired box gene in the paediatric solid tumour alveolar rhabdomyosarkoma. *Nature Genet* 1993; 3:113-7.
51. Turc-Carel C, Limon J, Dal Cin P et al. Cytogenetic studies of adipose tissue tumors. II. Recurrent reciprocal translocation



- t(12;16)(q13;p11) in myxoid liposarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 23:291-9.
52. Aman P, Ron D, Mandahl N et al. Rearrangement of the transcription factor gene CHOP in myxoid liposarcomas with t(12;16)(q13;p11). *Genes Chrom Cancer* 1992; 5:278-85.
 53. Rabbits TH, Forster A, Larson R et al. Fusion of the dominant negative transcription regulator CHOP with a novel gene FUS by translocation t(12;16) in malignant liposarcoma. *Nature Genet* 1993; 4:175-180.
 54. Limon J, Dal Cin P, Sandberg AA. Translocations involving the X chromosome in solid tumors: presentation of two sarcomas with t(X;8)(q13;p11). *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 23:87-91.
 55. Clark J, Roques PJ, Crew AJ et al. Identification of novel genes, SYT and SSX, involved in the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcoma. *Nature Genet* 1994; 7:502-8.
 56. Croden J, Thliveris A, Samowitz W et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis gene. *Cell* 1991;66:587-600.
 57. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y et al. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 1991; 253:665-669.
 58. Fearon ER. Molecular studies of the adenoma-carcinoma sequence. *Adv Intern Med* 1994; 39:123-147.
 59. Hedrick L, Cho KR, Fearon ER, Hamilton SR et al. The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. *Genes Dev* 1994;8:1174-1183.
 60. Αγκάντη Ν.Ι. Ιστοπαθολογία των καλοήθων παθήσεων του μαστού. (Σύγχρονη Μαστολογία Λυδία Ιωαννίδου Μουζάκα) 1996 σελ.305-319.
 61. Love SM, Gelman RS, Silen W. Fibrocystic "disease" of the breast-a non-disease? *N Engl J med* 1982; 307:1010-1014.
 62. Καρκαβέλας Γ. Μαστός. Στοιχεία Ειδικής Παθολογίας και Παθολογικής Ανατομικής Εκδόσεις University Studio Press 1988 σελ. 495-515.
 63. Houlihan MG. Fibroadenoma and hamartoma. In:Harris JR, Morrow M, Lippman ME, Hellman S (eds) *Diseases of the Breast*, pp 45-48. Philadelphia: Lippincott-Raven 1996.



64. Sloane JP. In: Biopsy pathology of the breast 1985; pp 69-145.
65. Page DL, Salhany KE, Jensen RA, Dupont WD. Subsequent breast carcinoma risk after biopsy with atypia in breast papilloma. *Cancer* 1996; 78:258-266.
66. Petrek JA. Phyllodes tumors. In: Harris JR, Morrow M, Lippman ME, Hellman S (eds) *Diseases of the Breast*, Philadelphia: Lippincott-Raven 1996, pp863-869.
67. Marshall E. Search for a killer: focus shifts from fat to hormone. *Science* 1993;259:618-621.
68. Ioannidou-Mouzaka L, Mantonakis J, Toufexi H et al. [Is prolonged psychological stress an etiological factor in breast cancer?] *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 1986;5(8):1049-1053.
69. Edwards R. Gene links smoking to Breast cancer. *New Scientist* 1996; 152:4-5.
70. Hansen M, Marrow M. Breast Disease. *Med Clin North Am* 1998; 82:203-222.
71. Page DL, Dupont WD. Anatomic markers of human premalignancy and risk of breast cancer. *Cancer* 1990; 66:1326-1335.
72. Page DL, Dupont WD, Rogers LW et al. Continued local recurrence of carcinoma 15-25 years after a diagnosis of low-grade ductal carcinoma in situ of the breast treated only by biopsy. *Cancer* 1995; 76:1197-1200.
73. Rosen PP. Invasive mammary carcinoma. In: Harris JR, Morrow M, Lippman ME, Hellman S (eds). *Diseases of the Breast*, 1996; pp393-444. Philadelphia: Lippincott-Raven.
74. Ellis IO, Galea M. Broughton N et al. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 20:479-489.
75. Donegan WL. Tumor-related prognostic factors for breast cancer. *Cancer J Clin* 1997; 47:28-51.
76. Berg JW, Hutter RV. Breast Cancer. *Cancer* 1995; 75:257-269.
77. Elston CW, Ellis IO, Pinder SE. Pathological prognostic factors in invasive carcinoma of the breast. *Clin Oncol* 1998; 10:14-17.



78. ACS: National Comprehensive Cancer Network and the American Cancer Society; Breast cancer treatment guidelines for patients 2000 Version III.
79. Azzopardi GJ. Problems in breast Pathology.1979; Vol II. Ed. W.B Saunders CO., London-Philadelphia-Toronto pp. 92-103.
80. Αγνάντη Ν Ι. Ιστοπαθολογία της κυστικής νόσου & των άλλων κακοήθων παθήσεων του μαστού. Ελληνική Ακτινολογία 1987;18:126.
81. Karabela-Bouropoulou V, Liapi-Avgeri G, Iliopoulou E et al. Histological Findings in Breast tissue specimens from reduction mammoplasties. Pathol Res Pract 1994; 190(8): 792-798.
82. Consensus Statement by the Cancer Committee of the College of American Pathologists. Is "fibrocystic disease" of the breast precancerous? Arch Pathol Lab Med 1986; 110:171-173.
83. Page DL, Dupont WD. Benign breast diseases: Indicators of increased breast cancer risk. Cancer Detect Prev 1992; 16:93-97.
84. Agnantis NJ. Cystic disease and cancer of the breast. Bull Cons. Med Lab. 1986; 14:1-3.
85. Fechner R, Mills ST. Breast pathology-benign proliferation, atypias and in situ-carcinoma. ASCP Press, 1990.
86. Page DL, Anderson TJ, Johnson RL. Sarcomas of the Breast.1987; In: Diagnostic Histopathology of the Breast, 1st ed., DL Page Eds. Livingstone, Edinburgh, pp.335-353.
87. Pandis N, Heim S, Bardi G et al. Improved technique for short-term culture and cytogenetic analysis of human breast cancer. Genes Chromosomes Cancer 1992; 5:14-20.
88. Dairkee SH, Paulo EC, Traquina P et al. Partial enzymatic degradation of stroma allows enrichment and expansion of primary breast tumor cells. Cancer Res 1997; 57:1590-1596.
89. Dutrillaux B, Gerbault-Seureau M, Zafrani B. Characterization of chromosomal anomalies in human breast cancer. A comparison of 30 paradiplod cases with few chromosome changes. Cancer Genet Cytogenet 1990; 49:203-217.
90. Lu IJ, Xiao S, YanYS et al. Direct chromosome analysis of 50 primary breast carcinomas. Cancer Genet Cytogenet 1993; 69:91-99.



91. Pandis N, Jin Y, Gorunova L et al. Chromosome analysis of 97 primary breast carcinomas: identification of eight karyotypic subgroups. *Genes Chromosom and Cancer*, 1995; 12:173-185.
92. Pandis N, Yin Y, Limon J et al. Interstitial deletion of the short arm of chromosome 3 as a primary chromosome abnormality in carcinomas of the breast. *Genes Chromosom and Cancer* 1993; 6:151-155.
93. Pandis N, Teixeira MR, Gerdes AM et al. Chromosomes abnormalities in bilateral breast carcinomas. Cytogenetic evaluation of the clonal origin of multiple primary tumors. *Cancer* 1995; 76:250-258.
94. Teixeira MR, Pandis N, Bardi et al. Discrimination between multicentric and multifocal breast carcinoma by cytogenetic investigation of microscopically distinct ipsilateral lesions. *Genes Chromosom and Cancer* 1997; 18:170-174.
95. Adeyinka A, Mertens F, Idvall I et al. Different patterns of chromosomal imbalances in metastasising and non-metastasising primary breast carcinomas. *Int J Cancer* 1999; 84:370-375.
96. Pandis N, Heim S, Bardi G et al. Whole-arm t(1;16) and i(1q) as sole anomalies identify gain of 1q as a primary chromosomal abnormality in breast cancer. *Genes Chromosom and Cancer* 1992; 5:235-238.
97. Bullerdiek J, Leuschner E, Taquia E et al. Trisomy 8 as a recurrent clonal abnormality in breast cancer? *Cancer Genet Cytogenet* 1993; 65:64-67.
98. Afify A, Bland KI, Mark HFL. Fluorescent in situ Hybridization of chromosome 8 copy number in breast cancer. *Breast Cancer Reas Treat* 1996; 238:201-208.
99. Bullerdiek J, Bonk U, Staats B et al. Trisomy 18 as the first chromosome abnormality in a medullary carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 73:75-78.
100. Teixeira MR, Pandis N and Heim S. Cytogenetic Clues to breast carcinogenesis. *Genes Chromosom and Cancer* 2002; 33(1): 1-16.
101. Tsarouha H, Pandis N, Bardi G et al. Karyotypic evolution in breast carcinomas with i(1)(q10) and der(1;16)(q10;p10) as the primary chromosome abnormality. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 113:156-161.



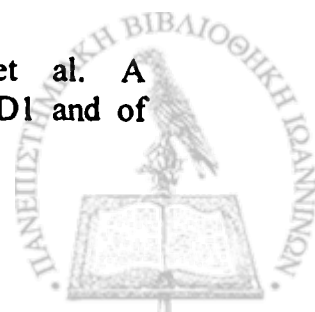
102. Pandis N, Idvall I, Bardi G et al. Correlation between karyotypic pattern and clinicopathologic features in 125 breast cancer cases. *Int J Cancer* 1996; 66:191-196.
103. Teixeira MR, Pandis N, Bardi G et al. Karyotypic comparisons of multiple tumorous and macroscopically normal surrounding samples from patients with breast cancer. *Cancer Res* 1996b; 56:855-859.
104. Heim S, Teixeira MR, Dietrich CU et al. Cytogenetic polyclonality in tumors of the breast. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 95:16-19.
105. Teixeira MR, Pandis N, Bardi G et al. Cytogenetic analysis of multifocal breast carcinomas: detection of unrelated clones as well as clonal similarities between tumour foci. *Br J Cancer* 1994; 70:922-927.
106. Teixeira MR, Pandis N, Bardi G et al. Clonal heterogeneity in breast cancer: karyotypic comparisons of multiple intra- and extra-tumorous samples from 3 patients. *Int J Cancer* 1995; 63:63-68.
107. Zafrani B, Gerbault-Sereau M, Mosseri V et al. Cytogenetic Study of breast cancer: clinicopathologic significance of homogeneously staining regions in 84 patients. *Hum Pathol* 1992; 23: 542-547.
108. Saint-Ruf C, Gerbault-Sereau M, Viegas-Pequignot E et al. Proto-oncogene amplification and homogeneously staining regions in human breast carcinomas. *Genes Chromosom Cancer* 1990; 2:18-26.
109. Bernardino J, Apiou F, Gerbault-Seureau M et al. Characterization of recurrent homogeneously staining regions in 72 breast carcinomas. *Genes Chrom Cancer* 1998; 23: 100-108.
110. Gerbault-Seureau M, Vielh P, Dutrillaux B. Recurrent hsr in the centromeric region of chromosome 8 in breast cancer. *Ann Genet* 1987; 30:146-151.
111. Dutrillaux B, Gerbault-Seureau M, Zafrani B. Characterization of chromosomal anomalies in human breast cancer. A comparison of 30 paradiplod cases with few chromosomal changes. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; 49:203-217.
112. Kallionemi O-P, Kallionemi A, Piper J et al. Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by Comparative Genomic Hybridization. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 2156-2160.



113. Kleive K, Lothe RA, Heim S et al. Genome Profiling of Breast Cancer Cells Selected Against in vitro Reveals Multiple Abnormalities. (In press).
114. Adeyinka A, Kytola S, Mertens F et al. Spectral Karyotyping and Chromosome Studies of primary breast carcinomas and their lymph node metastasis. *Int J of Molec Med* 2000; 5:235-240.
115. Escot C, Theillet C, Lidereau R et al. Genetic alterations of the c-myc oncogene in human breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:4834-4838.
116. Nass SJ, Dickson RB. Defining a role for c-myc in breast tumorigenesis. *Breast Cancer Res Treat* 1997; 44:1-22.
117. Walker RA, Jones JL, Chappell S et al. Molecular Pathology of breast cancer and its application to clinical management. *Cancer Metast Rev* 1997; 16:5-27.
118. Watson PH, Safneck JR, Lee K et al. Relationship of c-myc amplification to progression of breast cancer from in situ to invasive tumor and lymph node metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:902-907.
119. Visscher DW, Wallis T, Awussah S et al. Evaluation of MYC and chromosome 8 copy number in breast carcinoma by interphase cytogenetics. *Genes Chrom Cancer* 1997; 18:1-7.
120. Beckmann MW, Niederacher D, Schnurh HG et al. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumor heterogeneity. *J Mol Med* 1997; 75:429-439.
121. Varley JM, Swallow JE, Brammar WJ et al. Alterations to either erb-B-2 (neu) or c-myc protooncogenes correlate with poor short-term prognosis. *Oncogene* 1987; 1:423-430.
122. Watson PH, Singh R, Hole AK. Influence of c-myc on the progression of human breast cancer. *Cur Top Microbiol Immunol* 1996; 213:267-283.
123. Hortobagyi GN, Khayat D. Targeting progress: The development of growth factor receptor-directed therapy. *Semin Oncol* 2000; 5(9): 1-2.
124. Bieche I, Lidereau R. Genetic alterations in breast cancer. *Genes Chrom Cancer* 1995; 14:227-251.
125. Radice P, Pierotti MA. Molecular Genetics of breast cancer. *Q J Nucl. Med* 1997; 41:189-199.



126. Borrensens A-L, Ottestad L, Gaustad A et al. Amplification and protein over-expression of the neu/HER-2 protooncogene in human breast carcinomas: relationship to loss of gene sequences on chromosome 17, family history and prognosis. *Br J Cancer* 1990; 62:585-590.
127. American Society of Clinical Oncology (ASCO). Clinical Practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14:2843-2877.
128. Slamon DJ, Clark SJ, Wong W et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987; 235:177-182.
129. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA et al. Studies of the HER-2/neu Proto-oncogene in Human Breast and Ovarian Cancer. *Science* 1989; 244:707-712.
130. Gullick WJ. The role of the epidermal growth factor receptor and the c-erbB-2 protein in breast cancer. *Int J Cancer* 1990; 5(supl): 55-61.
131. Seshadri R, Firgaira FA, Horsfall DJ et al. Clinical significance of Her-2 oncogene amplification in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1993; 11:1136-1142.
132. Shepard HM, Lewis GD, Sarup GC et al. Monoclonal antibody therapy of human cancer: taking the HER2 protooncogene to the clinic. *J Clin Immunol* 1991; 11:117-127.
133. Carter P, Presta L, Gorman CM et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:4285-4289.
134. Colbreigh MA, Vogel CL, Tripathy D et al. Multinational Study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2 overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999; 17:2639-2648.
135. Gillet C, Fantl V, Smith R et al. Amplification and overexpression of cyclin D1 in breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res* 1994; 54:1812-1817.
136. Landberg G, Roos G. The cell cycle in breast cancer. *APMIS* 1997; 105:575-589.
137. Michalides R, Hageman H, van Tinteren H et al. A clinicopathological study on overexpression of cyclin D1 and of

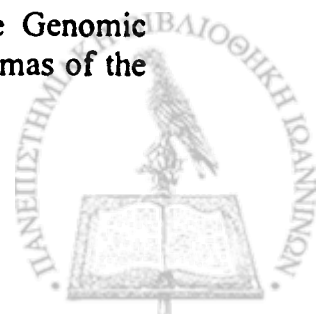


p53 in a series of 248 patients with operable breast cancer. Br J Cancer 1996; 73:728-734.

138. Weinstat-Saslow D, Merino MJ, Manrow JA et al. Overexpression of cyclin D mRNA distinguishes invasive and in situ breast carcinomas from non-malignant lesions. *Nature Med* 1995; 1:1257-1260.
139. Bartkova J, Lucas J, Muller H et al. Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *Int J Cancer* 1994;57:353-361.
140. Fische M, Avet-Loiseau H, Maugard CM et al. Gene amplification detected by fluorescence in situ hybridization in pure intraductal breast carcinomas: Relation to morphology, cell proliferation and expression of breast cancer-related genes. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 2000; 89:403-410.
141. Courjal F, Cuny M, Sinony-Lafontaine J et al. Mapping of DNA amplifications at 15 chromosomal localizations in 1875 breast tumor : definition of phenotypic groups. *Cancer Res* 1997; 57:4360-4367.
142. Courjal F, Theillet C. Comparative Genomic Hybridization analysis of breast tumors with predetermined profiles of DNA amplification. *Cancer Res* 1997; 57:4368-4377.
143. Chang F, Syrjanen S, Syrjanen K. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical Oncology. *J Clin Oncol* 1995;13:1009-1022.
144. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M et al. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54:4855-4878.
145. Kok K, Naylor SL, Buys CH. Deletions of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes. *Adv Cancer Res* 1997; 71:27-92.
146. Lindblom A. Familial breast cancer and genes involved in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 34:171-183.
147. Ford D, Easton DF. The genetics of breast and ovarian cancer. *Br J Cancer* 1995; 72:805-812.
148. Miki Y, Shattuck-Eidens D, Futreal PA et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266:66-71.



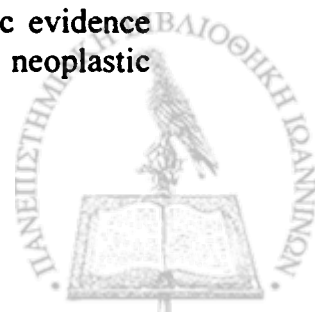
149. Wooster R, Bignell G, Lancaster J et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995; 378:789-792.
150. Hakansson S, Johansson O, Johansson U et al. Moderate frequency of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutation in Scandinavian familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 1997;60:1068-1078.
151. Antoniou AC, Pharoah PD, McMullan et al. Evidence for further breast cancer susceptibility genes in addition to BRCA1 and BRCA2 in a population study. *Genet Epidemiol* 2001; 21(1): 1-18.
152. Lundin C and Mertens F. Cytogenetics of benign breast lesions. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 51:1-15.
153. Staats B, Bonk U, Gohla G et al. Two cases of fibrocystic breast disease with polysomy 18 as sole clonal cytogenetic abnormality. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 103(2): 91-94.
154. Burbano RR, Medeiros A, de Amorim MI et al. Cytogenetics of epithelial hyperplasias of the human breast. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 119(1): 62-66.
155. Calabrese G, Di Virgilio C, Cianchetti E et al. Chromosome abnormalities in breast fibroadenomas. *Genes chromosomes Cancer* 1991; 3:202-204.
156. Ozisik YY, Meloni AM, Stephenson CF et al. Chromosome abnormalities in breast fibroadenomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 77:125-128.
157. Dietrich CU, Pandis N, Rizou H et al. Cytogenetic findings in phyllodes tumors of the breast: Karyotypic complexity differentiates between malignant and benign tumors. *Hum Pathol* 1997; 28:1379-1382.
158. Lu Y-J, Birdshall S, Osin P et al. Phyllodes tumors of the breast analysed by Comparative Genomic Hybridization and association of increased 1q copy number with stromal overgrowth and recurrence. *Genes chromosomes Cancer* 1997; 20:275-281.
159. Ried T, Just KE, Holtgreve-Grez H et al. Comparative Genomic Hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumors reveals different patterns of chromosomal gains and losses in fibroadenomas and aneuploid carcinomas. *Cancer Res* 1995; 55:5415-5423.
160. Ojopi EP, Rogatto Sr, Caldeira JR et al. Comparative Genomic Hybridization detects novel amplifications in fibroadenomas of the breast. *Genes chromosomes Cancer* 2001; 30(1): 25-31.



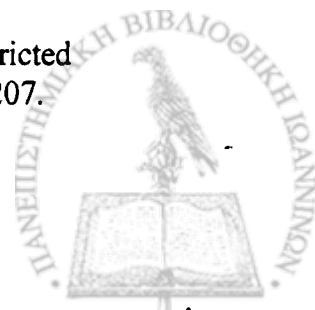
161. Aubele M, Cummings M, Walsch A et al. Heterogeneous chromosomal aberrations in intraductal breast lesions adjacent to invasive carcinoma.
162. Tibiletti MG, Sessa F, Bernasconi B et al. A large 6q deletion is a common cytogenetic alteration in fibroadenomas, pre-malignant lesions, and carcinomas of the breast. *Clin Cancer Res* 2000; 6(4): 1422-143.
163. Jones C, Damiani S, Wells D et al. Molecular Cytogenetic Comparison of apocrine hyperplasia and apocrine carcinoma of the breast. *Am J Pathol* 2001; 158(1):107-214.
164. Visscher DW, Wallis TL, Crissman JD. Evaluation of chromosome aneuploidy in tissue sections of preinvasive breast carcinomas using interphase cytogenetics. *Cancer* 1996 ; 77:315-320.
165. Tsukamoto F, Miyoshi Y, Koyama H et al. Detection of chromosomal Aneusomy by fluorescence in situ hybridization in fine-needle aspirates from breast tumors: application to the preoperative diagnosis of breast carcinoma. *Cancer* 2000; 90(6):373-378.
166. Komoike Y, Motomura K, Inaji H et al. Diagnosis of Ductal Carcinoma in situ (DCIS) and Intraductal Papilloma using Fluorescence in situ Hybridization (FISH) analysis. *Breast Cancer* 2000; 30;7(4):332-336.
167. Sneige N, Sahin A, Din H et al. Interphase cytogenetics in mammographically detected breast lesions. *Hum Pathol* 1996; 27:330-335.
168. Cummings MC, Aubele M, Mattis A et al. Increasing chromosome 1 copy number parallels histological progression in breast carcinogenesis. *Br J Cancer* 2000;82(6):1204-1210.
169. Agnantis NJ, Mahera H, Maounis N et al. Immunohistochemical study of ras and myc oncogenes in apocrine breast lesions with and without papillomatosis. *Eur J Gynaecol Oncol* 1992;13(4):309-315.
170. Papamichalis G, Francia K, Karachaliou FE et al. Expression of the c-myc oncoprotein in human metaplastic epithelial cells of fibrocystic disease. *Anticancer Res* 1988; 1217-1222.
171. Spandidos DA, Pintzas A, Kakkanas A et al. Elevated expression of the myc gene in human malignant breast lesions compared to normal tissue. *Anticancer Res* 1987; 7:1299-1304.



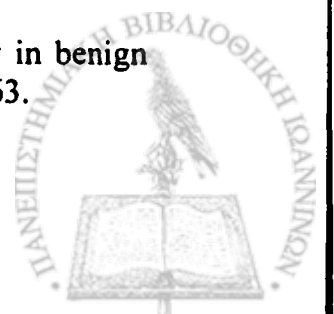
172. Lizard-Nacol S, Lidereau R, Collin F et al. Benign Breast disease: absence of genetic alterations at several loci implicated in breast cancer malignancy. *Cancer Res* 1995; 55:4416-4419.
173. Rao JY, Apple SK, Jin Y et al. Comparative Polymerase Chain Reaction analysis of c-myc amplification on archival breast fine-needle aspiration materials. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9(2): 175-179.
174. Ioachim EE, Malamou-Mitsi V, Kamina SA et al. Immunohistochemical expression of Bcl-2 protein in breast lesions: correlation with Bax, p53, Rb, C-erbB-2, EGFR and proliferation indices. *Anticancer Res* 2000; 20(6B): 4221-4225.
175. Coene ED, Schelfhout V, Winkler RA et al. Amplification units and translocation at chromosome 17q and c-erbB-2 expression in benign and malignant breast disease. *Virchows Arch* 1997; 430:365-372.
176. Stark A, Hulka BS, Joens S et al. HER-2/neu amplification in benign breast disease and the risk of subsequent breast cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18(2):267-274.
177. Selim AG, El-Ayat G, Wells CA. c-erbB2 oncoprotein expression, gene amplification, and chromosome 17 aneusomy in apocrine adenosis of the breast. *J Pathol* 2000; 191(2): 138-142.
178. Kandel R, Zhu XL, Li SQ et al. Cyclin D1 and gene amplification in benign breast tissue and breast cancer risk. *Eur J Cancer* 2001; 10(1):43-51.
179. Zhu XL, Hartwick W, Rohan T et al. Cyclin D1 Gene Amplification and Protein Expression in Benign Breast Disease and Breast Carcinoma. *Mod Pathol* 1998; 11(11):1082-1088.
180. Amari M, Suzuki A, Moriya T et al. LOH analyses of premalignant and malignant lesions of human breast: frequent LOH in 8p, 16q, 17q in atypical ductal hyperplasia. *Oncol Rep* 1999; 6(6):1277-1284.
181. McCulloch RK, Seliner LN, Papadimitriou JM et al. The incidence of microsatellite instability and loss of heterozygosity in fibroadenomas of the breast. *Breast Cancer Research Treatment* 1998; 49:165-168.
182. Dietrich CU, Pandis N, Andersen JA, Heim S. Chromosome abnormalities in adenolipomas of the breast: Karyotypic evidence that the mesenchymal component constitutes the neoplastic parenchyma. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 72:146-150.



183. Mandahl N. Methods in solid tumour cytogenetics. In Rooney DE, Czepulkowski BH (ed), Human Cytogenetics: A practical Approach, Vol II, Malignancy and Acquired Abnormalities, 2nd ed 1992;pp155-187. Oxford:IRL press.
184. Pauletti G, Godolphin W, Press MF et al. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene* 1996; 13:63-72
185. Petersson C, Johansson B, Pandis N et al. Clonal chromosome aberrations in fibrocystic breast disease associated with increased risk of cancer. *Int J Oncology* 1994; 5:1207-1210.
186. Petersson C, Pandis N, Rizou H et al. Karyotypic Abnormalities in Fibroadenomas of the breast. *Int J Cancer* 1997; 70:282-286.
187. Micale MA, Visscher WD, Gulino SE et al. Chromosomal aneuploid in proliferative breast disease. *Hum Pathol* 1994; 25:29-35.
188. Devilee P van den Broek M, Dijkshoorn N et al. At least for different chromosomal regions are involved in loss of heterozygosity in human breast carcinoma. *Genomics* 1989; 5:554-560.
189. Buchagen DL, Qiu L and Etkind P. Homozygous deletion, rearrangement and hypermethylation implicate chromosome region 3p14.3-3p21.3 in sporadic breast cancer development. *Int J Cancer* 1994; 57:473-479.
190. Negrini M, Monaco C, Vorechovski I et al. The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in breast carcinomas. *Cancer Res* 1996; 56:3173-79.
191. Panagopoulos I, Pandis N, Thelin S. The FHIT and PTPRG genes are deleted in benign proliferative breast disease associated with familial breast cancer and cytogenetic rearrangements of chromosomes band 3p14. *Cancer Research* 1996; 56:4871-4875.
192. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC et al. Mutations in p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 1989; 342:705-708.
193. Milikan R, Hulka B, Thor A et al. P53 mutations in benign breast tissue. *J Clin Oncol* 1995; 13:3293-3300.
194. Fletcher JA, Pincus GS, Weidner N et al. Lineage restricted clonality in biphasic tumors. *Amer J Pathol* 1991; 138:1199-1207.



195. Hoglund M, Gisselsson D, Mandahl N et al. Multivariate analysis of genomic imbalances in solid tumors reveal distinct and converging pathways of karyotypic evolution. *Genes Chromosomes & Cancer* 2001; 31:156-171.
196. Heim S, Teixeira M, Pandis N. Cytogenetic Approaches to Breast Cancer in *Breast Cancer*, ed. Bowcock, Humana Press, New Jersey 1999 pp373.
197. Teixeira MR, Pandis N, Gerdes A-M et al. Cytogenetic abnormalities in an in situ ductal carcinoma and five prophylactically removed breasts from members of a family with hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 38:177-182.
198. Dietrich CU, Pandis N, Bardi G et al. Rearrangement of chromosomal band 3p13-14 in two hamartomas of the breast. *Int J Oncol* 1995; 6:559-561.
199. Cleton-Jansen AM, Moerland EW, Kuipers-Dijkshoorn NJ et al. At least two different regions are involved in allelic imbalance on chromosome arm 16q in breast cancer. *Genes Chromosom Cancer* 1994;9:101-107.
200. Petersson C, Mertens F, Rizou H et al. Cytogenetic Changes in Benign Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Breast. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 107:118-120.
201. Dietrich CU, Pandis N, Teixeira MR et al. Chromosome abnormalities in benign hyperproliferative disorders of epithelial and stromal Breast tissue. *Inr J Cancer* 1995; 60:49-53.
202. Stephenson CF, Davis RA, Moore GE et al. Cytogenetic and fluorescence in situ hybridization analysis of breast fibroadenomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 63:32-36.
203. Nilbert M, Heim S. Uterine leiomyoma cytogenetics. *Genes Chromosomes Cancer* 1990; 2:3-13.
204. Mandahl N, Hoglund M, Mertens F. Cytogenetic aberrations in 188 benign and borderline adipose tissue tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; 9:207-215.
205. Petersson C, Pandis N, Mertens F et al. Chromosome aberrations in prophylactic mastectomies from women belonging to breast cancer families. *Genes Chromosomes & Cancer* 1996; 16:185-188.
206. Dal-Cin P, Pauwels P, Moerman P et al. Hyperdiploidy in benign breast lesions. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 101:162-163.



207. Belda F, Lester S, Pinkus GS et al. Lineage restricted chromosome translocation in a benign fibrous tumor of the breast. *Hum Pathol* 1993; 24:923-927.
208. Maquire HC, Jr Hellman ME, Greene M et al. Expression of c-erbB-2 in in-situ and in adjacent invasive ductal adenocarcinoma of the female breast. *Pathobiology* 1992; 60:177-181.
209. Rennstam K, Baldetorp B, Kytola S et al. Chromosomal rearrangements and oncogene amplification in the genetic evolution of breast cancer. *Cancer Research* 2001; 61:1214-1219.
210. Goussia A, Agnantis NJ, Athanassiadou S et al. Prognostic significance of c-erbB-2 and hormone receptors status in human benign and malignant breast lesions. *Anticancer Res* 1995; 15(5B): 2313-18.
211. Moore JG, To V, Patel SJ et al. Her-2/neu Gene Amplification in Breast Imprint Cytology analysed by FISH: Direct Comparison with companion tissue sections. *Diagnostic Cytopathology* 2000; 23(5):299-301.
212. Johansson B, Mertens F, Mitelman F. Primary vs. Secondary Neoplasia Associated Chromosomal Abnormalities - Balanced Rearrangements vs. Genomic Imbalances? *Genes Chrom & Cancer* 1996; 16:155-163.

